



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO.**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN.**

**APLICACION DE LA REACCION EN CADENA DE LA
POLIMERASA (PCR) PARA EL DIAGNOSTICO DE *Mycobacterium
avium* subespecie *paratuberculosis* A PARTIR DE HECES DE OVINOS.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

MEDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA

P R E S E N T A:

NORMA GUADALUPE JAIMES MEJIA

ASESOR: M EN C. MARCO ANTONIO SANTILLAN FLORES.

COASESOR: M EN C. JORGE ALFREDO CUELLAR ORDAZ.



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.

DEDICATORIA.

A todos esos seres tan maravillosos y admirables que me llenan de felicidad e inspiración y por ser para mi una especial manifestación de Dios. Gracias por permitirme aprender tanto de ustedes .

A mis abuelitos Chela, Julio y Nacha por ser mi fuente de vida y estar siempre conmigo.

A mi padre por ser mi guía y mi ejemplo a seguir por llenarme de entusiasmo, quitarme el miedo, llenarme de fortaleza y sobre todo por confiar tanto en mi y darme tu apoyo incondicional, te lo debo todo papá. Te amo.

A mi madre por ser mi mejor amiga, por tu amor incondicional, por hacerme sentir tan segura junto a ti y por ser la mejor madre en todo el mundo. Con tu carisma y fortaleza eres mi ejemplo de vida. Te amo mamá.

Al amor de mi vida, Oscar, por tomar siempre mi mano en cada momento difícil y no dejarme caer, por ser pilar esencial en mi vida, por tu amor incondicional y por inspirarme cada día. Me haces muy feliz. Te amo cielo.

A mi hermano Víctor por estar siempre a tu manera muy cerca de mi, por llenarme de alegría y por enseñarme con tu ejemplo a recibir las cosas con serenidad. Te amo hermanito.

A mi hermano Omar por ser mi amigo, por confiar en mi y permitirme estar a tu lado en momentos difíciles. Por la felicidad que me brindas. Te amo.

A mi Tiita por ser tan linda conmigo, por lo feliz que me hace tu compañía, por alentarme y confiar siempre en mi. Eres una gran amiga. Te amo.

A mis peques Chiri, Nina, Chata, Persy, Dashi, Chacha, Hieni, Dorita y Presidente por su amor incondicional y ver en mi siempre la luz.

AGRADECIMIENTOS.

A la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán por ser mi segundo hogar y por todo el conocimiento que me permitió obtener.

Al CENID Microbiología (INIFAP) por permitirme realizar mi trabajo experimental.

A CONACYT por el apoyo económico para realizar este trabajo.

A Marco por su paciencia, su amistad y confianza en la dirección de esta tesis.

Al Dr. Cuéllar por su gran apoyo y sus valiosas enseñanzas.

Al Dr. Manuel Delgado por su confianza y habernos abierto las puertas que hicieron posible este trabajo.

A la Dra. Claudia Guzmán por habernos facilitado material de trabajo muy valioso.

A todos los investigadores del INIFAP, por sus aportaciones a este trabajo.

A cada uno de mis profesores por su valiosa participación en mi formación académica.

Al Doc Alfredo García por sus enseñanzas y su confianza. Por ser más que mi profesor, por ser mi amigo y por haber hecho de mi estancia en la FES algo de lo más hermoso en mi vida.

A la Dra. Coco por abrirme las puertas de su hogar, por su confianza, su cariño, su apoyo. Es usted la pieza principal de mi formación, gracias por su amistad.

A la Dra. María Elena por sus enseñanzas, su entusiasmo, sus experiencias compartidas, por alentarme siempre pero sobre todo por su valiosa amistad.

A Don Víc por su confianza, apoyo y por darle su toque alegre a cada día de trabajo.

A Auro por permitirme compartir momentos hermosos junto a ti, por tus enseñanzas y por tu valiosa participación en la realización de este trabajo, gracias amiga.

A mis amigos, Clodis, Ruth, Bere, Lucero, Gaby, Dulce, Marce, Soni, Rey, Lalo, Héctor y a todos aquellos que han hecho de toda mi vida académica una experiencia inolvidable.

INDICE GENERAL

Página

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. RESUMEN..... | i. |
| 2. INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| 2.1 Definición..... | 1 |
| 2.2 Etiología..... | 1 |
| 2.3 Transmisión..... | 2 |
| 2.4 Cuadro clínico..... | 3 |
| 2.5 Lesiones..... | 4 |
| 2.6 Diagnóstico..... | 4 |
| 2.7 Tratamiento..... | 7 |
| 2.8 Prevención y control | 7 |
| 2.9 Zoonosis..... | 8 |
| 2.10 Importancia económica..... | 8 |
| 3. HIPÓTESIS..... | 10 |
| 4. OBJETIVOS..... | 11 |
| 5. JUSTIFICACIÓN..... | 12 |
| 6. MATERIAL Y MÉTODOS..... | 13 |
| 6.1 Obtención de muestras..... | 13 |
| 6.2 Diagnóstico serológico mediante inmunodifusión en agar gel (IDGA)..... | 13 |
| 6.3 Cultivo bacteriano..... | 14 |
| 6.3.1 Procesamiento de las heces..... | 14 |
| 6.3.2 Siembra..... | 14 |
| 6.4 Obtención de ADN de <i>Mycobacterium avium</i> subespecie <i>paratuberculosis</i> a partir de heces..... | 15 |
| 6.4.1 Concentración de bacterias..... | 15 |
| 6.4.2 Extracción de ADN..... | 15 |
| 6.5 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) anidada..... | 16 |
| 6.6 Prueba de especificidad de la prueba de PCR anidada | 17 |
| 6.7 Prueba de sensibilidad de la PCR anidada | 17 |
| 7. RESULTADOS | 18 |
| 7.1 Inmunodifusión en agar gel (IDGA) y prueba de la Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) anidada | 18 |
| 7.2 Cultivo bacteriológico..... | 19 |
| 7.3 Prueba de especificidad | 20 |
| 7.4 Prueba de sensibilidad | 20 |
| 8. DISCUSIÓN..... | 22 |

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 9. CONCLUSIONES..... | 28 |
| | |
| 10. CUADROS | |
| 10.1 Cuadro 1. Edad, condición corporal y resultados de las pruebas de IDGA, PCR y cultivo de los animales muestreados | 29 |
| 10.2 Cuadro 2. Número y porcentaje de ovinos positivos y negativos a <i>Mycobacterium avium</i> subespecie <i>paratuberculosis</i> mediante las pruebas de Inmunodifusión en gel de agar y Reacción en cadena de la polimerasa..... | 19 |
| 10.3 Cuadro 3. Número y porcentaje de ovinos positivos y negativos a <i>Mycobacterium avium</i> subespecie <i>paratuberculosis</i> mediante las pruebas de inmunodifusión en gel de agar y cultivos bacteriológicos | 19 |
| 10.4 Cuadro 4. Resultados de la cantidad de Unidades Formadoras de Colonias de <i>Mycobacterium avium</i> subespecie <i>paratuberculosis</i> en cada dilución para la prueba de sensibilidad de la prueba de Reacción en cadena de la polimerasa anidada..... | 21 |
| | |
| 11. FIGURAS | |
| 11.1 Figura 1. Productos de amplificación de 210 pb de la PCR anidada a partir de ADN de <i>Mycobacterium avium</i> subespecie <i>paratuberculosis</i> de muestras de heces de ovinos..... | 18 |
| 11.2 Figura 2. Resultados de la PCR anidada de varias micobacterias..... | 20 |
| 11.3 Figura 3. Resultados de PCR de las diluciones del cultivo de <i>Mycobacterium avium</i> subespecie <i>paratuberculosis</i> | 21 |
| | |
| 12. ANEXOS..... | 38 |
| 12.1 Anexo 1. Protocolo de la elaboración del medio de cultivo de yema de huevo de Herrold..... | 38 |
| 12.2 Anexo 2. Elaboración del gel para IDGA..... | 38 |
| | |
| 13. APENDICE DE REACTIVOS UTILIZADOS | 39 |
| | |
| 14. BIBLIOGRAFÍA..... | 40 |

RESUMEN.

La paratuberculosis es una infección entérica crónica progresiva mundialmente distribuida, afecta a rumiantes silvestres y domésticos, es causada por *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis*, un bacilo intracelular de lento crecimiento dependiente de micobactina. El control de esta enfermedad se ha visto limitado por falta de pruebas diagnósticas confiables, sin embargo, las pruebas de ADN se empiezan a utilizar para el diagnóstico de paratuberculosis a partir de heces, ofreciendo así una opción diagnóstica confiable y rápida a diferencia del cultivo fecal que tarda como mínimo de 8 a 12 semanas. El objetivo de este trabajo fue establecer como una prueba diagnóstica de la paratuberculosis ovina la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) anidada, a partir de ADN obtenido de heces de ovinos. Se trabajaron 84 muestras de heces tomadas directamente de recto de ovinos positivos a paratuberculosis por la prueba de inmunodifusión y 79 heces de animales negativos a la misma prueba, a estas muestras se les realizó cultivo fecal y extracción de ADN mediante la técnica enfriamiento calentamiento, la amplificación del ADN se llevó a cabo mediante PCR anidada y finalmente los productos obtenidos fueron observados en geles de agarosa. De los 84 animales positivos a inmunodifusión el 44 % también fue positivo a PCR y el 10.7 % fue positivo a cultivo fecal. De los 74 animales negativos a inmunodifusión el 13.9 % resultaron positivos con PCR anidada y 6.3 % resultaron positivos a cultivo fecal. La PCR anidada es una buena alternativa diagnóstica que muestra una sensibilidad de 36 Unidades Formadoras de Colonias por gramo de heces y especificidad del 100 % y que a diferencia del cultivo ofrece rapidez para la detección de animales con paratuberculosis, detectando aquellos animales infectados que están eliminando el bacilo y que por su baja producción de anticuerpos no son detectados con inmunodifusión y sin embargo, representan una importante fuente de infección para el rebaño, por lo que se considera necesario realizar el diagnóstico de paratuberculosis con dos pruebas, una serológica que detecte anticuerpos contra *M. avium* subespecie *paratuberculosis* y una que identifique a los animales excretores del bacilo, de esta forma se detecta mayor cantidad de animales infectados y se aumenta la sensibilidad del diagnóstico.

Trabajo parcialmente financiado por CONACYT- SAGAP 2003- 002-140.

2. INTRODUCCIÓN.

2.1. Definición.

La paratuberculosis o enfermedad de Johne descrita por primera vez por Johne y Frothingham en 1895 es una infección entérica crónica progresiva invariablemente fatal que afecta todas las categorías de rumiantes domésticos y silvestres incluyendo bovinos, ovinos, caprinos, camellos, búfalos y venados entre otros, ocasionando grandes pérdidas económicas en la industria ganadera (Kreeger, 1991; Erume y col., 2001; Quinn y Markey, 2002; Taddei y col., 2004; Yayo y col., 2001). Es una enfermedad mundialmente distribuida, su importancia es considerable en vacas y ovejas en climas templados y en algunas áreas húmedas tropicales. La incidencia es mayor en animales criados en climas templados, húmedo tropicales y en explotaciones intensivas que favorecen la diseminación de la enfermedad (Radostits y col., 2002; Yayo y col., 2001).

2.2. Etiología.

La paratuberculosis es una enfermedad bacteriana causada por *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* (MAP) el cual es un bacilo intracelular de 1-2 μm por 0.5 μm , es aeróbico, no forma esporas, carece de flagelos y de cápsula, citoquímicamente las micobacterias son grampositivas pero debido a la elevada cantidad de lípidos y ácidos micólicos que contiene las células se tiñen difícilmente con el método de Gram, las capas superficiales de ácidos micólicos ramificados de cadena larga y sus ésteres constituyen la mayoría de los lípidos de la pared celular, estos ácidos micólicos están enlazados con la capa más interna de peptidoglicano por medio de arabinogalactanas. Su propiedad tintorial más notable es su ácido alcohol resistencia, ya que una vez teñidos con fushina, ésta no es removida por el decolorante alcohol – ácido usado en el método de tinción Ziehl- Neelsen (Biberstein y Zee, 1994; Quinn y Markey, 2002). El medio de cultivo de elección para *M. avium* subespecie *paratuberculosis* es yema de huevo de Herrold, su crecimiento es extremadamente lento ya que para su aislamiento a partir de heces toma de 8 a 12 semanas, además para su crecimiento *in vitro* requiere un factor para utilización del hierro denominado micobactina (Vary y col., 1990; Yayo y col., 2001).

Las micobacterias son resistentes a varios agentes antimicrobianos y desinfectantes, sin embargo, los desinfectantes fenólicos son los más eficaces (Biberstein y Zee, 1994).

2.3. Transmisión.

Como las principales lesiones de paratuberculosis ocurren en la parte terminal del intestino delgado y linfonodos, el organismo es altamente excretado en las heces de animales infectados (Yayo y col., 2001, Biberstein y Zee, 1994, Radostits y col., 2002).

En condiciones de campo, la enfermedad se transmite por la ingestión de alimentos y agua contaminados por las heces de animales infectados que excretan el microorganismo (Radostits y col., 2002; Quinn y Markey, 2002; Carter y Chengappa, 1994). Los animales estabulados tienen mayor riesgo de infección debido a la gran contaminación fecal de alimentos y agua y a la larga supervivencia de las bacterias en sitios protegidos (Radostits y col., 2002). La infección entre especies es posible si animales sanos se alimentan en praderas donde previamente pastorearon animales infectados que eliminan el bacilo en heces ya que el microorganismo puede sobrevivir conservando su potencial infectivo varios meses en suelo o materia orgánica si se encuentra protegido de la luz del sol y de la desecación (Biberstein y Zee, 1994; Yayo y col., 2001; Sweeney, 1996).

La infección fetal se asocia principalmente a estadios más avanzados de la enfermedad cuando la hembra gestante elimina mayor cantidad del microorganismo, sin embargo, la infección fetal se produce en hembras con y sin signos clínicos aunque esta ruta es menos importante en la transmisión de la enfermedad (Radostits y col., 2002; Yayo y col., 2001; Quinn y Markey, 2002; Kreeger, 1991; Scanlan, 1991). Aunque en bovinos teóricamente un embrión infectado podría transmitir la enfermedad a la vaca receptora esto no ha sido observado en la práctica, igualmente, de los embriones transferidos a hembras infectadas raramente se observan crías contagiadas (Sweeney, 1996).

La bacteria ha sido aislada en el semen de toros infectados por lo que es frecuente la infección intrauterina, sin embargo, los gérmenes inoculados experimentalmente en útero en el momento de la inseminación son destruidos y no

causan infección general por lo que epidemiológicamente la transmisión venérea no es muy importante (Radostits y col., 2002; Quinn y Markey, 2002; Yayo y col., 2001).

Los recién nacidos son el grupo del rebaño más susceptible a la infección debido a la contaminación fecal de la ubre de las madres y a la presencia del microorganismo en calostro y leche, pequeñas dosis de la bacteria son requeridas para que se establezca la infección en el recién nacido considerando que la dosis mínima infectante es aproximadamente entre 50 y 1000 unidades formadoras de colonias (Yayo y col., 2001; Harris y Barleta, 2001; Scanlan, 1991; Sweeney, 1996). Aunque los animales adultos son refractarios a la infección, esta es posible si se ingieren altas cantidades de la bacteria, algunos animales pueden desarrollar la enfermedad clínica mientras que otros sólo desarrollan sensibilidad a la Johnina (es el antígeno extraído de *M. avium* subespecie *paratuberculosis* usado para la prueba intradérmica) (Yayo y col., 2001; Biberstein y Zee, 1994).

2.4. Cuadro clínico.

Existen factores que favorecen el desarrollo de la enfermedad clínica como son el estrés, incluido el parto y transporte, alta producción de leche, deficiencias nutricionales y supresión inmunológica debido a otros agentes etiológicos como parásitos, bacterias o virus (Radostits y col., 2002; Yayo y col., 2001).

Los animales que se infectan desde jóvenes presentan una fase prolongada subclínica sin presentar evidencias de infección y la transición a la fase clínica puede ocurrir a cualquier edad (Scalan, 1991; Carter y Chengappa, 1994). Sin embargo, los signos clínicos se manifiestan principalmente en animales adultos de dos a tres años y raramente ocurre en animales jóvenes.

La paratuberculosis se presenta como una infección intestinal crónica que se caracteriza sobre todo por pérdida de peso progresiva debido a la mala absorción, signos de hipoproteinemia, como edema submandibular y a diferencia de los bovinos en los que hay diarrea intensa, en los ovinos la diarrea es menos marcada o puede estar ausente pero las heces pueden ser tan blandas y pastosas que pierden su forma característica (Matthews y House, 1999; Biberstein y Zee, 1994; Quinn y Markey, 2002; Radostits y col., 2002). El apetito inicialmente se mantiene pero más tarde disminuye, incrementándose la letargia y depresión, se observa pérdida de lana o pelo y la anemia aumenta conforme progresa la enfermedad (Matthews y House, 1999).

2.5. Lesiones.

Tras su ingestión las bacterias se establecen en la mucosa del intestino delgado y en sus linfonodos, las bacterias son fagocitadas por los macrófagos dentro de los cuales se mantienen viables y protegidas de factores humorales (Radostits y col., 2002). Las lesiones macroscópicas principales son el engrosamiento de la porción distal del intestino delgado lo cual le da una apariencia corrugada debido a la respuesta del hospedador con extensa infiltración de macrófagos, además se observa aumento de tamaño y edema en linfonodos mesentéricos e ileocecales y ocasionalmente pérdida de grasa mesentérica (Carter y Chengappa, 1994; Scanlan, 1991; Sweeney, 1996). Las lesiones microscópicas se caracterizan por inflamación granulomatosa con infiltración de células epiteloideas, células gigantes, eosinófilos, linfocitos y células plasmáticas en mucosa y submucosa de intestino delgado además de numerosos organismos ácido alcohol resistentes intra y extracelulares (Sweeney, 1996; Carter y Chengappa, 1994; Scanlan, 1991).

2.6. Diagnóstico.

Las principales pruebas diagnósticas para la paratuberculosis ovina son:

- *Identificación del organismo ácido alcohol resistente en las heces de los animales.* En casos subclínicos es poco seguro debido a la excreción intermitente y en los animales clínicamente afectados se puede detectar la bacteria entre 30% y 60 % de los casos a partir de las heces (Carter y Chengappa, 1994; Biberstein y Zee, 1994).
- *Cultivo fecal.* La única manera de detectar animales infectados en etapa temprana es por la demostración del organismo en los tejidos por cultivo o demostración histológica, estos animales pueden eliminar el microorganismo al ambiente en niveles debajo del umbral de detectabilidad (Sweeney, 1996).

El cultivo fecal es la prueba antemortem más fiable pero requiere de 8 a 16 semanas como mínimo para detectar al microorganismo, además de que las cepas ovinas y caprinas son difíciles de cultivar a partir de heces y el cultivo es poco sensible por lo

que no es práctico como prueba diagnóstica (Carter y Chengappa, 1994; Biberstein y Zee, 1994; Matthews y House, 1999; Sweeney, 1996; Radostits y col., 2002).

- *Fijación del complemento (CF)*. Además de que es una prueba laboriosa sólo es precisa cuando las lesiones intestinales están avanzadas. Los anticuerpos fijadores del complemento generalmente no son detectables durante el primer año después de la exposición, sólo son detectables cuando las lesiones se extienden (Matthews y House, 1999).
- *La prueba intradérmica de Johnina*. En esta prueba se utiliza un antígeno extraído de *M. avium* subespecie *paratuberculosis* el cual se ha utilizado para estimular respuesta inmunológica en los animales infectados. La especificidad de la prueba se ha aumentado con la utilización de un derivado de proteína purificada de Johnina (PPD), que detecta la hipersensibilidad tardía, pero puede dar falsas reacciones positivas hasta en un 75% debido a que existen micobacterias saprofitas que aunque no ocasionan enfermedad dan una respuesta positiva (Biberstein y Zee, 1994; Matthews y House, 1999; Scanlan, 1991).
- *Inmunodifusión en agar*. Se ha descrito que su sensibilidad y especificidad en ovinos es comparable al aislamiento bacteriológico, siendo útil para detectar animales adultos con infección subclínica ya que ellos pueden tener anticuerpos detectables (Sweeney, 1996).
- *La reacción en cadena de la polimerasa (PCR)* es una técnica usada *in vitro* basada en la amplificación de secuencias específicas del DNA del microorganismo en cuestión (Kaufman y Wu, 1995; Meltzer, 1998).

La amplificación del DNA se lleva a cabo con un par de oligonucleótidos sintéticos que flanquean la región específica a amplificar, en una serie de ciclos que están conformados por: 1) *Desnaturalización* inicial de las cadenas de ADN blanco, en la cual se separan las cadenas complementarias de ADN, 2) *Alineamiento* de los oligonucleótidos o *primers* con las cadenas simples de DNA complementarias, a

una temperatura conocida como T_m del oligo y, 3) *Extensión*, en la que la ADN polimerasa termoestable extiende la longitud de los iniciadores apareados al ADN blanco, al ir polimerizando los desoxinucleótidos trifosfatados libres, resultando en nuevas cadenas complementarias a las dos cadenas sencillas presentes al inicio de la reacción (Barrera y col., 1993; Vélez, 1998).

Al final de cada ciclo las nuevas cadenas vuelven a ser duplicadas por la misma enzima, lográndose una producción exponencial de millones de copias del segmento de ADN específico sometido al proceso (Barrera y col., 1993)

La PCR anidada ofrece una rápida y confiable manera de obtener productos de amplificación. Se utilizan dos iniciadores que son internos al primer producto de PCR. El producto de la primer reacción es usado como plantilla de ADN para la segunda ronda de PCR con estos iniciadores internos. Con esto se obtiene un producto de amplificación más pequeño que el producto original lo que permite aumentar la sensibilidad y especificidad de detección del producto adecuado (McPherson y Moller, 2000).

Las pruebas de ADN son altamente sensibles y específicas y se han empezado a usar para detectar *M. avium* subespecie *paratuberculosis* en las heces (Quin y Markey, 2002; Carter y Chengappa, 1994; Radostis y col., 2002; Matthews y House, 1999).

En el caso del diagnóstico de la paratuberculosis mediante PCR, se utiliza un elemento genético descubierto en 1980, único para *M. avium* subespecie *paratuberculosis*, denominado IS900 del cual hay de 14 – 18 copias en el genoma de la bacteria y codifica para 399 aminoácidos (Bull y col., 2000). Las pruebas genéticas para la detección de esta región permiten distinguir *M. avium* subespecie *paratuberculosis* de otras micobacterias, incluyendo miembros del complejo *M. avium*- intracellulare como *M. avium silvaticum* y *M. avium avium* (Vary y col., 1990; Yayo y col., 2001; Sweenwy, 1996).

2.7. Tratamiento.

Actualmente no existe ningún fármaco antimicrobiano reconocido para el tratamiento de la enfermedad de Johne. Debido a la falta de eficacia y al fracaso de todos los antimicrobianos para proporcionar una curación, no se recomienda ningún tratamiento (Radostits y col., 2002; Biberstein y Zee, 1994; Matthews y House, 1999).

2.8. Prevención y control.

Para la prevención son necesarias prácticas de manejo como: evitar la introducción de animales provenientes de rebaños de los cuales no se conoce su estado sanitario, manejo de los riesgos asociados con el pastoreo como evitar este en praderas que previamente han sido pastoreadas por otros rebaños y especies susceptibles, introducir hembras para reemplazo provenientes de zonas de bajo riesgo, manejo de los riesgos cuando se transportan a los animales a exhibiciones o ventas mediante separación e higiene, manejo de aguas y afluentes provenientes de tierras vecinas y eliminación de estiércol (Yayo y col., 2001)

En algunos países se utilizan controladamente vacunas parenterales preparadas con cepas de MAP, tanto vivas como muertas pero no siempre se dispone de ellas (Biberstein y Zee, 1994; Harris y Barleta, 2001; Benedictus y Kalis, 2003; Sweeney, 1996). La vacunación proporciona protección contra la enfermedad clínica y disminuye la excreción fecal pero no elimina ni previene la infección (Scanlan, 1991; Radostits y col., 2002, Benedictus y Kalis, 2003).

El veterinario juega la parte más importante para el control de paratuberculosis al informar a los propietarios del rebaño acerca de la naturaleza de la enfermedad y de las importantes pérdidas económicas que ocasiona (Yayo y col., 2001).

El control de la enfermedad en ovinos se ve limitado por falta de pruebas fiables, además de que la elección de pruebas diagnósticas es complicada por consideraciones económicas, sin embargo, la mejor prueba es la que detecta animales eliminadores de *M. avium* subespecie *paratuberculosis* (Matthews y House, 1999; Sweeney, 1996).

El control eficaz de la enfermedad depende del control de la transmisión fecal – oral, de la adquisición de reemplazos de rebaños sin antecedentes de la enfermedad y de

minimizar el riesgo de contaminación de futuras generaciones, así como de la detección temprana de animales infectados y de la eliminación de portadores sanos del rebaño (Yayo y col., 2001; Sweeney, 1996).

2.9. Zoonosis.

La leche y el agua son fuentes importantes para la adquisición de MAP ya que se ha comprobado que MAP eliminado en la leche resiste la pasteurización así como el tratamiento del agua con cloro (Biet y col., 2005).

M. avium subespecie *paratuberculosis* ha sido aislado de tejido intestinal de pacientes con enfermedad de Crohn, esto ha hecho suponer que puede ser patógeno para humanos, sin embargo, esto no ha sido comprobado y los postulados de Koch no han sido cumplidos para la enfermedad de Crohn, por lo que este aspecto es aún controversial (Harris y Barleta, 2001; Yayo y col., 2001; Biet y col., 2005).

2.10. Importancia económica.

La paratuberculosis causa pérdidas económicas a través de la muerte de los animales infectados, disminución en la producción de leche, bajas en la producción de crías y por el incremento en los honorarios veterinarios y costos relacionados con el diagnóstico y los medicamentos utilizados. Como esta enfermedad afecta la absorción de nutrientes, el consumo de alimentos que permanece normal está subutilizado porque la condición corporal de los infectados se deteriora a medida que la enfermedad progresa. Otra pérdida económica está referida a la pérdida de valor y prestigio de los reproductores con lo cual hay pérdida de mercados (Traversa y col., 2005).

Existen otras pérdidas que no son evidentes y se denominan costos ocultos o inaparentes, entre ellos se puede considerar (Traversa y col., 2005):

- La venta prematura de los animales enfermos clínicos o infectados.
- Reducción en el valor de venta de animales menos productivos e incremento de la tasa de desecho.

- Reducción a la mitad de la expectativa de vida productiva.
- Reducción del rebaño de reposición, con lo cual se limita la diversidad genética.
- Incremento de los costos de reposición.
- Período improductivo desde el deshecho hasta que el animal de reemplazo comienza a producir. Sumado a la disminución de la óptima utilización de los salarios, maquinarias y edificios.
- Reducción de la conversión del alimento.
- Pérdida de inversión en el rebaño de reposición que ha sido infectado o expuesto desde el nacimiento.
- Incremento en la susceptibilidad a otras enfermedades y problemas reproductivos.
- Incremento de costos veterinarios.

3. HIPÓTESIS.

La PCR anidada realizada a partir de ADN obtenido de heces de ovinos es una herramienta diagnóstica que permite detectar animales excretores del bacilo *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis*.

4. OBJETIVOS.

Implementar la técnica de PCR anidada con ADN de *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* obtenido a partir de heces de ovinos para el diagnóstico de la paratuberculosis.

5. JUSTIFICACIÓN.

El uso de pruebas diagnósticas donde se detecta al *Mycobacterium avium* subespecie paratuberculosis en heces es de gran importancia para identificar los animales que son fuente de infección para el rebaño o diseminadores de la enfermedad por lo que en el presente estudio se implementó una técnica molecular que permite detectar de manera rápida y confiable a los animales que eliminan el microorganismo por heces.

6. MATERIAL Y MÉTODOS.

6.1 Obtención de muestras.

Se evaluaron 197 muestras de heces y suero de ovinos provenientes de explotaciones ubicadas en los estados de México, Guanajuato y Jalisco. En las cuales el diagnóstico de paratuberculosis sólo era de tipo clínico presuntivo y no se contaba con un programa de control de dicha enfermedad. En estas explotaciones se tenía como antecedente la presentación de casos de ovinos generalmente mayores de dos años con adelgazamiento crónico sin respuesta al tratamiento (desparasitantes, vitaminas, anabólicos) o al cambio de alimento, las hembras que después del parto perdían condición corporal y no recuperaban peso, además de que se reportaba la aparición de edema submandibular y heces pastosas en algunos animales.

Para el cultivo bacteriano y la PCR se tomaron muestras de heces directamente de recto de animales mayores a dos años con signos clínicos sugestivos de paratuberculosis (básicamente condición corporal menor a 2, edema submandibular, debilidad y alopecia), también se tomaron muestras de animales mayores a dos años aparentemente sanos y de animales menores a dos años igualmente sin cuadro clínico sugestivo del problema. Las muestras de heces se mantuvieron en refrigeración a 4 °C hasta su procesamiento en el laboratorio de Micobacterias CENID Microbiología del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias.

De los mismos animales también se tomaron muestras de sangre de la vena yugular en tubos con vacío sin anticoagulante, se mantuvieron a temperatura ambiente y posteriormente se centrifugaron a 2,500 rpm (Sol-bat C-300) durante 5 minutos para la obtención del suero, el cual fue utilizado para el diagnóstico serológico de paratuberculosis.

6.2. Diagnóstico serológico mediante inmunodifusión en agar gel (IDGA).

Se colocaron 15 ml del agar en una caja de petri hasta la formación del gel y se realizaron los pocillos (6 laterales y uno central). En el pozo del centro se colocó el antígeno (*Protoplasmic antigen from Mycobacterium paratuberculosis*, Allied Monitor, Inc.) y en los pozos periféricos los sueros problema en cantidades iguales (30 µl), además se colocó un suero control positivo. La caja se mantuvo en una cámara húmeda

a 37° C durante 24-48 horas, finalizado este tiempo se realizó la lectura, si se presentaba una banda de precipitación definida antes de 48 horas se consideraba como positivo, mientras que la ausencia de dicha banda se consideró negativo.

6.3. Cultivo bacteriano.

6.3.1. Procesamiento de las heces.

Se tomaron dos gramos de heces y se colocaron en 40 ml de agua destilada contenidos en tubos Falcon de 50 ml. Se mantuvieron en agitación durante 30 minutos y posteriormente se dejaron en reposo durante una hora.

Se colocaron 5 ml del sobrenadante de la suspensión de heces en 40 ml de Zephiran al 0.3%, se mezcló invirtiendo el tubo varias veces y se dejó en reposo esta solución durante toda la noche.

6.3.2. Siembra.

Usando una pipeta Pasteur se colocaron de 4 a 7 gotas del sedimento de la suspensión de heces en Zephiran. La siembra se hizo por duplicado en el medio de cultivo yema de huevo de Herrold adicionado con micobactina, anfotericina B y fungizona.

Se mantuvieron en incubación en posición horizontal a 37 °C. Se revisaron cada mes para ver si se observaba crecimiento. Si después de mínimo ocho semanas de incubación se observaba algún crecimiento sospechoso de *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* se procedía a realizar un frotis de las colonias para teñirlo con Zheel- Nielsen. Si a la observación microscópica se detectaban bacilos ácido alcohol resistentes (BAAR), el cultivo bacteriológico era considerado como positivo.

6.4. Obtención de ADN de *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* a partir de heces.

6.4.1. Concentración de bacterias.

Se tomaron 2 g de heces y se disolvieron en 40 ml de cloruro de hexadecilpiridinio (HCP) al 0.76%, se colocaron 15 minutos en un agitador orbital (*Thermolyne Big Bill*) a 150 rpm, para posteriormente dejar la solución en reposo durante 18 horas. Posteriormente se tomaron 20 ml del sobrenadante de la solución, se centrifugó (Sol-bat C-300) por 10 minutos a 2,500 rpm, se desechó el sobrenadante y al *pellet* obtenido se le realizaron tres lavados con 5 ml de PBS cada uno..

El *pellet* se resuspendió en 1.5 ml de PBS 1X y fue transferido a tubos Eppendorf de 2 ml, posteriormente se centrifugó (Centrifuga 5410) 5 minutos a 14,000 rpm y se eliminó el sobrenadante.

6.4.2. Extracción de ADN.

Para la lisis celular y extracción de ADN se trabajó con el método de enfriamiento calentamiento (Garrido y col., 2000), para lo cual el *pellet* obtenido en el paso de concentración de bacterias fue resuspendido en 500 µl de TE- Triton X100 en criotubos de 1.5 ml. Las muestras se colocaron en nitrógeno líquido durante 5 minutos y enseguida en calor seco (horno) a 100 °C durante 5 minutos, este procedimiento se realizó tres veces. Después del enfriamiento y calentamiento se agregaron a cada muestra 450 µl de isoticianato de guanidina 5 M y 250 µl de acetato de amonio con pH de 6.3, se mezclaron por inversión varias veces y los criotubos se colocaron en hielo durante 15 minutos.

Las muestras se transfirieron a tubos Eppendorf de 2 ml y se les agregó 500 µl de cloroformo alcohol isoamílico (24:1), se mezcló durante 10 segundos y se centrifugó 5 minutos a 14,000 rpm, la fase acuosa de cada muestra fue transferida a un tubo Eppendorf de 1.5 ml, donde nuevamente se le agregan 500 µl de cloroformo – alcohol isoamílico para repetir el procedimiento. A la fase acuosa obtenida se le agregaron 450 µl de isopropanol para precipitar los ácidos nucleicos y se colocó a -20 °C durante toda la noche. Posteriormente se centrifugó durante 15 minutos a 14,000 rpm y se eliminó el sobrenadante, se realizaron dos lavados con 1 ml de etanol al 70%, se mezcló por

inversión y se centrifugó durante 5 minutos a 14,000 rpm, se eliminó el sobrenadante, y el *pellet* obtenido se dejó secar a temperatura ambiente. Se resuspendió el *pellet* en 100 µl de agua bidestilada estéril. El ADN fue conservado a -20 °C hasta su utilización en la PCR anidada.

6.5. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) Anidada.

En las muestras de heces obtenidas se buscó la presencia de ADN de *M. avium* subespecie *paratuberculosis* a través de la PCR anidada. Para este procedimiento, se realizaron dos reacciones, en donde el producto de la primera reacción de PCR simple es usado como plantilla para amplificar segmentos más pequeños en una segunda reacción anidada. Los iniciadores utilizados están basados en el elemento de inserción IS 900 el cual es único para el bacilo *M. avium* subespecie *paratuberculosis*, el cual presenta de 14 a 18 copias dentro de su genoma y codifica para 399 aminoácidos de la bacteria (Bull, 2000). Para la reacción simple, se utilizaron los iniciadores (Erume y col., 2001): PARA1 (5' TGA TCT GGA CAA TGA CGG TTA CGG A 3') y PARA4 (5'CGC GGC ACG GCT CTT GTT 3') (*Invitrogen*) para obtener un producto de amplificación de 563 pb y posteriormente ser utilizados como templete en la reacción anidada, en donde los iniciadores utilizados fueron: PARA2 (5' GCC GCG CTG CTG GAG TTA A 3') y PARA3 (5' AGC GTC TTT GGC GTC GGT CTT G 3') (*Invitrogen*) con la finalidad de amplificar un producto final de 210 pb.

Para la primer reacción se utilizaron 3 µl de ADN proveniente de heces de ovinos, las condiciones para 50 µl de reacción fueron: Amortiguador de reacción 67 Mm (*Biogenica*), MgCl₂ 2 mM (30 mM, *Biogenica*), dNTP's 200 mM c/u, (*Biogenica*), 25 pMol de los iniciadores PARA 1 y PARA 4 (*Invitrogen*), 1 U de ADN Polimerasa Termoestable (5 U/ul, *Biogenica*), y 34.75 µl de agua. La amplificación se llevó a cabo en un termociclador (*Termo electrón corporation*) con el siguiente programa:

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

Las condiciones de la PCR anidada para 50 µl de reacción son las siguientes: 3 µl como plantilla de la primera reacción de PCR, amortiguador de reacción 67 Mm (Biogenica), MgCl₂ 2mM (30 mM, Biogenica), dNTP's 200 mM c/u, (Biogenica), 25 pMol de los iniciadores PARA 1 y PARA 4 (Invitrogen), 1 U de ADN Polimerasa Termoestable (5 U/µl, Biogenica), y 34.75 µl de agua. Las muestras se colocaron en el termociclador con las mismas condiciones de la PCR simple.

Los productos finales de PCR fueron visualizadas en un gel de agarosa al 2 % utilizando una cámara de electroforesis (*Gibco BRL electrophoresis supply, model 250*) a 75 voltios durante 40 minutos y teñidos con bromuro de etidio 0.5 µg/ml.

6.6. Prueba de especificidad de la PCR anidada.

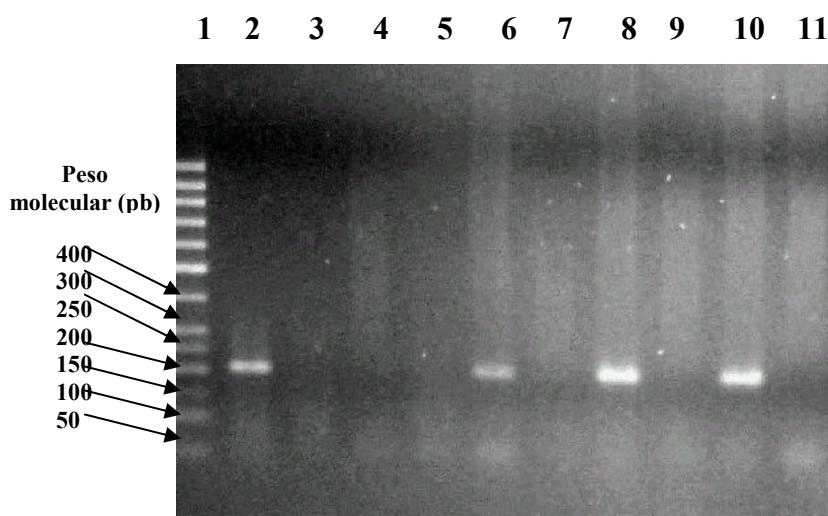
Para determinar la especificidad de la PCR anidada estandarizada, se realizó esta técnica utilizando ADN proveniente de cepas de *M. avium* (ATCC 25291), *M. vaccae* (ATCC 15483), *M. kansasii* (ATCC 12478), *M. tuberculosis* (H37 RV ATCC 25618), *M. phlei* (ATCC 12298), *M. bovis* (BCG cepa Pasteur ATCC 35734, AN5 ACTT 35726) y *M. paratuberculosis* (ATCC 19698) con la finalidad de excluir amplificaciones inespecíficas (Soolingen y col., 1991).

6.7. Prueba de sensibilidad de la PCR anidada.

Para determinar la cantidad mínima de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) que pueden ser detectadas con PCR anidada se tomó 1 ml de medio líquido Proskauer & Beck con crecimiento de *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* y se colocó en un tubo para espectrofotómetro para medir la absorbancia (espectrofotómetro Lambda EZ 150). En base a la absorbancia de 1 para 1,000,000 de UFC se realizaron diluciones décuples de las micobacterias e igualmente se realizó la medición de la absorbancia para realizar los cálculos correspondientes y obtener las UFC que se encuentran en cada dilución. De cada dilución de bacterias previamente estimadas se tomó 1 ml y se mezcló con 1 g de heces para posteriormente realizar extracción de ADN y realizar la técnica de PCR anidada y determinar la máxima dilución con la que se obtenía un PCR positivo.

7. RESULTADOS.

De los 197 animales muestreados, se obtuvieron 84 (42.6 %) ovinos positivos a *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* por medio de la técnica de inmunodifusión en agar gel (IDGA), resultando 113 (57.3 %) negativos. Por su parte, con la prueba de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) anidada el 27.9% (55/197) fueron positivos y el 72% (142/197) negativos (Figura 1). Con el diagnóstico bacteriológico el 7.1% (14/197) resultaron positivos y 92.9 % (183/197) negativos en las muestras de heces colectadas (Cuadro 1).



11.1 Figura 1. Gel de agarosa al 2 % teñido con bromuro de etidio.

Productos de amplificación de 210 pb de la PCR anidada a partir de ADN de *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* de muestras de heces de ovinos. Carriles: 1) Marcador de peso molecular, 2) *M. avium* subespecie *paratuberculosis* (control +), 3-5, 7, 9) Muestras de heces negativas 6, 8, 10) Muestras de heces positivas, 11) Agua (control -).

7.1 Inmunodifusión en agar gel (IDGA) y prueba de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) anidada.

En cuanto a la comparación de resultados de la técnica de IDGA con los obtenidos en la prueba de PCR anidada (Cuadro 2), se observó que de los 84 animales positivos a IDGA se logró amplificar un producto de 210 pares de bases del elemento de inserción IS900 del bacilo *M. avium* subespecie *paratuberculosis* en 37 muestras (44%),

mientras que 47 (55%) fueron negativos. De los 113 animales negativos a la serología, se observó que 18 (16%) muestras amplificaron el producto de 210 pb.

Cuadro 2. Número y porcentaje de ovinos positivos y negativos a *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* mediante las pruebas de inmunodifusión en gel de agar y reacción en cadena de la polimerasa.

| | IDGA ^a (+) | | IDGA (-) | | Total |
|----------------------------|-----------------------|------|----------|------|-------|
| | n | % | n | % | |
| PCR^b (+) | 37 | 44.0 | 18 | 15.9 | 55 |
| PCR (-) | 47 | 55.9 | 95 | 84.1 | 142 |
| Total | 84 | 100 | 113 | 100 | 197 |

^aPrueba de inmunodifusión en gel de agar

^bReacción en cadena de la polimerasa

7.2. Cultivo bacteriológico.

De los cultivos bacterianos a partir de heces, se obtuvieron 14 cultivos con crecimiento bacteriano, a los que se les realizó frotis y tinción Ziehl-Neelsen y donde se pudieron observar los bacilos ácido alcohol resistentes (BAAR). De estos aislamientos 5 (4.4%) eran de animales negativos a la serología y 9 (10.7%) procedían de animales seropositivos a *M. avium* subespecie *paratuberculosis* (Cuadro 3).

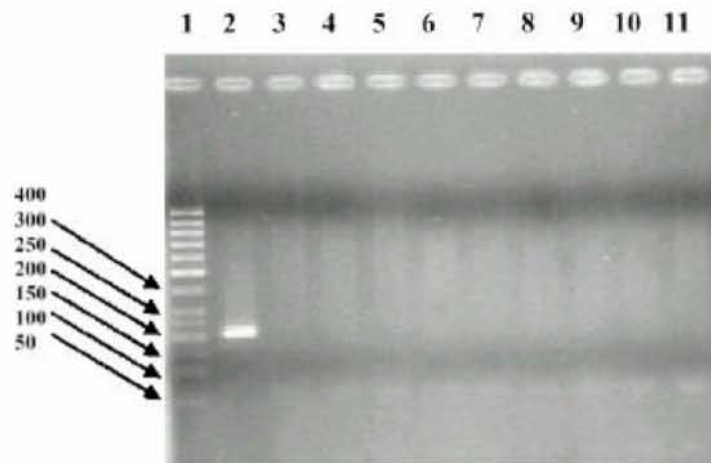
Cuadro 3. Número y porcentaje de ovinos positivos y negativos a *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* mediante las pruebas de inmunodifusión en gel de agar y cultivo bacteriológico.

| | IDGA ^a (+) | | IDGA (-) | | Total |
|--------------------|-----------------------|------|----------|------|-------|
| | n | % | n | % | |
| Cultivo (+) | 9 | 10.7 | 5 | 4.4 | 14 |
| Cultivo (-) | 75 | 89.3 | 108 | 95.6 | 183 |
| Total | 84 | 100 | 113 | 100 | 197 |

a Prueba de inmunodifusión en gel de agar.

7.3. Prueba de especificidad.

Con la finalidad de excluir amplificaciones inespecíficas en la PCR anidada estandarizada y asegurar la especificidad, se utilizaron ADN provenientes de cepas de *M. avium* subespecie *paratuberculosis* y otras micobacterias (*M. avium*, *M. vaccae*, *M. kansasii*, *M. tuberculosis*, *M. phlei*, *M. bovis*), obteniendo solo amplificación de un producto de 210 pb con el ADN de *M. avium* subespecie *paratuberculosis* (Figura 2).



11.2 Figura 2. Gel de agarosa al 2 % teñido con bromuro de etidio.

Resultados de la PCR anidada de varias micobacterias. Carriles: 1) Marcador de peso molecular, 2) *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis*, 3) *Mycobacterium avium avium*, 4) *Mycobacterium vaccae*, 5) *Mycobacterium phlei*, 6) *Mycobacterium kansasii*, 7) *Mycobacterium tuberculosis* 8) *Mycobacterium bovis*, 9) agua (control -).

7.4. Prueba de sensibilidad.

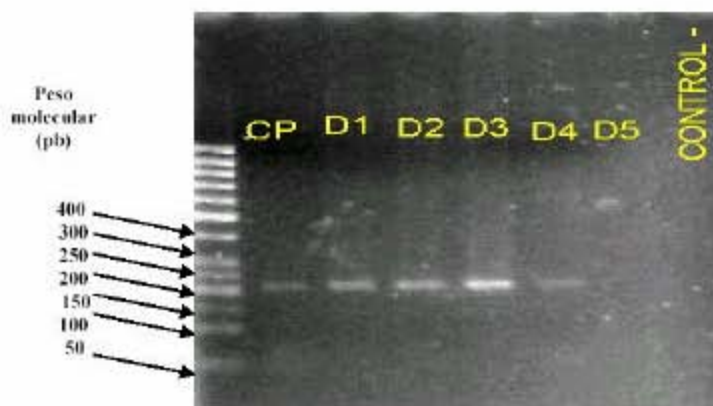
La densidad óptica para el mililitro de cultivo puro de MAP fue de 0.3603, por lo que esta solución contiene aproximadamente 360,300 UFC. La cantidad de UFC calculadas para cada dilución de este cultivo puro se muestra en el cuadro 4 .

10.4 Cuadro 4. Resultados de la cantidad de unidades formadoras de colonias de *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* en cada dilución para la prueba de sensibilidad de la prueba de reacción en cadena de la polimerasa anidada.

| Dilución | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|---------------------|----------|-------|-----|----|-----|
| UFC/ml ^a | 36,033.3 | 3,603 | 360 | 36 | 3.6 |

a Unidades formadoras de colonia por mililitro de solución.

Se obtuvo el ADN de MAP a partir de las heces mezcladas con cada dilución del cultivo puro y posteriormente se realizó PCR anidada y se observó amplificación del producto de 210 pb en la dilución 1, 2, 3 y 4 que corresponden a 36,000, 3,600, 360 y a 36 UFC respectivamente, por lo que la PCR anidada puede detectar hasta 36 UFC por gramo de heces (Figura 3).



11.3 Figura 3. Gel de agarosa al 2 % teñido con bromuro de etidio.

Resultados de PCR de las diluciones del cultivo de *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis*. Carriles: 1) marcador de peso molecular, 2) cultivo puro, 3) dilución 1 con 36,000 unidades formadoras de colonias (UFC), 4) dilución 2 con 3,600 UFC, 5) dilución 3 con 360 UFC, 6) dilución 4 con 36 UFC, 7) dilución 5 con 3 UFC, 8) agua (control -).

8. DISCUSIÓN.

En este trabajo se implementó la técnica de PCR anidada utilizando ADN de *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* (MAP) a partir de muestras de heces de ovinos, lo cual permite detectar a los animales que excretan la micobacteria y que diseminan la enfermedad.

El diagnóstico inmunológico de paratuberculosis en ovinos se realiza mediante la técnica de inmunodifusión en gel de agar (IDGA), prueba considerada la más adecuada para ovinos debido a la confiabilidad y simplicidad para realizarse en todo el rebaño y empezar a detectar a los animales positivos (Merkal, 1989; Vélez 1998), por lo que en este trabajo fue la utilizada para corroborar junto con la prueba de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) anidada y el cultivo bacteriológico la presencia de la enfermedad en los rebaños trabajados detectándose que el 42.6 % (84/197) de los animales procedentes de explotaciones con antecedentes de la enfermedad resultaron serológicamente positivos, aunque esta cantidad se considera alta, no hay trabajos similares con los cuales comparar estos resultados, por lo que se considera necesario establecer estudios para determinar la seroprevalencia de paratuberculosis en los ovinos de México y detectar las áreas en las cuales esta enfermedad representa un mayor problema y empezar a tomar medidas de control. Para la IDGA se ha reportado una sensibilidad del 73 % y una especificidad entre el 97.5 % y 100 %, sin embargo, se podrían obtener resultados falsos negativos debido a la anergia del animal (Sweeney, 1996; Radostits y col., 2002) por lo cual esta prueba debería ser complementada con otras técnicas (Dimareli y Sarris, 2001) que detecten a animales excretores de *M. avium* subespecie *paratuberculosis* en las heces.

Recientemente se han empezado a utilizar técnicas moleculares como la PCR para la detección de MAP en muestras de heces y poder identificar a aquellos animales que están eliminando la bacteria (Quin y Markey, 2002; Carter y Chengappa, 1994; Radostis y col., 2002; Matthews y House, 1999).

Aunque después de la extracción de ADN, varios tipos de PCR pueden ser probados para la amplificación, la PCR anidada ha mostrado más sensibilidad debido a

que con este método se obtiene como resultado una amplificación exponencial de un producto de ADN previamente amplificado (Hennings y col., 2003).

El mayor reto para el diagnóstico por la técnica de PCR a partir de heces es obtener ADN libre de inhibidores de la reacción por lo cual se han utilizado diferentes métodos de extracción de ADN de MAP a partir de heces, sin embargo, para este trabajo se probaron las técnicas de extracción utilizadas por Stabel y Benentine. (2005), Erume y col. (2001) y Garrido y col. (2000). Siendo con la técnica empleada por este último (enfriamiento – calentamiento) con la que se obtuvo DNA de mejor calidad para ser empleado en la PCR anidada.

Las secuencias contenidas en el elemento de inserción IS 900 son únicas y altamente específicas para *M. avium* subespecie. *paratuberculosis*, por lo tanto, el IS 900 representa una herramienta valiosa para la detección de *M. avium* subespecie *paratuberculosis* sin que exista la posibilidad de interferencia con otras micobacterias incluyendo *M. avium* (Vary y col., 1990). En este trabajo se pudo corroborar que la prueba de PCR basada en el elemento de inserción IS900 también proporciona alta especificidad (100%) para el diagnóstico de paratuberculosis (Ikonomopoulos y col., 2004), pues solo se obtuvo amplificación de DNA con *M. avium* subespecie *paratuberculosis* y no con otras mycobacterias incluyendo *M. avium*, dando una validez importante a la técnica para poder ser utilizada en estudios epidemiológicos sin que existan amplificaciones inespecíficas de otras micobacterias.

Taddei y col., (2004) trabajaron la prueba de PCR a partir de ADN de muestras de heces de bovinos con la cual también obtuvieron una especificidad del 100% empleando el elemento de inserción IS 900. Por su parte, Gwozdz y col., (1997), empleando la misma técnica, a partir de ADN de tejidos de ovinos (sangre, hígado, linfonodos ileocales e ileon) basándose en el IS 900, obtuvieron también el 100% de especificidad.

Por otra parte, Garrido y col. (2000), obtuvieron una sensibilidad para la prueba de PCR de 50 bacterias por gramo de heces utilizando la técnica de extracción de ADN de enfriamiento–calentamiento. Asimismo, Taddei y col. (2004) emplearon 3 diferentes kits comerciales de PCR para el diagnóstico de paratuberculosis a partir de heces de

bovinos obteniendo como resultados que la mayoría de PCR positivos correspondía a animales considerados como altos excretores de la bacteria (más de 50 UFC).

Vary y col. (1990) reportan para la técnica de PCR un límite de detección de 100 UFC por ml de heces de bovino, siendo similar el límite de detección para el cultivo bacteriológico (Merkal, 1989). Cuando se emplea esta prueba para la detección de MAP a partir de tejidos, se logran identificar aproximadamente 2 genomas (10 fg) de *M. avium* subespecie *paratuberculosis* en 5.0 mg de tejido (Gwozdz y col., 1997).

Mientras que en el presente trabajo utilizando la técnica de extracción de DNA enfriamiento – calentamiento y empleando la prueba de PCR anidada para aumentar la sensibilidad de la prueba se lograron detectar hasta 36 UFC, cantidad que corresponde a excretores moderados (Taddei y col., 2004), por lo que los animales que fueron detectados como excretores mediante la técnica de PCR anidada al menos estaban eliminando 36 UFC por gramo de heces, sin embargo, en las muestras de heces la sensibilidad de la prueba puede variar o verse reducida por la presencia de inhibidores (Harris y Barleta, 2001; Gwozdz y col., 1997; Taddei y col., 2004) como son las células epiteliales, la sangre, sales biliares, componentes de vegetales y carbohidratos complejos, cuya remoción representa el mayor reto para mejorar la sensibilidad ya que afectan la amplificación de ADN incluyendo en muestras de heces de animales que eliminan grandes cantidades de bacterias (Stabel y col., 2005; Hennings y col., 2003).

De los animales positivos a serología, el 55.9% (47/84) resultó negativo a *M. avium* subespecie *paratuberculosis* mediante la prueba de PCR debido a que los animales clínicamente afectados eliminan el microorganismo en forma intermitente por las heces, por lo que se pudieron haber perdido periodos de excreción bacteriana en el cual no se tomó muestra (Romero, 2003), con esto se explica el porque en las pruebas diagnósticas, donde se detecta el bacilo en heces, pueden obtenerse resultados negativos con muestras de animales positivos a serología, y es debido a que el microorganismo no se está eliminando en ese momento o se está eliminando en cantidades no detectables razón por la cual aunada a los inhibidores en las heces en este trabajo no todos los animales que fueron positivos a IDGA también resultaron positivos a PCR .

El 15.9% (18/113) de los animales que fueron positivos a *M. avium* subespecie *paratuberculosis* mediante la técnica de PCR no habían sido detectados con serología por la falta de títulos de anticuerpos detectables, sin embargo, están eliminando el bacilo en las heces y representan una fuente de infección importante para el rebaño. Los animales negativos a *M. avium* subespecie *paratuberculosis* con inmunodifusión en ocasiones resultan positivos a la prueba de PCR o a cultivo debido a que en estos animales la producción de anticuerpos o respuesta inmune humoral disminuye cuando la respuesta celular aumenta, esta relación inversa se ha visto que es mediada por la actividad antagonista entre los linfocitos cooperadores T_{H1} y T_{H2} (Sweeney, 1996), otra razón por la cual la producción de anticuerpos se puede ver afectada es por la pérdida de respuesta inmune ante la infección, actividad supresora denominada anergia, sin embargo, se sabe que aunque estos animales poseen grandes cantidades de bacterias no son detectados con diagnóstico serológico (Toman y col., 2003; Sweeney, 1996).

En cuanto a los resultados de la prueba PCR anidada estandarizada para el diagnóstico de *M. avium* subespecie *paratuberculosis* en comparación con la serología, se obtuvo que el 44% (37/84) resultaron positivos a ambas pruebas, es decir estos animales poseen títulos de anticuerpos detectables por IDGA y al mismo tiempo están eliminando el bacilo en heces, esto se debe a que la presencia y cantidad de inmunoglobulinas contra antígenos de MAP está directamente relacionada a la carga y eliminación bacteriana ya que la presencia de inmunidad humoral generalmente implica incremento de la proliferación bacteriana. La prueba de IDGA es muy específica y posee mejor sensibilidad para identificar animales en etapas avanzadas de la enfermedad, por lo que esta prueba puede detectar algunos animales que eliminan el microorganismo (Sweeney, 1996; Harris y Barleta, 2001).

De los 197 animales con los que se trabajó, 55 fueron positivos a *M. avium* subespecie *paratuberculosis* por medio de la técnica de PCR y con el cultivo solamente se detectaron 14. Esta mayor sensibilidad de la PCR contra cultivo para diagnóstico de paratuberculosis ya había sido reportada anteriormente por diferentes autores como, Dimarrelli y Sarris (2001) quienes también reportan haber detectado mayor cantidad de animales positivos a paratuberculosis utilizando la prueba de PCR que con cultivo bacteriológico, ambas técnicas a partir de heces. Erume y col. (2001) realizaron el

diagnóstico de paratuberculosis mediante cultivo bacteriológico, las técnicas de PCR simple y PCR anidada, con lo cual obtuvieron dos muestras positivas con la PCR anidada que habían resultado negativas a cultivo y a la PCR simple. A pesar de que el cultivo bacteriológico de heces ha sido considerado como la prueba más preciada para el diagnóstico de la paratuberculosis, posee grandes desventajas, requiere medio de cultivo específico adicionado con micobactina y mucho tiempo en incubación, de 12 a 16 semanas como mínimo, otro problema que se presenta con el cultivo fecal es la pérdida por contaminación con otros microorganismos y la gran dificultad con la que crecen las cepas ovinas (Ikonomopoulos y col., 2004; Yayo y col., 2001) razón por la que son pocos los ovinos que son detectados con este método (Ikonomopoulos y col., 2004), además de requerir de por lo menos 10^3 bacilos por ml de muestra procesada para asegurar el crecimiento (Ikonomopoulos y col., 2004; Romero, 2003), reportándose una sensibilidad del 25.4 % (Dimareli y Sarris, 2001). La técnica de PCR es capaz de detectar bacterias viables y no viables por lo que la sensibilidad es mayor con este método que con el cultivo que solamente detecta las bacterias viables capaces de desarrollarse en el medio de cultivo (Gwozdz y col., 1997) lo anterior explica el porque en este trabajo sólo se obtuvieron 14 cultivos positivos, este resultado depende también de la habilidad del microbiólogo. Otra desventaja es el alto costo de la técnica debido al material específico requerido, el tiempo de permanencia de los tubos en estufa bacteriológica, la labor humana requerida durante varios meses, además de que el costo puede aumentar aún más al requerirse pruebas complementarias para la certera identificación de *M. avium* subespecie *paratuberculosis* (Merkal, 1989; Yayo y col., 2001) . Sweeney (1996) reporta que en Estados Unidos que la mayoría de los laboratorios de diagnóstico veterinario estiman el costo del cultivo de MAP a partir de heces, usando tubos con medio de cultivo yema de huevo de Herrold, en aproximadamente US \$12.00 y en México tiene un costo aproximado de \$200.00 por muestra procesada.

La técnica de PCR también detecta animales excretores de MAP en las heces y a diferencia del cultivo bacteriológico, los resultados se pueden obtener rápidamente de 3 a 4 días (Stabel y col., 2005; Dimareli y Sarris 2001)), aunque el diagnóstico mediante PCR anidada tiene grandes ventajas, el costo de esta prueba representa una gran limitante, sin embargo, su uso sería de mucha utilidad cuando se requiere el diagnóstico en breve tiempo antes de introducir nuevos animales a una explotación que pudieran representar riesgo sanitario para el resto del rebaño, su aplicación también podría ser

recomendado para proyectos de investigación y para el control de paratuberculosis de animales muy valiosos (Taddei y col., 2004; Garrido y col., 2000).

En este trabajo todos los animales que resultaron positivos a alguna de las técnicas diagnósticas (PCR, IDGA o cultivo) son de dos o más años de edad, mientras que los animales de un año de edad provenientes de explotaciones con antecedentes de la enfermedad confirmada mediante cultivo bacteriológico resultaron negativos a todas las pruebas de diagnóstico empleadas, sin embargo estadios tempranos de la enfermedad en animales jóvenes podrían no ser detectadas debido a la alta respuesta celular que limita la proliferación de *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* y a su vez la respuesta humoral, al decaer la respuesta inmune celular, las micobacterias intracelulares proliferan y la respuesta inmune humoral aumenta (Yayo y col., 2001; Vélez, 1998).

Se observa que no sólo los animales con mala condición corporal resultaron positivos a paratuberculosis, sino que algunos animales en buen estado de carnes sin ningún signo clínico resultaron positivos, debido a que pueden existir fases prolongadas en las que los animales aparentemente se encuentran sanos (Scanlan, 1991), se ha reportado que la excreción del microorganismo ocurre entre el año y dos años y medio antes de la aparición de los signos clínicos (Pavlik y col, 2000).

9. CONCLUSIONES.

1) Se concluye que la prueba de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) anidada es una buena alternativa diagnóstica para *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* que ofrece rapidez, alta especificidad y buena sensibilidad para la detección de animales diseminadores de paratuberculosis y que puede ser útil para el control de la enfermedad.

2) Con la PCR anidada es posible detectar animales infectados con *M. avium* subespecie *paratuberculosis* que están eliminando el bacilo en heces y que por su baja producción de anticuerpos no pueden ser detectados por pruebas serológicas como inmunodifusión.

3) El diagnóstico de la enfermedad en los rebaños se debe llevar a cabo con dos pruebas diagnósticas una serológica que detecte anticuerpos contra *M. avium* subespecie *paratuberculosis* y otra prueba que identifique a los animales excretores del bacilo, para de esta forma poder detectar la mayor cantidad de animales infectados y así aumentar la sensibilidad del diagnóstico.

4) Se requieren futuros trabajos que permitan hacer más eficiente la extracción de ADN de *M. avium* subespecie *paratuberculosis* a partir de heces para mejorar la sensibilidad de la prueba de PCR.

10.1 Cuadro 1. Edad, condición corporal y resultados de las pruebas de IDGA, PCR y cultivo de los animales muestreados.

| ID^a | CC^b | Edad (años) | IDGA^c | PCR^d anidada | cultivo |
|-----------------------|-----------------------|--------------------|-------------------------|------------------------------------|----------------|
| 294 | 3 | 4 | + | - | - |
| 201 | 2 | 4 | + | + | - |
| 208 | 2 | 4 | + | + | - |
| 018 | 2 | 4 | + | - | - |
| 2026 | 3 | 3 | + | + | - |
| 4055 | 3 | 5 | + | - | - |
| 5076 | 2 | 4 | + | - | - |
| 4035 | 3 | 5 | + | + | - |
| 4039 | 3 | 4 | + | - | - |
| 11250 | 2 | 3 | + | + | + |
| 733 MSL | 1 | 2 | + | + | - |
| 763 MSL | 1 | 2 | + | - | - |
| 589 MSL | 1 | 2 | + | - | - |
| 1114 MSL | 1 | 2 | + | + | - |
| 06AVQ | 3 | 2 | + | + | - |
| 8CMS | 2 | 2 | + | - | - |
| 33CMS | 2 | 1 | + | + | - |
| 191 | 2 | 1 | + | + | - |
| 174 | 2 | 1 | + | + | - |
| 15JR | 2 | 2 | + | - | - |
| 3JR | 2 | 2 | + | - | - |
| 107JR | 2 | 3 | + | - | - |
| 102JR | 3 | 2 | + | + | - |

- a. Identificación individual**
b. Condición corporal
c. Inmunodifusión en Gel de Agar
d. Reacción en cadena de la Polimerasa
 (continuación)

| ID^a | CC^b | Edad (años) | IDGA^c | PCR^d anidada | Cultivo |
|-----------------------|-----------------------|--------------------|-------------------------|------------------------------------|----------------|
| 53JR | 2 | 2 | + | - | - |
| 101JR | 2 | 2 | + | + | - |
| 116JR | 2 | 3 | + | - | - |
| 104JR | 2 | 3 | + | - | - |
| 43JR | 2 | 2 | + | - | - |
| 2601CNZ | 3 | 3 | + | - | - |
| 77 JR | 2 | 2 | + | - | - |
| 26 JR | 3 | 3 | + | - | - |
| 96 JR | 2 | 2 | + | - | - |
| 120 JR | 3 | 3 | + | - | - |
| 18 JR | 2 | 3 | + | + | - |
| 13 JR | 2 | 3 | + | + | - |
| 5068 | 3 | 3 | + | - | - |
| 91 JR | 3 | 3 | + | + | - |
| 11098 | 3 | 3 | + | + | + |
| 11258 | 3 | 3 | + | - | - |
| 10990 | 3 | 3 | + | - | - |
| 11284 | 3 | 3 | + | + | - |
| 73 JR | 3 | 3 | + | - | - |
| 53 CNZ | 2 | 2 | + | - | - |
| 92 JR | 2 | 3 | + | + | - |
| 140 | 3 | 3 | + | - | - |
| 11485 | 3 | 3 | + | + | - |

- a. Identificación individual
- b. Condición corporal
- c. Inmunodifusión en Gel de Agar
- d. Reacción en Cadena de la Polimerasa.

(continuación)

| ID^a | CC^b | Edad (años) | IDGA^c | PCR^d | Cultivo |
|-----------------------|-----------------------|--------------------|-------------------------|------------------------|----------------|
|-----------------------|-----------------------|--------------------|-------------------------|------------------------|----------------|

| | | | | anidada | | |
|--------|---|---|---|----------------|---|--|
| 12226 | 3 | 3 | + | + | - | |
| 11982 | 3 | 3 | + | - | + | |
| 11297 | 3 | 3 | + | - | - | |
| 11236 | 3 | 3 | + | + | - | |
| 24583 | 3 | 3 | + | + | - | |
| 10937 | 3 | 3 | + | - | + | |
| 11221 | 3 | 3 | + | + | + | |
| 909 | 1 | 2 | + | + | - | |
| 1313 | 2 | 3 | + | - | + | |
| 1307 | 2 | 4 | + | + | - | |
| 40623 | 3 | 3 | + | + | - | |
| 216 | 2 | 3 | + | - | + | |
| 62 | 2 | 4 | + | - | - | |
| 1206 | 1 | 3 | + | + | - | |
| 381 | 1 | 4 | + | + | + | |
| 152 | 3 | 4 | + | - | - | |
| 560 | 3 | 3 | + | - | - | |
| 1009 | 1 | 3 | + | - | - | |
| 606 A | 2 | 3 | + | + | - | |
| 70 | 1 | 3 | + | - | - | |
| 159684 | 1 | 3 | + | + | - | |
| 2490 | 1 | 2 | + | + | - | |
| 187394 | 3 | 2 | + | - | - | |

- a. Identificación individual
- b. Condición corporal
- c. Inmunodifusión en Gel de Agar
- d. Reacción en Cadena de la Polimerasa.

(continuación)

ID^a CC^b Edad IDGA^c PCR^d Cultivo

| | | (años) | | anidada | |
|--------|---|--------|---|---------|---|
| 159106 | 2 | 4 | + | - | - |
| 161 | 2 | 3 | + | + | - |
| 136 | 2 | 3 | + | - | - |
| 480 | 2 | 4 | + | - | - |
| 70 CH | 1 | 3 | + | + | - |
| 860 N | 3 | 4 | + | - | - |
| 1299 | 4 | 4 | + | - | - |
| 843 N | 3 | 4 | + | - | - |
| 661 | 2 | 3 | + | + | - |
| 837 | 2 | 4 | + | - | - |
| 109 | 2 | 4 | + | + | - |
| 1115 | 2 | 4 | + | - | - |
| 1159 | 3 | 4 | + | + | - |
| 1051 | 2 | 4 | + | - | - |
| 416 | 3 | 4 | + | - | + |
| 66 D | 2 | 3 | - | - | - |
| 24 | 3 | 3 | - | - | - |
| 22 | 3 | 4 | - | - | - |
| 608 | 1 | 1 | - | - | - |
| 151 | 3 | 2 | - | - | - |
| PP2 | 3 | 2 | - | - | + |
| 26 | 3 | 2 | - | - | - |
| 607 | 1 | 1 | - | - | - |

- a. Identificación individual
- b. Condición corporal
- c. Inmunodifusión en Gel de Agar
- d. Reacción en Cadena de la Polimerasa.

(continuación)

| ID ^a | CC ^b | Edad (años) | IDGA ^c | PCR ^d anidada | Cultivo |
|-----------------|-----------------|----------------|-------------------|-----------------------------|---------|
|-----------------|-----------------|----------------|-------------------|-----------------------------|---------|

| | | | | | |
|--------|---|---|---|---|---|
| 187 | 1 | 1 | - | - | - |
| 602 | 3 | 1 | - | - | - |
| PP1 | 1 | 1 | - | - | - |
| S/N AN | 3 | 3 | - | + | - |
| 101 | 3 | 2 | - | + | - |
| S/N OR | 2 | 4 | - | - | + |
| S/N AA | 3 | 3 | - | + | + |
| 615 M | 3 | 3 | - | - | + |
| 177M | 3 | 3 | - | - | - |
| 150185 | 2 | 2 | - | - | - |
| 92066 | 2 | 2 | - | - | - |
| 962 | 3 | 1 | - | - | - |
| 170485 | 2 | 2 | - | - | - |
| 50 | 3 | 2 | - | - | - |
| 59 | 2 | 3 | - | - | - |
| S/N 11 | 3 | 1 | - | - | - |
| 21327 | 2 | 4 | - | - | - |
| 148546 | 2 | 3 | - | + | - |
| 47 | 1 | 4 | - | + | - |
| 119 | 3 | 4 | - | - | - |
| 17 | 3 | 3 | - | - | - |
| 32 | 3 | 2 | - | - | - |

- a. Identificación individual
- b. Condición corporal
- c. Inmunodifusión en Gel de Agar
- d. Reacción en Cadena de la Polimerasa

(continuación)

ID^a CC^b Edad IDGA^c PCR^d Cultivo

| | | (años) | | anidada | |
|----------|---|--------|---|---------|---|
| 205 | 2 | 2 | - | - | - |
| 028 | 1 | 3 | - | - | - |
| 375 | 3 | 4 | - | - | - |
| 50 A | 3 | 3 | - | - | - |
| 002R | 3 | 3 | - | - | - |
| 389 A | 3 | 3 | - | - | - |
| 205 A | 3 | 4 | - | - | - |
| 039 A | 3 | 4 | - | - | - |
| 65 N | 3 | 3 | - | - | - |
| 286 A | 2 | 4 | - | - | - |
| 40623 | 3 | 3 | - | - | - |
| 89 | 2 | 3 | - | - | - |
| 78 CH | 1 | 3 | - | - | - |
| 1083 | 1 | 2 | - | - | - |
| 60 | 2 | 3 | - | - | - |
| 779 | 3 | 1 | - | - | - |
| PP3 | 3 | 3 | - | - | - |
| 601 | 3 | 1 | - | - | - |
| Y 47 GRM | 3 | 4 | - | - | - |
| S/N2 | 1 | 3 | - | + | - |
| 573643 | 3 | 3 | - | + | - |
| 0203 | 2 | 4 | - | - | - |

- a. Identificación individual
- b. Condición corporal
- c. Inmunodifusión en gel de agar
- d. Reacción en cadena de la polimerasa

(continuación)

| ID ^a | CC ^b | Edad (años) | IDGA ^c | PCR ^d anidada | Cultivo |
|-----------------|-----------------|----------------|-------------------|-----------------------------|---------|
|-----------------|-----------------|----------------|-------------------|-----------------------------|---------|

| | | | | | |
|----------|---|-----|---|---|---|
| 0613 | 2 | 3 | - | - | - |
| 166 | 1 | 3 | - | - | - |
| S/A 4 | 1 | 2 | - | - | - |
| 159314 | 1 | 4 | - | + | - |
| 37468 | 1 | 3 | - | - | - |
| 2331 | 2 | 2 | - | - | - |
| 693 | 4 | 4 | - | - | - |
| 298 | 2 | 4 | - | - | - |
| 266 | 3 | 3 | - | - | - |
| 606 | 2 | 3 | - | + | - |
| 946 | 2 | 2 | - | - | - |
| 206614AG | 3 | 5 | - | - | - |
| 206605AG | 2 | 6 | - | - | - |
| 206623AG | 1 | 5 | - | - | - |
| 56565AG | 1 | 5 | - | - | - |
| 67909AG | 2 | 5 | - | - | - |
| 6622AG | 3 | 1.5 | - | - | - |
| 0020AG | 2 | 5 | - | - | - |
| 5071 | 3 | 4 | - | - | - |
| 5084 | 3 | 3 | - | - | - |
| 147 AAG | 2 | 2 | - | - | - |
| 354 AAG | 2 | 1 | - | - | - |

- a. Identificación individual
- b. Condición corporal
- c. Inmunodifusión en Gel de Agar
- d. Reacción en Cadena de la Polimerasa.

(continuación)

| ID ^a | CC ^b | Edad (años) | IDGA ^c | PCR ^d anidada | Cultivo |
|-----------------|-----------------|----------------|-------------------|-----------------------------|---------|
| 102 AAG | 2 | 3 | - | - | - |

| | | | | | |
|----------|---|----------|---|---|---|
| 11 AAG | 1 | 4 | - | + | - |
| 420 AAG | 1 | 10 meses | - | - | - |
| 208 AAG | 1 | 2 | - | + | - |
| 160 | 3 | 4 | - | - | - |
| 140 | 3 | 4 | - | - | - |
| 1.4 a | - | | - | + | - |
| 3065 | 2 | 4 | - | + | + |
| 2199 | 3 | 3 | - | + | - |
| 56561AG | 2 | 3 | - | - | - |
| 05AG | 1 | 4 | - | - | - |
| 206625AG | 1 | 5 | - | - | - |
| 37 | 2 | 3 | - | - | - |
| 213695 | 1 | 4 | - | + | - |
| S/A 3A | 2 | 3 | - | - | - |
| 6065 | 2 | 3 | - | - | - |
| A 11 GRM | 2 | 2 | - | - | - |
| A 8 GRM | 2 | 2 | - | + | - |
| Z 02 GRM | 2 | 4 | - | - | - |
| 355 AAG | 1 | 2 | - | - | - |
| 204 AAG | 1 | 3 | - | - | - |
| 113AAG | 1 | 2 | - | - | - |
| Z 03 GRM | 3 | 3 | - | - | - |

- a. Identificación individual
b. Condición corporal
c. Inmunodifusión en Gel de Agar
d. Reacción en Cadena de la Polimerasa.

(continuación)

| ID ^a | CC ^b | Edad (años) | IDGA ^c | PCR ^d anidada | Cultivo |
|-----------------|-----------------|----------------|-------------------|-----------------------------|---------|
| 779 V | 2 | 3 | - | + | - |
| 0018 AG | 1 | 3 | - | - | - |
| 206620 AG | 2 | 2 | - | - | - |

| | | | | | |
|----------|---|---|---|---|---|
| 67954 AG | 1 | 4 | - | - | - |
| 10595 AG | 2 | 3 | - | - | - |
| 553 AG | 2 | 2 | - | - | - |
| 474 AG | 1 | 2 | - | + | - |
| 6601 AG | 2 | 4 | - | - | - |
| 6625 AG | 3 | 3 | - | - | - |
| Y 11 GRM | 3 | 2 | - | - | - |
| Z 46 GRM | 2 | 2 | - | - | - |
| A 39 GRM | 2 | 3 | - | - | - |
| 704 | 2 | 3 | - | - | - |
| A 44 GRM | 2 | 2 | - | - | - |
| A 40 GRM | 2 | 2 | - | - | - |
| 296 | 2 | 4 | - | - | - |

- a. **Identificación individual**
- b. **Condición corporal**
- c. **Inmunodifusión en Gel de Agar**
- d. **Reacción en Cadena de la Polimerasa.**

12. ANEXOS.

12.1 Anexo 1. Protocolo de elaboración del medio de cultivo de yema de huevo de Herrold.

Ingredientes:

| | |
|-------------------------|--------|
| Peptona..... | 9.0 g |
| Na Cl..... | 4.5 g |
| Agar noble..... | 15.3 g |
| Extracto de carne..... | 2.7 g |
| Glicerol..... | 27 ml |
| Agua destilada..... | 870 ml |
| Na OH..... | 4.1 ml |
| Micobactina..... | 4 ml |
| Yema de huevo..... | 6 |
| Verde de malaquita..... | 5.1 ml |

Se mezclan los primeros seis ingredientes en una botella de 2 litros con despachador, introducir una barra agitadora magnética y colocar la botella sobre un agitador magnético. Con una pipeta se agregan los 4 ml de micobactina directamente en el medio. Ajustar el pH a 7.5 adicionando aproximadamente 4.1 ml de NaOH al 4%. Se introduce a la autoclave a 121° C por 25 minutos, posteriormente se deja enfriar a 56 °C aproximadamente y aseptícamente se agregan las 6 yemas de huevo y 5.1 ml de verde de malaquita al 2 % estéril, agitar generosamente y servir de 8-10 ml por tubo, colocar los tubos en posición horizontal. Revisar la esterilidad mediante incubación a 37 °C por 48 horas.

12.2 Anexo 2. Elaboración del gel para IDGA.

Para la preparación del gel se pesaron 0.5g de agar noble (*Difco laboratories*), los cuales se disolvieron por calentamiento en 50 ml de buffer salino de fosfatos (PBS) para obtener una concentración final de 0.75% de agar. Una vez disuelto se le añadió 1 ml de azida de sodio al 0.2% (*J.T. Baker*). En cajas de petri de 10 cm de diámetro se depositan aproximadamente 15 ml de la solución evitando la formación de burbujas de aire.

13. APENDICE DE REACTIVOS UTILIZADOS.

PBS

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------|---------|
| NaCl (cloruro de sodio, <i>J.T. Baker</i>)..... | 8.5 g |
| Na ₂ HPO ₄ (fosfato de sodio dibásico, <i>Técnica Química</i>)..... | 1.1 g |
| NaH ₂ PO ₄ (fosfato de sodio monobásico, <i>J.T.Baker</i>)..... | 0.32 g |
| Agua destilada cbp..... | 1000 ml |

HCP 0.76 % (*Sigma*)

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

Acetato de amonio 7.5 M

| | |
|------------------------|---------|
| Acetato de amonio..... | 578.1 g |
| Agua destilada | 1000ml |

TE

| | |
|--------------------------------------------|----------|
| Tris 1 M..... | 6.05 ml |
| Agua destilada | 93.95 ml |
| Adicionar a la solución de Tris: EDTA..... | 1.489 g |

TE- Triton X 100

2 % (v/v) Triton X 100

| | |
|-------------------|-------|
| Triton X 100..... | 2 ml |
| TE..... | 98 ml |

Ticionato de guanidina 5M

| | |
|-----------------------------|---------|
| Ticionato de guanidina..... | 59.08 g |
| Agua destilada..... | 100 |

14. BIBLIOGRAFÍA

1. Barrera H, Ortiz R, Rojas A, Reséndez D. Febrero de 1993. Reacción en cadena de la polimerasa. Ciencia y Desarrollo. CONACYT. México. 50-59.
2. Benedictus G, Kalis C. 2003. Paratuberculosis: Eradication, control and diagnostic methods. Acta Vet. Scand. 44(3-4): 231-241.
3. Biberstein E, Zee C. 1994. Tratado de microbiología Veterinaria. Editorial Acribia. España. 229-230.
4. Biet F, Boschirolì M, Thorel M, Guilloteau A. 2005. Zoonotic aspects of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium avium intracellulare* complex (MAC). Vet. Res. 36: 411-436.
5. Bull T, Hermon J, Pavlik I. 2000. Characterization of IS900 loci in *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and development of multiplex PCR typing. Microbiology. 146: 2185-2197.
6. Carter G, Chengappa M. 1994. Bacteriología y micología veterinaria. Editorial Manual Moderno. México. 372-375.
7. Dimareli M, Sarris K. 2001. Comparison of DNA probe test and cultivation methods for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in caprine and ovine faeces. Aust. Vet. 79 (1): 47-50.
8. Erume J, Spersger J, Rosengarten R. 2001. Rapid detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from cattle and zoo animals by Nested PCR. African Health Sciences. 1 (2): 83- 89.
9. Garrido J, Cortabarría N, Oguiza J, Juste R. 2000. Use of a PCR method on fecal samples for diagnosis of sheep paratuberculosis. Vet. Microbiol. 77(3-4): 379-386.
10. Gwozdz J, Reichel M, Murria A, Manktelow W. 1997. Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in ovine tissues and blood by the polymerase chain reaction. Vet. Microbiol. 51: 233-244.
11. Harris N, Barleta R. 2001. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Veterinary Medicine. Clin. Microbiol. 14(3): 489-512.
12. Hennings J, Dammen M, Weeks S, Epperson W. 2003. Comparison of two DNA extractions and nested PCR, real time PCR, a new commercial PCR assay, and bacterial culture for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in bovine feces. J Vet. Diagn. Invest. 15: 87-93.

13. Ikonopoulou J, Gazouli M, Pavlik I. 2004. Comparative evaluation of PCR assay for the robust molecular detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. J Microbiol Methods. 56: 315-321.
14. Kaufman P, Wu W. 1995. Handbook of molecular and cellular methods in biology and medicine. Editorial CRC. 243.
15. Kreeger J. 1991. Ruminant paratuberculosis a century of progress and frustration. J Vet. Diagn. Invest. 3: 373-383.
16. Matthews JG, House C. 1999. Diseases of the goat. 2nd ed. Reino Unido: Blackwell science. 111-114.
17. McPherson MJ, Moller SG. 2000. PCR. Editorial Oxford, N.Y. 1-25.
18. Meltzer S. 1998. PCR in bioanalysis. Editorial Humana Press. 6-9.
19. Merkal R. 1989. Diagnóstico de la Paratuberculosis ovina y caprina. Informes Técnicos No. 34 III Reunión sobre Paratuberculosis en España. 11-16.
20. Pavlik I, Matlova L, Bartl J. 2000. Parallel faecal and organ *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* culture of different productivity types of cattle. Vet. Microbiol. 77: 309-324.
21. Quinn P, Markey B. 2002. Microbiology veterinary and microbial disease. Blackwell Science. 98-105.
22. Radostits OM, Gay CC, Blood DC, Hinchliff KW. 2002. Medicina Veterinaria. Tratado de las enfermedades del Ganado bovino, ovino, porcino, caprino y equino. Vol 1. Ed. McGraw Hill Interamericana, España . 9ª ed. 1088-1103.
23. Romero A. 2003. Asociación de la excreción de *Mycobacterium bovis* con la respuesta inmune específica en un hato de alta prevalencia. Tesis de Maestría en Ciencias de la Producción y de la Salud animal. FESC- UNAM. México.
24. Scanlan C. 1991. Introducción a la bacteriología veterinaria. Editorial Acribia. Zaragoza España. 349-354.
25. Soolingen D, Haas P, Hermans P, Embden J. 1991. National Institute of Public Health and Environmental Protection, Bilthoven, The Netherlands. 6-10
26. Stabel J, Benentine J P. 2005. Development of a Nested PCR method targeting a unique multicopy element, ISMap02, for detection

- Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in fecal samples. J Clin. Microbiol. 43(9): 4744-4750.
27. Stabel J, Bosworth T, Kirkbride T. 2004. A simple, rapid, and effective method for the extraction of *Mycobacterium paratuberculosis* DNA from fecal samples for polymerase chain reaction. J Vet. Diagn. Invest. 16 (1): 22-30.
 28. Sweeney R. 1996. The Veterinary clinics of North America. Food Animal Practice. Paratuberculosis (Johne's Disease). 12 (2): 305-338, 345-350, 357-368, 441-452.
 29. Taddei S, Robbi C, Cesena C, Rossi I. 2004. Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in bovine fecal samples: comparison of three polymerase chain reaction based diagnostic tests with a conventional culture method. J Vet. Diagn. Invest. 16: 503-508.
 30. Toman M, Faldyna M, Pavlik I. 2003. Immunological characteristics of cattle with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection. Vet. Med. 48 (6): 147-154.
 31. Traversa MJ, Schettino DM, Fresneda K, Mendivil Iparraguirre M, 2005. Epidemiología e importancia económica de la paratuberculosis bovina. <http://www.portalveterinaria.com/modules.php?name=Articles&file=article&sid=438>.
 32. Vary P, Andersen P, Green E. 1990. Use of highly specific DNA probes and the Polymerase Chain Reaction to detect *Mycobacterium paratuberculosis* in Johne's disease. Journal of Clinical Microbiology. 28(5): 933-937.
 33. Vélez M. 1998. Comparación de diferentes técnicas de diagnóstico en paratuberculosis caprina. Tesis de Maestría. FMVZ. UNAM. México.
 34. Yayo W, Machackova M, Pavlik I. 2001. The transmisión and impact of paratuberculosis infection in domestic and wild ruminants. Vet. Med. 46(7-8): 205-224.