

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE PARATUBERCULOSIS (*Mycobacterium avium*
subespecie *paratuberculosis*) Y TUBERCULOSIS BOVINA (Complejo *Mycobacterium*
tuberculosis) POR PCR EN MUESTRAS DE SANGRE DE BOVINOS

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA

PRESENTA

ALBA PARK DE LA TORRIENTE

ASESORES:

GILBERTO CHÁVEZ GRIS

EDITH MALDONADO CASTRO

México D.F.

2015



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

AGRADECIMIENTOS

Agradecimientos al financiamiento del proyecto PAPIIT-UNAM: IT225211.

A mis asesores, la M en C Edith Maldonado y el Doctor Gilberto, por la paciencia y la atención que siempre han tenido hacia mi, por enseñarme y apoyarme durante este periodo; también por su amistad y por todos los momentos divertidos.

Al Doctor Jorge Hernández y el Doctor José Luis Torres del IFC, quienes fueron parte esencial en esta tesis. Gracias por el tiempo, esfuerzo y recursos que me dedicaron; por compartir sus conocimientos y experiencias conmigo.

A los compañeros y amigos que ayudaron a realizar este trabajo: Vicky, Diana, Jorge, Julio, Rodrigo; por dedicar parte de su valioso tiempo a revisar y discutir asuntos que fueron de gran ayuda para lograr este trabajo.

A todo el personal de la USEDICO – CEIEPAA, por siempre estar dispuestos a ayudar, de una u otra manera, a los estudiantes; y por ser parte de un armonioso grupo de trabajo.

A los miembros de mi jurado, porque sus aportaciones ayudaron a mejorar este trabajo. La experiencia de cada uno fue útil para que en conjunto se lograra esta tesis.

DEDICATORIA

A mis papás, por apoyarme siempre y asegurarse de que nunca me hiciera falta nada. La conclusión de mis estudios profesionales es gracias a su apoyo incondicional.

A mi hermana, por ser una amiga incondicional con quien siempre puedo confiar, por apoyarme y enseñarme tantas cosas.

A mis amigas, porque crecimos juntas y aprendimos tantas cosas en el camino, por siempre hacerme feliz y por inspirarme a ser cada vez mejor; cada vez más como ustedes.

A mis amigos de la facultad, porque la magia de la mejor carrera del mundo se potencializó cuando los conocí; por agregarle diversión a cada día de la licenciatura.

A Pato, por ser mi mejor amigo y mi mejor maestro; por apoyarme y soportarme durante tanto tiempo y por estar conmigo cada vez que lo necesitaba.

| | | |
|------------|--|-----------|
| 1 | Resumen | 6 |
| 2 | Introducción | 7 |
| 2.1 | Micobacterias | 7 |
| 2.2 | Paratuberculosis | 8 |
| 2.2.1 | Problema económico | 8 |
| 2.2.2 | Enfermedad de Crohn | 9 |
| 2.2.3 | <i>Mycobacterium avium</i> subespecie <i>paratuberculosis</i> (MAP) | 11 |
| 2.2.4 | Patogenia | 11 |
| 2.2.5 | Situación mundial actual | 14 |
| 2.2.6 | Control de la paratuberculosis | 16 |
| 2.2.7 | Diagnóstico | 17 |
| 2.3 | Tuberculosis bovina | 26 |
| 2.3.1 | Problema económico | 28 |
| 2.3.2 | Situación mundial actual | 28 |
| 2.3.3 | Campaña nacional de control y erradicación de la tuberculosis bovina y situación zoonositaria en México | 30 |
| 2.3.4 | Patogenia | 32 |
| 2.3.5 | Diagnóstico | 35 |
| 3 | Justificación | 46 |
| 4 | Hipótesis | 47 |
| 5 | Objetivo general | 47 |
| 6 | Objetivos específicos | 48 |
| 7 | Material y Métodos | 49 |
| 7.1 | Diseño del estudio | 49 |
| 7.2 | Muestras clínicas | 49 |
| 7.2.1 | Hatos de estudio | 49 |
| 7.2.2 | Tamaño mínimo de muestra para demostrar la presencia de las enfermedades | 50 |
| 7.2.3 | Preparación de muestras y extracción de DNA | 51 |
| 7.3 | Detección de Map por PCR IS900 | 52 |

| | | |
|------------|---|-----------|
| 7.3.1 | Testigos | 52 |
| 7.3.2 | Iniciadores y condiciones de la PCR | 54 |
| 7.3.3 | Concentración mínima detectable | 54 |
| 7.4 | Detección del CMt por PCR IS6110 | 55 |
| 7.4.1 | Testigos | 55 |
| 7.4.2 | Iniciadores y condiciones de la PCR | 56 |
| 7.4.3 | Concentración mínima detectable | 56 |
| 7.5 | PCR multiplex..... | 57 |
| 7.5.1 | Testigos | 58 |
| 7.5.2 | Iniciadores y condiciones de la PCR | 58 |
| 7.5.3 | Concentración mínima detectable | 58 |
| 7.6 | Diferenciación entre <i>M. bovis</i> y <i>M. tuberculosis</i> mediante PCR RD9 | 59 |
| 7.7 | Interpretación de resultados..... | 60 |
| 8 | Resultados | 62 |
| 8.1 | Diagnóstico de paratuberculosis por PCR IS900 | 62 |
| 8.2 | Diagnóstico de tuberculosis bovina por PCR IS6110 | 63 |
| 8.3 | PCR multiplex..... | 64 |
| 8.4 | Diagnóstico por PCR multiplex | 65 |
| 8.5 | Concentración mínima detectable | 67 |
| 8.6 | PCR RD9 | 70 |
| 9 | Discusión | 70 |
| 10 | Conclusiones..... | 80 |
| 11 | Referencias | 82 |
| 12 | Apéndice 1 | 94 |
| 13 | Apéndice 2 | 95 |
| 14 | Apéndice 3 | 96 |
| 15 | Apéndice 4 | 97 |

1 Resumen

La paratuberculosis, provocada por *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* (MAP) y la tuberculosis bovina, provocada por el Complejo *Mycobacterium tuberculosis* (CMt) son enfermedades cuya importancia radica principalmente en el impacto económico que ocasionan en el sector agropecuario y en el potencial zoonótico que tienen. Un diagnóstico preciso de ambas micobacteriosis es uno de los puntos de mayor importancia para su control. La alta semejanza genética entre estas dos micobacterias ha dificultado el diagnóstico, dando lugar a falsos positivos. La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) ha demostrado ser una herramienta útil para el diagnóstico debido a que es una prueba práctica, sensible y específica. Hasta este momento, no se ha informado el desarrollo de una PCR multiplex para el diagnóstico antemortem de estas dos micobacteriosis. El presente trabajo pretende desarrollar un protocolo de PCR para la detección de la presencia de MAP y de bacterias del CMt a partir de muestras de sangre, para lo cual se tomaron 120 muestras sanguíneas de bovinos pertenecientes a tres hatos. Las muestras fueron procesadas mediante tres protocolos distintos de PCR; el primero y segundo se basan en la amplificación de fragmentos de las secuencias de inserción IS900 e IS6110 de MAP y del CMt, respectivamente. El tercer ensayo constó de una PCR multiplex para el diagnóstico simultáneo de ambas micobacterias. Los resultados de los ensayos fueron comparados mediante estadística descriptiva. De las 120 muestras clínicas colectadas, el 0.83% (1 bovino) fue detectado como positivo a la presencia de MAP mediante PCR IS900, mientras que el 4.16% (5 bovinos), fue detectado como positivo a la presencia del CMt mediante PCR IS6110. El 0.83% (1 bovino) fue detectado como positivo a la presencia de MAP mediante PCR multiplex. La diferencia en los resultados obtenidos es posible que se deba a que en la PCR multiplex se buscó una alta especificidad al determinar las secuencias a amplificar, por lo que en consecuencia, se obtuvo una menor sensibilidad. En contraste, las secuencias de inserción IS900 e IS6110 son fragmentos genéticos altamente conservados y que además se repiten dentro del genoma de las micobacterias de interés, lo cual le da al ensayo una mayor sensibilidad. Este ensayo demuestra que la técnica de PCR es capaz de detectar la presencia de micobacterias en muestras sanguíneas de bovinos, por lo que puede servir como examen diagnóstico confirmatorio y complementario a otras pruebas, pero también destaca la necesidad de mejorar la sensibilidad de la prueba sin sacrificar la especificidad que pueda tener.

2 Introducción

2.1 Micobacterias

Las micobacterias pertenecen al orden *Actinomycetales* y a la familia *Mycobacteriaceae*. El género *Mycobacterium* incluye al complejo *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. canettii*, *M. bovis*, *M. pinipedii*, *M. caprae* y *M. microti*) y al complejo *Mycobacterium avium* (*M. avium* subsp. *avium*, *M. avium* subsp. *hominissuis*, *M. avium* subsp. *paratuberculosis* y *M. intracellulare*), además de otras micobacterias patógenas para el hombre que no pertenecen a los complejos mencionados, como *M. leprae* y numerosas micobacterias saprófitas (Olsen *et al.*, 2010).

Las micobacterias son bacilos de aproximadamente 0.6 x 1.0 x 1.0 µm, aerobios obligados, inmóviles y que no forman esporas. Poseen una pared celular rica en ácidos micólicos que les confiere la característica de ser ácido alcohol resistentes; es decir, que con la tinción de Ziehl-Neelsen, son resistentes a la decoloración inclusive con solventes ácidos o con alcoholes. El desarrollo de los cultivos de micobacterias se considera lento, pues el periodo generacional de estos microorganismos varía entre 2 y 20 horas. De tal manera que estas bacterias pueden ser clasificadas como micobacterias de lento crecimiento, cuando forman colonias visibles después de siete días en medios sólidos; o de rápido crecimiento cuando éstas tardan menos de siete días. Muchas micobacterias atípicas son organismos inocuos para los humanos y animales domésticos, sin embargo, existen algunas especies de interés por provocar enfermedades crónicas en los animales o por ser zoonóticas, como las que ocasionan la paratuberculosis y la tuberculosis bovina (Kazda, 2009).

2.2 Paratuberculosis

La paratuberculosis o enfermedad de Johne es un padecimiento crónico e infeccioso del aparato digestivo de los rumiantes causado por *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* (MAP). La enfermedad de Johne fue descrita formalmente por primera vez en Dresden, Alemania en el año de 1895 por Johne y Frothingham, pero fue hasta 1910 que Trowt logró aislar a la bacteria y reproducir la enfermedad en animales infectados experimentalmente, cumpliendo así los postulados de Koch (Manning y Collins, 2010). A inicios del siglo XX, la enfermedad de Johne comenzó a ser cada vez más frecuente en Dinamarca, Francia, Noruega, Reino Unido, Estados Unidos de América, Bélgica y Suiza. Desde entonces, la enfermedad ha continuado diseminándose a través de todo el mundo en los hatos y rebaños de rumiantes (Bakerma *et al.*, 2010).

2.2.1 Problema económico

La importancia de la paratuberculosis radica principalmente en las pérdidas económicas que es capaz de producir en el sector agropecuario. El problema financiero que implica una alta prevalencia de MAP en el hato es fácilmente subestimado, ya que las pérdidas económicas que causa no son percibidas como gastos directos del productor, sino que el impacto económico radica en lo que deja de ganar por la disminución en la producción; causada por una pobre conversión alimenticia, baja eficiencia reproductiva, menor peso en la matanza de los animales de desecho, desecho prematuro e incremento en la incidencia de mastitis (Johnson-Ifearulundu *et al.*, 1999; Vidic *et al.*, 2013).

Miranda Bandera (2005) calculó pérdidas de \$9,116 pesos o \$564 dólares por vaca al año, en un hato de Tizayuca, Hidalgo con una seroprevalencia del 24.1%. En este estudio

se menciona que las mayores pérdidas calculadas fueron por fallas reproductivas, así como por la disminución en la producción láctea la cual, en hatos con una seroprevalencia mayor al 20%, puede ser de hasta 53.79%. Existen otros estudios que también informan una diferencia significativa entre la producción láctea de bovinos positivos a MAP y aquellos libres del microorganismo. En uno de ellos, se concluyó que hay una disminución desde 4% y hasta el 20% en la producción de leche en animales que son positivos a MAP mediante cultivo bacteriológico a partir de heces, en comparación con aquellos que resultan negativos dentro del mismo hato (Lombard, 2011). Adicionalmente, Lombard *et al.* (2005) concluyeron mediante un estudio longitudinal con 7,879 bovinos lecheros diagnosticados mediante el ensayo de inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA), que aquellos animales fuertemente seropositivos a MAP (punto de corte mayor al resultado de un coeficiente de 3.5) tienen mayores probabilidades de ser enviados a matanza. Las pérdidas económicas también son considerables en el ganado cárnico donde la disminución de peso y los signos clínicos son motivo de castigo de precio, sin mencionar las pérdidas por tratamientos médicos ineficaces y aumento en la mortalidad. Se ha documentado que aquellos bovinos positivos a MAP pesan entre 30 y 54 kg menos al sacrificio, que aquellos libres del microorganismo (Johnson-Ifearegulu *et al.*, 1999).

2.2.2 Enfermedad de Crohn

Otra razón por la que se le debe dar importancia a la enfermedad de Johne y a MAP es el potencial zoonótico que tiene, pues se ha sugerido que MAP puede ser el causante de la enfermedad de Crohn (EC), una enfermedad inflamatoria del intestino de los humanos en la que el signo clínico principal es diarrea crónica intermitente usualmente acompañada de hemorragia, fiebre, dolor abdominal, anorexia y pérdida de peso (Chacon *et al.*, 2004). La EC, junto con la colitis ulcerativa crónica idiopática, componen a la enfermedad

inflamatoria intestinal (EII). Ésta es considerada una enfermedad de los países desarrollados, pues es en el norte de Europa y Estados Unidos donde mayor prevalencia e incidencia se reportan. En México, hasta hace algunos años se consideraba una enfermedad rara, no obstante, su incidencia se duplicó entre los años de 2004 y 2008, según un estudio epidemiológico realizado en el Noreste de México (Bosques-Padilla *et al.*, 2011). Otros países latinoamericanos en vías de desarrollo como Brasil y Puerto Rico han mostrado también un incremento considerable en la incidencia de EC (Souza *et al.*, 2002; Appleyard *et al.*, 2004). Las semejanzas entre las lesiones patológicas en humanos con EC y animales con paratuberculosis, la correlación de las crecientes incidencias de paratuberculosis y la EC en zonas geográficas y periodos determinados, y el alto porcentaje de pacientes con EC que logran ser diagnosticados por diferentes métodos con la presencia de MAP, dan una fuerte evidencia de la relación entre esta micobacteria y la EC. No obstante, la EC sigue siendo considerada una enfermedad con etiología multifactorial, no se considera a MAP como el agente causal único debido a la imposibilidad de aislar al microorganismo de todos los pacientes con EC (Retamal *et al.*, 2011) y porque además se ha aislado a MAP de personas sanas (Park *et al.*, 2014). Favila-Humara *et al.* (2011), demostraron que la hibridización *in situ* es capaz de detectar a MAP en pacientes con EC de los cuales no fue posible el aislamiento bacteriológico, debido a que existen formas de la micobacteria deficientes de pared celular, las cuales son difíciles de cultivar en el laboratorio y cuyo desarrollo es extremadamente lento (Chiodini *et al.*, 1986). Es posible que la transmisión de MAP a los humanos se dé mediante el consumo de productos lácteos, pues se ha demostrado la presencia del microorganismo mediante PCR y aislamiento bacteriológico en muestras de leche cruda y pasteurizada (Corti y Stephan, 2002; Grant *et al.*, 2002). Estos hallazgos sugieren que el control de la enfermedad de Johne debe hacerse de forma más estricta, pues la capacidad de MAP de sobrevivir a la pasteurización de alta temperatura/corto lapso o

HTST (por las siglas en inglés High Temperature/Short time), indica que hay una alta posibilidad de infección. Además de la EC, se ha asociado a la infección de MAP con otras enfermedades en humanos de origen autoinmune y de gran impacto como la diabetes Mellitus tipo I (Rosu *et al.*, 2009), así como la enfermedad de Parkinson (Dow, 2014).

2.2.3 *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* (MAP)

MAP es un bacilo corto, ácido-alcohol resistente, inmóvil y con una pared celular gruesa y rica en ácidos grasos. Es considerado un patógeno intracelular facultativo. A diferencia de otras micobacterias, MAP es incapaz de producir micobactina: un agente quelante de hierro, esencial para su replicación. Por esta característica, MAP es considerado un parásito obligado de células de mamífero y su desarrollo *in vitro* requiere de la adición de este agente al medio de cultivo (Olsen *et al.*, 2010). En compensación, la gruesa pared celular que posee y la tendencia de esta especie a formar grandes cúmulos de células bacterianas, le otorgan la capacidad de permanecer viable durante más de un año fuera del hospedador y bajo condiciones adversas como altas temperaturas (Lombard, 2011). MAP tiene una de las tasas de desarrollo más lentas; en medios de cultivo líquidos, el tiempo de replicación por cada generación va de 1.3 a 4.4 días y para obtener colonias visibles en medios sólidos, deben pasar al menos 12 semanas (Whittington, 2010).

2.2.4 Patogenia

La transmisión de MAP generalmente se da por la ruta fecal-oral, aunque también puede darse de forma transplacentaria, o a través del calostro y leche (Sweeney, Whitlock y Rosenberger, 1992a). Se sabe que la susceptibilidad de los individuos va disminuyendo

con la edad, siendo los neonatos los más vulnerables a la infección (Sweeney, 2011). Dada la capacidad de MAP de permanecer viable durante prolongados periodos en el medio ambiente, el contacto oral con superficies contaminadas, puede ser una vía de contagio importante; además de la susceptibilidad por la edad del individuo, el tamaño de la dosis ingerida también influye en la probabilidad de infección. Una dosis de 1.5×10^6 unidades formadoras de colonias (UFC) por vía oral es considerada suficiente para provocar una infección en becerros de forma confiable, pero lo suficientemente baja para producir experimentalmente lesiones similares a las encontradas en una infección natural (Sweeney *et al.*, 2006). Una vez que el hospedador entra en contacto con MAP por vía oral, se da una colonización principalmente en yeyuno e íleon, aunque experimentalmente se ha comprobado que las tonsilas también pueden actuar como vía de entrada (Gilmour *et al.*, 1965; Waters *et al.*, 2003). Las células M, localizadas en las placas de Peyer del intestino delgado, facilitan la entrada de MAP desde el epitelio intestinal hasta la submucosa, donde son fagocitadas por los macrófagos (Momotani *et al.*, 1988). Si los macrófagos logran eliminar a las micobacterias fagocitadas, la infección se evita; sin embargo, MAP tiene la capacidad de sobrevivir dentro de éstas células, evitando la maduración y la acidificación de las vacuolas fagocíticas, por lo que algunos de los animales expuestos fracasan en el intento por eliminar a la bacteria (Hostetter *et al.*, 2002). Los macrófagos infectados migran hacia los linfonodos mesentéricos y hacia otros órganos distantes como el hígado por vía linfática y sanguínea pocas horas después de la infección (Wu *et al.*, 2007).

La paratuberculosis puede ser dividida en cuatro etapas: silenciosa, subclínica, clínica y avanzada (Whitlock y Buergelt, 1996). Durante la fase silenciosa de la infección, la diseminación de MAP a través del intestino y tejido linfoide asociado se da de forma lenta y controlada gracias a los procesos inmunológicos del hospedador. En esta primera etapa

no se muestran signos clínicos, la bacteria no se elimina en heces y no es posible la detección de anticuerpos circulantes. La presencia de MAP en la submucosa intestinal y linfonodos mesentéricos atrae a nuevos macrófagos y linfocitos al área afectada. De esta forma comienza la lesión granulomatosa, la cual en un principio logra contener la infección (Sweeney, 2011). Si bien las micobacterias se mantienen confinadas dentro de los macrófagos por la respuesta inflamatoria granulomatosa generada, éstas siguen viables y eventualmente logran proliferar cuando la inmunidad celular pierde la capacidad de controlar la infección.

Durante la fase subclínica, que puede durar más de dos años, los bovinos afectados no muestran signos de infección, la baja en la producción es prácticamente indetectable, la eliminación en heces de MAP es muy baja y las pruebas serológicas de diagnóstico son poco sensibles (Sweeney, 2011).

La evolución hacia la enfermedad clínica es comúnmente asociada a una transición de una respuesta inmune celular basada en la producción de Interferón gamma a una respuesta inmune humoral basada principalmente en la producción de anticuerpos y de citocinas como IL-4 e IL-10 (Stabel, 2000). Como consecuencia de la falta de control de la infección, la eliminación del microorganismo en heces incrementa considerablemente y de manera paralela se comienza una diseminación a otros órganos como el hígado (Wu *et al.*, 2007), testículos (Khol *et al.*, 2010), útero y glándula mamaria, pudiendo causar una transmisión vertical al producto de una gestación (Sweeney *et al.*, 1992a, 1992b). Los signos clínicos como la diarrea líquida y pérdida progresiva de peso sin reducir el consumo de alimento van manifestándose gradualmente, se ha visto que estos tienden a exacerbarse después de un evento de estrés como puede ser el parto. A medida que estos se vuelven más evidentes, las lesiones granulomatosas se vuelven difusas en yeyuno, íleon y ciego. El infiltrado masivo provoca que el intestino se vea engrosado y las

vellosidades se acorten y pierdan su capacidad de absorción. La inflamación granulomatosa que existe en los linfonodos mesentéricos provoca una linfangiectasia. Todo lo anterior se traduce en una mala absorción intestinal, pérdida de peso e hipoproteinemia, el cual se ve reflejado como edema submandibular. La diarrea que se puede ver en los animales enfermos puede disminuir o incluso cesar durante varias semanas o meses y posteriormente reincidir.

Al pasar a la etapa clínicamente avanzada, se puede apreciar una pérdida de peso que puede llegar a caquexia y atrofia muscular. Puede presentarse edema submandibular y el animal se muestra letárgico. Finalmente, el animal puede morir por una grave desnutrición y deshidratación que frecuentemente se observan asociados a otros procesos infecciosos (Olsen, *et al.*, 2010). Se estima que por cada animal con paratuberculosis que muestre signos clínicos, existen otros 5 a 10 que se encuentran en etapa subclínica (Collins, 1994). La tasa de mortalidad de este padecimiento es un parámetro que no se tiene estimado, pues el curso crónico provoca que una parte importante de los animales enfermos sean desechados antes de que la enfermedad le provoque la muerte.

2.2.5 Situación mundial actual

La enfermedad de Johne tiene una distribución mundial. Inclusive en países como Noruega y Suecia, donde se informa que el ganado es libre de MAP, se han encontrado algunos casos seropositivos (Holstad *et al.*, 2005; Sternberg *et al.*, 2007). El problema mundial que representa la paratuberculosis se va agravando con el tiempo a causa del movimiento de ganado, el continuo crecimiento de los hatos, la intensificación de las producciones y el confinamiento de los animales, además de la ausencia, hasta la fecha,

de un inmunógeno que prevenga la adquisición de la enfermedad y de un tratamiento efectivo (Click y Van Kampen, 2010).

La prevalencia de MAP generalmente es mayor en ganado lechero que para el cárnico. En Estados Unidos se ha informado una prevalencia del 1 al 20% en bovinos lecheros y de menos de 5% en bovinos de carne. La prevalencia a nivel de hato lechero en Estados Unidos de América, basado en el cultivo de muestras fecales, indica que el 68% de los hatos está infectado con MAP. Las estimaciones son mucho más bajas para los hatos de carne, con 7.9% de hatos infectados con MAP (Lombard, 2011).

Existen pocos datos sobre la prevalencia de la paratuberculosis en México. Sin embargo, muchas cabezas de ganado han sido introducidas al territorio nacional provenientes de Europa, Estados Unidos de América, Canadá, Nueva Zelanda y Australia (Estévez-Denaives *et al.*, 2007). Tomando en cuenta que los requisitos para la importación de ganado no incluyen el diagnóstico negativo de paratuberculosis, se puede asumir que muchos de estos animales son portadores de MAP y que la prevalencia de la enfermedad ha ido incrementando. La prevalencia de paratuberculosis en bovinos lecheros y doble propósito en el estado de Guanajuato, mediante la prueba de ELISA, fue informado por Santillán *et al.* (2003), y resultó de 30.65% y 24%, respectivamente. En el complejo agropecuario industrial de Tizayuca, Hidalgo, Castillo-Velázquez *et al.* (2015) calcularon una prevalencia del 25% mediante estudios histopatológicos y baciloscofia.

Chávez-Gris *et al.* (2009) estimaron una prevalencia del 18.36%, basándose en el número de casos diagnosticados como positivos mediante el servicio de diagnóstico del Departamento de Patología y del Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), así como en la Unidad de Servicios de Diagnóstico y Constatación (USEDICO) del Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Animal en el Altiplano

(CEIEPAA). El estudio abarcó un total de 7,461 casos de rumiantes (bovinos, caprinos, ovinos y cérvidos) provenientes de 14 estados de la República Mexicana, y el diagnóstico fue realizado mediante estudios anatomopatológicos, serológicos, bacteriológicos, y moleculares.

2.2.6 Control de la paratuberculosis

Los programas de control de paratuberculosis deben ser elaborados dependiendo de las características, necesidades y prevalencia de cada hato. No obstante, la intención de eliminar posibles fuentes de contagio es uno de los puntos primordiales en cualquier programa de control. El mejoramiento en el manejo dentro de la producción se considera la herramienta más útil para controlar la enfermedad (Harris y Barletta, 2001), es decir, la limpieza general de las instalaciones, el manejo de las heces, el cuidado de neonatos y la restricción del contacto entre éstos y adultos, son manejos básicos indispensables que ayudan sustancialmente a prevenir la transmisión de MAP. Los animales silvestres, rumiantes y no rumiantes, también pueden verse afectados por MAP (Beard *et al.*, 2001). Estos actúan como reservorio y fuente de transmisión del microorganismo, por lo que el contacto del ganado con los animales silvestres debe evitarse en la medida que sea posible. El uso de vacunas ha demostrado ser de ayuda en programas de control de la enfermedad de Johne, pues resulta en una disminución sustancial de las UFC de MAP excretadas en las heces de aquellos animales infectados (Ocepek *et al.*, 2014). En México, estas vacunas no se encuentran disponibles y su uso no está permitido ya que despierta una respuesta inmune celular que puede interferir con el diagnóstico oficial de tuberculosis bovina (Patton, 2011).

El diagnóstico periódico de la enfermedad de Johne es una herramienta útil que puede no sólo identificar posibles fuentes de infección, sino que también evaluar el progreso del programa de control. Adicionalmente, debido a que ninguna prueba es sensible o específica al 100%, y tomando en cuenta la historia natural de la enfermedad, se deben realizar tomas de muestras repetidas durante al menos tres años con espaciamiento de aproximadamente 6 meses a un año (Collins, 1994). Es por esto que el diagnóstico del hato es un punto crítico en el control de la paratuberculosis.

2.2.7 Diagnóstico

Como se mencionó anteriormente, el alto contenido de lípidos en la pared celular de MAP le confiere la capacidad de subsistir durante más de un año fuera del hospedador y bajo condiciones adversas como la desecación (Lombard, 2011). Puede sobrevivir dentro de los macrófagos, lo que le otorga a la enfermedad el curso crónico y progresivo que la caracteriza (Sweeney, 2011). Las propiedades mencionadas anteriormente hacen que la identificación de la presencia del agente en el hato no sea tarea fácil, ya que los métodos de diagnóstico utilizados más comúnmente suelen ser poco sensibles para detectar a los animales infectados durante las etapas silenciosa y subclínica. El curso crónico de la enfermedad de Johne y la lenta evolución en animales infectados, hace que sea prácticamente imposible el detectar a todos los animales positivos con una sola prueba diagnóstica y en un sólo periodo determinado (Kalis *et al.*, 2003). Por esta razón, es recomendable utilizar más de un tipo de prueba diagnóstica y programar muestreos de manera periódica cuando se tiene el objetivo de controlar la paratuberculosis en el hato.

Los programas de control de paratuberculosis son planificados y llevados a cabo dependiendo del fin zootécnico del hato y de la prevalencia presente de MAP (Collins,

2011). Independientemente de lo anterior, es probable que el productor se encuentre con gastos no contemplados (Lombard, 2011), por lo que es importante que los métodos de diagnóstico utilizados sean accesibles, altamente sensibles y específicos inclusive durante las etapas subclínicas de la enfermedad.

Las pruebas diagnósticas disponibles para la enfermedad de Johne pueden ser clasificadas en los siguientes grupos: pruebas que detectan la respuesta inmune celular, pruebas que detectan la respuesta inmune humoral y pruebas que detectan al microorganismo o parte de él (Bakerma *et al.*, 2010), así como el diagnóstico anatomopatológico.

2.2.7.1 Pruebas empleadas en el diagnóstico de paratuberculosis que detectan la respuesta inmune celular

2.2.7.1.1 Intradermoreacción

El diagnóstico temprano de MAP solía hacerse mediante la prueba intradérmica, la cual se basa en evaluar la hipersensibilidad retardada (tipo IV) de los animales tras la inoculación intradérmica de 0.1 ml (0.5 mg/ml, 25,000 UI) de derivado proteico purificado de *M. avium* (PPD-A) o de Johnina (PPD de MAP) en el tercio medio de la tabla del cuello de los animales. La forma en que se evalúa esta respuesta inmune celular es midiendo y comparando el grosor de la piel antes y 72 horas después de la inoculación. Si se provoca una inflamación mayor a los dos milímetros, el animal es considerado positivo (Gilardoni *et al.*, 2012). Esta es una prueba de bajo costo, fácil de realizar y que permite la identificación de animales positivos en la etapa subclínica de la infección. No obstante, la continua reacción cruzada que provoca la sensibilización con antígenos de micobacterias ambientales ha puesto en duda la confiabilidad de esta prueba (Harris y Barletta, 2001) y

por esta razón se recomienda que sea utilizada únicamente como prueba preliminar y que se realice en conjunto con pruebas más confiables (OIE, 2014).

2.2.7.1.2 Prueba de Interferón gamma

La prueba de interferón gamma (IFN- γ) evalúa la producción específica de esta citocina por los linfocitos T tras haber sido estimulados con un antígeno particular (en este caso, con PPD-A). Fue desarrollada a partir de la necesidad de una temprana detección de los animales infectados de tuberculosis bovina (ver apartado 2.3.5: “Diagnóstico de tuberculosis bovina”) y actualmente se comercializa como un estuche comercial de diagnóstico llamado *Bovigam* (Prionics, Switzerland). A partir de ésta, se hicieron modificaciones para lograr también la identificación de MAP, no obstante, la prueba no ha sido validada por el fabricante para el diagnóstico de paratuberculosis y por lo tanto los resultados pueden ser difíciles de interpretar (OIE, 2014). Algunas limitantes de esta prueba como el elevado costo, la necesidad de procesar las muestras clínicas casi inmediatamente y el requerimiento de personal calificado para obtener resultados confiables, no permiten que esta prueba sea de uso primario en la detección de paratuberculosis. Adicionalmente, McDonald *et al.* (1999) informaron que todos los animales clasificados como testigos negativos durante su estudio obtuvieron al menos un resultado positivo mediante la prueba de IFN- γ a lo largo de la experimentación. Esto sugiere que la prueba de IFN- γ adaptada para diagnóstico de enfermedad de Johne requiere ajustes que hagan a la prueba más precisa, como puede ser el uso de antígenos estimulantes específicos de MAP y una adecuada estandarización de la prueba.

2.2.7.2 Pruebas empleadas en el diagnóstico de paratuberculosis que detectan la respuesta inmune humoral

Los animales con paratuberculosis desarrollan tanto una respuesta inmune celular como una humoral, y estas pueden ser correlacionadas con la etapa de la enfermedad. Como se mencionó anteriormente, las etapas silenciosa y subclínica de la paratuberculosis son caracterizadas por despertar una respuesta inmune celular principalmente, donde los linfocitos T CD4 y CD8, y las células mononucleares juegan un papel fundamental para el control de la infección. Cuando la infección es avanzada y generalizada, la respuesta inmune celular va disminuyendo a medida que aumenta la respuesta humoral basada en anticuerpos. Es en estas etapas donde la sensibilidad de las pruebas serológicas es mayor. Se utilizan principalmente tres pruebas para la detección de anticuerpos contra MAP, éstas son de utilidad en programas de control de paratuberculosis, pues a pesar de que no siempre son capaces de identificar a todos los animales con enfermedad subclínica, son las más apropiadas para la detección de aquellos animales con enfermedad avanzada, es decir, aquellos cuya eliminación de la bacteria en heces es superior, y que representan una importante fuente de contagio (Harris y Barletta, 2001). A continuación se describen brevemente.

2.2.7.2.1 Fijación del complemento

La prueba de fijación del complemento solía ser utilizada con frecuencia en el pasado y eventualmente se utiliza para cubrir los requisitos de importación de ciertos países (OIE, 2014). Es útil para la confirmación del diagnóstico de animales con signos clínicos sugerentes de enfermedad de Johne, sin embargo, no es lo suficientemente sensible y específica para ser utilizada en programas de control de la enfermedad, además de que

no es fácil de ejecutar y se trabaja únicamente en laboratorios de referencia (Gilardoni *et al.*, 2012).

2.2.7.2.2 Inmuno difusión en Gel de Agar (IDGA)

Este es un método simple y de bajo costo que se basa en la precipitación de complejos inmunes formados por los anticuerpos de animales infectados con un antígeno extraído de MAP. Puede ser utilizado como prueba confirmatoria rápida en casos de sospecha de paratuberculosis clínica. La sensibilidad varía mucho siendo de 90-95% en etapas clínica y avanzada, y de hasta 30% en etapas subclínicas (Ayele *et al.*, 2001).

2.2.7.2.3 Ensayo de Inmunoadsorción Ligado a Enzimas (ELISA)

Actualmente, la prueba de ELISA es el método más usado para el diagnóstico serológico de paratuberculosis. Pueden utilizarse diferentes antígenos de MAP. Esta prueba puede ser utilizada con muestras de suero, plasma o leche. Con esta prueba se tiene la posibilidad de procesar varias muestras clínicas simultáneamente, es de bajo costo, puede ser automatizada y permite una interpretación objetiva de los resultados. La sensibilidad de la prueba de ELISA en la fase silenciosa es de 7%, del 15% en la fase subclínica y entre 85 y 98% en fases clínicas (Gilardoni *et al.*, 2012). Castrellón-Ahumada (2012) desarrolló una metodología diagnóstica basada en la detección de anticuerpos contra la proteína P35, cuya sensibilidad es del 100% y la especificidad es del 92% al compararla con aislamiento bacteriológico a partir de heces de ovinos. Esta proteína se encuentra presente en MAP, *M. avium* en *M. leprae*, pero no en bacterias del complejo *Mycobacterium tuberculosis*, por lo que no aparecen reacciones cruzadas al utilizarla como antígeno para el diagnóstico serológico.

2.2.7.3 Pruebas que detectan a MAP o parte de él

2.2.7.3.1 Bacterioscopía

Para la identificación directa del microorganismo causante de la paratuberculosis por microscopía se utilizan muestras clínicas de heces, calostro y/o leche. Estas deben ser teñidas con el método de Ziehl-Neelsen (ZN) para su visualización. La morfología de MAP es la de un bacilo corto y la disposición en que generalmente puede encontrarse es formando cúmulos de bacterias. Esta prueba es de bajo costo y práctica, pero es de baja sensibilidad y los resultados que se obtienen son cualitativos (Gilardoni *et al.*, 2012).

2.2.7.3.2 Aislamiento y cultivo bacteriológico de MAP

La prueba diagnóstica de referencia para la identificación de MAP es el cultivo bacteriológico, ya que tiene una especificidad cercana al 100%, sin embargo, por sí sola es poco empleada pues resulta muy impráctica ya que la formación de colonias visibles tarda al menos 12 semanas (Slana *et al.*, 2008; Whittington, 2010). Adicionalmente, el desarrollo *in vitro* de MAP requiere al menos de 100 UFC por cada gramo de heces, condición que muy probablemente sea cumplida por los animales en etapas clínica y avanzada, pero no por aquellos en etapa silenciosa o subclínica. Es por esto que la prueba puede detectar únicamente al 15-25% de los animales que no manifiestan signos clínicos (Gilardoni *et al.*, 2012). Por esta última característica, es recomendable coleccionar muestras periódicas consecutivas para un diagnóstico más acertado, lo que consume aún más tiempo.

Se puede recurrir a heces, calostro, leche, raspados de mucosa intestinal, semen y leucocitos como muestras clínicas para el cultivo bacteriológico (Grant *et al.*, 2002; Khol *et*

al., 2010; OIE, 2014). Los filtros utilizados en las máquinas ordeñadoras pueden ser usados también como fuente para el cultivo, así como muestras de tierra y estiércol. La descontaminación de éstas, previa a la inoculación en el medio de cultivo, es una práctica común que sirve para eliminar a aquellas bacterias de rápido crecimiento y evitar la contaminación, sin embargo, esta descontaminación química puede eliminar también hasta 10^3 UFC de MAP, haciendo a la prueba aún menos sensible (Gilardoni, Paolicchi y Mundo, 2012).

Los medios de cultivo que son utilizados generalmente para el crecimiento de MAP son: Medio Herrold con yema de huevo, Löwenstein-Jensen y Middlebrook. Todos son adicionados con micobactina y una combinación de antibióticos y antimicóticos como la polimixina B, la anfotericina B, ácido nalidíxico, vancomicina, entre otros utilizados (OIE, 2014).

Para el diagnóstico de MAP se toman en cuenta varios criterios como el tiempo de formación de colonias visibles, la morfología de las colonias, la dependencia de micobactina para el crecimiento, la propiedad de ácido alcohol resistencia y la morfología celular (OIE, 2014). Adicionalmente a estas características, la confirmación del cultivo de MAP puede hacerse mediante la amplificación de fragmentos genéticos específicos de la bacteria por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (Singh *et al.*, 2010).

2.2.7.3.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Las técnicas moleculares como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), han resultado prácticas y sensibles para el diagnóstico de diferentes enfermedades infecciosas, pues requieren cantidades mínimas de ADN bacteriano. Mcpherson y Moller (2006) mencionan que bajo condiciones ideales, un microgramo, o 3×10^5 moléculas de

ADN genómico, puede producir 3×10^{11} fragmentos amplificados después de 20 ciclos. Recientemente, el manual de las pruebas de diagnóstico y de las vacunas para los animales terrestres de la (OIE, 2014) incluyó a la PCR dentro de los métodos para la identificación del agente en la enfermedad de Johne. La PCR permite la rápida identificación de microorganismos cuyo crecimiento en medio de cultivo es lento, tal como MAP. Su uso para el diagnóstico de paratuberculosis es cada vez mayor, pues tiene la ventaja de que es rápida en comparación con el cultivo bacteriológico, dando resultados en pocas horas.

Las muestras clínicas que son comúnmente utilizadas en el diagnóstico por PCR son heces, calostro, leche, secciones de tejido de la válvula ileocecal, íleon o yeyuno y linfonodos mesentéricos. Después de la infección inicial, es posible detectar un periodo de bacteremia en el que MAP circula en sangre dentro de los macrófagos, posteriormente, durante la etapa clínica, se da otra fase de bacteremia que es fácilmente detectable (Bower *et al.*, 2011; Gilardoni *et al.*, 2012). Es por esto que el uso de sangre como muestra clínica para el diagnóstico por PCR ha sido probado repetidas veces como prueba complementaria con exitosos resultados (Buergelt y Williams, 2004; Bhide *et al.*, 2006; Singh *et al.*, 2010).

Esta prueba ha sido utilizada ampliamente para el diagnóstico de paratuberculosis mediante la amplificación de fragmentos específicos de la secuencia de inserción IS900, la cual es un transposón simple, es decir, un elemento genético corto que puede moverse de manera autosuficiente a diferentes partes del genoma de la bacteria. Esta secuencia de 1,451 pares de bases (pb) puede encontrarse entre 15 y 20 veces dentro del genoma de MAP y es altamente conservada entre las diferentes cepas de la especie (Bhide *et al.*, 2006). Es por eso que se ha logrado el diagnóstico de MAP, a partir de cantidades

mínimas de DNA, mediante la identificación de fragmentos de este elemento de inserción por PCR.

2.2.7.4 Diagnóstico anatomopatológico e histológico

El diagnóstico anatomopatológico e histológico suelen hacerse posterior a la muerte del animal, pues su aplicación antemortem resulta en un elevado costo que generalmente el productor no está dispuesto a pagar. En casos de enfermedad clínica o de animales con diagnóstico positivo por otros medios, y cuando se decide la eutanasia del animal, este tipo de diagnóstico suele ser utilizado como prueba confirmatoria.

Para hacer el diagnóstico de paratuberculosis mediante la inspección macroscópica de un animal sospechoso, se debe exponer la mucosa del intestino desde el duodeno hasta el recto y poner especial atención en los cambios que puedan apreciarse en el íleon terminal (OIE, 2014). La lesión macroscópica típica de la paratuberculosis es el engrosamiento de la pared intestinal dándole un característico aspecto corrugado que se da por la presencia de infiltrado mononuclear en la submucosa del intestino. Adicionalmente, los linfonodos mesentéricos pueden encontrarse fusionados, aumentados de tamaño y edematosos, además de la linfangiectasia que los acompaña. Aunque es poco común, pueden encontrarse lesiones extra intestinales como aterosclerosis de la aorta, atrofia muscular, atrofia de la grasa, infarto renal, edema submandibular y ascitis (Tiwari *et al.*, 2006).

Durante la exploración, se deben tomar varias muestras del intestino, linfonodos mesentéricos y cualquier otro órgano que aparente estar afectado para su posterior examen microscópico. Los cortes histológicos de estas muestras y un frotis del contenido y mucosa intestinal, deben ser teñidos con la técnica de Ziehl-Neelsen y examinarse en el microscopio para identificar la presencia de bacilos ácido alcohol resistentes (OIE, 2014).

Microscópicamente, en la lámina propia, mucosa y submucosa del intestino pueden encontrarse dos tipos de lesiones, dependiendo de la fase de la infección en la que el animal haya muerto: las lesiones tuberculoides, que se refieren a una enteritis granulomatosa focal o multifocal y linfocítica, y con escasas micobacterias (paucibacilar); y las lesiones lepromatosas, las cuales se refieren a una enteritis granulomatosa difusa, con infiltrado de macrófagos, linfocitos, células plasmáticas, células epitelioides y células gigantes multinucleadas y con abundantes micobacterias (multibacilar) (González *et al.*, 2005). También pueden encontrarse lesiones granulomatosas en la región cortical de los linfonodos mesentéricos así como una hepatitis granulomatosa. En algunos casos, la tinción de Ziehl-Neelsen de los cortes histológicos permiten la apreciación de bacilos ácido alcohol resistentes agrupados dentro de los macrófagos (Gilardoni, Paolicchi y Mundo, 2012).

2.3 Tuberculosis bovina

El complejo *Mycobacterium tuberculosis* (CMt) está conformado por *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis*, *M. bovis* BCG, *M. microti*, *M. canetti*, *M. caprae* y *M. pinipedi*. Si bien estas especies han ido adaptándose a un hospedador en particular, se ha documentado la infección inter especie. La tuberculosis bovina es una enfermedad zoonótica provocada principalmente por *Mycobacterium bovis*, aunque pueden estar involucradas otras bacterias que componen al CMt (Rodríguez-Campos *et al.*, 2014). Los bovinos son los hospederos principales de *M. bovis*, pero ésta se ha aislado de numerosas especies domésticas y silvestres como ovinos, caprinos, perros, gatos, caballos, cerdos, jabalíes, camellos, ciervos, hurones, nutrias, mapaches, coyotes, entre otros (De Lisle *et al.*, 2002). Por otro lado, *M. tuberculosis* es el agente considerado mayoritariamente como el

causante de la tuberculosis en humanos, pero se ha comprobado que todos los miembros del complejo *M. tuberculosis* pueden provocarla (Reddington *et al.*, 2011).

La tuberculosis en humanos es la segunda causa más frecuente de muertes debido a un solo agente infeccioso, siendo el Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH) la primera de éstas. Se calcula que un tercio de la población mundial total posee tuberculosis latente. En el 2013, 9 millones de personas en el mundo enfermaron de tuberculosis activa y 1.5 millones murieron a causa de esta enfermedad. El 95% de estas muertes ocurrieron en países con niveles de ingresos medio a bajo (WHO, 2015). El problema ha empeorado desde la pandemia de VIH y SIDA, pues el riesgo de muerte en pacientes infectados con VIH se duplica cuando existe una coinfección con bacterias del CMt (Barnes, Lakey y Burman, 2002). Una cuarta parte de las muertes relacionadas con VIH son causadas por una coinfección con tuberculosis. La multiresistencia a antibióticos que poseen algunas cepas de *M. tuberculosis* agrava cada vez más la situación. Durante el 2013, 280 mil personas desarrollaron tuberculosis multidrogo resistente. Existe una fuerte preocupación por lo que estas cepas multiresistentes representan, pues muy pocos medicamentos que son efectivos contra estas cepas se encuentran disponibles, y estos son muy costosos (Lessem *et al.*, 2015). La tuberculosis es un grave problema mundial de salud pública y su erradicación se encuentra dentro de los objetivos de desarrollo del milenio de la Organización de las Naciones Unidas (ONU, 2000). El papel que juega el sector de salud animal es importante dado que los animales con tuberculosis bovina y sus derivados implican una potencial fuente de infección para los humanos (Sreevatsan *et al.*, 2000).

La tuberculosis bovina es también un problema mundial, el cual, a pesar de décadas de grandes esfuerzos por parte de los gobiernos y de organizaciones internacionales, no ha podido ser erradicado por diferentes razones. En algunos países, los animales silvestres representan un reservorio de la enfermedad y actúan como una constante fuente de

infección para el ganado. Las limitantes que presentan los exámenes diagnósticos utilizados actualmente, la tendencia de crecimiento acelerado de los hatos, el incremento en la movilidad y comercio de ganado, entre otros aspectos, resultan obstáculos para su erradicación (Schiller *et al.*, 2010).

2.3.1 Problema económico

La tuberculosis bovina es capaz de producir grandes pérdidas económicas y limitar la comercialización de los productos pecuarios por lo que es de gran impacto en la industria agropecuaria. Se estima que esta enfermedad provoca pérdidas económicas en el mundo de más de 3 mil millones de dólares anuales. La producción láctea puede bajar hasta un 12% en bovinos con presencia de tuberculosis, así como provocar infertilidad en el 5% de los animales positivos. En cuanto a ganado productor de carne, pueden haber pérdidas entre el 6 y el 12% de la producción en hatos con más del 80% de los animales infectados (Zinsstag *et al.*, 2006a). En Estados Unidos de América se invierten más de 40 millones de dólares anuales y más de 100 millones de libras en el Reino Unido en las campañas de erradicación de la tuberculosis bovina (Schiller *et al.*, 2010). Las pérdidas anuales en Argentina se estiman en 65 millones de dólares, y éstas se atribuyen a una pérdida de peso de hasta 36%, una baja en la producción de leche del 13%, una baja en la producción de terneros del 12% y 9% de pérdidas por decomiso (SENASA, 2012).

2.3.2 Situación mundial actual

En la Unión Europea la prevalencia de la tuberculosis bovina se encuentra en ascenso. De 2006 a 2007 incrementó de 0.48% a 0.53%. De los países que la conforman, Irlanda y

el Reino Unido tienen las prevalencias más altas, siendo de 4.37% y 6.7%, respectivamente (Schiller *et al.*, 2010).

En Nueva Zelanda, la prevalencia de tuberculosis en bovinos y en producciones de venados se ha reducido de 3.78% en 1995 a 0.77% en 2004. La infección es localizada principalmente donde puede encontrarse la zarigüeya australiana (*Trichosurus vulpecula*), la cual es el reservorio natural de la zona (Kaneene y Pfeiffer, 2006).

En la mayoría de los países africanos se tiene poco conocimiento sobre la prevalencia de tuberculosis en bovinos debido al bajo presupuesto que se le otorga a la investigación. Existen pocos estudios sobre prevalencia de tuberculosis y generalmente estos no son publicados. Se estimó una prevalencia del 3 al 9.6% por medio de la prueba intradérmica simple en algunas producciones de Nigeria, de entre el 10 y 9% en Ghana, 7.4% en Zambia y 19.7% en Uganda (Zinsstag *et al.*, 2006b).

En Argentina, desde 1999, año en que se implementó el programa para la erradicación de la tuberculosis bovina, 3,455 producciones bovinas han adquirido el nombramiento de hatos libres tuberculosis (Torres, 2006), alcanzando una prevalencia del 1.4%. En Brasil, la prevalencia a nivel de hato es del 5%, mientras que a nivel individual va del 0.8% en bovinos productores de carne y hasta el 15% en bovinos productores de leche (Ritacco *et al.*, 2006).

Estados Unidos de América ha logrado disminuir la prevalencia a menos de 0.001% por medio de la campaña de erradicación implementada. El estatus de "Libre" no se le ha otorgado a este país debido principalmente al reservorio silvestre y a la problemática que implica la importación de ganado de México, donde aún existen zonas de alta prevalencia y la campaña de erradicación es llevada a cabo de forma variable en cada estado (Schiller *et al.*, 2010).

2.3.3 Campaña nacional contra la tuberculosis bovina y situación zoonosana en México

En México existe la Campaña Nacional Contra la Tuberculosis Bovina (*Mycobacterium bovis*), en la cual se invierten más de 200 millones de pesos anualmente (CONASA, 2011) y la cual está respaldada por la Norma Oficial Mexicana NOM-031-ZOO-1995. Ésta es de observancia obligatoria en todo el territorio nacional y su objetivo es regular y establecer los procedimientos, actividades, criterios, estrategias, técnicas y características para el control y erradicación de esta enfermedad. La campaña se orienta a bovinos de cualquier raza y función zootécnica y contempla tres fases de operación: control, erradicación y libre. En aquellos estados donde existe una prevalencia de hato mayor al 2% o desconocida, pero donde existe un control de movilización además de otras restricciones, se denominan estados en fase de “Control”. El estatus de “Erradicación” se le otorga, por aprobación expresa de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) a aquellas regiones donde se ha probado al 100% de los hatos para conocer la prevalencia de la zona y ésta es menor al 2%, además de que existe un control estricto de la movilización. El estatus de “libre” se le otorga a aquellas regiones donde no se ha registrado un caso de la enfermedad en los últimos cinco años, donde se ha dado la constatación del 100% de los hatos y donde se cuenta con un Dispositivo de Emergencia en Salud Animal ([NOM] Norma Oficial de la Federación, 1996).

La SAGARPA, por medio del Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA) informa que existen 25 regiones o estados en México que se encuentran actualmente clasificados como de baja prevalencia. También se informa que el 84.13% del territorio nacional se encuentra en fase de erradicación y donde la prevalencia es menor al 0.5%. Mientras que el resto del territorio nacional se encuentra en

fase de control, donde la prevalencia promedio es del 2.05%, excepto en cuencas lecheras, donde se encuentra alrededor del 16.5% (SENASICA, 2015).

En 1993 se creó un acuerdo entre el gobierno mexicano y el de los Estados Unidos de América para la erradicación de la tuberculosis bovina, en el cual se basarían para permitir o no la exportación de ganado bovino. El departamento de agricultura de los Estados Unidos de América (USDA) ha reconocido 25 regiones de baja prevalencia en México, lo que equivale al 66.23% del territorio nacional (Figura 1). De las regiones reconocidas por la USDA, 13 pueden exportar con una sola prueba de tuberculina del lote, 11 con prueba de lote y prueba de hato de origen, y una región puede exportar ganado castrado sin necesidad de prueba de tuberculina (SENASICA, 2015).

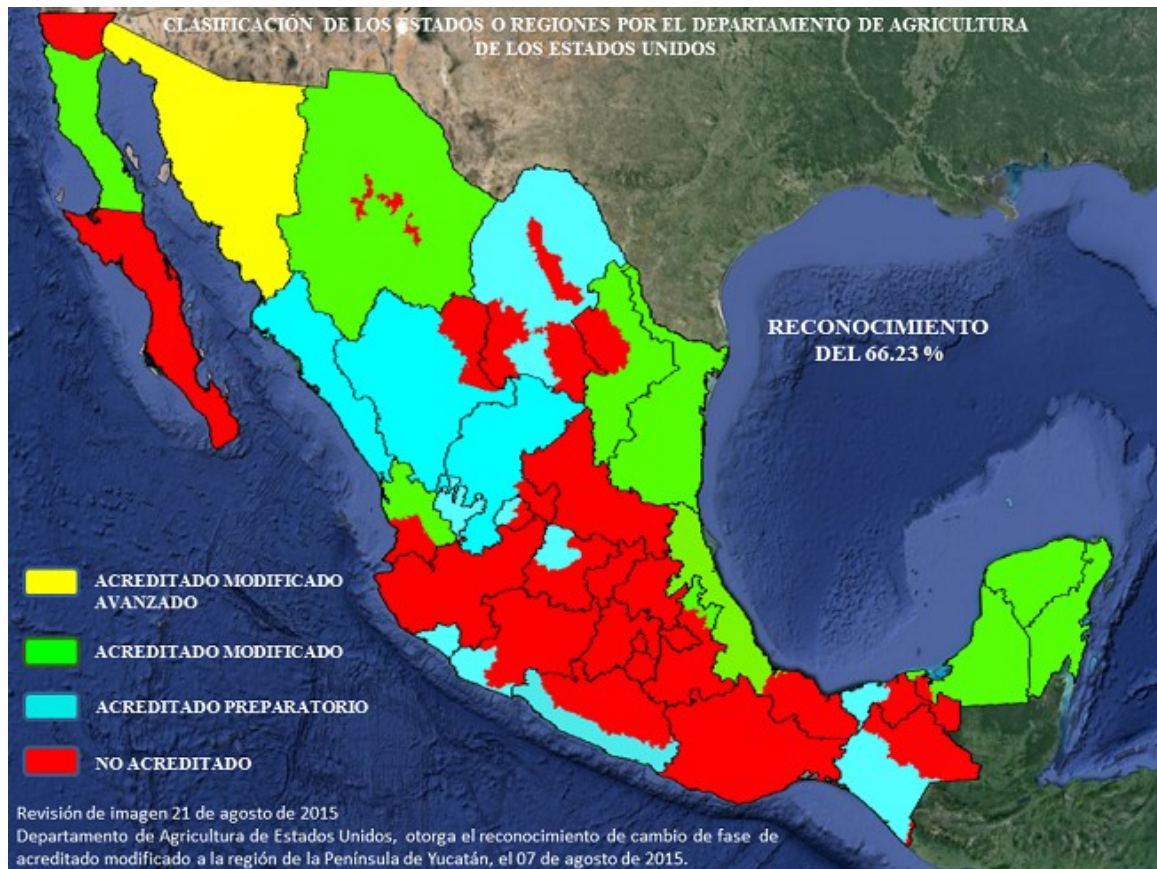


Figura 1. Clasificación de las regiones de México por el departamento de agricultura de Estados Unidos de América. (SENASICA, 2015) Disponible en: <http://www.senasica.gob.mx/?id=4369>

2.3.4 Patogenia

La vía aerógena es la forma de infección más común y provoca el desarrollo de lesiones en nasofaringe, pulmones y linfonodos asociados. Los dos primeros sitios de infección se conocen como complejo primario y suele clasificarse como completo o incompleto dependiendo si ambos sitios presentan la lesión o si la lesión no se encuentra en el sitio de entrada de la micobacteria (Domingo *et al.*, 2014). La ingesta de *M. bovis* u otra micobacteria del CMt en pasto, agua o alimento contaminado es la segunda vía de entrada más común (Menzies y Neill, 2000) y causa lesiones en los linfonodos mesentéricos y escasas o nulas lesiones en la pared intestinal. Otras rutas de infección menos comunes son la transplacentaria e intramamaria, mientras que la transmisión genital puede llegar a darse pero es extremadamente rara (Neill *et al.*, 1994). La transmisión transplacentaria hacia el feto se da en casos de endometritis tuberculosa y provoca en el feto un complejo primario en el hígado y linfonodos portales. Los becerros que nacen con infección congénita generalmente desarrollan tuberculosis generalizada dentro de los primeros meses de vida (Vural y Tunca, 2001).

Una vez que *M. bovis* ha entrado al organismo, su presencia en membranas mucosas o en los espacios alveolares genera la activación de las rutas de inflamación en las células fagocíticas. Las micobacterias son fagocitadas por macrófagos, los cuales interactúan subsecuentemente con otras células del sistema inmune innato y adaptativo atrayendo así a neutrófilos hacia el sitio de infección. A pesar de que los macrófagos juegan el papel principal en la eliminación de los bacilos para evitar la enfermedad, *M. bovis* es capaz de evitar la fusión fago-lisosomal, y así sobrevivir y replicarse libremente dentro de los macrófagos. Estas células presentan antígenos micobacterianos a los linfocitos T, los

cuales comenzarán una expansión clonal dando inicio a la respuesta inmune adquirida (Pollock y Neill, 2002).

Después de la infección inicial, las micobacterias son transportadas dentro de las células fagocíticas a través de los capilares linfáticos hacia los linfonodos regionales donde establecen una nueva infección. Una vez que comienza a responder la inmunidad celular frente a la infección por *M. bovis*, inicia simultáneamente la formación de la lesión típica de la tuberculosis, conocida como granuloma tuberculoso o tubérculo (Pollock y Neill, 2002). Se trata de un nódulo inflamatorio granulomatoso circunscrito y de color amarillento, que en un principio está más o menos encapsulado por tejido conectivo y que comúnmente contiene un centro con necrosis caseosa y mineralización. Histológicamente, los granulomas tuberculosos pequeños están formados por neutrófilos, macrófagos epitelioides que a veces presentan citoplasma espumoso y algunas células gigantes multinucleadas (Domingo *et al.*, 2014). La actividad inmunológica celular, la formación del granuloma, y el flujo de macrófagos y células T hacia el sitio de infección son mecanismos encaminados a la inhibición de las micobacterias, no obstante, en algunas ocasiones la bacteria no logra ser eliminada por completo.

Al desarrollar la lesión, ésta presenta un centro con necrosis caseosa debido a la respuesta inmune de los linfocitos T, los cuales son capaces tanto de activar como de destruir a los macrófagos infectados (Cassidy, 2006). La necrosis puede verse como material eosinofílico amorfo con fragmentos de células necróticas y mineralización central. Los macrófagos epitelioides, las células gigantes multinucleadas y los linfocitos pueden encontrarse rodeando esta necrosis central del granuloma. Progresivamente, se va formando una cápsula de tejido conectivo más compleja por la proliferación de fibroblastos. Es posible encontrar muy escasas bacterias ácido alcohol resistentes en el

material eosinofílico caseoso o dentro de los macrófagos y células gigantes (Domingo *et al.*, 2014).

En algunos animales, la presencia de una respuesta inmune celular vigorosa puede prevenir el crecimiento de las lesiones y la diseminación hacia otros órganos, pero la respuesta inmune sistémica que actúa en la sangre y compartimentos linfáticos, generalmente no es capaz de detener la dispersión de la infección a través de canales anatómicos pre existentes como las vías aéreas de los pulmones. Es así como la pequeña lesión granulomatosa inicial se vuelve más grande con el tiempo. En el pulmón, la lesión crónica se caracteriza por extensión a través de bronquiolos y árbol bronquial, con necrosis caseosa multifocal coalescente y eventualmente, la formación de lesiones cavernosas dentro del lóbulo afectado inicialmente (Domingo *et al.*, 2014). Este fenómeno se da por la licuefacción de las lesiones y se considera un factor importante involucrado en la capacidad de infectividad del CMt, ya que de esta forma se permite la salida de las micobacterias que se encuentran en contacto estrecho con las vías aéreas del aparato respiratorio (Cassidy, 2006). La zona afectada muestra una aguda delimitación que respeta las barreras del estroma lobular. Pueden existir lesiones ulcerativas en bronquios y tráquea. En esta etapa, los linfonodos afectados de manera crónica pueden verse aumentados de tamaño y ocupados por material caseoso y rodeado por trabéculas irregulares de tejido fibroso.

Cuando la respuesta inmune no logra ser efectiva, puede darse un fenómeno de generalización sistémica, ya sea en las fases iniciales de la infección (generalización temprana) o cuando la infección es crónica (generalización tardía). Ésta se da por la diseminación de las micobacterias como consecuencia de una erosión de pequeños vasos sanguíneos o linfáticos debido al crecimiento de los granulomas. La forma más común de generalización es conocida como tuberculosis miliar, que se caracteriza por un

gran número de pequeños focos caseosos de coloración grisácea a amarillenta. Estas estructuras son debido a la liberación masiva de micobacterias hacia la circulación. Durante la generalización, algunos animales pueden encontrarse anérgicos y no mostrar reactividad ante las pruebas de tuberculina e IFN- γ (Domingo *et al.*, 2014).

2.3.5 Diagnóstico

A pesar de décadas de grandes esfuerzos por erradicar la tuberculosis bovina en el mundo, ésta persiste y ha reemergido en algunos países que habían logrado niveles de prevalencia muy bajos (Schiller *et al.*, 2010). El diagnóstico de tuberculosis sigue siendo un reto debido a que los métodos utilizados actualmente carecen de una sensibilidad y/o especificidad adecuadas. En México, las pruebas de diagnóstico que son aceptadas oficialmente en la campaña nacional contra la tuberculosis bovina son la tuberculinización, análisis bacteriológico e histopatológico y otras que determine la SAGARPA. Existen tres tipos de prueba de tuberculina autorizadas; la prueba simple en el pliegue caudal, la prueba cervical comparativa y la prueba cervical simple. Estas pueden ser aplicadas únicamente por médicos veterinarios aprobados por la Secretaría y la lectura se debe hacer a las 72 horas por el mismo médico veterinario que la aplicó ([NOM] Norma Oficial de la Federación, 1996). Existen otras pruebas diagnósticas que si bien no son utilizadas actualmente en la campaña, han servido como pruebas complementarias en otros países. A continuación se describen algunas de las pruebas utilizadas, sus ventajas y desventajas.

2.3.5.1 Pruebas empleadas para el diagnóstico de tuberculosis que detectan la respuesta inmune celular

2.3.5.1.1 Prueba de tuberculina

La prueba intradérmica de tuberculina ha sido utilizada en exitosas campañas de erradicación de diferentes países por más de 100 años por ser una prueba de bajo costo. Es reconocida por la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) como la prueba primaria de diagnóstico de tuberculosis (2009). Algunos países como Australia lograron erradicar esta enfermedad, mientras otros como Finlandia y el Reino Unido han logrado niveles mínimos de incidencia de tuberculosis bovina con programas basados en la identificación y eliminación de animales reactivos a esta prueba (de la Rúa-Domenech *et al.*, 2006; Bezos *et al.*, 2014). La prueba de tuberculina tiene como fundamento una respuesta de hipersensibilidad retardada o tipo IV, tras la inyección intradérmica de un extracto proteico de cultivos de micobacterias llamado derivado purificado de proteína (PPD). El PPD consta de la fracción hidrosoluble de los productos de lisis de *M. bovis* cepa AN5 tras un tratamiento térmico. Cuando la tuberculina bovina es inyectada por vía intradérmica en un animal cuyo sistema inmune ha sido sensibilizado por infección con *M. bovis* o alguna otra micobacteria que provoque una reacción cruzada, se producirá una inflamación significativa en el sitio de inyección a las 72 horas después de la inoculación. Aquellos animales que no han sido sensibilizados no producirán una respuesta inflamatoria significativa (de la Rúa-Domenech *et al.*, 2006). El tratamiento típico que se lleva a cabo para la elaboración del PPD bovino resulta en una mezcla de proteínas, lípidos y carbohidratos poco definidos que le dan una baja especificidad a la prueba. Por esta razón, se ha experimentado con proteínas específicas como candidatos para una tuberculina mucho más específica con la cual la exposición o sensibilización con MAP y/o

micobacterias ambientales no interfiera con el diagnóstico certero de tuberculosis (Flores-Villalva *et al.*, 2012).

La prueba simple de tuberculina consiste en inyectar la tuberculina por vía intradérmica en la base de la cola o el cuello del animal. El sitio de inyección es palpado y medido a las 72 horas post inoculación. La prueba doble comparativa consiste en inocular de forma intradérmica tuberculina bovina y tuberculina aviar en dos sitios diferentes de la tabla del cuello. El objetivo de esta modalidad de la prueba es incrementar la especificidad y permitir la discriminación de aquellos animales cuyo sistema inmune provoca una reacción inflamatoria por contacto con micobacterias del complejo *Mycobacterium avium* pero que son libres de tuberculosis (Francis *et al.*, 1978). El tipo de prueba intradérmica que se debe aplicar depende de la prevalencia de tuberculosis del hato que se va a estudiar y de la prevalencia de otras micobacterias que pueden sensibilizar al sistema inmune de los animales y provocar reacción inflamatoria tras la tuberculinización, es decir, es importante tomar en cuenta la prevalencia de paratuberculosis para decidir el tipo de prueba intradérmica que conviene utilizar. La hipersensibilidad hacia la tuberculina tarda en desarrollarse entre una y nueve semanas post infección (Kleeberg, 1960), sin embargo la potencia de la tuberculina debe ser adecuada para poder manifestar esta respuesta inmune celular. La prueba simple de tuberculina tiene una sensibilidad de entre 63.2% y 100% y una especificidad entre el 75.5% y 99% mientras que la de la prueba doble comparativa puede ser desde 52% hasta 100% sensible y un 78.8% y hasta 100% específica. A pesar de lo atractivos que parecen estos porcentajes es importante mencionar que la sensibilidad y la especificidad de la prueba puede variar ampliamente por diversos factores. En el cuadro 1 se mencionan algunos factores que pueden afectar la sensibilidad y especificidad de la prueba intradérmica de tuberculina (de la Rúa-Domenech *et al.*, 2006).

| | |
|--|---|
| Factores relacionados con el animal | Desensibilización por un periodo demasiado corto entre dos diferentes inoculaciones de tuberculina (menos de 60 días) |
| | Tiempo insuficiente post infección para despertar una respuesta inmune visible |
| | Anergia por una infección generalizada o crónica avanzada |
| | Previa exposición o coinfección con micobacterias que provocan una reacción cruzada |
| | Vacunación contra MAP |
| | Infección con virus que debilitan al sistema inmune |
| | Terapia con corticosteroides o algún otro fármaco inmunosupresor |
| | Eventos de estrés (nutrición deficiente, transportación, periodo post parto) |
| Factores relacionados con la tuberculina | Producto caduco |
| | Condiciones de almacenamiento inadecuado |
| | Errores de manufactura |
| Factores relacionados con el método de administración, lectura e interpretación | Cantidad inoculada insuficiente |
| | Inoculación subcutánea |
| | Inyección de PPD-B en el sitio del PPD-A y viceversa |
| | Lectura fuera de las 72 ±6 horas post tuberculinización |
| | Errores al documentar las lecturas |
| | Errores al identificar al animal reactor |

Cuadro 1. Factores que afectan la sensibilidad y especificidad de la prueba intradérmica de tuberculina (Modificado de: de la Rúa-Domenech *et al.*, 2006)

A pesar de que esta prueba ofrece numerosas ventajas y que su uso en diferentes países donde se ha logrado erradicar la tuberculosis bovina validan su eficacia, también presenta algunas limitaciones y desventajas como la subjetividad en la interpretación de los resultados y sobre todo, la presentación de falsos positivos por reacciones contra otras micobacterias, ya sean comensales o incluso por la infección con MAP, la cual ha sido

identificada en diversos estudios como responsable de falsos positivos en pruebas intradérmicas de tuberculina (Bezoz *et al.*, 2014). La prueba de tuberculina es considerada una buena prueba a nivel de hato pero una pobre prueba diagnóstica a nivel individual (de la Rúa-Domenech *et al.*, 2006). Por ejemplo, en Australia se logró erradicar la tuberculosis bovina basándose en la despoblación total de hatos con animales reactivos a la prueba simple de tuberculina. Mientras que en otros países como México, los programas de erradicación no han logrado su meta debido a que esta prueba no ofrece la suficiente confiabilidad a nivel individual. Mientras más grandes son los hatos bovinos y conforme el concepto de bienestar animal toma mayor importancia en el mundo, es menos justificable la despoblación total de un hato. Las limitaciones de esta prueba hacen necesario el uso de otros métodos de diagnóstico confirmatorios.

2.3.5.1.2 Prueba de Interferón Gamma (INF- γ)

La prueba de IFN- γ , al igual que la prueba de tuberculina, se basa en la detección de la respuesta inmune celular ante la presencia de la micobacteria. Ésta es una prueba *in vitro* que consiste en incubar la sangre periférica, recién colectada y heparinizada, a diferentes antígenos (típicamente al PPD bovino y PPD aviar) durante 16 a 24 horas para estimular la producción de IFN- γ por los linfocitos T. Posteriormente se cuantifica, mediante un ELISA comercial, la cantidad de IFN- γ que fue producido por las células sanguíneas durante la incubación.

El uso de la prueba de IFN- γ está aprobado en la Unión Europea desde 2002 y en Estados Unidos desde 2003 (Bezoz *et al.*, 2014). En México, la Campaña Nacional contra la Tuberculosis Bovina no considera al ensayo de IFN- γ dentro de las pruebas diagnósticas oficiales. A pesar de que logra superar algunas limitantes de la prueba de

tuberculina, se recurre a su uso sólo en algunos países y en ciertas situaciones zoonositarias difíciles. Se considera que el ensayo de INF- γ tiene un porcentaje de sensibilidad al menos igual que el de la prueba de tuberculina, con la ventaja de que esta prueba logra diagnosticar a los animales infectados en una etapa más temprana de la infección de lo que lo hace la prueba de tuberculina. De la Rua-Domenech *et al.* (2006) recopila en una revisión, diferentes publicaciones donde la sensibilidad de la prueba de INF- γ va desde 73% hasta 100% y especificidad entre 85 y 99.6%. La discrepancia entre los diferentes resultados depende, entre otros factores, de las características del ganado que se evaluó en cada trabajo, los puntos de corte determinados por cada autor y la tuberculina utilizada. Otra ventaja que ofrece la prueba de INF- γ en comparación con la prueba de tuberculina es que elimina la necesidad de una segunda visita a la explotación pecuaria para la lectura de resultados, además de que los resultados son más objetivos y estandarizados, y en caso de ser necesario, se puede repetir la prueba sin la necesidad de esperar 60 días. Claramente, el ensayo de INF- γ tiene numerosas ventajas, desafortunadamente, también posee desventajas como el elevado costo, la necesidad de procesar las muestras clínicas casi inmediatamente, el requerimiento de personal calificado para obtener resultados confiables y la especificidad, que es menor que la de la prueba doble comparativa de tuberculina. Por lo cual, esta prueba no es utilizada como primera opción, sino que su uso generalmente se limita a casos de brotes agresivos, como prueba auxiliar y paralela a la prueba tamiz (Bezós *et al.*, 2014).

2.3.5.2 Pruebas empleadas en el diagnóstico de tuberculosis bovina que detectan la respuesta inmune humoral

La tuberculosis subclínica progresa a la etapa clínica a medida que la respuesta inmune del hospedador pasa de ser una respuesta predominantemente mediada por células a

una respuesta humoral mediada por anticuerpos. Esto es, algunos animales con tuberculosis crónica o generalizada son incapaces de mostrar una respuesta inmune celular y por lo tanto las pruebas de tuberculina e IFN- γ no logran identificar a estos animales como positivos (Lepper, Pearson y Corner, 1977). A estos animales se les conoce como anérgicos y representan una peligrosa fuente de infección para sus congéneres (Bezoz *et al.*, 2014). El título de anticuerpos puede variar significativamente durante la infección pero principalmente son producidos en etapas avanzadas de la enfermedad, por lo que los animales anérgicos pueden ser identificados mediante pruebas serológicas (Pollock y Neill, 2002).

2.3.5.2.1 ELISA

De las pruebas que detectan anticuerpos, el ELISA es el más adecuado para el diagnóstico de tuberculosis, ya que ofrece la facilidad de trabajar varias muestras al mismo tiempo, es sencillo, económico, rápido y permite la estandarización de la técnica en diferentes laboratorios (Cho *et al.*, 2007). Este examen puede ser utilizado como prueba complementaria ya que, a pesar de que es capaz de detectar a aquellos animales anérgicos, su sensibilidad en etapas subclínicas de la tuberculosis bovina no es adecuada para su uso como prueba primaria (OIE, 2009). Ha sido de utilidad para el diagnóstico de tuberculosis en algunos animales silvestres y de zoológico (Greenwald *et al.*, 2003), por lo que ha sido adoptado por los gobiernos de Estados Unidos de América y del Reino Unido para el diagnóstico en primates no humanos y tejones.

2.3.5.3 Diagnóstico anatomopatológico e histológico

El diagnóstico presuntivo post-mortem de tuberculosis bovina puede hacerse durante la necropsia y mediante la observación de cortes histológicos detectando las lesiones microscópicas típicas de la enfermedad como necrosis caseosa, mineralización, células epitelioides, células gigantes multinucleadas y macrófagos. La presencia de *M. bovis* o de otras micobacterias del CMt puede detectarse mediante frotis y cortes histológicos de órganos afectados y teñidos mediante la técnica de Ziehl-Neelsen o alguna otra tinción que permita reconocer a los bacilos ácido-alcohol resistentes. El examen microscópico es una prueba práctica, sin embargo, carece de una sensibilidad adecuada ya que las lesiones frecuentemente suelen ser paucibacilares, por lo que es recomendable la confirmación mediante otras técnicas (OIE, 2009).

2.3.5.4 Identificación del agente o parte de él

2.3.5.4.1 Cultivo y aislamiento bacteriológico

El aislamiento bacteriológico se utiliza frecuentemente como una prueba confirmatoria para aquellos animales reactivos a la prueba intradérmica de tuberculina. Para el cultivo suelen utilizarse muestras de leche, sangre, tejidos, hisopados nasales e inclusive muestras ambientales (de la Rúa-Domenech *et al.*, 2006). Ésta se considera la prueba de oro para el diagnóstico de tuberculosis bovina, pues su especificidad es mayor a la de cualquier otra prueba (Courcoul *et al.*, 2014), pero su sensibilidad es limitada. Además, por ser una micobacteria de crecimiento lento, el cultivo tarda al menos 4 semanas, lo que la hace una prueba poco práctica para el diagnóstico antemortem (OIE, 2009). Cuando el cultivo bacteriológico se hace posterior a la muerte del animal, se toman muestras de los tejidos que presenten lesiones o de aquellos que frecuentemente se ven afectados como

pulmones, linfonodos mediastínicos, submandibulares y retrofaríngeos. Estos son macerados y descontaminados para posteriormente centrifugar la suspensión y utilizar el sedimento para el cultivo, el cual puede hacerse con medios a base de huevo como Löwenstein-Jensen, Coletsos, Herrold o Stonebrink. También pueden utilizarse medios a base de agar como Middlebrook para el cultivo primario. El tiempo de incubación es preferentemente de 10 a 12 semanas (OIE, 2009). La morfología de la colonia y de las bacterias además de la propiedad de ácido alcohol resistencia pueden dar presunción de la presencia de *M. bovis*, sin embargo, es importante mejorar la especificidad mediante pruebas bioquímicas complementarias o mediante ensayos de identificación de secuencias de ácidos nucleicos como la PCR.

2.3.5.4.2 PCR

Un método alternativo para el diagnóstico de tuberculosis bovina es la identificación de secuencias específicas de DNA mediante PCR (Nahar *et al.*, 2011; Courcoul *et al.*, 2014; Sabry y Elkerdasy, 2014). Esta prueba ofrece varias ventajas como la practicidad y la rapidez en comparación con el cultivo bacteriológico. La alta especificidad de esta prueba se ha calculado alrededor de 97% (Courcoul *et al.*, 2014). Su uso como prueba confirmatoria antemortem, tiene la desventaja de una variada sensibilidad que va desde 61.1% hasta 90.9% (Parra *et al.*, 2008; Courcoul *et al.*, 2014), dependiendo entre otros factores, de la muestra clínica que se tome y la etapa de la enfermedad en la que se encuentra el animal al momento de colectarla. Por esta razón, algunos autores consideran que es poco realista considerar que este método puede reemplazar a las pruebas inmunológicas (de la Rúa-Domenech *et al.*, 2006). Por otro lado, existen algunos estudios que afirman que la PCR puede ser usada como un examen diagnóstico rápido, eficiente y preciso (Sabry y Elkerdasy, 2014).

El uso de esta prueba es cada vez más frecuente para el diagnóstico de tuberculosis pulmonar en humanos, utilizando esputo como muestra clínica. Frecuentemente, se utilizan métodos automatizados de diagnóstico que además de confirmar la presencia del bacilo, se determina si la cepa problema es resistente a los antifímicos de primera elección en el sector de salud (López-Revilla, 2015). Por otro lado, se han realizado pruebas para determinar la sensibilidad y especificidad de esta prueba utilizando sangre periférica como muestra clínica. Los resultados han sido variables, habiendo autores que declaran que la PCR a partir de muestras de sangre resulta útil únicamente en pacientes que se encuentran inmunocomprometidos. No obstante, existen autores que desafiaron esta declaración, por ejemplo, Ahmed *et al.* (1998) declararon una sensibilidad del 43.75% de esta prueba a partir de ADN de leucocitos de sangre periférica de un grupo de pacientes inmunocompetentes con tuberculosis pulmonar diagnosticados mediante baciloscopía de esputo. Los autores discuten que la sensibilidad en este trabajo podría estar subestimada pues los pacientes tenían dos semanas bajo tratamiento con antibióticos. El diagnóstico de tuberculosis bovina por PCR utilizando muestras de sangre ha sido experimentado por algunos autores con resultados satisfactorios (Mishra *et al.*, 2005; Sabry y Elkerdasy, 2014), no obstante, no suele utilizarse como prueba diagnóstica de campo debido a que las fases de bacteremia suelen ser intermitentes y la cantidad colectada en la muestra clínica puede no ser suficiente.

La secuencia de inserción IS6110, presente en todos los miembros del CMT, ha servido como marcador clave en la investigación epidemiológica del CMT (Safi *et al.*, 2004). La amplificación de fragmentos de este elemento móvil de 1,358 pb, ha sido utilizada ampliamente para el diagnóstico del CMT por PCR, por ser un elemento genético altamente conservado en estos microorganismos (Sanjuan-Jimenez *et al.*, 2013; Courcoul *et al.*, 2014). También se han estudiado secuencias para la diferenciación entre las

especies del CMT, tales como las regiones de diferencia RD1, RD4, RD9 y RD12. La amplificación de estas secuencias ha resultado útil para reconocer al agente causal específico en infecciones por componentes del CMT, ya sea posterior al aislamiento bacteriológico o directamente a partir de muestras clínicas (Halse *et al.*, 2011).

Es fácil notar que hasta la fecha no se cuenta con un método diagnóstico perfecto. Es decir, que además de contar con una sensibilidad y una especificidad perfecta, sea una prueba económica, práctica y rápida. Así mismo, es importante mencionar que tanto la naturaleza de la pared celular de las micobacterias descritas, como la cronicidad de los padecimientos que provocan, complican aún más el diagnóstico. Una prueba con sensibilidad deficiente disminuye considerablemente la posibilidad de identificar a animales infectados en hatos de baja prevalencia y con ello aumentar el riesgo de brotes. Por otro lado, una especificidad inadecuada dará como resultado la matanza innecesaria e injustificada de animales reactores falsos positivos. Si bien esto puede parecer de poca importancia en un hato con una alta prevalencia y donde el objetivo es el control y erradicación de las enfermedades, en un hato con una baja prevalencia, la matanza de estos animales es injustificada y representará una pérdida económica innecesaria del productor. Al no contar con una prueba diagnóstica perfecta para todas las etapas de las enfermedades, es recomendable mantener un programa de vigilancia periódica donde se combine el uso de diferentes pruebas para incrementar la fidelidad del diagnóstico. La combinación de diferentes métodos de diagnóstico pueden incrementar la identificación de animales infectados en diferentes etapas ayudando así a un diagnóstico más acertado y un mejor control de la enfermedad (Schiller *et al.*, 2010).

3 Justificación

La paratuberculosis y la tuberculosis bovina son enfermedades micobacterianas que además de ser un riesgo para la salud de los humanos, provocan grandes pérdidas económicas en el sector agropecuario (Miranda Bandera, 2005; Schiller *et al.*, 2010; Lombard, 2011). El control de estas enfermedades es imprescindible para frenar y disminuir tales pérdidas. La paratuberculosis, es una enfermedad que no ha despertado suficiente interés en las autoridades mexicanas, puesto que el país carece de una planificación oficial para su control. Por otro lado, la tuberculosis bovina cuenta con un programa de control y erradicación oficial desde 1996. Si bien se asegura que la prevalencia ha disminuido gracias a la campaña (SENASICA, 2015), la regulación no ha sido del todo efectiva en unidades lecheras ni en hatos con función zootécnica distinta, como el ganado de lidia, debido a que las disposiciones oficiales no se ajustan a las necesidades de los productores. Para un eficiente control de estas enfermedades se debe tomar en cuenta el costo-beneficio de las acciones a tomar y en la medida de lo posible, evitar mayores pérdidas económicas a los productores. Por tal motivo, se debe contar con un sistema diagnóstico integral y preciso. Tal como se mencionó anteriormente, el diagnóstico de las enfermedades de curso crónico, como son la paratuberculosis y la tuberculosis bovina, es complicado y por ello se ha sugerido que se realicen diferentes tipos de prueba simultáneamente (Schiller *et al.*, 2010). Adicionalmente, la relación genética que tienen estas dos bacterias ha sido causa de baja especificidad en las pruebas de rutina (Bezoz *et al.*, 2014), induciendo a la matanza innecesaria de animales y con ello a pérdidas económicas adicionales. Por su alta especificidad, la PCR ha demostrado ser una herramienta útil para complementar el diagnóstico de la campaña. Ésta ha sido ampliamente utilizada para confirmar el crecimiento de micobacterias en

medios de cultivo y también ha servido como prueba diagnóstica mediante la amplificación de fragmentos de DNA directamente de muestras clínicas. Sin embargo, hasta ahora no se han publicado trabajos donde se informe el uso de esta técnica para el diagnóstico simultáneo antemortem de paratuberculosis y tuberculosis bovina, por lo que el presente trabajo pretende demostrar su utilidad como prueba diagnóstica a partir de muestras sanguíneas. Las ventajas de utilizar este tipo de muestra se asocian a que la colecta de estas no es invasiva y que pueden utilizarse para el diagnóstico de las dos enfermedades micobacterianas, puesto que se han demostrado periodos de bacteremia en ambas micobacteriosis, que aunque son intermitentes, pueden darse tanto en etapas subclínicas como clínicas (Bower *et al.*, 2011).

4 Hipótesis

El diagnóstico simultáneo de *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* y del complejo *Mycobacterium tuberculosis*, a partir de muestras de sangre de bovinos, es posible mediante la amplificación de fragmentos de DNA.

5 Objetivo general

Estandarizar las condiciones para el diagnóstico simultáneo de *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* y del complejo *Mycobacterium tuberculosis* mediante un ensayo de PCR multiplex en bovinos a partir de muestras de sangre.

6 Objetivos específicos

Identificar regiones del genoma de MAP y del CMt que sean específicas de cada especie y que sean apropiadas como secuencias para el diagnóstico de paratuberculosis y tuberculosis bovina mediante PCR.

Diseñar los iniciadores que permitan la amplificación simultánea de fragmentos de diferente tamaño molecular de MAP, *M. bovis* y *M. tuberculosis*.

Establecer y estandarizar las condiciones de la PCR para la amplificación de las secuencias establecidas tanto de MAP como del CMt utilizando DNA testigo.

Establecer y estandarizar las condiciones de la PCR para la amplificación de las secuencias establecidas tanto de MAP como del CMt utilizando DNA de muestras clínicas testigo.

Evaluar el protocolo establecido a partir de DNA obtenido de sangre periférica de bovinos sospechosos a paratuberculosis y tuberculosis bovina, comparando los resultados obtenidos con los del diagnóstico por PCR IS900 y PCR IS6110.

Comparar los resultados del diagnóstico de paratuberculosis por PCR IS900 y por PCR Multiplex con los resultados obtenidos mediante ELISA P35.

7 Material y Métodos

7.1 Diseño del estudio

Se emplearon 120 muestras de sangre periférica de bovinos con sospecha de paratuberculosis y tuberculosis bovina, remitidas al Laboratorio de Microbiología Molecular de la USEDICO del CEIEPAA, donde se realizó la extracción de DNA de dichas muestras, así como el diagnóstico de paratuberculosis, el cual se hizo mediante el protocolo de PCR para la amplificación de un fragmento de 314 pb de la secuencia de inserción IS900 de MAP, informado por Ayele *et al.* (2005) y por López-Yurame (2014). Asimismo, se realizó el diagnóstico de tuberculosis bovina, utilizando el protocolo de PCR para la amplificación de un fragmento de 275 pb de la secuencia de inserción IS6110, informado por Zumárraga *et al.* (2005). Posteriormente, las muestras fueron procesadas siguiendo el protocolo de PCR multiplex que se diseñó y estandarizó en la Unidad de Microarreglos de DNA del Instituto de Fisiología Celular (IFC) de la UNAM. Los resultados de los distintos protocolos fueron comparados mediante estadística descriptiva.

7.2 Muestras clínicas

7.2.1 Hatos de estudio

7.2.1.1 Hato A

El hato A es una producción de ganado de lidia del Estado de México con un total de 110 cabezas, el cual, no ha presentado antecedentes clínicos a paratuberculosis y en un estudio previo resultó negativo a la misma mediante cultivo de 52 semanas y PCR IS900, sin embargo, resultó positivo a ELISA P35 (Castrellón-Ahumada, información no publicada) en un 64%. Cabe aclarar que el productor informa que algunos de los animales fueron inmunizados contra paratuberculosis. Por otro lado, tampoco presenta

antecedentes clínicos a tuberculosis, sin embargo, presentó una prevalencia del 5% mediante la prueba de PCR IS6110 a partir de muestras de sangre.

7.2.1.2 Hatos B y C

El segundo y tercer hato son ganaderías especializadas en la producción de leche del Estado de Querétaro. El hato B cuenta con un total de 392 cabezas, mientras el hato C cuenta con 672 cabezas. Los productores refieren haber presentado antecedentes clínicos tanto de paratuberculosis como de tuberculosis, así como animales reactivos a la prueba intradérmica de tuberculina. A pesar de que se eliminaron animales con la intención de controlar la incidencia de tuberculosis bovina, se dejó de dar seguimiento al programa por cuestiones económicas, por lo que las prevalencias actuales se desconocen.

7.2.2 Tamaño mínimo de muestra para demostrar la presencia de las enfermedades

Para su determinación, se utilizó la ecuación propuesta por Canon y Roe (Jaramillo Arango y Martínez Maya, 2010):

$$n = [1 - (1 - \alpha)^{1/E}] [N - ((E - 1)/2)]$$

Dónde:

N = Total de individuos en la población

E = Número probable de individuos afectados, es decir, la prevalencia estimada por el número de individuos de la población

α = Nivel de confianza

Tomando la prevalencia de paratuberculosis para el estado de Querétaro estimada por Chávez-Gris *et al.* (2009), la cual es de 19.95%, se calculó como mínimo 14 muestras clínicas para demostrar la presencia de la enfermedad de Johne en el hato B, y 15 muestras para el hato C. Para hato A, se tomó la prevalencia de 4.06% para el Estado de México, estimada por Chávez-Gris *et al.* (2009), con lo que se calculó un tamaño mínimo de 47 muestras clínicas.

Así mismo, tomando en cuenta la prevalencia de tuberculosis bovina en cuencas lecheras informada por el Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA, 2015), la cual es del 16.5%, se determinó un mínimo de 17 muestras para determinar la presencia de tuberculosis en el hato B y C. Para el hato A, se tomó en cuenta la prevalencia calculada en un durante el 2014, la cual resultó ser del 5%, con lo cual se determinó que el tamaño mínimo de muestra sería de 41.

En total se procesaron por conveniencia, 120 muestras clínicas de los tres hatos estudiados. Del hato A se procesaron 69 muestras clínicas, correspondientes al total de los vientres del hato. Del Hato B y C se procesaron 33 y 18 muestras clínicas respectivamente, de bovinos seleccionados aleatoriamente.

7.2.3 Preparación de muestras y extracción de DNA.

Las muestras clínicas sanguíneas en tubos con anticoagulante EDTA fueron remitidas al Laboratorio de Microbiología Molecular de la USEDICO del CEIEPAA donde fueron procesadas. Los tubos con las muestras clínicas de sangre completa fueron centrifugados a 3,220 X g durante 5 minutos para separar la capa flogística del plasma y eritrocitos. Se tomaron 400 µl de plasma, se guardaron en tubos de microcentrífuga y se congelaron a

-80°C hasta su uso. La capa leucoplaquetaria fue transferida a un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml.

La extracción de DNA de los glóbulos blancos se realizó mediante el uso de columnas comerciales *EZ-10 Spin Column Blood DNA MiniPreps kit*® (BIO BASIC). El procedimiento se realizó de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Al finalizar la extracción se llevó a cabo la electroforesis de 3 µl del DNA junto con 2 µl de solución amortiguadora de carga, en un gel de agarosa al 1.5%, durante 45 minutos a 100 Volts. Posteriormente, el gel fue teñido con bromuro de etidio y visualizado en un transiluminador de luz U.V. *UV Transilluminator M-20* (UVP, Analytik Jena). La presencia de bandas de alto tamaño molecular que mostraran una intensidad similar a la del marcador de tamaño molecular *50 bp ladder [1.0 µg/µl]* (Invitrogen, Life Technologies) sugieren que el DNA conserva su integridad.

7.3 Detección de MAP por PCR IS900

7.3.1 Testigos

7.3.1.1 DNA testigo

Se utilizó como testigo positivo, el DNA genómico de colonias de MAP, cultivadas a partir de heces de un caso clínico en el Laboratorio de Microbiología Molecular de la USEDICO del CEIEPAA. La extracción de DNA de colonias de MAP se realizó mediante choque térmico. Dentro de un gabinete de bioseguridad tipo 2 *BIO-II-A* (Azbil Telstar), se tomó con un asa bacteriológica algunas colonias de la superficie del medio de cultivo y se depositaron en un tubo de microcentrífuga con 100 µl de agua ultra pura. El tubo fue incubado a 100°C durante 20 minutos. Al terminar el tiempo de incubación, el tubo se

centrifugó a 16,000 X *g* durante 5 minutos. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo. Se llevó a cabo la electroforesis de 3 µl del contenido del tubo junto con 2 µl de solución amortiguadora de carga en un gel de agarosa al 1.5%, durante 45 minutos a 100 volts. Posteriormente, el gel fue teñido con bromuro de etidio y visualizado en un transiluminador de luz U.V. *UV Transilluminator M-20* (UVP, Analytik Jena). La presencia de bandas de alto tamaño molecular mostrando una intensidad similar a la del marcador de tamaño molecular *50 bp ladder [1.0 µg/µl]* (Invitrogen, Life Technologies) sugieren que el DNA conserva su integridad.

El DNA genómico de *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* cepa K10 (ATCC BAA-968-D-5), fue utilizado también como testigo positivo de la PCR IS900. Así mismo, este protocolo fue probado con DNA genómico de *M. intracellulare*, *M. smegmatis* (ATCC 700084D-5), *M. bovis* BCG (donación de la Doctora Yolanda López Vidal de la Facultad de Medicina de la UNAM), *M. tuberculosis* (ATCC 25177D-5) y *M. bovis* (Donación del Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica [INDRE]) como testigos negativos.

7.3.1.2 Muestra clínica testigo

La muestra clínica que se utilizó como el testigo positivo de paratuberculosis fue una muestra de sangre de un caprino, proveniente del rebaño caprino del CEIEPAA, que mostró signos clínicos sugerentes a paratuberculosis (pobre condición corporal, heces pastosas), resultó positivo a la prueba de ELISA P35 (Castrellón-Ahumada, 2012) y a la tinción de Ziehl-Neelsen en frotis de heces.

7.3.2 Iniciadores y condiciones de la PCR

Las muestras de DNA fueron probadas mediante PCR para la amplificación de un fragmento de 314 pb de la secuencia de inserción IS900 (secuencia reportada en el *Genbank* del NCBI con el número de acceso S74401.1) utilizando un termociclador *Hybaid Px2 Gradient Thermal Cycler* (Thermo Electron). Se utilizaron los iniciadores designados como P3N (5' GGG TGT GGC GTT TTC CG 3') y P5N (5' ATT TCG CCG CCA CCG CCA CG 3') (Invitrogen™, Life Technologies®) (Ayele *et al.*, 2005; López-Yurame, 2014). El contenido de reacción de amplificación y las condiciones de la PCR se especifican en el Apéndice 1.

En cada serie de reacciones se incluyó a un testigo positivo, así como un testigo negativo, sustituyendo la muestra de DNA por agua ultra pura, para descartar la posibilidad de contaminación cruzada.

Se llevó a cabo la electroforesis en un gel de agarosa al 1.5% durante una hora a 90 volts de los productos de PCR y de un marcador de tamaño molecular de 50 pb *50 bp ladder* [1.0 µg/µl] (Invitrogen, Life Technologies). Las muestras fueron consideradas como positivas a la presencia de MAP cuando el fragmento amplificado resultara de un tamaño de 314 pb.

7.3.3 Concentración mínima detectable

Para estimar la sensibilidad de la prueba de PCR, se cuantificó el DNA contenido en el testigo positivo por medio de un espectrofotómetro *Nanodrop ND-1000* (Thermo Scientific). Se hicieron diluciones décuples seriadas del testigo positivo para utilizarse en la PCR bajo las mismas condiciones mencionadas anteriormente. Se llevó a cabo la electroforesis de los productos de PCR en un gel de agarosa al 1%, a 90 Volts durante una hora. Este fue teñido con bromuro de etidio y visualizado en un transiluminador de luz

U.V. *UV Transilluminator M-20* (UVP Analytik Jena). La concentración mínima detectable se determinó tomando en cuenta la última dilución en la que se puede amplificar y observar un producto de PCR, mientras que las UFC fueron determinadas con base en lo informado por Mishra *et al.* (2005), quién utiliza una relación de 10^6 bacilos por 10 ng de DNA.

7.4 Detección del CMt por PCR IS6110

7.4.1 Testigos

7.4.1.1 DNA testigo

Para la detección de bacterias del CMt mediante PCR IS6110 se utilizó como testigo positivo del Complejo *Mycobacterium tuberculosis*, DNA genómico de *Mycobacterium bovis* BCG, donado por la Doctora Yolanda López Vidal de la Facultad de Medicina de la UNAM, así como DNA genómico de *M. tuberculosis* (ATCC 25177D-5) y DNA genómico de *M. bovis*, donado por el INDRE. Así mismo, el protocolo fue probado con DNA genómico de *M. intracellulare*, *M. smegmatis* (ATCC 700084D-5) y MAP cepa K10 (ATCC BA-968-D-5) para descartar la posibilidad de reacciones cruzadas por estas micobacterias.

7.4.1.2 Muestra clínica testigo

Como testigo positivo de tuberculosis bovina, se utilizó la muestra sanguínea de un bovino que resultó positivo al CMt mediante PCR IS6110 y cuyo amplicón fue purificado mediante el estuche comercial *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen) según las indicaciones del fabricante, para posteriormente ser secuenciado y buscar una homología con la secuencia reportada en el Genbank del NCBI. La secuenciación se realizó en la Unidad de Biología

Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM. Por cuestiones de bioseguridad, no se llevaron a cabo más pruebas para diagnóstico de tuberculosis bovina.

7.4.2 Iniciadores y condiciones de la PCR

Las muestras clínicas fueron probadas mediante PCR para la amplificación de un fragmento de 275 pb de la secuencia de inserción IS6110 (secuencia reportada en el *Genbank* del NCBI con el número de acceso X57835.2) en un termociclador *Hybaid Px2 Gradient Thermal Cycler* (Thermo Electron). Se utilizaron los iniciadores designados como INS1 (5' CGT GAG GGC ATC GAG GTG GC 3') e INS2 (5' GCG TAG GCG TCG GTG ACA AA 3') (Invitrogen™ de Life Technologies®) (Zumárraga *et al.*, 2005). El contenido de cada reacción de amplificación y las condiciones de la PCR se especifican en el Apéndice 2.

En cada serie de reacciones se incluyó a un testigo positivo, así como un testigo negativo, sustituyendo la muestra de DNA por agua ultra pura, para descartar la posibilidad de contaminación cruzada.

Se llevó a cabo la electroforesis en un gel de agarosa al 1.5% durante una hora a 90 volts de los productos de PCR y de un marcador de tamaño molecular *50 bp ladder [1.0 µg/µl]* (Invitrogen, Life Technologies). Las muestras fueron consideradas como positivas a la presencia del CMt cuando el fragmento amplificado resultara de un tamaño de 275 pb.

7.4.3 Concentración mínima detectable

Para estimar la sensibilidad de la prueba de PCR, se cuantificó el DNA contenido en el testigo positivo por medio de un espectrofotómetro *Nanodrop ND-1000* (Thermo Scientific). Se hicieron diluciones décuples seriadas del testigo positivo para utilizarse en

la PCR bajo las mismas condiciones mencionadas anteriormente. Se realizó la electroforesis de los productos de PCR en un gel de agarosa al 1%, a 90 Volts durante una hora. Este fue teñido con bromuro de etidio y visualizado en un transiluminador de luz U.V. *UV Transilluminator M-20* (UVP, Analytik Jena). La concentración mínima detectable se determinó tomando en cuenta la última dilución en la que se puede amplificar y observar un producto de PCR, mientras que las UFC fueron determinadas con base en lo informado por Mishra *et al.* (2005), quién utiliza una relación de 10^6 bacilos por 10 ng de DNA.

7.5 PCR multiplex

El diseño, estandarización y experimentación de la PCR multiplex fueron llevados a cabo en la Unidad de Microarreglos de DNA del IFC de la UNAM. Se analizaron las secuencias del genoma de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (secuencia informada en el *Genbank* del NCBI con el número de acceso NZ_CP009480.1), *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* cepa K-10 (secuencia informada en el *Genbank* del NCBI con el número de acceso NC_002944.2) y *Mycobacterium bovis* BCG cepa México (secuencia informada en el *Genbank* del NCBI con el número de acceso NC_016804.1). Con el objetivo de obtener productos de amplificación que fueran fáciles de diferenciar, se buscaron secuencias de 1000, 500 y 250 pb, respectivamente, por medio de alineaciones BLAST, que fueran específicas de MAP y del CMT.

7.5.1 Testigos

Se utilizaron como testigos positivos DNA genómico de *Mycobacterium tuberculosis* (ATCC 25177D-5), *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* cepa K-10 (ATCC BAA-968-D-5) y *Mycobacterium bovis* donación del INDRE, así como DNA genómico de colonias de MAP cultivadas a partir de un caso clínico en el Laboratorio de Microbiología Molecular de la USEDICO del CEIEPAA.

7.5.2 Iniciadores y condiciones de la PCR

Los iniciadores se diseñaron utilizando el programa eprimer3 de EMBOSS (disponible en la página: <http://emboss.bioinformatics.nl/cgi-bin/emboss/eprimer3>), y fueron sintetizados en la Unidad de Biología Molecular del IFC de la UNAM. La secuencia de cada iniciador y la concentración utilizada se especifican en el Apéndice 3, así como el contenido de cada reacción de amplificación y las condiciones de la PCR.

En cada serie de reacciones se incluyó a los testigos positivo y negativo. Se llevó a cabo la electroforesis de los productos de PCR junto con 4 µl de solución amortiguadora de carga en un gel de agarosa al 1% a 90 volts durante una hora. Posteriormente, éste fue teñido con bromuro de etidio y visualizado en un transiluminador de luz U.V. *UV Transilluminator M-20* (UVP, Analytik Jena).

7.5.3 Concentración mínima detectable

Para estimar la sensibilidad de la prueba de PCR, se cuantificó el DNA contenido en cada uno de los testigos por medio de un espectrofotómetro *Nanodrop ND-1000* (Thermo Scientific). Se hicieron diluciones décuples seriadas de los testigos positivos para

utilizarse en la PCR bajo las mismas condiciones mencionadas anteriormente. Se realizó la electroforesis de los productos de PCR en un gel de agarosa al 1%, a 90 Volts durante una hora. Este fue teñido con bromuro de etidio y visualizado en un transiluminador de luz U.V. *UV Transilluminator M-20* (UVP, Analytik Jena). La concentración mínima detectable se determinó tomando en cuenta la última dilución en la que se puede amplificar y observar un producto de PCR, mientras que las UFC fueron determinadas con base en lo informado por Mishra *et al.* (2005), quién utiliza una relación de 10^6 bacilos por 10 ng de DNA.

7.6 Diferenciación entre *M. bovis* y *M. tuberculosis* mediante PCR RD9

La secuencia de la región de diferencia RD9 de *Mycobacterium bovis* BCG (informada en el *Genbank* con el número de acceso Y18604.1) fue utilizada para poder diferenciar infecciones de *M.bovis* y *M. tuberculosis* en aquellas muestras positivas al CMt mediante PCR multiplex. Se utilizó DNA genómico de *M. tuberculosis* (ATCC 25177D-5) y *M. bovis* (donación del INDRE) como testigos positivos, obteniendo amplificadores de 2,470 pb y 481 pb, respectivamente.

Los iniciadores, el contenido de las reacciones de amplificación y las condiciones de la PCR se mencionan en el Apéndice 4.

7.7 ELISA P35

El diagnóstico de paratuberculosis por ELISA fue elaborado por Castellón-Ahumada (información no publicada) siguiendo el procedimiento descrito por la misma (Castrellón-Ahumada, 2012), en el cual se detectó la presencia de anticuerpos contra la proteína de membrana de 35 kDa de MAP (P35), para lo cual se colocaron 100 µl de fago M13 expresando la proteína P35 de MAP a una concentración de 2.1×10^{10} fagos/ml en cada pozo para la sensibilización.

Se realizó una preadsorción de los sueros problema, utilizando una suspensión de *M. phlei* a una concentración de 0.2 mg/ml. Tras una noche de incubación, se añadió a cada pozo de la placa, 1 µl de la mezcla de suero y 99 µl de PBS-TG. Se dejó incubando durante 2 horas y posteriormente se lavaron las placas con PBS-TG.

Se utilizó anti-IgG de cabra conjugado con una peroxidasa (ZYMED) a una dilución de 1/4,000 con PBS-TG. Se agregaron 100 µl de esta solución a cada pozo de la placa y se dejó incubar durante 2 horas. Se lavaron tres veces las placas con PBS-TG.

Se preparó una solución de revelado agregando 0.011 mg de ABTS en 50 mg de solución de citrato 0.05M. Al momento de el revelado se agregó a ésta 19 µl de peróxido de hidrógeno y se colocaron 100 µl de la mezcla en cada pozo. Tras 10 minutos de incubación, se hizo la lectura mediante un lector de placas de ELISA *ELx800* (Biotek) con un filtro de 405 nm.

7.8 Interpretación de resultados

Los resultados fueron analizados mediante estadística descriptiva, indicando los porcentajes de positividad de cada una de las pruebas realizadas. Los resultados del diagnóstico mediante PCR multiplex fueron comparados contra los del diagnóstico por PCR IS900 y PCR IS6110, así como con los de ELISA P35.

8 Resultados

8.1 Detección de MAP por PCR IS900

Del total de 120 bovinos muestreados, 0.83% (1 bovino) resultó positivo a MAP mediante esta prueba (Figura 2), el cual pertenece al hato B, del cual se procesaron 33 muestras por lo cual el porcentaje de positividad del hato es del 3.03%. No se presentaron reacciones cruzadas al utilizar DNA de los testigos negativos (*M. intracellulare*, *M. smegmatis*, *M. bovis* y *M. tuberculosis*) con este protocolo.

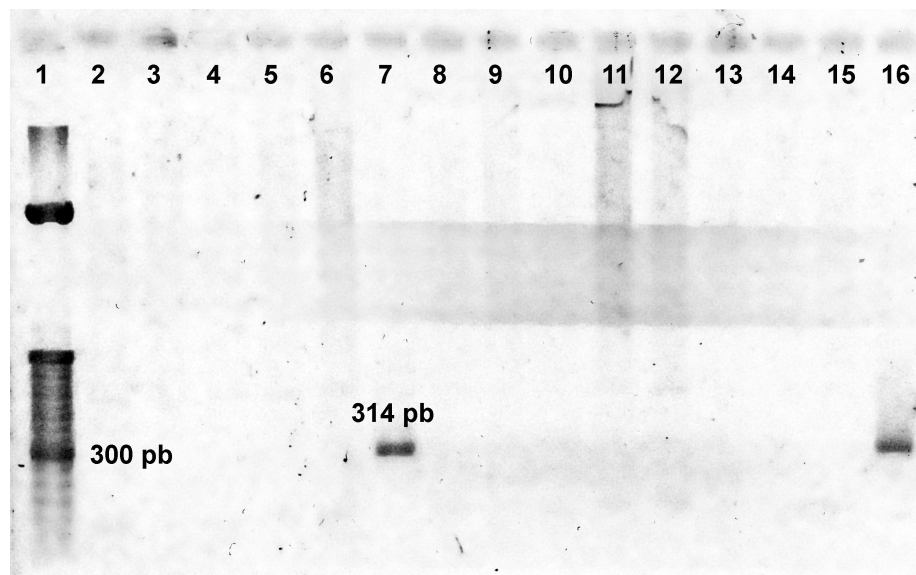


FIGURA 2. Gel de electroforesis de los productos de PCR IS900. Carriles: 1) Marcador de tamaño molecular de 50 pb. 2-14) Muestras clínicas. 15) Testigo negativo: sin muestra de DNA 16) Testigo positivo: DNA de colonias de MAP cultivadas en el LMM del CEIEPAA.

8.2 Detección del CMt por PCR IS6110

Del total de 120 bovinos muestreados, 4.16% (5 bovinos) resultaron positivos al CMt mediante esta prueba (Figuras 3 y 4). Todos los bovinos positivos al CMt mediante esta prueba pertenecen al hato A, de donde se colectaron y procesaron las muestras clínicas de 69 animales, por lo que el 7.24% del hato se considera positivo a la presencia del CMt. La posibilidad de reacciones cruzadas con *M. intracellulare* y *M. smegmatis* y MAP fue descartada al probar el protocolo con el DNA de estas micobacterias y obtener resultados negativos.

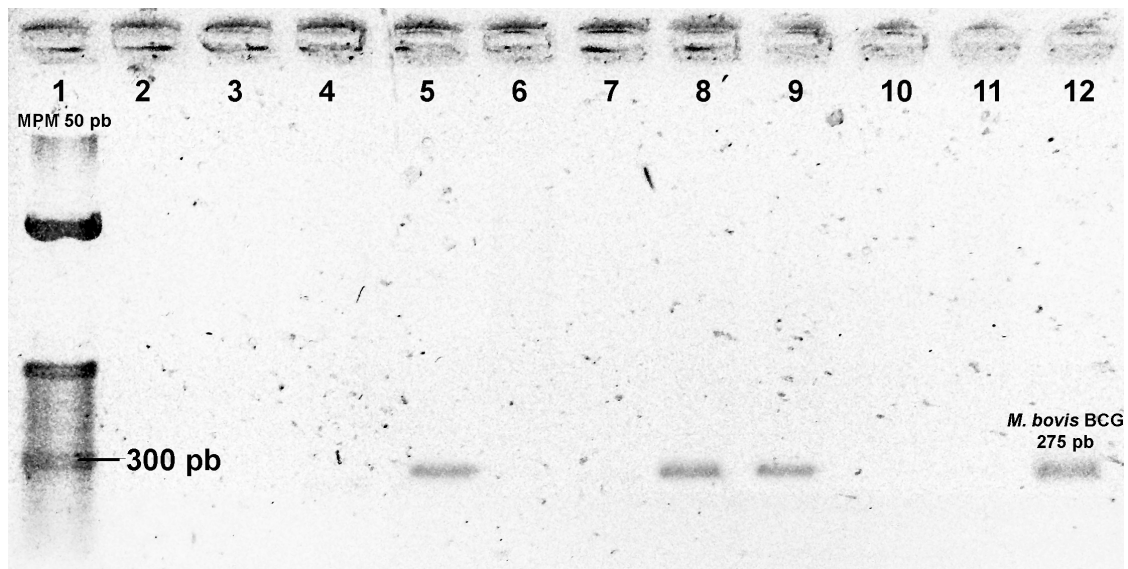


FIGURA 3. Gel de electroforesis de los productos de PCR IS6110. Carriles: 1) Marcador de tamaño molecular de 50 pb. 2-10) Muestras clínicas. 11) Testigo negativo: sin muestra de DNA. 12) Testigo positivo: DNA de *M. bovis* BCG

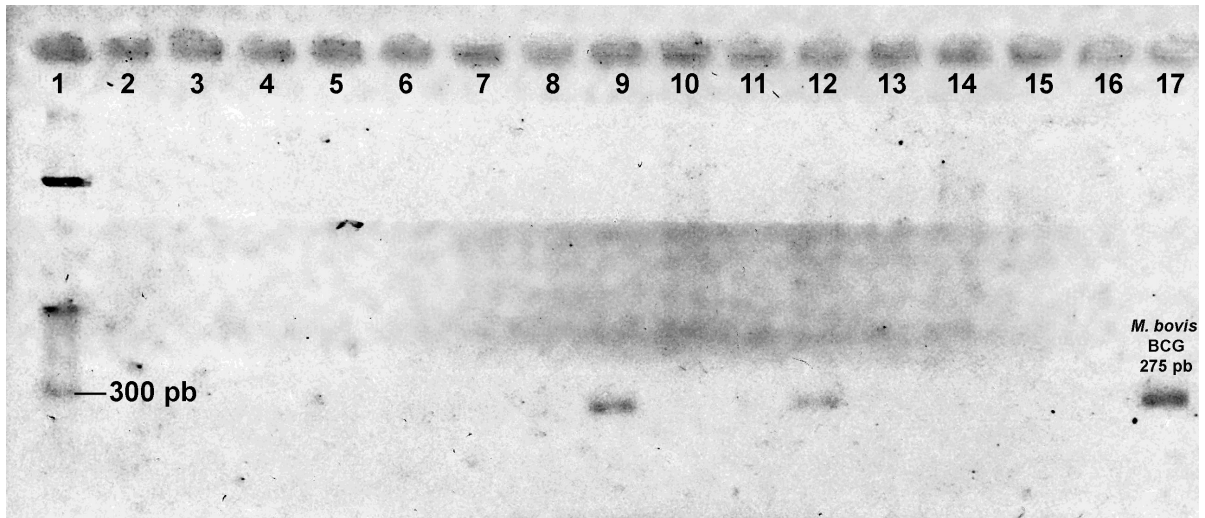


FIGURA 4. Gel de electroforesis de los productos de PCR IS6110. Carriles: 1) Marcador de tamaño molecular de 50 pb. 2-15) Muestras clínicas. 16) Testigo negativo: sin muestra de DNA. 17) Testigo positivo: DNA de *M. bovis* BCG

8.3 PCR multiplex

Al probar la PCR multiplex con el testigo positivo de *M. tuberculosis*, resultó en la amplificación de un fragmento de 1,000 pb, uno de 500 pb con el testigo de MAP y con el testigo positivo de *M. bovis* resultó la amplificación de un fragmento de 1000 pb junto con uno de 250 pb. Por esta razón, las muestras se consideraron como positivas al CMt cuando el amplicón, producto de la PCR multiplex fuera de 1000 o de 250 pb o ambos y estos fueran visibles en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. Por otro lado, se consideraron como muestras positivas a MAP a aquellas cuyo producto de PCR mostrara un amplicón de 500 pb y este fuera visible en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. Se consideraron como coinfectadas a aquellas muestras cuyo producto de la PCR multiplex apareciera como un amplicón de 500 pb junto con uno de

250 pb, o bien, un producto de 500 pb junto con uno de 250 pb y uno de 1000 pb (Figura 5).

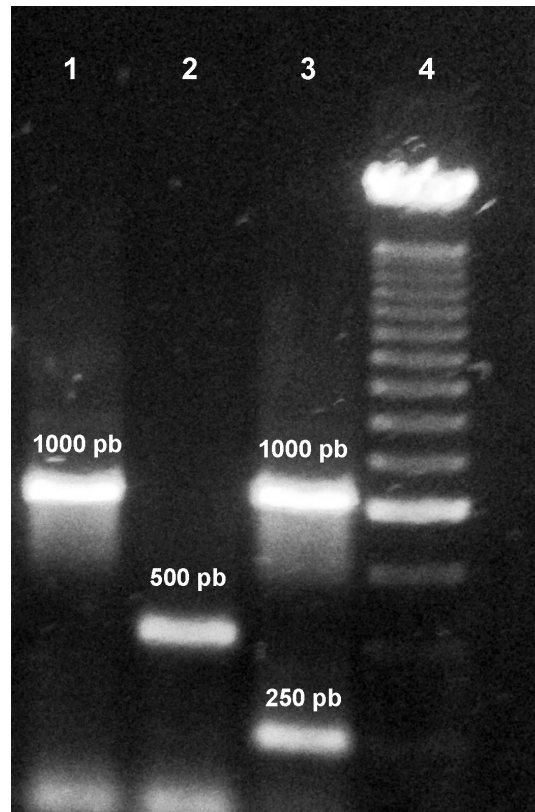


FIGURA 5. Gel de electroforesis de los productos de PCR multiplex. Carriles: 1) Testigo positivo: *Mycobacterium tuberculosis* (ATCC 25177D-5). 2) Testigo positivo: *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* cepa K-10 (ATCC BAA-968-D-5). 3) *Mycobacterium bovis* (INDRE). 4) Marcador de tamaño molecular de 250 pb.

8.4 Diagnóstico por PCR multiplex

De las 120 muestras clínicas que fueron probadas mediante la PCR multiplex, el 0.83% (un individuo) resultó positivo a la presencia de MAP. Ningún bovino resultó positivo a la presencia del CMt (Figura 6). El bovino que resultó positivo a MAP mediante esta prueba pertenece al hato A, por lo que el 1.44% del hato resultó positivo a la presencia de MAP. Los testigos clínicos no fueron capaces de ser identificados mediante la PCR multiplex.

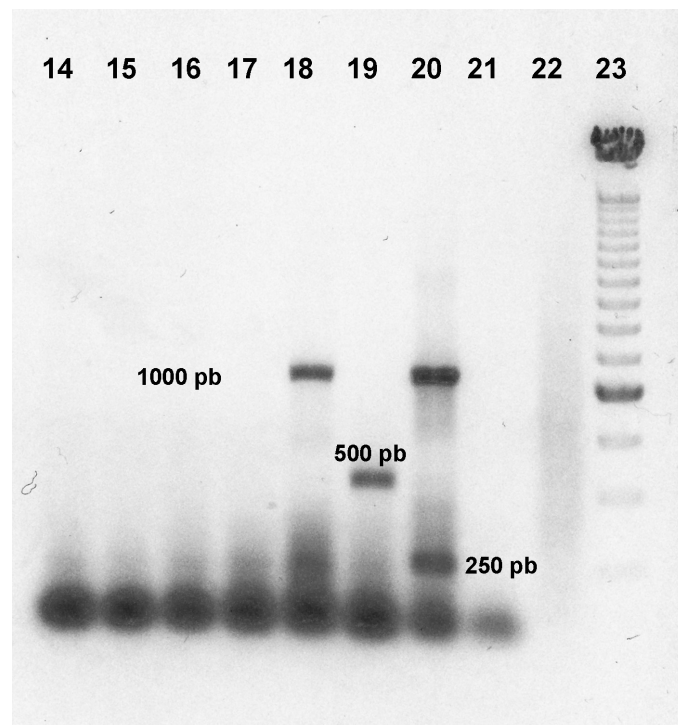
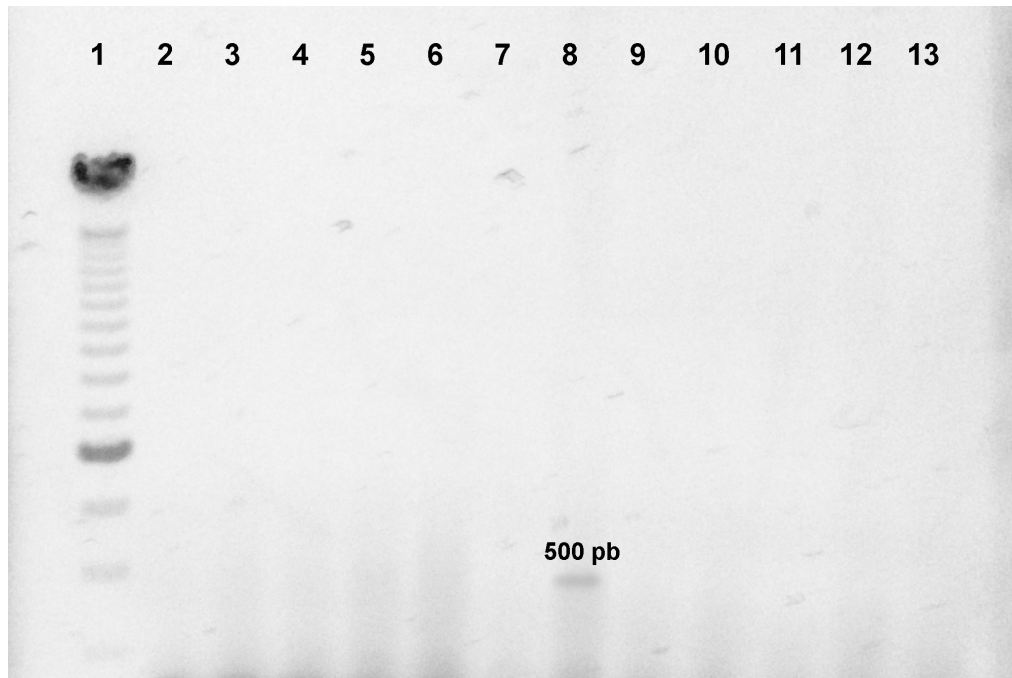


FIGURA 6. Gel de electroforesis de los productos de PCR multiplex. Carriles: 1) Marcador de tamaño molecular de 250 pb. 2-17) Muestras clínicas. 18) Testigo positivo: *M. tuberculosis*. 19) Testigo positivo: MAP. 20) Testigo positivo: *M. bovis*. 21) Testigo negativo: sin DNA. 23) Marcador de tamaño molecular de 250 pb.

8.5 Concentración mínima detectable

El resultado de la cuantificación de los testigos de DNA y la concentración mínima detectable de cada uno se expresan en el cuadro 2.

| Ensayo | Testigo | Concentración inicial de DNA (ng/μl) | Máxima dilución de amplificación | Concentración mínima detectable (ng/μl) | UFCs | Figura |
|---------------|-----------------------------|--------------------------------------|----------------------------------|---|--------------------|--------|
| PCR multiplex | <i>M. tuberculosis</i> ATCC | 4.7 | 1:100 | 0.047 | 4.7×10^3 | 7 |
| PCR multiplex | MAP cepa K-10 ATCC | 5 | 1:100 | 0.05 | 5×10^3 | 8 |
| PCR multiplex | <i>M. bovis</i> (INDRE) | 42.3 | 1:10 | 4.23 | 4.23×10^5 | 9 |
| PCR IS6110 | <i>M. bovis</i> (INDRE) | 42.3 | 1:1,000 | 0.0423 | 4.23×10^3 | 10 |
| PCR IS900 | MAP colonia | 80 | 1:100 | 0.8 | 8×10^4 | 11 |

CUADRO 2. Determinación de la concentración mínima detectable

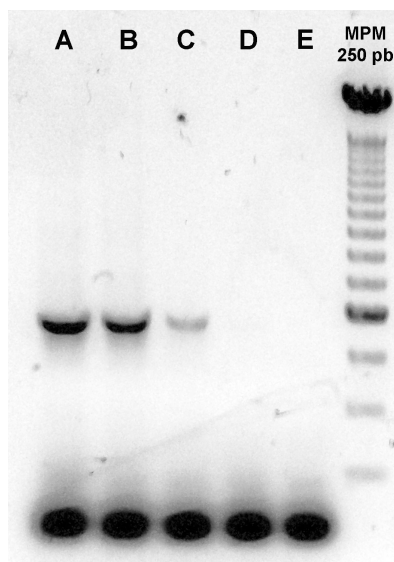


FIGURA 7. Gel de electroforesis de los productos de PCR multiplex de *M. tuberculosis* para la determinación de la concentración mínima detectable. Carriles: A) Concentración de DNA 4.7 ng/μl B) Dilución 1:10. C) Dilución 1:100. D) Dilución 1:1,000. E) Dilución 1:10,000.

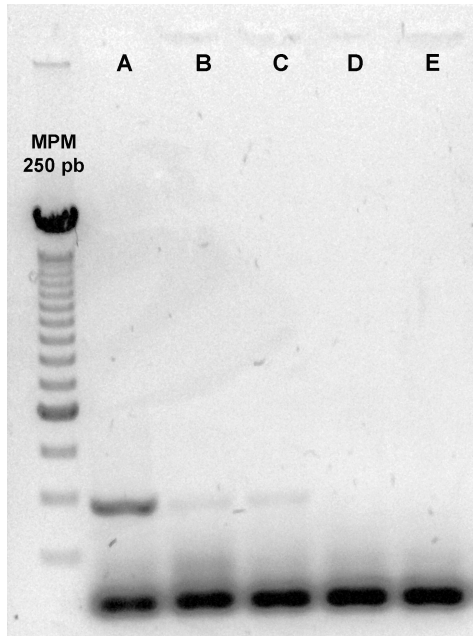


FIGURA 8. Gel de electroforesis de los productos de PCR multiplex de MAP para determinar la concentración mínima detectable. Carriles: A) Concentración de DNA 5 ng/μl. B) Dilución 1:10. C) Dilución 1:100. D) Dilución 1:1,000. E) Dilución 1:10,000.

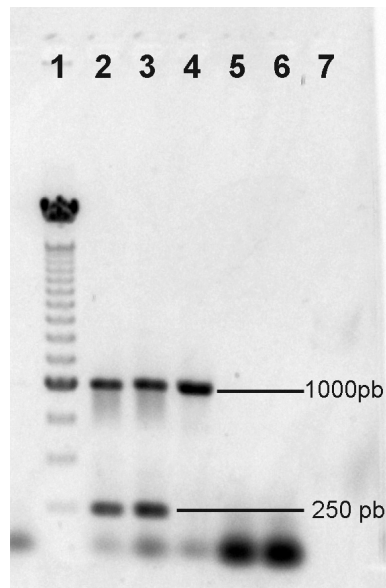


FIGURA 9. Gel de electroforesis de los productos de PCR multiplex de *M. bovis* para determinar la concentración mínima detectable. Carriles: 1) Marcador de tamaño molecular de 250 pb. 2) Concentración de DNA 42.3 ng/μl. 3) Dilución 1:10. 4) Dilución 1:100. 5) Dilución 1:1,000. 6) Dilución 1:10,000

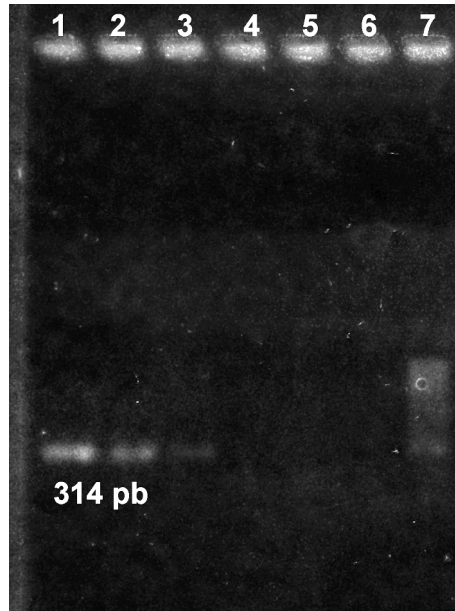


FIGURA 10. Gel de electroforesis de los productos de PCR IS900 de MAP para determinar la concentración mínima detectable. Carriles: 1) Concentración de DNA 80 ng/μl. 2) Dilución 1:10. 3) Dilución 1:100. 4) Dilución 1:1,000. 5) Dilución 1:10,000. 6) Dilución 1:100,000. 7) Marcador de tamaño molecular de 100 pb.

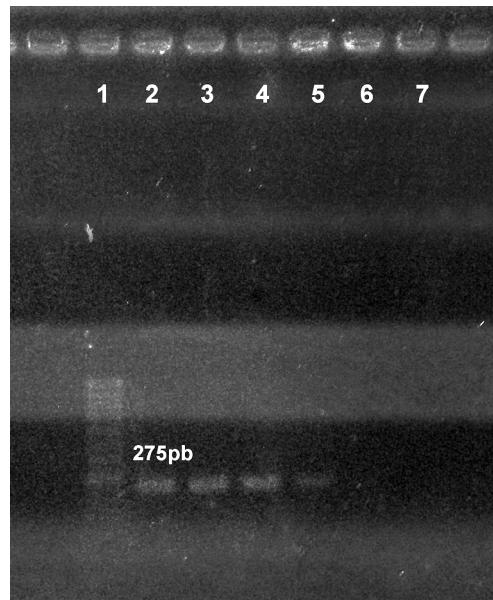


FIGURA 11. Gel de electroforesis de los productos de PCR IS6110 de *M. bovis* para determinar la concentración mínima detectable. Carriles: 1) Marcador de tamaño molecular de 100 pb. 2) Concentración de DNA 42.3 ng/μl. 3) Dilución 1:10. 4) Dilución 1:100. 5) Dilución 1:1,000. 6) Dilución 1:10,000 7) Dilución 1:100,000

8.6 PCR RD9

Con el ensayo de PCR RD9 se logró la diferenciación entre el DNA testigo de *M. tuberculosis* y el DNA testigo de *M. bovis* (Figura 12). Las muestras positivas al CMt fueron procesadas con este protocolo, sin embargo, no se logró obtener resultados positivos y por lo tanto la diferenciación entre ambas micobacterias no fue posible.

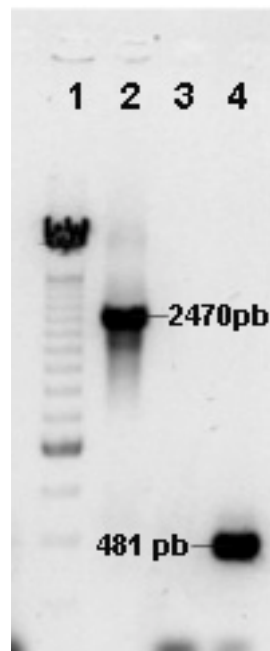


FIGURA 12. Gel de electroforesis de los productos de PCR RD9. Carriles: 1) Marcador de tamaño molecular de 250 pb. 2) Testigo positivo: *M. tuberculosis*. 3) Testigo negativo: MAP. 4) Testigo positivo: *M. bovis*.

8.7 ELISA P35

El hato A resultó positivo a paratuberculosis por ELISA P35 en un 29.57%, el hato B en un 73.33% y el hato C en un 40.74%.

9 Discusión

El diagnóstico de enfermedades micobacterianas como la paratuberculosis y la tuberculosis bovina siguen siendo un desafío debido a factores como el lento desarrollo de las micobacterias *in vitro*, la intermitencia en la excreción de las mismas, la cronicidad de las enfermedades y la alta semejanza genética entre las especies del género. Es por esto que la investigación para el desarrollo y mejoramiento de metodologías diagnósticas para estas enfermedades sigue siendo un tema de interés y la capacidad de las pruebas diagnósticas con diferentes muestras clínicas debe ser explorada. Los resultados del presente trabajo indican que es posible la detección de MAP y de bacterias del CMt en sangre de bovinos mediante PCR, tal como ha sido descrito por otros autores (Ahmed *et al.*, 1998; Buergelt y Williams, 2004; Mishra *et al.*, 2005; Bhide *et al.*, 2006; Pinedo *et al.*, 2008; Khol *et al.*, 2010; Singh *et al.*, 2010; Bower *et al.*, 2011; Sabry y Elkerdasy, 2014). En este trabajo, la detección de MAP a partir de muestras de sangre pudo ser determinada tanto por PCR IS900 como mediante PCR multiplex, pudiendo detectar un animal positivo en cada uno de estos dos ensayos, lo que corresponde en ambos casos al 0.83% (1/120). La detección de MAP en bovinos y pequeños rumiantes empleando PCR IS900 en sangre ha sido ya comprobada por otros autores, con porcentajes de detección del 11.45% en hatos de animales aparentemente sanos y con signos clínicos (Bhide *et al.*, 2006). En otro estudio, con bovinos en etapa subclínica de paratuberculosis pero pertenecientes a un hato con antecedentes anatomopatológicos y serológicos, la detección de MAP en sangre empleando PCR IS900 fue del 52.17% (Buergelt y Williams, 2004), mientras que Barrington *et al.* (2003) calcularon una sensibilidad del 40% para la misma prueba y mencionaron que al utilizar muestras como leche, heces e incluso hígado se obtiene una mayor sensibilidad (96%, 87% y 93% respectivamente), planteándose que

la intermitencia en la bacteremia pueda ser la causa de la baja sensibilidad cuando se utiliza sangre como muestra clínica. Esto sugiere la posibilidad de emplear otras muestras para mejorar el diagnóstico mediante la PCR IS900. Los porcentajes de detección de MAP en sangre en los estudios antes citados presentan diferencias dependiendo del estado de infección de los hatos y rebaños, siendo más elevados en aquellos con casos clínicos, como lo observado en rebaños caprinos clínicamente afectados, donde se ha detectado hasta un 94.4% de positividad mediante la misma prueba (Singh *et al.*, 2010). Debido a esto, en este trabajo la baja detección de MAP en sangre mediante PCR IS900 se puede explicar por una baja prevalencia en los hatos, pues los animales no mostraron signos clínicos al momento de la toma de muestras. Con relación a esto, se ha planteado que aunque los eventos de bacteremia pueden darse en infección inicial, ésta se asocia principalmente a fases avanzadas de paratuberculosis caracterizadas por la enfermedad clínica y presentación de lesiones multibacilares (Bower, Begg y Whittington, 2011). El hato B, en el que se detectó al 3% (1/33) como positivo a la PCR IS900, se presentó una seroprevalencia a través de ELISA P35 del 73.3%. Esta prueba serológica ha mostrado una alta sensibilidad (100%) y especificidad (92%) tanto en etapas subclínicas como clínicas (Castrellón-Ahumada, 2012). La diferencia en el porcentaje de detección entre estas dos pruebas se debe a que el blanco de detección de cada prueba es distinto y que tienen una dinámica diferente, es decir, en el caso de la PCR, depende la presencia de una bacteremia, la cual se ha planteado que ocurre esporádicamente en fases subclínicas, mientras que la prueba de ELISA detecta anticuerpos desde los 60 días postinfección y hasta fases clínicas avanzadas, por lo que se recomienda el empleo conjunto de una prueba que detecte anticuerpos, como ELISA-P35, y de una que detecte al agente, como PCR, en animales con sospecha de paratuberculosis. Esta metodología ha mostrado una mayor eficiencia en la detección de animales infectados con MAP (Pinedo *et al.*, 2008), pues a pesar de que entre los resultados de ambas pruebas suele

existir una baja correlación, ésta se asocia a que las pruebas detectan diferentes poblaciones o estados de la infección por MAP, con lo que se concluye que utilizando ambas, se incrementa la posibilidad de detectar animales positivos en diversas fases de infección.

Por otro lado, la PCR multiplex ofrece ventajas como el ahorro de material y tiempo al ser capaz de detectar a más de un agente en el mismo tubo de reacción. El uso de PCR multiplex ha sido descrito para la detección de MAP en animales previamente diagnosticados mediante aislamiento bacteriológico en heces, demostrando una sensibilidad del 87% y logrando detectar desde 10 UFC/ml (Schonenbrucher *et al.*, 2008). Por otra parte, en un estudio realizado por Coetsier *et al.* (2000), se logró la detección simultánea de MAP, *M. bovis* y *M. avium* a partir de tejidos incluidos en parafina de casos confirmados como positivos a tuberculosis por histopatología y aislamiento bacteriológico. Así mismo, en la revisión bibliográfica que se hizo, no se encontraron trabajos donde se informe el uso de PCR multiplex para la detección de MAP a partir de sangre, por lo cual, el presente trabajo muestra evidencia de la posibilidad de diagnóstico de la prueba en los animales de estudio. El caso positivo por PCR multiplex se detectó en el hato A (n=69), en el cual se habían realizado estudios de diagnóstico previos mediante PCR IS900 y cultivo con resultados negativos, pero con prevalencia serológica del 64%. Como se mencionó anteriormente, el hato A corresponde a una producción de ganado de lidia donde se reportan antecedentes de vacunación contra MAP, por lo que los resultados arrojados por la prueba de ELISA (29.57%) pueden explicarse por efecto de producción de anticuerpos debido a la inmunización. Patton (2011) recomienda que en los hatos donde se tiene un programa de vacunación contra MAP, se utilicen pruebas diagnósticas basadas en la detección del agente como el cultivo o PCR, pues los resultados de pruebas basadas en la detección de la respuesta inmune no son confiables bajo estas características. Por esta

razón, el hecho de haber detectado MAP mediante PCR-multiplex en un animal confirma la presencia de al menos un individuo infectado, e indica que mediante el empleo de esta prueba es posible distinguir a los animales vacunados de infectados.

En este estudio se pudo detectar a MAP mediante PCR IS900 y PCR multiplex. Si bien ambos ensayos mostraron la misma proporción de detección (0.83%), las muestras que resultaron positivas no corresponden al mismo hato. Es posible que esta diferencia pueda deberse a que la determinación de las secuencias que se amplifican y el diseño de los iniciadores estuvieron basados en criterios distintos; para el caso de PCR IS900, se dirigió a un fragmento de 314 pb que encuentra altamente conservado en las diferentes cepas de MAP y que se repite entre 15 y 20 veces en el genoma de la micobacteria (Gilardoni *et al.*, 2012), por su parte, para el caso de la PCR-multiplex, el fragmento de 500 pb fue elegido por ser específico de MAP, sin embargo no está incluido dentro de la IS900. Aunado a lo anterior, las diferencias en las metodologías empleadas pueden explicar los distintos resultados. Adicionalmente, las muestras clínicas sanguíneas y los reactivos utilizados en la extracción del material genético poseen factores, como la hemoglobina, que pueden estar involucradas en un desempeño desfavorable del ensayo (Al-Soud y Radstrom, 2001) y que en este caso, podrían estar implicados en la discrepancia de los resultados de detección de MAP por los diferentes ensayos, pues se ha determinado que estos factores inhibitorios de la PCR hacen que la prueba tenga una menor confiabilidad y repetibilidad pudiendo dar resultados falsos negativos. Por lo anterior, como una consideración general para la optimización de los distintos ensayos empleados, pueden plantearse estrategias para la detección de los factores de inhibición utilizando controles de amplificación interna (Chui *et al.*, 2004), además del empleo de algunos protocolos diseñados para la eliminación de factores de inhibición basados en la digestión enzimática de las muestras de interés (Park *et al.*, 2014).

Con respecto al diagnóstico del CMt, la utilización de secuencias de inserción, como la IS6110, ha servido para la detección de tuberculosis a través de diversas muestras clínicas como hisopados nasales, leche, aspirados de linfonodo (Vitale *et al.*, 1998), tejido pulmonar y de linfonodos, sangre, orina, líquido cefalorraquídeo, líquido pericárdico y médula ósea (Amin *et al.*, 2011). Particularmente en muestras de sangre, la detección de agentes del CMt mediante PCR ha sido comprobada en humanos inmunocomprometidos (Folgueira *et al.*, 1996) e inmunocompetentes (Ahmed *et al.*, 1998) mediante la amplificación de un fragmento de la secuencia de inserción IS1081 en pacientes con resultado positivo de baciloscopía, representando una sensibilidad del 43.75%. Sin embargo, las muestras clínicas sanguíneas son poco utilizadas para el diagnóstico del CMt por PCR en bovinos, pues se considera que la diseminación sistémica de la micobacteria es poco frecuente, que durante la mayor parte de la enfermedad ésta se encuentra localizada dentro del complejo primario de infección, y que entre ambos órganos la comunicación se da por vía linfática principalmente (Domingo *et al.*, 2014). No obstante, el corto tiempo para la obtención de resultados mediante PCR en comparación con el cultivo bacteriológico ha hecho que se exploren los alcances que esta técnica puede tener como prueba diagnóstica. De tal manera que, en un estudio llevado a cabo por Sabry y Elkerdasy (2014) con muestras sanguíneas de bovinos en diferentes fases de infección, se pudo detectar al CMt en el 37.14% de animales reactivos a la prueba de tuberculina mediante el ensayo de PCR IS1081. También se ha realizado la detección del CMt en sangre de bovinos con diferentes fases de infección, amplificando el gen *hupB* mediante PCR anidada, obteniendo una sensibilidad del 83.3% y un límite de detección de 5 UFC (Mishra *et al.*, 2005). Estos estudios demuestran que es posible la detección del CMt en diferentes fases de infección a partir de muestras de sangre, además de que destacan la utilidad de algunas secuencias de inserción para este fin. En el presente estudio, donde a pesar de que los animales pertenecientes a los hatos evaluados no

mostraron cuadro clínico compatible con las micobacteriosis buscadas, se logró la detección del CMt mediante PCR IS6110 en sangre en el 4.16% de los casos (5/120). Cabe destacar, que todos los casos positivos corresponden al hato de ganado bravo (A) que resultó en una prevalencia del 7.24% (5/69). Este grupo ya contaba con antecedentes de presencia del CMt mediante PCR IS6110 durante el 2013, donde se detectó al 5% de los animales como positivos a la prueba, mismos que fueron eliminados. Por lo que es indicado continuar las estrategias de control mediante la realización de pruebas complementarias que permitan detectar a la mayor parte de los animales infectados. Si consideramos el temperamento del ganado de lidia y el riesgo que conlleva su manejo, resultan convenientes para este fin, aquellas pruebas en las que se utilizan muestras sanguíneas, como ELISA, IFN- γ y PCR, pues la colecta no implica un método invasivo, y la misma muestra puede ser utilizada para diferentes pruebas, sin mencionar que la obtención de resultados no requiere de una segunda visita al establecimiento; a diferencia de la prueba de tuberculina, cuya lectura requiere un segundo manejo de los animales.

Por otra parte, en los hatos B y C, que corresponden a bovinos especializados en producción láctea y donde no se detectaron muestras positivas a la PCR IS6110, los productores manifestaron haber tenido casos de animales reactivos a la prueba intradérmica de tuberculina, sin embargo, la información sanitaria concreta de los hatos no fue revelada, lo que implicó una desventaja en el trabajo. Por esta razón, a pesar de los resultados negativos, no es posible descartar la presencia de la infección en el hato con un único ensayo. Es decir, es necesaria la realización paralela de otro tipo de pruebas con la intención de diagnosticar animales en diferentes fases infecciosas, pues es probable que en algunos de los animales del estudio este presente la infección, pero ésta no haya podido ser detectada debido a la ausencia de bacteremia o a una cantidad insuficiente de micobacterias en la muestra colectada.

Con respecto al uso de PCR multiplex para la detección antemortem de micobacterias del CMt, se han utilizado muestras clínicas de leche e hisopados nasales para la detección de éstas junto con *Brucella abortus* en Argentina, México e India. Los rangos de detección variaron según la prevalencia de las regiones geográficas, oscilando entre el 3.1% y el 32.6% en muestras de leche, mientras que en hisopos nasales se logró detectar entre un 9.09% al 56.2% como positivo al CMt (Sreevatsan *et al.*, 2000). En contraste con los resultados de la PCR IS6110, no se detectaron animales positivos al CMt mediante el ensayo de PCR multiplex - aún incluyendo al testigo clínico positivo. Se especula que la presencia de factores de inhibición de la PCR pudiera ser la causa de la inconsistencia en los resultados obtenidos por ambos protocolos; tal como lo señalaron Park *et al.* (2014), los factores de inhibición se encuentran relacionados con la falta de repetibilidad en las reacciones de PCR y la presentación de resultados falsos negativos. Sin embargo, al ser probada con los testigos de DNA, estos fueron detectados satisfactoriamente, lo que indica que la PCR multiplex requiere de una mayor optimización para poder ser utilizada con muestras sanguíneas, o que puede ser utilizada para la confirmación de cultivos bacterianos.

La diferencia entre los porcentajes de detección de la PCR IS6110 (4.16%) y PCR multiplex (0%) puede atribuirse a una mayor sensibilidad en la primera, la cual se hace evidente en el ensayo de determinación de la concentración mínima detectable, pues se puede ver que la PCR IS6110 es capaz de detectar una concentración 100 veces menor de DNA micobacteriano que la PCR multiplex. La secuencia de inserción IS6110 ha sido utilizada numerosas veces para el diagnóstico del CMt, pues se le caracteriza por otorgar una mayor sensibilidad a los ensayos de PCR (Mathema *et al.*, 2006; Sankar *et al.*, 2010) por encontrarse de forma repetida en el genoma de las micobacterias del CMt (una a dos

copias en *M. bovis* y *M. bovis* BCG, y 15 a 20 copias en la mayoría de las cepas de *M. tuberculosis* (Ollar y Connell, 1999).

A diferencia de los ensayos de PCR IS900 y PCR IS6110, los cuales amplifican fragmentos de secuencias ampliamente utilizadas y cuya función biológica está bien estudiada, la PCR multiplex fue diseñada bajo el único criterio de obtener una alta especificidad, por lo cual, las secuencias que se amplificaron fueron seleccionadas mediante alineaciones BLAST del genoma micobacteriano completo, buscando que fueran específicas de cada especie, y sin importar el gen donde estuviera localizada ni la función genética de la región. A pesar de estas consideraciones, y tomando en cuenta que los miembros del CMt poseen una semejanza genética del 99.95% (Thoen y Barletta, 2006), al momento de la estandarización con los testigos de DNA se observó que existía una reacción cruzada en el resultado de *M. bovis*, pues aunque se esperaba la amplificación de un fragmento único de 250 pb, se amplificó también un fragmento de 1,000 pb, mismo que corresponde al resultado esperado para *M. tuberculosis*. Es posible que esto se deba a que se utilizó como referencia el genoma de *M. bovis* BCG en el diseño, mientras que durante la estandarización se utilizó el DNA genómico de *M. bovis*. Dado que el genoma de *M. bovis* BCG es una versión reducida del de *M. bovis*, es probable que la secuencia de 1,000 pb este presente en esta última y no en la micobacteria apatógena. Estos resultados no permiten la diferenciación entre una infección por *M. bovis* y una coinfección *M. bovis* - *M. tuberculosis*, pues en ambos casos se obtendrían los mismos resultados. Por ello, se realizó el diseño de una PCR basado en la amplificación de la región de diferencia RD9 y que permitiera la diferenciación entre ambas micobacterias. Esta prueba, si bien permitió la identificación de *M. bovis* y de *M. tuberculosis* empleados como testigos, no logró dicha identificación a partir de las muestras clínicas. A diferencia de Halse *et al.* (2011), quienes lograron la diferenciación

mediante la amplificación de RD1, RD4, RD9 y RD12 a partir de muestras de abscesos, aspirado de linfonodo, fluido corporal, fluido gástrico y orina, obteniendo un 94% de correlación con los resultados del cultivo bacteriológico. Esta referencia sugiere que se requiere una mejor estandarización con muestras clínicas. Así mismo, los resultados favorables que se obtuvieron con los testigos de DNA indican que esta metodología puede ser utilizada para la confirmación y diferenciación de aislamientos bacteriológicos, lo que puede ser de utilidad en estudios epidemiológicos. Por otra parte, la importancia de poder identificar al agente que afecta a las poblaciones de bovinos está ligada a cuestiones de salud pública, pues se sabe que *M. bovis* y *M. tuberculosis* tienen diferente grado de patogenicidad y susceptibilidad a diferentes antibióticos. Así mismo, el personal que trabaja en las producciones bovinas y se encuentra en contacto estrecho con los animales, es considerado como un posible reservorio de tuberculosis en humanos (Mishra *et al.*, 2005).

Con el ensayo para la determinación de la concentración mínima detectable se determinó que los protocolos evaluados tienen una capacidad de detección que va desde 4.23×10^3 UFC (PCR IS6110) hasta 4.23×10^5 UFC (PCR multiplex). Existen estudios que reportan ensayos de PCR que son capaces de detectar desde 5 UFC (Mishra *et al.*, 2005), lo que sugiere que las pruebas evaluadas son susceptibles de mejorar la sensibilidad, por lo que se plantea la posibilidad de implementar variantes de la PCR que han demostrado ser más sensibles para el diagnóstico directo de muestras clínicas, como la PCR anidada (Burgelt y Williams, 2004; Mishra *et al.*, 2005) y la PCR en tiempo real (Schonenbrucher *et al.*, 2008; Halse *et al.*, 2011), logrando la detección desde 5 UFC. También debe considerarse el uso de otras pruebas moleculares como los microarreglos de DNA (Tobler *et al.*, 2006; Jia *et al.*, 2012), pues los resultados que se han informado indican que ésta

es una técnica prometedora que ha llegado a detectar desde 5 UFC y que realiza de forma exitosa la diferenciación entre diferentes especies del género *Mycobacterium*.

La investigación para el desarrollo de nuevos y mejores herramientas para el control de la paratuberculosis y la tuberculosis bovina son esenciales para su posterior aplicación oficial. Para lograr esto es importante crear un vínculo entre las instituciones de enseñanza e investigación y las empresas pecuarias privadas donde se resalte el beneficio de ambas partes. De esta forma se estará impulsando el desarrollo de investigación y tecnologías al mismo tiempo que se mejoren las condiciones sanitarias de los hatos.

10 Conclusiones

Los resultados de este trabajo son un primer testimonio de que los ensayos de PCR probados pueden llegar a ser útiles para el diagnóstico antemortem de paratuberculosis y tuberculosis bovina, no obstante, el bajo porcentaje de detección de animales positivos y los resultados de la determinación de la concentración mínima detectable son sugerentes de que los protocolos son susceptibles de mejoras.

Para que los ensayos de este trabajo puedan alcanzar una confiabilidad deseable para una prueba diagnóstica, se requiere de una mayor profundización en la investigación con el objetivo de buscar las mejores condiciones para cada paso de la prueba, así como una óptima estandarización para su uso a partir de muestras clínicas. Así mismo, es necesaria una evaluación que estime la sensibilidad y la especificidad de éstas.

El empleo de más de una prueba de diagnóstico como ELISA-P35, PCR-IS900 y PCR-multiplex permitió identificar un mayor número de animales infectados. Es recomendable el uso conjunto de pruebas diagnósticas enfocadas en la detección de distintos elementos para un mayor espectro de detección de animales infectados.

En hatos con animales vacunados contra paratuberculosis, la PCR es una herramienta diagnóstica confiable con la cual se puede diferenciar a los animales infectados de los inmunizados.

Los ensayos de PCR multiplex y PCR RD9 del trabajo no resultaron adecuados para el diagnóstico directo a partir de DNA de muestras del sangre, sin embargo, los resultados mostrados con los testigos de DNA indican que estos ensayos pueden ser utilizados para la confirmación de aislamientos bacteriológicos, así como para la diferenciación entre *M. bovis* y *M. tuberculosis*.

Las secuencias de inserción IS900 e IS6110 han mostrado una mayor capacidad para el diagnóstico de la presencia de MAP y del CMt, respectivamente. Considerando los beneficios que otorga la PCR multiplex, el diseño y estandarización de un ensayo para la detección simultánea de MAP y del CMt, basada en las secuencias de inserción mencionadas, puede resultar en una herramienta útil para el diagnóstico.

Los resultados que se obtuvieron pueden dar origen a futuros estudios dentro del mismo proyecto que tengan como objetivo común la optimización de diferentes pruebas diagnósticas empleadas para el control de tuberculosis y paratuberculosis.

11 Referencias

- Ahmed N, Mohanty AK, Mukhopadhyay U, Batish VK, Grover S. 1998. PCR-based rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* in blood from immunocompetent patients with pulmonary tuberculosis. *Journal of clinical microbiology* 36:3094–3095.
- Amin I, Idrees M, Awan Z, Shahid M, Afzal S, Hussain A. 2011. PCR could be a method of choice for identification of both pulmonary and extra-pulmonary tuberculosis. *BMC research notes* 4:332.
- Appleyard CB, Hernández G, Rios-Bedoya CF. 2004. Basic epidemiology of inflammatory bowel disease in Puerto Rico. *Inflammatory Bowel Diseases* 10:106–111.
- Ayele WY, Svastova P, Roubal P, Bartos M, Pavlik I. 2005. *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis cultured from locally and commercially pasteurized cow's milk in the Czech Republic. *Applied and Environmental Microbiology* 71:1210–1214.
- Ayele WY, Machackova M, Pavlik I. 2001. The transmission and impact of paratuberculosis infection in domestic and wild ruminants. *Veterinarni Medicina* 46:205–224.
- Bakerma HW, Hesselink JW, McKenna SL, Benedictus G, Groenendaal H. 2010. Global prevalence and economics of infection with *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis in ruminants. In: Behr MA, Collins DM eds. *Paratuberculosis: organism, disease, control*. Wallingford, UK ; Cambridge, MA: CABL.
- Barnes PF, Lakey DL, Burman WJ. 2002. Tuberculosis in patients with HIV infection. *Infectious Disease Clinics of North America* 16:107–126.
- Barrington GM, Gay JM, Eriks IS, Davis WC, Evermann JF, Emerson C, O'Rourke JL, Hamilton MJ, Bradway DS. 2003. Temporal patterns of diagnostic results in serial samples from cattle with advanced paratuberculosis infections. *Journal of veterinary diagnostic investigation* 15:195–200.
- Beard PM, Daniels MJ, Henderson D, Pirie A, Rudge K, Buxton D, Rhind S, Greig A, Hutchings MR, McKendrick I, Stevenson K, Sharp JM. 2001. Paratuberculosis infection of nonruminant wildlife in Scotland. *Journal of Clinical Microbiology* 39:1517–1521.

- Bezoz J, Casal C, Romero B, Schroeder B, Hardegger R, Raeber AJ, López L, Rueda P, Domínguez L. 2014. Current ante-mortem techniques for diagnosis of bovine tuberculosis. *Research in Veterinary Science* 97:S44–S52.
- Bhide M, Chakurkar E, Tkacikova L, Barbuddhe S, Novak M, Mikula I. 2006. IS900-PCR-based detection and characterization of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis from buffy coat of cattle and sheep. *Veterinary Microbiology* 112:33–41.
- Bosques-Padilla FJ, Sandoval-García ER, Martínez-Vázquez MA, Garza-González E, Maldonado-Garza HJ. 2011. Epidemiología y características clínicas de la colitis ulcerosa crónica idiopática en el noreste de México. *Revista de Gastroenterología de México* 76:34–8.
- Bower KL, Begg DJ, Whittington RJ. 2011. Culture of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis (MAP) from blood and extra-intestinal tissues in experimentally infected sheep. *Veterinary Microbiology* 147:127–132.
- Buergelt CD, Williams JE. 2004. Nested PCR on blood and milk for the detection of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis DNA in clinical and subclinical bovine paratuberculosis. *Australian Veterinary Journal* 82:497–503.
- Cassidy JP. 2006. The pathogenesis and pathology of bovine tuberculosis with insights from studies of tuberculosis in humans and laboratory animal models. *Veterinary Microbiology* 112:151–161.
- Castillo-Velázquez U, Gómez-Flores R, Chávez-Gris G, Favila-Humara L, Soto-Castor R, Maldonado-Castro E, Tamez-Guerra P. 2015. Presence of paratuberculosis in dairy cows culled in Tizayuca (Hidalgo, Mexico). *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias* 28.
- Castrellón-Ahumada VE. 2012. Expresión de la proteína recombinante P35 de *Mycobacterium avium* subespecie paratuberculosis y su uso en diagnóstico de paratuberculosis en ovinos. Tesis de maestría Thesis. México D.F., México: Universidad Nacional Autónoma de México.
- Chacon O, Bermudez LE, Barletta RG. 2004. Johne's disease, inflammatory bowel disease, and *Mycobacterium paratuberculosis*. *Annual Review of Microbiology* 58:329–363.
- Chávez-Gris G, Maldonado-Castro E, López-Yurame J, Pallás-Guzmán G, Torres-Ramos E. 2009. Situación global de la paratuberculosis en México. In: *17a Reunión Anual del CONASA*. Complejo Cultural Universitario BUAP, Cholula, Puebla,.
- Chiodini RJ, Van Kruiningen HJ, Thayer WR, Coutu JA. 1986. Spheroplastic phase of mycobacteria isolated from patients with Crohn's disease. *Journal of clinical microbiology* 24:357–363.

- Cho YS, Jung SC, Kim JM, Yoo HS. 2007. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay of bovine tuberculosis by crude mycobacterial protein 70. *Journal of Immunoassay and Immunochemistry* 28:409–418.
- Chui LW, King R, Lu P, Manninen K, Sim J. 2004. Evaluation of four DNA extraction methods for the detection of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis by polymerase chain reaction. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 48:39–45.
- Click RE, Van Kampen CL. 2010. Comparison of ante-mortem assays to assess progression/regression of paratuberculosis in individual dairy animals. *Virulence* 1:134–144.
- Coetsier C, Vannuffel P, Blondeel N, Deneff J-F, Cocito C, Gala J-L. 2000. Duplex PCR for differential identification of Mycobacterium bovis, M. avium, and M. avium subsp. paratuberculosis in formalin-fixed paraffin-embedded tissues from cattle. *Journal of clinical microbiology* 38:3048–3054.
- Collins MT. 1994. Clinical approach to control of bovine paratuberculosis. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 204:208–210.
- Collins MT. 2011. Diagnosis of Paratuberculosis. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice* 27:581–591.
- CONASA. 2011. Plan estratégico de la Campaña Nacional contra la Tuberculosis Bovina 2008-2012. In: *Reunión anual del CONASA*. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas,.
- Corti S, Stephan R. 2002. Detection of Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis specific IS900 insertion sequences in bulk-tank milk samples obtained from different regions throughout Switzerland. *BMC microbiology* 2:15.
- Courcoul A, Moyen J-L, Brugère L, Faye S, Hénault S, Gares H, Boschioli M-L. 2014. Estimation of sensitivity and specificity of bacteriology, histopathology and PCR for the confirmatory diagnosis of bovine tuberculosis using latent class analysis. *PLoS ONE* 9:e90334.
- De la Rua-Domenech R, Goodchild AT, Vordermeier HM, Hewinson RG, Christiansen KH, Clifton-Hadley RS. 2006. Ante mortem diagnosis of tuberculosis in cattle: A review of the tuberculin tests, γ -interferon assay and other ancillary diagnostic techniques. *Research in Veterinary Science* 81:190–210.
- De Lisle G, Bengis RG, Schmitt SM, O'Brien DJ. 2002. Tuberculosis in free-ranging wildlife: detection, diagnosis and management. *Revue Scientifique Et Technique (International Office of Epizootics)* 21:317–334.

- Domingo M, Vidal E, Marco A. 2014. Pathology of bovine tuberculosis. *Research in Veterinary Science* 97:S20–S29.
- Dow CT. 2014. M. paratuberculosis and Parkinson's disease – Is this a trigger. *Medical Hypotheses* 83:709–712.
- Estévez-Denaives I, Hernández-Castro R, Trujillo-García AM, Chávez-Gris G. 2007. Detection of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in goat and sheep flocks in Mexico. *Small Ruminant Research* 72:209–213.
- Favila-Humara LC, Chávez-Gris G, García-Vázquez FJ, Remes-Troche JM, Uscanga LF, Santillán Flores MA, Paolicchi F, Carrillo-Casas EM, Hernández-Castro R. 2011. Detection of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in Crohn's disease patients and ruminants intestine by in situ hybridization. In: Karoui S ed. *Crohn's disease*. Rijeka: InTech,.
- Flores-Villalva S, Suarez-Guemes F, Espitia C, Whelan AO, Vordermeier M, Gutierrez-Pabello JA. 2012. Specificity of the tuberculin skin test is modified by use of a protein cocktail containing ESAT-6 and CFP-10 in cattle naturally infected with Mycobacterium bovis. *Clinical and Vaccine Immunology* 19:797–803.
- Folgueira L, Delgado R, Palenque E, Aguado JM, Noriega AR. 1996. Rapid diagnosis of Mycobacterium tuberculosis bacteremia by PCR. *Journal of clinical microbiology* 34:512–515.
- Francis J, Seiler RJ, Wilkie IW, O'Boyle D, Lumsden MJ, Frost AJ. 1978. The sensitivity and specificity of various tuberculin tests using bovine PPD and other tuberculins. *The Veterinary Record* 103:420–425.
- Gilardoni LR, Paolicchi FA, Mundo SL. 2012. Bovine paratuberculosis: a review of the advantages and disadvantages of different diagnostic tests. *Revista Argentina de Microbiología* 44:201–15.
- Gilmour NJ, Nisbet DI, Brotherston JG. 1965. Experimental oral infection of calves with Mycobacterium johnei. *Journal of Comparative Pathology* 75:281–286.
- González J, Geijo MV, García-Pariente C, Verna A, Corpa JM, Reyes LE, Ferreras MC, Juste RA, García Marín JF, Pérez V. 2005. Histopathological classification of lesions associated with natural paratuberculosis infection in cattle. *Journal of Comparative Pathology* 133:184–196.
- Grant IR, Ball HJ, Rowe MT. 2002. Incidence of Mycobacterium paratuberculosis in bulk raw and commercially pasteurized cows' milk from approved dairy processing establishments in the United Kingdom. *Applied and Environmental Microbiology* 68:2428–2435.

- Greenwald R, Esfandiari J, Lesellier S, Houghton R, Pollock J, Aagaard C, Andersen P, Hewinson RG, Chambers M, Lyashchenko K. 2003. Improved serodetection of *Mycobacterium bovis* infection in badgers (*Meles meles*) using multiantigen test formats. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 46:197–203.
- Halse TA, Escuyer VE, Musser KA. 2011. Evaluation of a single-tube Multiplex Real-Time PCR for differentiation of members of the *Mycobacterium tuberculosis* Complex in clinical specimens. *Journal of Clinical Microbiology* 49:2562–2567.
- Harris NB, Barletta RG. 2001. *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis in Veterinary Medicine. *Clinical Microbiology Reviews* 14:489–512.
- Holstad G, Sigurdarottir OG, Storset AK, Tharaldsen J, Nyberg O, Schonheit J, Djonne B. 2005. Description of the infection status in a Norwegian cattle herd naturally infected by *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis. *Acta Veterinaria Scandinavica* 46:45–56.
- Hostetter JM, Steadham EM, Haynes JS, Bailey TB, Cheville NF. 2002. Cytokine effects on maturation of the phagosomes containing *Mycobacteria avium* subspecies paratuberculosis in J774 cells. *FEMS immunology and medical microbiology* 34:127–134.
- Jaramillo Arango CJ, Martínez Maya JJ. 2010. *Epidemiología veterinaria*. México D.F., México: Manual Moderno.
- Jia K, Yu M, Zhang G-H, Zhang J, Lin Z-X, Luo C-B, Yu H-Q, Li S-J. 2012. Detection and identification of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* from clinical species using DNA microarrays. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 24:156–160.
- Johnson-Ifeorlundu Y, Kaneene J, Lloyd J. 1999. Herd-level economic analysis of the impact of paratuberculosis on dairy herds. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 214:822–825.
- Kalis CHJ, Collins MT, Hesselink JW, Barkema HW. 2003. Specificity of two tests for the early diagnosis of bovine paratuberculosis based on cell-mediated immunity: the Johnin skin test and the gamma interferon assay. *Veterinary Microbiology* 97:73–86.
- Kaneene JB, Pfeiffer D. 2006. Epidemiology of *Mycobacterium bovis*. In: Thoen CO, Steele JH, Gilsdorf MJ eds. *Mycobacterium bovis infection in animals and humans*. Ames, Iowa: Blackwell Pub.,
- Kazda J. 2009. The chronology of mycobacteria and the development of mycobacterial ecology. In: Kazda J, Pavlik I, Falkinham JO, Hruska, K. K eds. *The ecology of mycobacteria: Impact on animal's and human's health*. Blacksburg, USA: Springer.,

- Khol JL, Kralik P, Slana I, Beran V, Aurich C, Baumgartner W, Pavlik I. 2010. Consecutive excretion of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis in semen of a breeding bull compared to the distribution in feces, tissue and blood by IS900 and F57 quantitative real-time PCR and culture examinations. *Journal of Veterinary Medical Science* 72:1283–1288.
- Kleeberg HH. 1960. The tuberculin test in cattle. *Journal of the South African Veterinary Medical Association* 31:213–225.
- Lepper W, Pearson CW, Corner L. 1977. Anergy to Tuberculin in Beef Cattle. *Australian Veterinary Journal* 53:214–216.
- Lessem E, Cox H, Daniels C, Furin J, McKenna L, Mitnick CD, Mosidi T, Reed C, Seaworth B, Stillo J, Tisile P, von Delft D. 2015. Access to new medications for the treatment of drug-resistant tuberculosis: Patient, provider and community perspectives. *International Journal of Infectious Diseases* 32:56–60.
- Lombard JE, Garry FB, McCluskey BJ, Wagner BA. 2005. Risk of removal and effects on milk production associated with paratuberculosis status in dairy cows. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 227:1975–1981.
- Lombard JE. 2011. Epidemiology and economics of paratuberculosis. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice* 27:525–535.
- López-Revilla R. 2015. Amplificación de ácidos nucleicos para el diagnóstico de la tuberculosis. In: *Simposium Nacional de Tuberculosis 2015*. Universidad Autónoma de San Luis Potosí. San Luis Potosí. SLP,.
- López-Yurame J. 2014. Evaluación de estrategias de control en paratuberculosis en hatos bovinos y rebaños caprinos, ovinos y ciervos afectados en el Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Animal en el Altiplano. Tesis de maestría Thesis. México D.F., México: Universidad Nacional Autónoma de México.
- Manning EJB, Collins MT. 2010. Epidemiology of paratuberculosis. In: Behr MA, Collins DM eds. *Paratuberculosis: organism, disease, control*. Wallingford, UK ; Cambridge, MA: CABI,.
- Mathema B, Kurepina NE, Bifani PJ, Kreiswirth BN. 2006. Molecular Epidemiology of Tuberculosis: Current Insights. *Clinical Microbiology Reviews* 19:658–685.
- McDonald WL, Ridge SE, Hope AF, Condrón RJ. 1999. Evaluation of diagnostic tests for Johne's disease in young cattle. *Australian Veterinary Journal* 77:113–119.
- McPherson M, Moller S. 2006. *PCR*. Hoboken, New Jersey, USA: Taylor & Francis Ltd.

- Menzies FD, Neill SD. 2000. Cattle-to-cattle transmission of bovine tuberculosis. *Veterinary Journal* 160:92–106.
- Miranda Bandera MV. 2005. Evaluación del impacto económico de la paratuberculosis en ganado bovino lechero (sistema intensivo), en el complejo agropecuario industrial. Tizayuca, Hidalgo, México. Tesis de maestría Thesis. México D.F., México: Universidad Nacional Autónoma de México.
- Mishra A, Singhal A, Chauhan DS, Katoch VM, Srivastava K, Thakral SS, Bharadwaj SS, Sreenivas V, Prasad HK. 2005. Direct detection and identification of Mycobacterium tuberculosis and Mycobacterium bovis in bovine samples by a novel Nested PCR assay: Correlation with conventional techniques. *Journal of Clinical Microbiology* 43:5670–5678.
- Momotani E, Whipple DL, Thiermann AB, Cheville NF. 1988. Role of M cells and macrophages in the entrance of Mycobacterium paratuberculosis into domes of ileal Peyer's patches in calves. *Veterinary Pathology* 25:131–137.
- Nahar Q, Pervin M, Islam MT, Khan M. 2011. Application of PCR for the detection of bovine tuberculosis in cattle. *Journal of the Bangladesh Agricultural University* 9:73–78.
- Neill SD, Pollock JM, Bryson DB, Hanna J. 1994. Pathogenesis of Mycobacterium bovis infection in cattle. *Veterinary Microbiology* 40:41–52.
- [NOM] Norma Oficial de la Federación. 1996. *NOM-031-ZOO-1995. Campaña Nacional Contra la Tuberculosis Bovina (Mycobacterium bovis)*. México: SAGARPA.
- Ocepek M, Staric J, Jezek J, Logar K, Zajc U, Bandelj P, Pate M. 2014. Effect of vaccination against paratuberculosis on fecal shedding and productivity of heavily infected cattle herds. In: *12th International Colloquium on Paratuberculosis*. Parma, Italy,.
- OIE. 2009. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals: OIE - World Organisation for Animal Health. Bovine tuberculosis. Available at <http://www.oie.int/en/manual-of-diagnostic-tests-and-vaccines-for-terrestrial-animals/> (accessed June 3, 2015).
- OIE. 2014. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals: OIE - World Organisation for Animal Health. Paratuberculosis (Johne's disease). Available at <http://www.oie.int/en/manual-of-diagnostic-tests-and-vaccines-for-terrestrial-animals/> (accessed June 3, 2015).
- Ollar RA, Connell ND. 1999. *Molecular Mycobacteriology: Techniques and Clinical Applications*. New York, U.S.A.: Marcel Dekker.

- Olsen I, Barletta RG, Thoen CO. 2010. Mycobacterium. In: Gyles CL, Prescott J, Songer G, Thoen CO eds. *Pathogenesis of bacterial infections in animals*. Iowa, USA: Wiley-Blackwell,.
- ONU. 2000. Objetivos de desarrollo del milenio. Objetivo 6: Combatir el VIH/SIDA, el paludismo y otras enfermedades. Available at <http://www.onu.org.mx/objetivo6.html> (accessed June 4, 2015).
- Park KT, Allen AJ, Davis WC. 2014. Development of a novel DNA extraction method for identification and quantification of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis from tissue samples by real-time PCR. *Journal of Microbiological Methods* 99:58–65.
- Parra A, García N, García A, Lacombe A, Moreno F, Freire F, Moran J, Hermoso de Mendoza J. 2008. Development of a molecular diagnostic test applied to experimental abattoir surveillance on bovine tuberculosis. *Veterinary Microbiology* 127:315–324.
- Patton EA. 2011. Paratuberculosis vaccination. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice* 27:573–580.
- Pinedo PJ, Rae DO, Williams JE, Donovan GA, Melendez P, Buergelt CD. 2008. Association among Results of Serum ELISA, Faecal Culture and Nested PCR on Milk, Blood and Faeces for the Detection of Paratuberculosis in Dairy Cows. *Transboundary and Emerging Diseases* 55:125–133.
- Pollock JM, Neill SD. 2002. Mycobacterium bovis infection and tuberculosis in cattle. *The Veterinary Journal* 163:115–127.
- Reddington K, O’Grady J, Dorai-Raj S, Niemann S, van Soolingen D, Barry T. 2011. A novel Multiplex Real-Time PCR for the identification of Mycobacteria associated with zoonotic tuberculosis. *PLoS ONE* 6:e23481.
- Retamal P, Beltrán C, Abalos P, Quera R, Hermoso M. 2011. Mycobacterium avium subsp paratuberculosis y enfermedad de Crohn: evidencias de una zoonosis. *Revista médica de Chile* 139:794–801.
- Ritacco V, Torres P, Sequeira, Reniero A, de Kantor. 2006. Bovine tuberculosis in Latin America and the Caribbean. In: Thoen CO, Steele JH, Gilsdorf MJ eds. *Mycobacterium bovis infection in animals and humans*. Ames, Iowa: Blackwell Pub,.
- Rodriguez-Campos S, Smith NH, Boniotti MB, Aranaz A. 2014. Overview and phylogeny of Mycobacterium tuberculosis complex organisms: Implications for diagnostics and legislation of bovine tuberculosis. *Research in Veterinary Science* 97:5–19.

- Rosu V, Ahmed N, Paccagnini D, Gerlach G, Fadda G, Hasnain SE, Zanetti S, Sechi LA. 2009. Specific immunoassays confirm association of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis with type-1 but not type-2 diabetes mellitus. *PLoS ONE* 4:e4386.
- Sabry M, Elkerdasy A. 2014. A polymerase chain reaction and enzyme linked immunosorbent assay based approach for diagnosis and differentiation between vaccinated and infected cattle with *Mycobacterium bovis*. *Journal of Pharmacy & Bioallied Sciences* 6:115–121.
- Safi H, Barnes PF, Lakey DL, Shams H, Samten B, Vankayalapati R, Howard ST. 2004. IS6110 functions as a mobile, monocyte-activated promoter in *Mycobacterium tuberculosis*: *M. tuberculosis* IS6110 activates downstream genes. *Molecular Microbiology* 52:999–1012.
- Sanjuan-Jimenez R, Morata P, Bermúdez P, Bravo MJ, Colmenero JD. 2013. Comparative clinical study of different multiplex real time PCR strategies for the simultaneous differential diagnosis between extrapulmonary tuberculosis and focal complications of brucellosis. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 7:e2593.
- Sankar S, Balakrishnan B, Nandagopal B, Thangaraju K, Natarajan S. 2010. Comparative evaluation of nested PCR and conventional smear methods for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum samples. *Molecular Diagnosis & Therapy* 14:223–227.
- Santillán FMA, Córdoba LD, Guzmán RCC, López RJ, Rosado RMI, Mojarro JFJ, Zermeño EA. 2003. Situación epidemiológica de la paratuberculosis en ganado bovino del estado de Guanajuato, México. In: *Memorias de la XXXIX Reunión Nacional de Investigación Pecuaria*. México D.F., México, 37.
- Schiller I, Oesch B, Vordermeier HM, Palmer MV, Harris BN, Orloski KA, Buddle BM, Thacker TC, Lyashchenko KP, Waters WR. 2010. Bovine tuberculosis: A review of current and emerging diagnostic techniques in view of their relevance for disease control and eradication. *Transboundary and Emerging Diseases* 57:205–220.
- Schonenbrucher H, Abdulmawjood A, Failing K, Bulte M. 2008. New Triplex Real-Time PCR Assay for Detection of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis in Bovine Feces. *Applied and Environmental Microbiology* 74:2751–2758.
- SENASA. 2012. Resolución 128. Available at <http://www.senasa.gov.ar/contenido.php?to=n&in=1526&io=20050> (accessed April 6, 2015).
- SENASICA. 2015. Campañas Zoonositarias: Tuberculosis bovina. Situación Actual. Available at <http://www.senasica.gob.mx/?id=4369> (accessed June 5, 2015).

- Singh PK, Singh SV, Kumar H, Sohal JS, Singh AV. 2010. Diagnostic application of IS900 PCR using blood as a source sample for the detection of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis in early and subclinical cases of caprine paratuberculosis. *Veterinary Medicine International* 2010:1–8.
- Slana I, Paolicchi F, Janstova B, Navratilova P, Pavlik I. 2008. Detection methods for *Mycobacterium avium* subsp paratuberculosis in milk and milk products: a review. *Veterinari Medicina* 53:283.
- Al-Soud WA, Radstrom P. 2001. Purification and Characterization of PCR-Inhibitory Components in Blood Cells. *Journal of Clinical Microbiology* 39:485–493.
- Souza MHL, Troncon LE, Rodrigues CM, Viana CFG, Onofre PHC, Monteiro RA, Passos ADC, Martinelli ALC, Meneghelli UG. 2002. Trends in the occurrence (1980-1999) and clinical features of Crohn's disease and ulcerative colitis in a university hospital in southeastern Brazil. *Arquivos De Gastroenterologia* 39:98–105.
- Sreevatsan S, Bookout JB, Ringpis F, Perumaalla VS, Ficht TA, Adams LG, Hagius SD, Elzer PH, Bricker BJ, Kumar GK, Rajsekhar M, Isloor S, Barathur RR. 2000. A multiplex approach to molecular detection of *Brucella abortus* and/or *Mycobacterium bovis* infection in cattle. *Journal of clinical microbiology* 38:2602–2610.
- Stabel JR. 2000. Cytokine secretion by peripheral blood mononuclear cells from cows infected with *Mycobacterium paratuberculosis*. *American Journal of Veterinary Research* 61:754–760.
- Sternberg L, Agren E, Frössling J, Holmström A, Lindberg A, Szanto E, Viske D. 2007. Control of paratuberculosis in Sweden. In: *Proceedings of the 9th International Colloquium on Paratuberculosis*. Madison, Wisconsin,.
- Sweeney RW, Uzonna J, Whitlock RH, Habecker PL, Chilton P, Scott P. 2006. Tissue predilection sites and effect of dose on *Mycobacterium avium* subs. paratuberculosis organism recovery in a short-term bovine experimental oral infection model. *Research in Veterinary Science* 80:253–259.
- Sweeney RW. 2011. Pathogenesis of paratuberculosis. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice* 27:537–546.
- Sweeney RW, Whitlock RH, Rosenberger AE. 1992a. *Mycobacterium paratuberculosis* cultured from milk and supramammary lymph nodes of infected asymptomatic cows. *Journal of Clinical Microbiology* 30:166–171.
- Sweeney RW, Whitlock RH, Rosenberger AE. 1992b. *Mycobacterium paratuberculosis* isolated from fetuses of infected cows not manifesting signs of the disease. *American Journal of Veterinary Research* 53:477–480.

- Tohen CO, Barletta RG. 2006. Pathogenesis of *Mycobacterium bovis*. In: Tohen CO, Steele JH, Gilsdorf MJ eds. *Mycobacterium bovis infection in animals and humans*. Ames, Iowa: Blackwell Pub.,
- Tiwari A, VanLeeuwen JA, McKenna SL, Keefe GP, Barkema HW. 2006. Johne's disease in Canada Part 1: Clinical symptoms, pathophysiology, diagnosis, and prevalence in dairy herds. *Canadian veterinary journal* 47:874.
- Tobler NE, Pfunder M, Herzog K, Frey JE, Altwegg M. 2006. Rapid detection and species identification of *Mycobacterium* spp. using real-time PCR and DNA-Microarray. *Journal of Microbiological Methods* 66:116–124.
- Torres P. 2006. Situación de la tuberculosis bovina en la República Argentina. In: SENASA. Buenos Aires, Argentina., 1–21.
- Vidic B, Savic S, Vidic V, Jovicin M, Prica N. 2013. Economic impact of paratuberculosis on milk production. *Biotechnology in Animal Husbandry* 29:183–191.
- Vitale F, Capra G, Maxia L, Reale S, Vesco G, Caracappa S. 1998. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* Complex in Cattle by PCR Using Milk, Lymph Node Aspirates, and Nasal Swabs. *Journal of clinical microbiology* 36:1050–1055.
- Vural SA, Tunca R. 2001. Generalized tuberculosis in a 45 day-old calf. *DTW. Deutsche tierärztliche Wochenschrift* 108:468–470.
- Waters WR, Miller JM, Palmer MV, Stabel JR, Jones DE, Koistinen KA, Steadham EM, Hamilton MJ, Davis WC, Bannantine JP. 2003. Early induction of humoral and cellular immune responses during experimental *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis infection of calves. *Infection and Immunity* 71:5130–5138.
- Whitlock RH, Buergelt C. 1996. Preclinical and clinical manifestations of paratuberculosis (including pathology). *The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice* 12:345–356.
- Whittington R. 2010. Cultivation of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis. In: Behr MA, Collins DM eds. *Paratuberculosis: organism, disease, control*. Wallingford, UK ; Cambridge, MA: CABI.,
- WHO. 2015. Tuberculosis. Tuberculosis fact sheet. Available at <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/en/> (accessed June 4, 2015).
- Wu C, Livesey M, Schmoller S, Manning E, Steinberg H, Davis W, Hamilton M, Talaat A. 2007. Invasion and persistence of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis during early stages of Johne's disease in calves. *Infection and Immunity* 75:2110–2119.

- Zinsstag J, Schelling E, Roth F, Kazwala R. 2006a. Economics of bovine tuberculosis. In: Thoen CO, Steele JH, Gilsdorf MJ eds. *Mycobacterium bovis infection in animals and humans*. Ames, Iowa: Blackwell Pub,.
- Zinsstag J, Kazwala R, Cadmus I, Ayanwale L. 2006b. Mycobacterium bovis in Africa. In: Thoen C, Steele J, Gilsdorf M eds. *Mycobacterium bovis infection in animals and humans*. Ames, Iowa: Blackwell Pub,.
- Zumárraga MJ, Meikle V, Bernardelli A, Abdala A, Tarabla H, Romano MI, Cataldi A. 2005. Use of touch-down polymerase chain reaction to enhance the sensitivity of Mycobacterium bovis detection. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation: Official Publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc* 17:232-238.

12 Apéndice 1

PCR IS900

| Reactivo | Cantidad | Concentración |
|------------------|----------|---------------|
| Agua ultra pura | 13 µl | - |
| Mezcla para PCR* | 20 µl | - |
| Iniciador P3N | 1 µl | 1 µM |
| Iniciador P5N | 1 µl | 1 µM |
| DNA | 5 µl | 30 ng/µl |

* *FastStart PCR Master* (Roche. Indianapolis, IN, EUA)

Condiciones de la PCR

| Etapa | Temperatura | Tiempo | Ciclos |
|---------------------------|-------------|-------------|-----------|
| Desnaturalización inicial | 94°C | 5 minutos | |
| Desnaturalización | 94°C | 40 segundos | 35 ciclos |
| Alineamiento | 55°C | 40 segundos | |
| Extensión | 72°C | 40 segundos | |
| Extensión final | 72°C | 5 minutos | |

13 Apéndice 2

PCR IS6110

| Reactivo | Cantidad | Concentración |
|------------------|------------|----------------|
| Agua ultra pura | 13 μ l | - |
| Mezcla para PCR* | 20 μ l | - |
| Iniciador INS1 | 1 μ l | 1 μ M |
| Iniciador INS2 | 1 μ l | 1 μ M |
| DNA | 5 μ l | 30 ng/ μ l |

* *FastStart PCR Master* (Roche. Indianapolis, IN, EUA)

Condiciones de la PCR

| Etapa | Temperatura | Tiempo | Ciclos |
|---------------------------|-------------|-----------|-----------|
| Desnaturalización inicial | 96°C | 3 minutos | |
| Desnaturalización | 96°C | 1 minuto | 35 ciclos |
| Alineamiento | 65°C | 1 minuto | |
| Extensión | 72°C | 2 minutos | |
| Extensión final | 72°C | 8 minutos | |

14 Apéndice 3

PCR Multiplex

Iniciadores

| Nombre | Secuencia | Concentración |
|---------|----------------------|---------------|
| MTBF1K | ACATACCCAACGCCGTTATC | 160 μ M |
| MTBR1K | GCGCCTACTTCTGTGTGGTC | 160 μ M |
| MAVF500 | GTGGAGATTCGTCTGGTCGT | 40 μ M |
| MAVR500 | GGTAGATGCGTTCCAGGTGT | 40 μ M |
| MBOF250 | CTTCTGCCTCGACAAGTCCT | 10 μ M |
| MBOR250 | ACTGTCCGAATCGAACTCGT | 10 μ M |

| Reactivo | Cantidad | Concentración |
|------------------------|-------------|--|
| Agua ultra pura | 2.8 μ l | - |
| Betaína | 1 μ l | 5M |
| Solución amortiguadora | 1 μ l | 500mM KCl, 100mM TRIS HCl p.H. 9, 1% TRITON X100 |
| MgCl ₂ | 0.4 μ l | 25 mM |
| dNTPs | 0.4 μ l | 10 mM |
| Taq Polimerasa | 0.4 μ l | 1 U/ μ l |
| Iniciadores | 1 μ l | - |
| DNA | 3 μ l | 30 ng/ μ l |

Condiciones de la PCR

| Etapa | Temperatura | Tiempo | Ciclos |
|---------------------------|-------------|-----------|-----------|
| Desnaturalización inicial | 94°C | 3 minutos | 30 ciclos |
| Desnaturalización | 94°C | 1 minuto | |
| Alineamiento | 60°C | 1 minuto | |
| Extensión | 72°C | 2 minutos | |
| Extensión final | 72°C | 5 minutos | |

15 Apéndice 4

PCR RD9

Iniciadores

| Nombre | Secuencia | Concentración |
|--------|-------------------------|---------------|
| RD9F01 | GTGTAGGTCAGCCCATCC | 20 μ M |
| RD9R01 | CGAGCTAGACCTGCACTA CTTG | 20 μ M |

Reacción de Amplificación

| Reactivo | Cantidad | Concentración |
|------------------------|-------------|---|
| Agua ultra pura | 2.8 μ l | - |
| Betaina | 1 μ l | 5M |
| Solución amortiguadora | 1 μ l | 500mM KCl, 100mM TRIS HCl p.H. 9, 1% TRITON X100 |
| MgCl ₂ | 0.4 μ l | 25 mM |
| dNTPs | 0.4 μ l | 10 mM |
| Taq Polimerasa | 0.4 μ l | 1 Unidad/ μ l |
| Iniciadores | 1 μ l | - |
| DNA | 3 μ l | 30 ng/ μ l |

Condiciones de la PCR

| Etapa | Temperatura | Tiempo | Ciclos |
|---------------------------|-------------|-----------|-----------|
| Desnaturalización inicial | 94°C | 3 minutos | |
| Desnaturalización | 94°C | 1 minuto | 30 ciclos |
| Alineamiento | 60°C | 1 minuto | |
| Extensión | 72°C | 2 minutos | |
| Extensión final | 72°C | 5 minutos | |