



**UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE MÉXICO**



**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

COMPARACIÓN DE UN ANTÍGENO DERIVADO DE *MYCOBACTERIUM AVIUM*  
CON EL ANTÍGENO PROTOPLÁSMICO DE *MYCOBACTERIUM AVIUM SUBSP.*  
*PARATUBERCULOSIS (PPA-3)* PARA EL DIAGNÓSTICO DE  
PARATUBERCULOSIS MEDIANTE ELISA

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
**MEDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA**

PRESENTA

**VERÓNICA BLÁSQUEZ VÁZQUEZ**

ASESORES

Dr. MVZ Gilberto Chávez Gris

M. en C. MVZ Edith Maldonado Castro

México D.F.

2012



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## DEDICATORIA

A mi mamá a quien amo (aunque no suele decirselo), que siempre me apoya y es parte fundamental para hacer realidad mis sueños y en la decisión de estudiar esta hermosa y gratificante carrera. Le doy gracias por su amor, cariño por todos sus desvelos, preocupación y esfuerzos para hacer de mí una persona de provecho y sobre todo le agradezco sus consejos y por enseñarme las cosas más importantes que te hacen crecer, esas que solo se aprenden en la escuela de la vida.

A mi hermana Carolina y a mi abuelita Andrea que me cuidaron y ayudaron mientras mi mamá tenía que salir a trabajar. Gracias por aguantar mi mal humor, tenerme tanta paciencia quererme así como soy.

A Roberto que tras 10 años de conocernos, siempre estuvo conmigo apoyándome, ayudándome a levantar en mis tropezones y aminorando mis penas con palabras de aliento. Le doy las gracias por ser mi compañero y por darme su amor y cariño.

A todos mis primos y tíos por regalarme una infancia feliz, por ser partícipes de mis sueños y por apoyarme en momentos difíciles.

Y por último pero no menos importante le dedico a mi padre esta tesis que es la culminación de un sueño y un ciclo, y le agradezco por darme la vida y cuidar de mí siempre, aunque sea desde allá arriba...

## AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Gilberto Chávez Gris por brindarme su confianza y ofrecerme su apoyo, paciencia y consejos para realizar este trabajo.

A la Dra. Edith Maldonado Castro por haberme enseñado todo lo referente a la parte de laboratorio, por facilitarme información para elaboración de mi trabajo y por toda su paciencia y disponibilidad para ayudarme y despejar mis dudas.

Al Dr. Jesús Núñez Saavedra por facilitar mi estancia en el CEIEPAA en el área de producción ovina, mientras realizaba la parte experimental de mi trabajo.

Al proyecto PAPIIT UNAM IT225211-3 “Desarrollo para el sistema para el diagnóstico en suero y leche en rumiantes afectados por paratuberculosis”, por financiar este trabajo.

A PRONABIVE por proveer y facilitar el filtrado de proteínas en suspensión de cultivo de *M. avium* subsp. *avium* para el desarrollo del presente trabajo.

Al Dr. Gabriel Campos Montes por la realización del análisis estadístico

A la UNAM y a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia por ayudar a forjarme en el ámbito profesional y personal.

# CONTENIDO

|   | <u>Página</u> |
|---|---------------|
| <b>RESUMEN</b> .....  | 1             |
| <b>INTRODUCCIÓN</b>   |               |
| 1. Etiología .....  | 2             |
| 1.1 Complejo <i>Mycobacterium avium</i> .....               | 3             |
| 1.2 Requerimientos para su desarrollo .....                 | 5             |
| 1.3 Resistencia y persistencia.....                         | 5             |
| 2. Patogenia  |               |
| 2.1 Entrada e invasión de <i>Map</i> en el hospedador ..... | 6             |
| 2.2 Respuesta inmune del hospedador .....                   | 7             |
| 3. Cuadro clínico .....                                     | 9             |
| 4. Lesiones   |               |
| 4.1 Lesiones macroscópicas .....                            | 11            |
| 4.2 Lesiones microscópicas.....                             | 13            |
| 5. Epidemiología  |               |
| 5.1 Hospederos.....   | 14            |
| 5.2 Transmisión .....                                       | 14            |
| 5.3 Distribución y prevalencia .....                        | 15            |

|   |    |
|---|----|
| 6. Importancia económica .....  | 16 |
| 7. Diagnóstico  |    |
| 7.1 Detección directa de <i>Map</i> .....                                   | 17 |
| 7.2 Pruebas que detectan la respuesta inmune del hospedador                 |    |
| 7.2.1 Inmunidad celular .....   | 17 |
| 7.2.2 Inmunidad humoral.....  | 17 |
| 7.3 Sensibilidad y especificidad desde enfoque epidemiológico .....         | 17 |
| 7.4 Prueba de ELISA indirecta .....   | 23 |
| 8. Tratamiento y control .....  | 26 |
| <b>JUSTIFICACIÓN</b> .....  | 29 |
| <b>HIPÓTESIS</b> .....  | 29 |
| <b>OBJETIVOS</b> .....  | 29 |
| <b>MATERIAL Y MÉTODOS</b>   |    |
| I. Procedencia de las muestras .....  | 30 |
| II. Procesamiento de muestras.....  | 31 |
| III. Antígenos utilizados en la prueba de ELISA .....                       | 31 |
| IV. Procedencia de los sueros controles.....                                | 32 |
| V. Elaboración de la prueba de ELISA con el antígeno PPA-3 y <i>Maa</i> ... | 32 |
| VI. Análisis estadístico .....  | 35 |

|   |    |
|---|----|
| <b>RESULTADOS</b> .....   | 37 |
| <b>DISCUSIÓN</b> .....  | 41 |
| <b>CONCLUSIONES</b> .....   | 47 |
| <b>CUADROS</b>  |    |
| 1. Diagnóstico basado en la detección directa de <i>Map</i> .....               | 18 |
| 2. Diagnostico basado en la detección de la inmunidad celular .....             | 29 |
| 3. Diagnóstico basado en la detección de la inmunidad humoral.....              | 20 |
| 4. Sensibilidad y especificidad desde el enfoque epidemiológico .....           | 22 |
| 5. Correlación de Spearman para los diagnósticos basados en los PC.....         | 37 |
| 6. Correlación de Spearman para los diagnósticos basados en el DI-CL ....       | 38 |
| 7. Concordancia del diagnóstico basado en el PC entre PPA-3 Y <i>Maa</i> .....  | 38 |
| 8. Concordancia del diagnóstico basado en el DI-CL entre PPA-3 y <i>Maa</i> ... | 39 |
| <b>ANEXOS</b>   |    |
| 1. Reactivos empleados en la realización de la técnica de ELISA .....           | 48 |
| 2. Lista de abreviaturas.....   | 50 |
| <b>REFERENCIAS</b> .....  | 53 |

## RESUMEN

BLÁSQUEZ VÁZQUEZ VERÓNICA. Comparación de un antígeno derivado de *Mycobacterium avium* con el antígeno protoplásmico de *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* (PPA-3) para el diagnóstico de paratuberculosis mediante ELISA (bajo la dirección de Dr. MVZ Gilberto Chávez Gris y M. en C. MVZ Edith Maldonado Castro).

El estudio evaluó como antígeno las proteínas en suspensión del filtrado de cultivo *M. avium subsp. avium* (*Maa*) cepa D4 en el diagnóstico de paratuberculosis, como alternativa para el diagnóstico nacional, ya que además tiene menor costo y mayor disponibilidad en el mercado. Los objetivos fueron estandarizar la concentración del antígeno filtrado de *Maa*, compararlo con el antígeno PPA-3 y proponer un protocolo empleando el antígeno de *Maa* como alternativa en el diagnóstico de PTB mediante la prueba de ELISA indirecto. Se sensibilizaron las placas con el antígeno PPA-3 a una concentración de 0.04 mg/ml y con el antígeno de *Maa* a 0.1, 0.2 y 0.3 mg/ml. Mediante análisis estadístico con pruebas de correlación de Pearson y Spearman con un intervalo de confianza del 95%, se determinó que la mayor concordancia se encuentra en la concentración de 0.3 mg/ml y un punto de corte de 0.90 D.O., con un valor de *Kappa* de 0.83. Los valores de sensibilidad y especificidad reportados para PPA-3 son de 47% y 86% respectivamente (132); aunque la asociación estadística que existe entre éste y el antígeno de *Maa* es alta, para establecer los valores de sensibilidad y especificidad para el antígeno filtrado de *Maa* se requiere de pruebas más específicas en la detección de animales positivos, como aislamiento o Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).



## INTRODUCCIÓN

### 1. Etiología

*Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (*Map*) pertenece al género *Mycobacterium*, familia *Mycobacteriaceae*, orden *Actinomycetales*, clase *Actinomycetes* (1). Es un bacilo aerobio de 1-2  $\mu\text{m}$  de longitud y 0.5  $\mu\text{m}$  de ancho, se desarrolla a 37°C, es ácido-alcohol resistente dado por sus características en la pared celular, la cual es relativamente resistente al agua y rica en ácidos micólicos, también presenta peptidoglicano, arabinogalactano, glucolípidos y lipopolisacáridos (lipoarabinomano o LAM) que forman la capa más superficial de la bacteria, siendo LAM muy importante en la patogénesis de la paratuberculosis debido a que es el principal componente antigénico de superficie de las micobacterias, comparándose con el lipopolisacárido con actividad endotóxica de las bacterias Gram negativas (antígeno O) ya que provoca una importante respuesta antimicrobiana en los macrófagos. (1,2,3). Se le considera capaz de ejercer un efecto inmunomodulador sobre componentes de la respuesta inmune, ya que bloquea el aumento citoplasmático de calcio responsable de la fusión del fagosoma con el lisosoma en los macrófagos y en pruebas *in vitro* inhibe la presentación de antígenos proteicos por las células presentadoras de antígenos, suprime la activación de LT e impide la activación de macrófagos mediada por IFN  $-\gamma$  (3). El alto porcentaje de lípidos que componen la pared celular de las micobacterias podría explicar la tendencia de éstas a producir un crecimiento en forma de agregados bacterianos y también la propiedad de ácido-

alcohol resistencia (4). Se han descrito microorganismos con una pared celular deficiente que no se tiñen por coloración ácido resistente denominados esferoplastos, aislados a partir de tejidos de pacientes con la enfermedad de Crohn y en animales con la enfermedad de Johne. La presencia de esferoplastos en animales con paratuberculosis puede representar una forma evolucionada de supervivencia con pérdida de la capa estructural externa de la bacteria para evadir la respuesta inmune del hospedador y permitir la supervivencia dentro de él (5). *Map* está clasificado dentro del complejo *Mycobacterium avium-intracellulare* (MAC) constituido por *M. avium* incluyendo sus subespecies (*Mycobacterium avium* subsp *avium*, *M. avium* subsp. *silvaticum* y *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*) y *M. intracellulare*. *Map* se diferencia de las otras subespecies por su dependencia a micobactina para su crecimiento *in vitro* (1). La micobactina es un ionóforo que facilita el transporte del hierro a través de su compleja pared celular, aunque está demostrado que *Map* puede crecer perfectamente sin aporte exógeno de este compuesto si el medio contiene suficiente hierro y otros nutrientes disponibles (6,7). La mayoría de las cepas de *Map* son no fotocromógenas y el crecimiento de algunas se estimula con piruvato. Carece de fosfatasa alcalina y es resistente a la D-cicloserina y la ansamicina (8)

### 1.1 Complejo *Mycobacterium avium*

En 1990, Thorel y cols. propusieron la taxonomía oficialmente aceptada en la actualidad, apoyándose en los estudios previos de caracterización genética y fenotípica, y en su trabajo de taxonomía numérica dividió al complejo

*Mycobacterium avium* en las subespecies *Mycobacterium avium* subsp. *avium* (*Maa*), *Mycobacterium avium* subsp. *silvaticum* (*Mas*) y *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (*Map*), garantizando así la representación de la homología observada entre ellas, considerando propiedades distintivas de cada una. Las diferencias más marcadas de las tres subespecies son las relativas a sus requerimientos de cultivo, su poder patógeno y su rango de hospedadores. *Maa* se aísla frecuentemente de muestras ambientales y crece sin necesidad de micobactina. Es la causante de tuberculosis en aves, puede ocasionar infección a un amplio espectro de animales y en humanos las principales patologías son infección pulmonar en adultos, adenopatías submandibulares en niños y septicemia en pacientes con SIDA. *Mas* causa enteritis crónica en terneros aunque se ha aislado principalmente en casos de tuberculosis aviar; no se ha aislado en el ambiente y es incapaz de crecer en medio con huevo. Para su aislamiento primario requiere el aporte externo de micobactina en el medio de cultivo. El distintivo más práctico de *Map* es su dependencia de micobactina para crecer *in vitro* y su extremadamente baja velocidad de crecimiento. Afecta principalmente a rumiantes causando enteritis crónica y parece estar implicada en la enfermedad de Crohn en humanos. (9). Según Hurley y cols., existe una identidad genética entre un 95-100% entre las distintas subespecies de *M. avium* y de un 72% entre éstas y *M. intracellulare* (10). Bannantine y cols. realizaron estudios comparativos de un total de 2'658,271 pares de bases de *Map*, se encontró que solo 27 secuencias codificantes (genes) en *Map* están ausentes en

*Maa* (11). Posteriormente encontraron que en la secuencia genómica de *Map* tiene un 97% de identidad con *Maa* en algunas regiones (12).

### 1.2 Requerimientos para su desarrollo

Los requerimientos nutricionales para el cultivo de *Map* son similares a los del resto de micobacterias y generalmente no necesitan factores de crecimiento, pero algunos componentes como detergentes, triglicéridos, ácido palmítico y oleico, albúmina sérica bovina, yema de huevo o dióxido de carbono, pueden potenciarlo. La fuente de carbono más utilizada tradicionalmente es el glicerol, aunque el piruvato puede ser el elegido en algunas circunstancias. También se pueden utilizar hidrocarburos. La aspargina es la fuente de nitrógeno preferida, sin embargo, ésta puede ser sustituida por glutamina, glutamato, ácido aspártico, o sales de amonio. Entre los minerales, los macroelementos que requieren en grandes cantidades son potasio, magnesio, azufre y fósforo. Mientras, los microelementos y oligoelementos más destacables son hierro, zinc, manganeso y molibdeno (8,13).

### 1.3 Resistencia y persistencia.

*Map* es resistente a las condiciones ambientales y puede sobrevivir en las pasturas por más de un año. También se ha encontrado a la bacteria viable hasta por una semana en la orina, y hasta por 44 semanas en las heces bovinas, 55 semanas en ambientes secos y sombríos, 48 semanas en agua de presa no expuesta a luz solar y es capaz de sobrevivir e incluso replicarse en el interior de

protistas ambientales (14,15,16). Soporta tratamientos como la pasteurización de la leche y queso, así como clorado del agua(17).

## 2. Patogenia

### 2.1 Entrada e invasión de *Map* en el hospedero

En la patogenia de paratuberculosis influyen varios factores entre los que destacan los genéticos y el estado inmunológico del hospedero (18). El principal mecanismo de entrada de *Map* en el hospedero es por transmisión fecal-oral aunque también existen otras vías de infección como se mencionará más adelante (19). Los animales generalmente se infectan durante las primeras etapas de vida, antes de los 4 meses de edad y tiene un periodo de incubación variable, que oscila entre 6 meses y 5 años. Sin embargo, los animales afectados con paratuberculosis presentan signos clínicos a partir de los 2 años de edad en el caso de ovinos y caprinos (20); en bovinos lecheros pueden llegar a manifestarse generalmente en la segunda o tercera lactación, debido al estrés originado durante la lactancia (21). La animales jóvenes son más susceptibles a la infección debido a que, a nivel intestinal, cuentan con extensa superficie de tejido linfoide asociado a mucosa intestinal, que va reduciéndose gradualmente con la edad, siendo el punto de entrada de la bacteria al organismo (22). Después de su ingestión por el hospedador, *Map* es endocitada por las células M que recubren las cúpulas de las placas de Peyer tanto del íleon como del yeyuno. En este proceso de endocitosis participan la proteína de membrana de 35 kDa de la bacteria, los puentes de unión de fibronectina entre la proteína de acoplamiento de fibronectina (FAP) de *Map* y

las integrinas de las células M (23,24,25). Posteriormente, la bacteria es transportada a través de las células M, de manera libre o en vacuolas dentro de ellas y después se introducen en fagosomas de macrófagos sub e intra-epiteliales adyacentes a las placas de Peyer (22,26). El macrófago intestinal es la célula blanco de la infección por la micobacteria ya que estas células fagocitan y procesan antígenos para presentarlos a los linfocitos T (LT) (27). Experimentos *in vitro*, han demostrado que a pesar de que los macrófagos son capaces de controlar la propagación de *Map*, grandes cantidades de la micobacteria son citotóxicas y provocan su apoptosis (28). *Map* es capaz de sobrevivir inhibiendo la acidificación del fagosoma, lo que impide su fusión a fagolisosoma, soporta las enzimas lisosómicas, el óxido nítrico y los demás mecanismos bactericidas que producen los macrófagos, debido a su envoltura celular lipídica (26,28,29). Se ha demostrado, que los esferoplastos pueden persistir en el organismo durante largos períodos de tiempo y que pueden resistir la fagocitosis mejor que las formas completas, por lo que su función podría ser la de mantener una infección subclínica, permaneciendo en células presentadoras de antígeno del epitelio intestinal y en determinado momento transformarse a la forma completa dando lugar a la forma clínica de la enfermedad (30).

## 2.2 Respuesta inmune del hospedador

Se considera que la inmunidad de protección contra *Map* está dada principalmente por la respuesta inmune celular, la cual depende de las interacciones entre las células T y las células presentadoras de antígeno infectadas (31). Sin embargo, la

infección es capaz de inducir a una respuesta humoral la cual no es crucial en los procesos de contención de la infección, pero es de ayuda para realizar el diagnóstico de la infección sobre todo en fases avanzadas de la enfermedad. (20). Los macrófagos son muy importantes para que se desencadene una respuesta inmune. Estas células fagocitan y procesan antígenos para presentarlos a los LT. Estos linfocitos cuentan con receptores altamente específicos que reconocen a los antígenos en asociación con glucoproteínas de las membranas de los macrófagos, con la subsecuente síntesis y liberación de interleucina 1 (IL-1) por parte de los macrófagos. Posteriormente, esta IL-1 estimula a los LT para producir interleucina 2 (IL-2), la cual impulsa la propagación de los LT CD8 + citotóxicos y los CD4+Linfocitos cooperadores tipo 1 (Th1), y estos últimos, liberan más IL-2, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  y factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), con el objetivo de activar el efecto bactericida de los macrófagos (32,33,34). Sustancias como el TNF- $\alpha$  activan la formación de granulomas alrededor de la infección micobacteriana y de esta forma se aísla el foco de infección, conteniendo a la bacteria y previniendo la diseminación a otros órganos (35). Estos mecanismos de defensa constituyen la respuesta inmune de tipo tuberculoide mediada por Th1, caracterizada por fuerte respuesta celular , pobre respuesta humoral, altos niveles de IFN-  $\gamma$ , de IL-2 así como baja cantidad de bacilos en el interior de los macrófagos(19). Cuando el sistema inmune no contuvo la infección, las micobacterias proliferan y se produce un cambio progresivo en el tipo de respuesta. En esta fase, los linfocitos CD4+ cooperadores tipo 2 (Th2) producen IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10, que suprimen la respuesta de tipo Th1 promoviendo la

proliferación de LB y la producción de anticuerpos. En este periodo la respuesta celular declina y aumenta la respuesta de tipo humoral a medida que *Map* se multiplica (27). Esta respuesta no es efectiva frente a microorganismos intracelulares como es el caso de *Map*, por lo tanto en la fase lepromatosa mediada por Th2 no se detiene la progresión de la infección, el desarrollo de la patología ni la proliferación bacteriana. En este momento, los animales presentan un elevado nivel de anticuerpos séricos y escasa reactividad a las pruebas de inmunidad celular (36). Estos mecanismos de defensa constituyen la respuesta inmune de tipo lepromatoide (Th2) en el que los niveles tanto de IFN- $\gamma$  como de IL-2 son bajos y presenta gran cantidad de bacilos en el interior de los macrófagos. (19). Por otra parte, existe un estado en el cual la producción de anticuerpos se puede ver afectada a causa de la pérdida de respuesta inmune ante la infección; esta actividad supresora es denominada anergia o “parálisis inmune”, debida probablemente a que con altas cantidades de antígeno no hay suficientes células presentadoras de antígeno, por lo que alcanza a los receptores de los LT colaboradores directamente y en ausencia de coestimulación, los vuelven anérgicos (27). Se presenta cuando los animales son viejos o la infección está en su etapa final, de manera que estos animales pueden estar excretando el bacilo y no ser detectados con las pruebas serológicas (27,37).

### 3. Cuadro clínico

La manifestación clínica de paratuberculosis es la pérdida progresiva de peso y condición corporal, debido a la insuficiente absorción de proteínas a nivel



intestinal y a las altas concentraciones de TNF- $\alpha$  que provocan un catabolismo tisular (38,39,40). En ganado bovino, además de una pérdida crónica y progresiva de peso, se caracteriza por diarrea crónica intermitente que no responde al tratamiento (41). En ovinos y caprinos la diarrea sólo aparece en la fase final de la enfermedad, cuando las lesiones afectan ampliamente al intestino, y muchas veces aparecen como un sutil reblandecimiento de las heces (19,39). También pueden observarse la disminución de la producción láctea y el deterioro del pelo o la lana en ovinos, sin embargo no pierden el apetito. Otros signos que pueden presentarse en las fases más avanzadas de la enfermedad son mucosas pálidas, edema submandibular, fiebre intermitente, alteración de algunos valores hemáticos y séricos, sangre en heces, anemia, caquexia extrema y atrofia muscular. Finalmente el animal queda postrado y muere (42). La progresión de la enfermedad se divide en cuatro fases (43):

Fase I. Infección silente: Caracterizada por la ausencia de signos clínicos y se encuentra fundamentalmente en ganado joven, aunque en ocasiones también se ha descrito en adultos.

Fase II. Fase subclínica. Se encuentra principalmente en animales jóvenes portadores de *Map*. Durante esta fase los animales no presentan signos clínicos de la enfermedad pero en ocasiones pueden presentar anticuerpos circulantes. La gran mayoría de los animales son negativos al cultivo en heces, aunque a pesar de esto los animales excretan en heces una baja carga bacteriana de manera intermitente.

Fase III. Fase clínica. Esta solo se desarrolla tras varios años de infección por *Map*. Los signos clínicos iniciales y característicos de esta fase son la disminución de la producción láctea, pelo hirsuto, pérdida de peso y diarrea.

Fase IV. Fase clínica avanzada. Tiene lugar solo unas semanas después de presentada la fase anterior, durante las cuales los animales entran en estado de letargo, debilidad y emaciación. Esta fase se caracteriza por edema submandibular debido a la hipoproteïnemia, caquexia y diarrea. Los animales mueren por deshidratación grave o son mandados al rastro por la baja o nula producción y pérdida de peso.

#### 4. Lesiones

##### 4.1 Lesiones macroscópicas

A la necropsia de animales con avanzados signos clínicos los hallazgos anatomopatológicos son comunes a todos los procesos que ocasionan pérdida de peso y condición corporal progresiva como fuertes parasitosis y desnutrición entre otros (44). Puede observarse falta de depósitos grasos, atrofia de la masa muscular, edemas y ascitis (45). Las lesiones granulomatosas específicas se producen en intestino y en los nódulos linfáticos regionales (46). Los nódulos mesentéricos yeyunales e ileocecales presentan un incremento en su tamaño, tumefacción y aspecto edematoso, al corte la zona medular adquiere un color café verdoso, la presencia de lesiones en otras zonas es menos frecuente. Pueden aparecer granulomas en el hígado y linfonodos asociados, depleción linfoide del timo, o lesiones arterioscleróticas en corazón o aorta (42,47). En ovinos y cabras

los vasos linfáticos que conectan la serosa con los linfonodos, pueden aparecer visiblemente inflamados o dilatados, dando un aspecto tortuoso a modo de cordón retorcido con aspecto blanquecino. Este aspecto es debido a las acumulaciones granulomatosas focales de células epitelioides y linfocitos. En los bovinos la lesión característica es el engrosamiento intestinal difuso que se observa como engrosamiento de la pared, principalmente la del íleon con la mucosa plegada en rugosidades transversas gruesas, como las circunvoluciones que presenta la corteza cerebral. Estos cambios son debidos a las lesiones granulomatosas tanto en la mucosa como en la submucosa intestinal (46). En pequeños rumiantes las lesiones intestinales se asemejan a las del ganado bovino, aunque el engrosamiento de la pared y los pliegues suelen ser menos evidentes. Las lesiones pueden ser pequeños nódulos, tumefacción de la mucosa, linfangitis y linfangiectasia que son muy marcadas especialmente en cabras, especie en la que puede observarse calcificación de las lesiones. Los nódulos linfáticos presentan un aspecto similar al de los bovinos, pero con caseificaciones y calcificaciones parecidas a las descritas en tuberculosis con mayor frecuencia en caprinos. (45,48). En algunos casos de ovinos el intestino puede aparecer coloreado de un tono naranja-amarillento, debido a la presencia masiva de bacilos pertenecientes a cepas pigmentadas de *Map* (49,50).

#### 4.2 Lesiones microscópicas

La lesión clásica es una enteritis granulomatosa que se torna más evidente en los últimos tramos de intestino delgado, primeros segmentos del intestino grueso, linfonodos y vasos linfáticos asociados. Se observa un infiltrado celular compuesto por macrófagos, linfocitos, células epitelioides y plasmáticas. Los macrófagos aparecen normalmente llenos de bacilos, acompañados frecuentemente de células gigantes también con numerosas bacterias en su interior. Estos agregados celulares afectan la lámina propia de la mucosa, la submucosa o la totalidad de las capas intestinales provocando la atrofia por fusión de vellosidades y la oclusión de las criptas de la mucosa intestinal (46,48). Las lesiones muestran una gran variabilidad, de focales a difusas, y dependen de factores como la dosis infectante, el estado inmunológico la susceptibilidad/resistencia del hospedador, y el tipo de cepa implicada. La clasificación de lesiones focales o multifocales están relacionadas con formas iniciales, latentes o subclínicas con baja carga micobacteriana, y en difusas o graves con alta carga micobacteriana en los tejidos. Esta variedad de lesiones ha provocado que se realicen diferentes clasificaciones de acuerdo a la especie afectada, la gravedad de las lesiones y los tipos celulares implicados. González y cols. realizaron la clasificación más completa para bovinos en 2006, Pérez y cols. en 1996 realizaron una clasificación de lesiones de PTB para ovinos, Corpa y cols. en 2000 para caprinos (48,51,52).

## 5. Epidemiología

### 5.1 Hospederos

*Map* afecta principalmente a rumiantes domésticos como ovinos, bovinos y caprinos, monogástricos tales como caballos, cerdos y primates (53). También afecta a rumiantes salvajes como ciervos, bisonte, búfalo , muflón, alpaca y antílope (54,55,56,57,58,59). En el caso de animales no rumiantes salvajes *Map* se ha descrito en distintos hospedadores como: comadreja, conejo salvaje, cuervo, liebre, oso, zorro, etc (60,61). También se ha descrito infectando protozoarios para sobrevivir a las condiciones ambientales, donde desarrolla una condición de vida intracelular dependiente de los mismos mecanismos de virulencia expresados durante la infección del macrófago, su célula blanco en la infección del hospedero animal (62,63).

### 5.2 Transmisión

La infección ocurre principalmente vía fecal-oral a partir de heces excretadas por animales infectados a través de la leche cuando se contamina con heces que contienen micobacterias o cuando la madre elimina micobacterias en leche, aunque también se menciona la infección transplacentaria (32,64). Los animales recién nacidos, que son los más susceptibles, pueden ingerir grandes cantidades de *Map* a través del calostro, leche, o al mamar de las ubres sucias. La razón de que animales jóvenes sean más susceptibles a la infección, reside en la extensa superficie que abarcan las placas de Peyer intestinales, que va reduciéndose gradualmente con la edad ya que es el punto de entrada de la bacteria al

organismo (22). El riesgo de infección es muy grande en explotaciones intensivas donde existe un contacto frecuente entre recién nacidos y animales eliminadores. *Map* ha sido aislada de tejidos fetales como membranas placentarias, cotiledones, y tejidos maternos como endometrio y mucosa uterina entre otros, aunque estos se presentan principalmente en casos de madres clínicamente enfermas (32). El semen de toros afectados por la enfermedad puede contener la bacteria provocando infección intrauterina en hembras receptoras, que al mismo tiempo puede ser trasladada al cigoto e infectar al embrión (65).

### 5.3 Distribución y prevalencia

La PTB es una enfermedad ampliamente distribuida por todo el mundo, reconocida como una importante enfermedad emergente en varios países siendo reportada en aproximadamente 60 de ellos incluyendo a México y en el 30% de estos países la enfermedad ha sido introducida por bovinos u ovinos importados de E.U.A. e Inglaterra respectivamente (20,66,67). Sin embargo, la prevalencia real de esta enfermedad puede estar enmascarada por las dificultades que plantea su diagnóstico. Las técnicas utilizadas en la detección de animales infectados en general no son muy sensibles, a lo que hay que añadir el largo período de incubación desde la infección hasta la aparición de signos, y la variabilidad del curso de la enfermedad entre animales (68). En nuestro país, los estudios llevados a cabo en el rastro, se han determinado prevalencias del 1.2 a 8.4 % para ganado caprino y del 0.8 a 4.4 % en ganado ovino (20). En el estado de Guanajuato, en un estudio epidemiológico de tipo transversal, se encontró una prevalencia de

paratuberculosis ovina de 42.42% (28/66) a nivel explotación y de 4.33% (60/1385) a nivel individual, con base en los sueros analizados por inmunodifusión en gel de agar (69). En otro estudio realizado en 2005 con bovinos en el mismo Estado, se encontró una seroprevalencia a nivel de establo del 29% (33/115) y de 29% en animales de diferentes establos (33/411) Los sueros fueron evaluados con un ELISA comercial (70). En el año 2009, por medio de ELISA se determinó una prevalencia de paratuberculosis bovina de 63.16% (120/190) a nivel de establos y de 31.37% (256/816) en animales de diferentes establos en el Estado de San Luis Potosí (71).

#### 6. Importancia económica

Las pérdidas económicas derivadas de esta enfermedad son cuantiosas y se deben tanto a causas directas como a causas indirectas e inaparentes. Las pérdidas directas se asocian a disminución de la producción láctea, mayor susceptibilidad a otras enfermedades, infertilidad, disminución del valor de los animales en el rastro, costos por tratamientos ineficaces y consumo de alimento de animales con baja conversión alimenticia. Las pérdidas indirectas se deben a restricciones en el mercado ganadero, movimiento de los animales, así como instauración de medidas preventivas. Entre las pérdidas inaparentes se encuentran las pérdidas de potencial genético por matanza temprana y algunas explotaciones infectadas que venden pie de cría permanecen cerradas, lo que limita la mejora genética (66). En un estudio realizado en 2005 sobre el impacto económico de la PTB en bovinos lecheros del centro del país, se calculó que este

ascendía a \$10,345.00 pesos por vaca al año, donde el mayor impacto se asoció a la pérdida en la producción láctea (72).

## 7. Diagnóstico

7.1 Detección directa de *Map* (Cuadro 1)

7.2 Pruebas que detectan la respuesta inmune del hospedador

7.2.1 *Inmunidad celular* (Cuadro 2)

7.2.2 *Inmunidad humoral* (Cuadro 3)

7.3 Sensibilidad y especificidad desde enfoque epidemiológico (Cuadro 4)



| <b>CUADRO 1</b>   |   |  |  |
|---|---|--|--|
| <b>7.1 Diagnóstico basado en la detección directa de <i>Map</i></b> |   |  |  |
| <i>Técnica</i>  | <i>Principio</i>  | <i>Ventajas</i>  | <i>Desventajas</i>   |
| <b>Tinción directa</b>  | Tinción Ziehl –Neelsen y H-E de frotis de heces o tejidos (73).   | Útil, rápida y barata (68).  | -No tiñe esferoplastos<br>-No permite la diferenciación de otras bacterias ácido-alcohol resistentes (74)  |
| <b>Inmunohistoquímica</b>   | Unión específica entre anticuerpos marcados y los antígenos que éstos reconocen, aplicado sobre cortes histológicos (47).   | Útil en detección de esferoplastos o cuando la presencia de bacilos es mínima (47,75)  | Puede dar reacciones cruzadas en caso de infecciones con otras micobacterias dependiendo del tipo de anticuerpo utilizado (47).                          |
| <b>Cultivo bacteriológico</b>                                       | Cultivo de muestras como heces, linfonodos mesentéricos o raspados de mucosa intestinal y leche, en medios sólidos o líquidos (73,76).  | -Proporciona diagnóstico definitivo<br>-Única prueba considerada como 100% específica (73).<br>-Prueba de referencia en muchos países (77) | -Técnicamente difícil de realizar.<br>-Alto costo<br>-Largo tiempo en espera de resultados (73).   |
| <b>Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).</b>                   | Amplifica de forma específica cantidades mínimas de ADN por la acción de la ADN polimerasa, haciendo que sean detectadas con facilidad. Detecta la secuencia de inserción específica de <i>Map</i> IS900 (78,79). | -Ventaja sobre cultivo por velocidad de obtención de resultados, automatización y precios competitivos (76).                               | -Presencia de inhibidores de la PCR sobre todo en muestras de heces producen falsos negativos (79).<br>-Requiere mayor infraestructura en el laboratorio |

| <b>Cuadro 2</b>   |   |   |  |  |
|---|---|---|--|--|
| <b>7.2.1 Diagnostico basado en la detección de la inmunidad celular del hospedero</b> |   |   |  |  |
| <b>Técnica</b>  | <b>Principio</b>  | <b>Cantidad mínima de anticuerpos que detecta</b> | <b>Ventajas</b>  | <b>Desventajas</b>   |
| <b>Prueba de intradermo-reacción</b>  | Se basa en la hipersensibilidad cutánea de tipo retardado en el animal infectado (73).  | <u>0.02 µg/ml</u>                                 | -Fácil realización   | -Los antígenos utilizados dan resultados poco específicos por que la sensibilización al complejo <i>M. avium</i> está muy extendida<br>-Interpretación complicada por falta de estandarización en la lectura de la prueba (80) |
| <b>Prueba de interferón gamma</b>   | Se basa en la detección de la citocina IFN-γ que liberan los LT sensibilizados durante un periodo de incubación de 18-36 horas con antígeno específico de <i>Map</i> o <i>Maa</i> . Se emplea la técnica de ELISA tipo emparejado para su realización (81). | <u>0.0005 µg/ml</u>                               | -Útil ante respuestas iniciales de tipo celular o infecciones más avanzadas de tipo tuberculoide o focal (82).<br>-Recomendada para animales de 1-2 años de edad (83). | -Reacciones cruzadas con otras micobacterias<br>-Elevados costos (83).   |

| <b>Cuadro 3</b>  |  |  |   |  |
|--|--|--|---|--|
| <b>7.2.2 Diagnóstico basado en la detección de a inmunidad humoral</b> |  |  |   |  |
| <i>Técnica</i>   | <i>Principio</i>   | <i>Cantidad mínima de anticuerpos que detecta</i>                | <i>Ventajas</i>   | <i>Desventajas</i>   |
| <b>Prueba de fijación del complemento directa.</b>                     | Se basa en la activación del complemento por la vía clásica, en donde es necesaria la presencia de una reacción antígeno anticuerpo para iniciar la reacción (84).                     | <u>0.05 µg/ml</u><br><br>Clase de inmunoglobulina detectada: IgG | -Es adecuada en casos de animales clínicamente sospechosos<br>- A menudo es solicitada por países que importan ganado (73).         | -Técnica laboriosa<br>-No recomendada 'para detectar animales en fase subclínica.<br>-Falsos positivos por reacciones cruzados con otras bacterias ácido-alcohol resistentes (85). |
| <b>Inmunodifusión en gel de agar (IDGA)</b>                            | Se basa en la unión antígeno-anticuerpo en gel de agar, enfrentando al suero problema con un control positivo y un antígeno específico de <i>Map</i> soluble (comúnmente PPA-3). (73). | <u>30 µg/ml</u><br><br>Clase de inmunoglobulina detectada: IgG   | -Útil para confirmar la enfermedad en rumiantes domésticos clínicamente sospechosos (73).<br>-Técnica económica, sencilla y rápida. | -No detecta a animales en fase subclínica (85).<br>-Menos sensible que ELISA (27-58%) respectivamente (86).  |

**Cuadro 3**  
**7.2.2 Diagnóstico basado en la detección de a inmunidad humoral**

| <i>Técnica</i>  | <i>Principio</i>   | <i>Cantidad mínima de anticuerpos que detecta</i>                  | <i>Ventajas</i>  | <i>Desventajas</i>   |
|---|--|--|--|--|
| <b>Ensayo de inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA) indirecto</b> | Se basa en la unión específica de antígeno-anticuerpo, detectada por la adición de un conjugado que contiene antiglobulina ligada químicamente a una enzima, que al unirse al complejo Ag-Ac y tras añadir un sustrato para la enzima, produce un cambio de color, medido en D.O, que es proporcional a la cantidad de complejo fijado (87). | <u>0.0005 µg/ml</u><br><br>Clase de Inmunoglobulina detectada: IgG | -Automatización.<br>-Elevado número de muestras para analizar (73).<br>- Se eliminan reacciones cruzadas con anticuerpos correspondientes a <i>Nocardia</i> spp, <i>Corynebacterium</i> spp. y otras micobacterias saprófitas (88) | - Baja sensibilidad (14-30%) con relación a la “prueba de oro” cultivo (100%) (89,90).<br>-Requiere mayor infraestructura en el laboratorio.<br>-Presenta mayor sensibilidad que prueba de IDGA y fijación del complemento ya que detecta cantidades más bajas de anticuerpos (86) |

### Cuadro 4

#### 7.3 Sensibilidad y especificidad desde el enfoque epidemiológico

Diagnóstico basado en la detección directa de *Map*

| <b>PRUEBA</b>  | <b>SENSIBILIDAD</b>  | <b>ESPECIFICIDAD</b>  |
|--|--|---|
| <b>Tinción directa</b>   | De 15% con respecto al cultivo (91).   | De 85% con respecto al cultivo (91).  |
| <b>Cultivo bacteriológico</b>  | De 90-100% en infecciones clínicas y 30-70% en infecciones subclínicas<br>-De 95% con mezclas de muestras fecales de ovinos con infecciones clínicas y de 50% en ovinos con infecciones subclínicas(92). | -Aproximada al 100% (73).   |
| <b>Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).</b>                        | -De 87% en leche de vaca colectada individualmente (93)*.<br>-De 66% en sangre de ovejas clínicamente afectadas (94)*.<br>-De 70% en heces de vaca (95)*.<br><i>*Con relación al cultivo</i>             | -De 95% en muestras de leche de vaca colectadas individualmente (93)*.<br>-Aproximada al 100% en sangre de ovejas clínicamente afectadas (94)*.<br>-De 85% en heces de vaca (95)*.<br><i>*Con relación al cultivo</i> |
| Diagnóstico basado en la detección de la inmunidad celular del hospedero |  |   |
| <b>Prueba de intradermo-reacción</b>                                     | De 28% en bovinos en relación con el cultivo (82)  | De 88.8% a 93.5% en bovinos a diferentes puntos de corte de la medición (80).   |
| <b>Prueba de in IFN-<math>\gamma</math></b>                              | De 75-100%, en la etapa subclínica, en relación con el cultivo(82).  | En bovinos varía de 67-94% dependiendo de los criterios de interpretación, (73,80).   |

| Pruebas diagnósticas basadas en la detección de a inmunidad humoral |  |   |
|---|--|---|
| <b>PRUEBA</b>   | <b>SENSIBILIDAD</b>  | <b>ESPECIFICIDAD</b>  |
| <b>Prueba de fijación del complemento directa (FC).</b>             | -De 50% en ovinos respecto al cultivo (96).<br>-De 38% en bovinos respecto al cultivo (105).   | -De 80% en ovinos respecto al cultivo (96).<br>-De 95% en bovinos respecto al cultivo (105).  |
| <b>Inmunodifusión en gel de agar (IDGA)</b>                         | -De 38% en animales con lesiones paucibacilares y 56% con lesiones multibacilares, respecto a histopatología (97).   | -De 90% en animales con lesiones paucibacilares y 98% con lesiones multibacilares, respecto a histopatología (97).  |
| <b>Ensayo de inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA) indirecto</b> | -De 48% en suero de ovinos con infección subclínica y de 96% con infección clínica, respecto a histopatología (98).<br>-De 14-30% en suero y leche de bovinos con relación con el cultivo (89,90). | -De 84% en suero de ovinos con infección subclínica y de 95% en suero con infección clínica respecto a histopatología (98).<br>-De 85-95% en suero y leche de bovinos con relación con el cultivo (89,90) |

#### 7.4 Prueba de ELISA indirecto.

Se basa en la unión específica de los anticuerpos presentes en muestras biológicas (suero, plasma, leche) con los antígenos (por ejemplo la proteína protoplásmica cepa 18 de *Map conocido como PPA-3*) de *Map* que están fijados a microplacas de poliestireno (87,68). La presencia de anticuerpos unidos se detecta por la adición de una solución que contiene antiglobulina ligada químicamente a una enzima (conjugado). Al unirse este conjugado al complejo antígeno-anticuerpo, éste conjugado se unirá de forma con covalente al complejo y tras

añadir un sustrato para la enzima, se produce un cambio de color, cuya densidad óptica (D.O.) es proporcional a la cantidad de complejo fijado (27). Para eliminar las reacciones cruzadas con anticuerpos inespecíficos contra *Nocardia* spp, *Corynebacterium* spp. y otras micobacterias saprófitas, los sueros se adsorben con *Mycobacterium phlei* (88). Por esta razón la especificidad de la prueba no baja del 90% (99). La técnica de ELISA se caracteriza por presentar una mayor sensibilidad con valores del 58% en comparación con las técnicas de FC e IDGA con valores de 38 y 27% respectivamente, en cuanto a la detección de animales subclínicamente infectados que actúan como portadores de la enfermedad (86). La mayor sensibilidad que presenta ELISA en relación con la prueba de IDGA y FC, se debe a que es capaz de detectar bajas cantidades de proteína (anticuerpos) con valores de 0.0005 µg/ml vs 0.05 µg/ml y 30 µg/ml que detectan FC e IDGA respectivamente. Según Pérez y cols., en ovinos y caprinos la prueba de ELISA presenta una sensibilidad entre el 48-96% y una especificidad del 84-95%. Como en las otras pruebas de detección de inmunidad humoral antes mencionadas, generalmente la sensibilidad de ELISA aumenta con el grado de excreción de bacterias en heces y el grado de difusión de las lesiones, debido a que aumenta la cantidad de antígenos circulantes (83). En comparación con el cultivo la sensibilidad general del ELISA puede ser de un 14-30% (90,100). Esta marcada diferencia podría deberse a que los animales en estados tempranos de la enfermedad, aún si excretaran la bacteria en heces, no necesariamente pueden ser detectados por la prueba de ELISA, ya que pueden pasar varios meses, o años, antes de que el nivel de anticuerpos circulantes sea suficiente para

desencadenar una reacción positiva, permaneciendo la respuesta humoral bajo el límite de detección de las pruebas serológicas actualmente disponibles (100). Como ya se mencionó anteriormente la prueba también se puede aplicar a muestras de leche incluso como indicador de la estimación de la prevalencia de rebaños utilizando muestras de leche de tanque (101). En comparación con los resultados de ELISA con suero sanguíneo, la sensibilidad relativa (21.2% en ELISA con muestras de leche y 23.5% con muestras de suero), es menor aunque parece mantener una concordancia aceptable esto se atribuye a las diferentes subclases de inmunoglobulinas y su origen, debido a que la inmoglobulina predominante en suero, calostro y leche de vaca es IgG que además se clasifica en tres subclases: IgG1, IgG2 e IgG3. La subclase IgG1 es la predominante en calostro y leche, pero únicamente constituye 50% de IgG en suero aproximadamente. Aunque una gran proporción de IgG de calostro es derivado de un transporte de esta inmunoglobulina en suero, la mayoría de IgG es producido por el plasma de las células residentes en la glándula mamaria (102). En cuanto a los resultados del cultivo se refiere, para algunos, los resultados de ELISA en leche muestran una concordancia superior que los del ELISA en suero (103). Se ha observado que la positividad aumenta en suero al final de la lactación, en leche al principio de la misma, y tanto en suero como en leche a partir del segundo parto (104). Entre las principales ventajas de esta técnica destacan la automatización y el elevado número de muestras que es capaz de analizar (73). En la actualidad es una de las pruebas que más se emplea para la determinación del nivel de infección en los rebaños. Sin embargo, el carácter multifacético o espectral de la



enfermedad, hace imposible la adopción de una técnica de referencia única, y si se pretende obtener un diagnóstico de gran sensibilidad y especificidad, debe aplicarse una combinación de técnicas, y hacerlo de manera repetida si es posible.

#### 8. Tratamiento y control

Debido al alto costo y a la ineficacia de los tratamientos disponibles, actualmente no se recomienda el uso de ningún tratamiento contra la paratuberculosis en ganado, a pesar de que ofrezcan buenos resultados *in vitro* (105). En 1996, St. Jean estudió en mayor detalle la respuesta de *Map* a los tratamientos terapéuticos y recomienda la aplicación de isoniazida (20mg/kg) cada 24 horas durante toda la vida productiva del animal y sin embargo los signos clínicos empeoran; también recomienda incluir rifampicina y en casos agudos la administración de un aminoglucósido (amikacina) durante 3-8 semanas (106). El tratamiento de la paratuberculosis es paliativo y no curativo por lo que solamente está indicado cuando se trata de ejemplares genéticamente irremplazables, teniendo en cuenta que los animales tratados pueden suponer un importante foco de contagio pues aunque su situación clínica puede mejorar durante el suministro de los fármacos, la excreción de micobacterias en heces continúa (107,108). La primera medida aplicable a tener en cuenta y de cumplimiento constante durante cualquier plan de control de la paratuberculosis, es llevar correctamente un manejo encaminado a evitar la introducción y la transmisión de la enfermedad en el rebaño (108). Son especialmente importantes las costumbres de manejo que afectan a la reposición de animales, los partos, los terneros, los animales con infección detectada, la

higiene y el manejo de las heces (109). La introducción de nuevos animales debería hacerse con las máximas garantías de que los animales sean negativos a PTB, aunque en realidad esto no se realiza en el país (110). Las vías de transmisión fecal-oral y láctea deberían ser contenidas evitando o restringiendo el contacto entre madres y crías, y entre adultos y jóvenes en general, evitando el contacto de las heces con los animales, los alimentos y la bebida, realizando tratamientos efectivos del calostro y de la leche (o usar preparados artificiales), manteniendo unas buenas medidas higiénicas generales, además de eliminar o aislar a los animales con signos clínicos. La mayoría de estas medidas son económicamente sostenibles y rentables, y su adopción reduce considerablemente la prevalencia del rebaño, aunque no siempre funcionan, principalmente por incumplimiento de alguna (111). Otras medidas aplicables son medir la tasa de infección del rebaño mediante pruebas serológicas (por ejemplo ELISA) en los animales mayores a un año; pues se considera que por cada caso clínico se encuentran entre 5 a 10 animales infectados; emplear compuestos fenólicos para la desinfección periódica de los corrales; desinfectar las heces con cal hidratada al 20% pH 11.0 para disminuir la viabilidad de la bacteria (20). Otra opción es la vacunación, pues según los hallazgos inmunopatológicos, reduce la tasa de sacrificios por paratuberculosis, disminuye la incidencia de la enfermedad clínica, y en ovinos, bovinos y caprinos limita la extensión y gravedad de las lesiones, (112). Se puede decir que la vacuna no evita la infección con *Map*, pero la incidencia de casos clínicos se ve reducida, además de ser una medida muy económica. Favorece la aparición de respuesta celular y humoral tempranas,

controlando la evolución de las lesiones a tuberculoides, provocando su focalización, reduciendo la cantidad de bacilos presentes en las mismas, así como la cantidad que se excreta en las heces (113). Sin embargo éstas respuestas interfieren al mismo tiempo con las pruebas serológicas de diagnóstico. Normalmente se recomienda administrar la vacuna durante el primer mes de vida con el fin de proteger al animal antes de ser infectado y de minimizar la interferencia con el posterior diagnóstico de tuberculosis. Hasta el momento los ensayos de revacunación no han mostrado una mayor protección, y la vacuna se administra sólo una vez en la vida del animal, lo que parece ser suficiente (114). Diferentes trabajos experimentales y de campo demuestran que la vacunación ha proporcionado mejores resultados en ovinos que en bovinos.. Esto se debe en parte a que los ovinos son resistentes a la tuberculosis, con lo que la vacunación de paratuberculosis en esta especie no se ha visto restringida, ya que en México, los ovinos y caprinos no se encuentran incluidos en la campaña de control de tuberculosis y no existen por lo tanto las interferencias en las pruebas diagnósticas de las campañas de control de la tuberculosis (intradermorreacción) aplicadas principalmente en ganado bovino, permitiendo así un amplio seguimiento, en contraste de los resultados obtenidos de múltiples trabajos (115). Entre los inconvenientes que puede ofrecer esta inmunización es la presentación de un nódulo postvacunal que puede debridar en algunos casos, así como la presentación de serología falsa positiva que al parecer persiste por un año y la sensibilización continua a pruebas de intradermorreacción (20).

## JUSTIFICACIÓN

Debido a que el antígeno propuesto presenta mayor disponibilidad y menor costo en el país, el estudio planteó evaluar como antígeno las proteínas en suspensión del filtrado de cultivo de *M. avium subsp. avium* en el diagnóstico de PTB , como alternativa para el diagnóstico nacional.

## HIPÓTESIS

La detección de animales infectados con paratuberculosis mediante la prueba de ELISA, al emplear el antígeno de *Maa* comparado con el antígeno PPA-3 tendrá una alta correlación en sus resultados.

## OBJETIVOS

1. Estandarizar la concentración del antígeno de *Mycobacterium avium* subsp *avium* para su utilización en la prueba de ELISA.
2. Comparar los resultados obtenidos en la prueba de ELISA al emplear el antígeno de *Maa* y PPA-3 en casos de paratuberculosis.
3. Proponer un protocolo en el diagnóstico de PTB mediante ELISA empleando el antígeno de *Maa*.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### I. Procedencia de las muestras.

a. Se utilizó un banco de sueros almacenados a  $-70^{\circ}\text{C}$  en la USEDICO (Unidad de Servicios de Diagnóstico y Constatación) perteneciente al CEIEPAA (Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Animal en Altiplano). Estos sueros fueron tomados de dos rebaños, uno de ovinos con 105 individuos y otro de caprinos conformado por 212 individuos con antecedentes clínicos, bacteriológicos, anatomopatológicos y serológicos a paratuberculosis. La edad de los animales de los cuales se obtuvieron las muestras fue de 1 a 4 años de edad. El CEIEPAA pertenece a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM, ubicado en el Km. 8.5 de la Carretera Federal Tequisquiapan–Ezequiel Montes Municipio de Tequisquiapan, Qro.

b. Se remitieron a la USEDICO sueros de 74 caprinos de una producción particular ubicada en Fuentezuelas, Municipio de Tequisquiapan, Qro., de los cuales se desconocía la prevalencia de paratuberculosis y no se habían descrito casos clínicos de paratuberculosis.

c. Se remitió a USEDICO un grupo de 49 muestras de sangre provenientes de dos rebaños de ovinos distintos de: Carretera Villa de Reyes- San Felipe Km 16, San Felipe, Guanajuato y Autopista México- Qro. Km 189, El Marquez,

Querétaro, de los cuales se desconocía el estatus de la enfermedad. La edad de los animales de los cuales se obtuvieron las muestras fue de 1 a 3 años.

## II. Procesamiento de muestras

Los tubos con sangre completa se mantuvieron en reposo a temperatura ambiente (15-25°C) para la adecuada formación del coágulo (1-2 horas). Se centrifugaron a 4500 rpm durante 5 minutos y posteriormente se separaron los sueros del tubo por medio de una micro-pipeta. Una vez obtenidos los sueros de las muestras sanguíneas, se realizaron alícuotas en viales con 100 µl cada uno, se identificaron adecuadamente separándolos por grupos de animales y se mantuvieron en congelación a -70°C hasta su posterior utilización.

## III. Antígenos utilizados en la prueba de ELISA

a) Proteína protoplásmica liofilizada cepa 18 de *Map* conocido como PPA-3 (Laboratorios Allied Monitor). Se utilizó la concentración estandarizada a 0.04 mg/ml (116).

b). Proteínas en suspensión de un filtrado de cultivo de *M. avium* subsp. *avium* cepa D4, de seis semanas de crecimiento no inactivado con 2mg/ml de proteína (donado por Productora Nacional de Biológicos Veterinarios – PRONAVIBE). Este antígeno se empleó a las siguientes concentraciones: de 0.1 mg/ml, 0.2 mg/ml y de 0.3 mg/ml.

#### IV. Procedencia de los sueros controles

-Controles positivos. Se obtuvieron de sueros de ovinos y caprinos diagnosticados con PTB mediante histopatología y cultivo bacteriológico.

-Controles negativos. Se obtuvieron de sueros de ovinos y caprinos negativos mediante histopatología y cultivo.

#### V. Elaboración de la prueba de ELISA con el antígeno PPA-3y el *Maa*

Las pruebas fueron realizadas en la USEDICO-CEIEPAA mediante la técnica de ELISA indirecto (116).

**ELISA (antígeno PPA-3).** Previamente se sensibilizó la microplaca con el antígeno PPA-3 a una concentración de 0.04mg/ml diluido en solución amortiguadora de carbonato pH 9.6 (dilución 1:250) para depositar 100 µl de antígeno por pozo en las placas de ELISA. Posteriormente las placas se agitaron por un lapso de 1 hora (h) y después se incubaron durante 12 h a 4 °C. Al día siguiente se realizó el lavado agregando 200 µl de la solución de lavado PBS-TG pH 7.4 (Phosphate buffered saline- Tween gelatine) a cada pocillo repitiendo esta operación tres veces. Se almacenaron las placas a - 20°C por un periodo de 15 días. Los sueros problema y sueros problema se adsorbieron con una suspensión de *M. phlei* (5g / 1000 ml de solución salina al 0.85%) guardando una relación 1:1; para lo cual se colocaron 100 µl de suspensión de *M. phlei* y 100 µl de suero, después se agitó la placa a temperatura ambiente (t.a) durante 1 h, al término de este lapso se incubó cada placa 12 h a 4°C. En las placas fijadas previamente

con el antígeno de *Maa*, se depositaron 5 µl de suero de la muestra sospechosa, y 95 µl de PBS-TG respectivamente. En cada una de las placas se colocó por duplicado el control positivo y negativo, posteriormente las placas fueron incubadas en cámara húmeda durante 2 h, se lavaron tres veces con 200 µl de PBS-TG. Finalmente se añadieron 100 µl de conjugado anti IgG caprino marcado con peroxidasa de rábano (HRP Zymed™) a una dilución de 1:4500; las placas se incubaron durante 2 h en cámara húmeda a t.a.. Una vez transcurrió el tiempo, las placas fueron lavadas 3 veces con PBS-TG 200 µl por pozo y posteriormente se añadieron 100µl de solución reveladora compuesta por solución amortiguadora de citrato 0.05 M ,pH 4 más , 2-2' azino-di-(3-etilbenzothiazol- sulfona-6) – (diamonio) (ABTS) y 10µl de peróxido de hidrógeno más 120µl de agua destilada a una (1:25). Se incubó la placa durante 15 minutos en agitación constante y envuelta en papel aluminio para protegerla de la luz. Se realizó la lectura de las placas en un espectrofotómetro de 8 canales (ELX-800, BIO-TEK Instruments., Inc.) y empleando un filtro de 405 nm. Los resultados obtenidos de las lecturas de las placas se valoraron mediante la obtención de un cociente que resultó de la división del valor medio de Densidad Óptica (DO) obtenida, entre el valor medio del control positivo de cada placa. El punto de corte  $\geq 0.8$  determinó a la muestra como positiva (116).

**ELISA (antígeno *Maa*)**. Previamente se sensibilizó la microplaca con el antígeno de *Maa* a una concentración de 0.1, 0.2 y 0.3 mg/ml diluido en solución amortiguadora de carbonato pH 9.6 para finalmente depositar 100 µl de antígeno por pozo. Posteriormente las placas se agitaron por un lapso de 1 h y se incubaron



durante 12 h a 4 °C. Al día siguiente realizó el lavado agregando 200 µl de la solución de lavado PBS-TG pH 7.4 a cada pocillo tres veces. Se almacenaron las placas a -20°C por un periodo de 15 días. Los sueros problema y los sueros control se adsorbieron con una suspensión de *M. phlei* (5g / 1000 ml de solución salina al 0.85%) guardando una relación 1:1; se colocaron 100 µl de suspensión de *M. phlei* y 100 µl de suero, después se agitó la placa a t.a .durante 1 h y al término de este lapso se incubó cada placa a 12 h a 4°C. En las placas fijadas previamente con el antígeno de *Maa*, se depositaron 5 µl de suero de la muestra sospechosa y 95 µl de 100 de PBS-TG. En cada una de las placas se colocó por duplicado el control positivo y negativo, posteriormente las placas fueron incubadas en cámara húmeda durante 2 h, se lavaron tres veces con 200 µl de PBS-TG. Finalmente se añadieron 100 µl de conjugado anti IgG caprino marcado con peroxidasa de rábano (HRP-Zymed™) a una dilución de 1:4500; las placas se incubaron durante 2 horas en cámara húmeda a t.a.. Una vez transcurrido el tiempo, las placas fueron lavadas 3 veces con PBS-TG 200 µl por pozo y posteriormente se añadieron 100µl de solución reveladora compuesta por solución amortiguadora de citrato 0.05 M pH 4.0, más 2-2´ azino-di-(3-etilbenzothiazol-sulfona-6) – (diamonio) (ABTS) y 10µl de peróxido de hidrógeno más 120µl agua (1:25). Se incubó la placa durante 15 minutos en agitación constante y envuelta en papel aluminio para protegerla de la luz. Se realizó la lectura de las placas en un espectrofotómetro de 8 canales (ELX-800, BIO-TEK Instruments, Inc.) empleando un filtro de 405nm. Los resultados obtenidos de las lecturas de las placas se valoraron mediante la obtención de un cociente que resultó de la división del valor

medio de Densidad Óptica (DO), entre el valor medio del control positivo de cada placa. Se establecieron diferentes puntos de corte los cuales fueron  $\geq$  a: 0.80, 0.85, 0.90, 0.95 y 1.0.

## VI. Análisis estadístico

Una vez obtenidos los resultados, se elaboraron bases de datos y mediante pruebas de correlación y concordancia se determinó la concentración y el punto de corte establecido para la utilización como antígeno de *M avium* subsp. *avium* en ELISA indirecto para el diagnóstico de paratuberculosis.

Se realizaron dos repeticiones de la prueba de ELISA con el antígeno PPA-3 a una concentración de 0.04mg/ml y 2 repeticiones con el antígeno de *Maa* a concentraciones de 0.1, 0.2 y 0.3 mg/ml con cada muestra de suero. Los valores de D.O. obtenidos fueron registrados en una base de datos de Excell™. Estos datos fueron procesados mediante pruebas de correlación de Pearson y Sperman y a través de estos se determinó la concentración (variable independiente) y el punto de corte (variable dependiente) del antígeno de *Maa* así como la correlación y la concordancia que existe entre *Maa* y PPA-3.

Se utilizaron dos tipos de diagnóstico:

1. Diagnóstico por punto de corte (DI-PC) Se sacó el promedio de las D.O. de las dos repeticiones y se dio como positivo cuando el promedio fuera mayor

o igual al punto de corte correspondiente y negativo el que diera por debajo de este. Es decir, no se tomo en cuenta cada repetición, si no el promedio de las dos.

2. Diagnóstico clínico (Di-CL). Se consideraron todas las D.O. de cada repetición a los diferentes puntos de corte y en el caso de que en las dos repeticiones dieran positivo se dio como positivo, si daban las dos negativo se daban como negativo y las demás combinaciones (negativo/positivo, positivo/negativo) se consideraron como sospechosas.

## RESULTADOS

A partir de pruebas de correlación de Pearson entre la D.O. promedio del antígeno PPA-3 y el antígeno de *Maa*, se determinó que la concentración de 0.3mg/ml-0.80 PC fue la que presentó mayor asociación con el antígeno comercial PPA-3 ( $r=0.78$ ,  $P<0.001$ ), por lo que fue usada como referencia para determinar la relación del antígeno PPA-3 y el antígeno *Maa*.

A partir de esta información se realizó una correlación de rangos de Spearman para determinar la asociación entre el diagnóstico clínico (Di-CL) y el diagnóstico a partir del punto de corte (Di-PC) de 0.3-0.80 del antígeno de *Maa* y PPA-3.

La correlación de rangos fue mayor entre los Di-CL PPA-3 con 0.3mg/ml- PC-0.80 = 0.67 ( $P<0.001$ ). (Cuadro 5 y 6)

**Cuadro 5**

**Correlación de Sperman para los diagnósticos basados en diferentes PC**

|                | Di-PC-PPA3 | Di-PC-0.3-0.80 | Di-PC-0.3-0.85 | Di-PC-0.3-0.90 | Di-PC-0.3-0.95 | Di-PC-0.3-1.00 |
|----------------|------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| Di-PC-PPA3     | 1          | 0.53           | 0.53           | <b>0.56</b>    | 0.50           | 0.48           |
| Di-PC-0.3-0.80 |            | 1              | 0.83           | 0.67           | 0.52           | 0.42           |
| Di-PC-0.3-0.85 |            |                | 1              | 0.80           | 0.63           | 0.50           |
| Di-PC-0.3-0.90 |            |                |                | 1              | 0.79           | 0.61           |
| Di-PC-0.3-0.95 |            |                |                |                | 1              | 0.79           |
| Di-PC-0.3-1.00 |            |                |                |                |                | 1              |

**Cuadro 6**  
**Correlación de Sperman para los diagnósticos basados en el Di-CL**

|                       | Di-CL-PPA3 | Di-CL-0.3-0.80 | Di-CL-0.3-0.85 | Di-CL-0.3-0.90 | Di-CL-0.3-0.95 | Di-CL-0.3-1.00 |
|-----------------------|------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| <b>Di-CL-PPA3</b>     | 1          | <b>0.67</b>    | 0.67           | 0.62           | 0.54           | 0.48           |
| <b>Di-CL-0.3-0.80</b> |            | 1              | 0.87           | 0.80           | 0.65           | 0.57           |
| <b>Di-CL-0.3-0.85</b> |            |                | 1              | 0.88           | 0.72           | 0.61           |
| <b>Di-CL-0.3-0.90</b> |            |                |                | 1              | 0.81           | 0.70           |
| <b>Di-CL-0.3-0.95</b> |            |                |                |                | 1              | 0.83           |
| <b>Di-CL-0.3-1.00</b> |            |                |                |                |                | 1              |

Mediante pruebas de concordancia se estimó el grado de semejanza del diagnóstico basado en el punto de corte de la prueba de ELISA utilizando el antígeno de PPA-3 Y *Maa* (Cuadro 7)

**Cuadro 7**  
**Concordancia del diagnostico basado en el PC entre PPA3 y Antígeno de Maa**

|                       | Concordantes | No concordantes | Porcentaje  |
|-----------------------|--------------|-----------------|-------------|
| <b>Di-PC-0.3-0.80</b> | 342          | 97              | 77.9        |
| <b>Di-PC-0.3-0.85</b> | 353          | 86              | 80.4        |
| <b>Di-PC-0.3-0.90</b> | 366          | 73              | <b>83.4</b> |
| <b>Di-PC-0.3-0.95</b> | 364          | 75              | 82.9        |
| <b>Di-PC-0.3-1.00</b> | 363          | 76              | 82.7        |

Mediante pruebas de concordancia se estimó el grado de semejanza del diagnóstico basado en el diagnóstico clínico de la prueba de ELISA utilizando el antígeno de PPA-3 y *Maa* (Cuadro 8).

| <b>Cuadro 8</b>  |              |                    |             |
|--|--------------|--------------------|-------------|
| <b>Concordancia del diagnostico basado en el Di-CL<br/>entre PPA3 y <i>Maa</i></b> |              |                    |             |
|  | Concordantes | No<br>concordantes | Porcentaje  |
| <b>Di-PC-<br/>0.3-0.80</b>   | 275          | 164                | 62.6        |
| <b>Di-PC-<br/>0.3-0.85</b>   | 297          | 142                | 67.7        |
| <b>Di-PC-<br/>0.3-0.90</b>   | 312          | 127                | <b>71.0</b> |
| <b>Di-PC-<br/>0.3-0.95</b>   | 299          | 140                | 68.1        |
| <b>Di-PC-<br/>0.3-1.00</b>   | 299          | 140                | 68.1        |

El coeficiente de correlación del método de Pearson fue de 0.78 con una concentración de 0.3mg/ml, por lo que según la escala para la interpretación de coeficientes de correlación según el rango de valores de Espíndola ,entra en el rango de correlación alta (Coeficiente 0= relación nula, 0-0.2= relación muy baja, 0.2-0.4= relación baja, 0.4-0.6= relación moderada, 0.6-0.8 relación alta, 0.8-0.1= relación muy alta, 1= relación perfecta) (117). Se estableció que la mayor concordancia se observó en la concentración de 0.3mg/ml a un punto de corte de 0.90 a partir de intervalos de confianza al 95%, presentando un valor de *Kappa* (K)

basado en el diagnóstico clínico de 0.83 donde  $K = 1$  representa una concordancia perfecta, más allá de la intervención al azar. Para la mayoría de los casos, valores menores a 0.40 la concordancia se estima como pobre, valores  $>0.40$  y hasta 0.75 la concordancia se estima de regular a buena y valores  $>0.75$  y hasta 0.99 se estiman como concordancia de buena a excelente (118). Por lo tanto los resultados de concordancia obtenidos son clasificados en el rango de bueno.

## DISCUSIÓN

El análisis estadístico de este estudio arrojó un valor de concordancia del 83% a una concentración de 0.3mg y un punto de corte de 0.90 D.O., lo que significa un alto nivel de acuerdo entre ambas pruebas de ELISA, al utilizar el antígeno PPA-3 y *Maa*. Si bien, la concordancia no evalúa la validez o la certeza sobre una u otra observación con relación a un estándar de referencia dado, sino cuán acordes están entre sí estas observaciones sobre el mismo fenómeno (119). El valor de correlación se determinó mediante el coeficiente de correlación de Pearson y de Spearman, debido a que es recomendable utilizar este último cuando los datos presentan valores extremos, ya que estos afectan en gran medida el coeficiente de correlación de Pearson, o ante distribuciones no normales. El procedimiento de Correlación de Spearman proporciona resultados que son ligeramente diferentes a los de Pearson, por lo que la interpretación de los coeficientes para ambas pruebas es prácticamente la misma, es decir, valores donde  $\pm 1$  concordancia o discordancia perfectas (120). Si consideramos que el empleo del antígeno PPA-3, es uno de los de mayor uso a nivel mundial y en el cual se basa el diagnóstico de paratuberculosis en hatos y rebaños, pero es poco disponible en México; por lo anterior el contar con una alternativa para el uso de otro antígeno, como el de *Maa*, genera una expectativa de su empleo a un menor costo con alta disponibilidad en el país sin la necesidad de importación. La concentración del antígeno de *Maa* que se determinó en este trabajo (0.3 mg/ml) podría verse como una desventaja debido a que esta es 7.5 veces mayor a la requerida por PPA-3



utilizando el mismo protocolo de ELISA, sin embargo su disponibilidad nacional y el menor costo en su producción genera una alternativa más viable para emplearse en el diagnóstico de paratuberculosis. Otras ventajas que puede representar el uso del antígeno de *Maa* son su fácil obtención a gran escala en condiciones de laboratorio ya que no requiere alta infraestructura e insumos costosos; éste antígeno también puede ser liofilizado, lo que permitiría su fácil conservación y transporte manteniendo las características estructurales como estabilidad de las proteínas. La prueba de ELISA indirecta con el empleo del antígeno PPA-3 presenta una sensibilidad de 47% y un 86% de especificidad (116); estos valores podrán ser establecidos en el ELISA empleado con antígeno de *Maa* al comparar la prueba con otros métodos diagnósticos con mayor sensibilidad y especificidad como los son el cultivo (prueba de oro) y la PCR. La utilización de *Maa* como antígeno en el diagnóstico de paratuberculosis mediante ELISA puede explicarse debido al alto grado de identidad genética de más del 97% entre éste y *Map*. A través de una matriz de homología de ADN de más de 2 millones de nucleótidos del genoma de *Maa* y *Map*. Bannantine y cols. demostraron que las dos subespecies, son altamente similares, con solo unas pocas secuencias presentes en un genoma pero ausentes en el otro. No obstante, estos resultados contrastan con las diferencias fenotípicas que cada uno muestra (12). Trabajos de Paustian y cols. distinguen a *Map* de las diferentes subespecies del complejo MAC, a partir de hibridaciones genómicas comparativas que demuestran que existen 210 y 135 marcos de lectura abierta (Open Reading Frames- ORF's) correspondientes a dos diferentes aislamientos de *Maa*

clasificándolos como divergentes de la cepa K10 de *Map*. Estos resultados evidencian la diferencia genética existente entre *Map* y *Maa* (121). Para la rápida diferenciación de *Map* de las subespecies del complejo *M. avium* (*M. avium* subsp. *avium* y *M. avium* subsp. *intracelulare*) se utiliza la detección de la secuencia de inserción específica mediante técnicas moleculares. Las otras dos subespecies de *M. avium* (*Maa* y *Mas*) parecen también tener 1 o 2 secuencias únicas (IS901 e IS902), aunque estas no siempre se evidencian (97). Basado en un estudio realizado por Chiodini en el que se propone el cambio de nombre del antígeno de *Map* cepa 18 a *Maa* cepa 18, Nielsen concluyó que el PPA-3 es un derivado crudo de una cepa de *Maa* y que éste no da resultados menos específicos ni sensibles que otro antígeno derivado de la cepa VRI 316 de *Map*. Estos resultados pueden explicarse debido a que puede que no se detecte anticuerpos contra epítopes específicos específicos para *Map* o *Maa* (122,123). Este estudio puede representar un antecedente en el uso de *Maa* como antígeno para el diagnóstico de PTB mediante ELISA. Sin embargo, no se ha esclarecido en su totalidad el origen real de la cepa del PPA-3, por lo que en la actualidad se sigue utilizando PPA-3 como antígeno de *Map*. En los últimos años se ha recurrido a la elaboración por medio de tratamientos físico-químicos de antígenos de cultivos de *Map* no purificados similares al PPA-3 por medio de tratamientos físico-químicos de cultivos de *Map* y hoy en día se pueden encontrar algunos comercializados en kits de diagnóstico, por diferentes laboratorios como IDEXX™, CSL™, etc. (124,125). En México se han probado diferentes antígenos como alternativa en el diagnóstico nacional, por motivos de disminución de los costos y los problemas de

disponibilidad de otros antígenos comerciales; tal es caso del antígeno protoplasmático de *Map* cepa 3065 de origen nacional descrito para el diagnóstico de paratuberculosis en ganado bovino, el cual presentó una sensibilidad y especificidad relativas de 79.31% y 82.25% respectivamente y un valor de concordancia de 0.2763 con relación al cultivo (126). En la búsqueda de antígenos más sensibles se han probado diferentes candidatos, entre los que podemos encontrar a las proteínas constitutivas AhpC y AhpD, la secretada de 14 kDa, proteínas de choque térmico y proteína de 35 kDa (127,128,129,) que son proteínas de secreción o proteínas inmunogénicas de *Map*, las cuales se ha reportado que estimulan mejor al sistema inmune de animales infectados y por lo tanto, serían de gran interés en el mejoramiento de técnicas diagnósticas basadas en serología (130). Con base en este trabajo se pueden realizar estudios futuros en los que se trabaje con proteínas de secreción de *Maa* para la elaboración de nuevos antígenos que mejoren la sensibilidad de la prueba. Existen estudios que determinan la existencia de proteínas antigénicas, como las proteínas de choque térmico GroES, que presenta un 100% de identidad con *Map* en su secuencia codificante y GroEL que además de ser una proteína de choque térmico, tiene importancia en la estimulación de la respuestas inmune celular y humoral contra las micobacterias; presenta una homología del 98.8% con *Map* y de 89.6% con *M. tuberculosis*, situación que limita el uso de esa proteína por las reacciones cruzadas que existen entre *Map* y el bacilo causante de tuberculosis (131,132). Otra de las limitantes por la cual no se lleva a cabo el diagnóstico de la PTB en el ganado en México, es por la baja disponibilidad de antígenos y kits comerciales

costosos, cuyo tiempo de entrega es demasiado largo al ser productos importados. Por esta razón, es importante el realizar estudios con antígenos disponibles en el país, que sean evaluados como candidatos para la realización del diagnóstico de la enfermedad sin dependencia del extranjero, así como la disminución en los costos de producción y precio de venta. La paratuberculosis es una enfermedad que causa grandes pérdidas económicas en la ganadería, por lo que, se requieren de pruebas diagnósticas sensibles, específicas, rápidas, económicas y altamente disponibles. Además, se hace indispensable que estas técnicas diagnósticas sean de fácil implementación en los laboratorios, y que puedan ser utilizadas para desarrollar estudios de tipo epidemiológico sobre la enfermedad en diversas especies de animales domésticos y silvestres, para poder determinar las medidas necesarias para su control. Los resultados obtenidos en el presente estudio, permiten recomendar el uso de ELISA con el antígeno filtrado de *Maa* como una alternativa para el diagnóstico de la paratuberculosis en pequeños rumiantes domésticos y se sugiere como prueba tamiz en hatos donde se desconozca la situación de la enfermedad. Según la OMS, una prueba tamiz se define como el uso de una prueba sencilla en una población saludable, para identificar a aquellos individuos que tienen alguna patología, pero que todavía no presentan signos. El objetivo de una prueba tamiz no es realizar un diagnóstico exacto, sino solamente identificar a los individuos o grupos que tengan una alta probabilidad de estar enfermos. A pesar de que ELISA no sea capaz de detectar a todos los animales infectados, nos muestra la magnitud de la enfermedad en un hato o rebaño, pudiendo implementar programas de control mediante la

eliminación o segregación de los casos positivos y confirmarlos mediante otras pruebas y reducir la exposición de los animales jóvenes que son los más susceptibles a infectarse con *Map*. También es necesario considerar que el diagnóstico de la enfermedad se debe llevar a cabo con una prueba serológica y en conjunto con pruebas confirmatorias como lo son el cultivo o la PCR. Sin embargo por la automatización, el menor tiempo de entrega de resultados y los precios competitivos que la PCR presenta sobre el cultivo, en la actualidad se ha convertido en la técnica diagnóstica más utilizada para confirmar casos de paratuberculosis en rumiantes domésticos, apoyándose en técnicas discriminatorias, rápidas y de menor costo como ELISA.

## CONCLUSIONES

1. La concentración del antígeno de *Mycobacterium avium* subsp. *avium* que se determinó fue de 0.3 mg/ml con un punto de corte de 0.90 D.O utilizando el protocolo de ELISA realizado en este trabajo.
2. La alta correlación ( $r= 0.78$ ) y buena concordancia ( $K=0.83$ ) que presenta la prueba de ELISA utilizando el antígeno de *Mycobacterium avium* subsp, *avium* en relación con el antígeno comercial PPA-3, así como el alto grado de homología genética entre ambas subespecies de cada antígeno, permiten recomendar el uso del antígeno propuesto en la prueba de ELISA como alternativa para el diagnóstico de paratuberculosis en pequeños rumiantes, considerando su uso como prueba tamiz.

## ANEXO 1

### Reactivos empleados en la realización de la técnica de ELISA

-Solución amortiguadora de carbonato

|   |         |
|---|---------|
| Carbonato de Sodio (Merck, Darmsdat, Germany) | 5.3 g   |
| Agua destilada                                | 1000 ml |

Ajustar el pH a 9.6

-Suspensión de *M. phlei*

|                                 |         |
|---------------------------------|---------|
| <i>M. phlei</i>                 | 5 g     |
| Solucion salina (NaCl al 0.85%) | 1000 ml |

-Amortiguador citrato 0.05 M

|   |         |
|---|---------|
| Solución A: Ácido cítrico monohidratado | 22.97 g |
| Agua destilada                          | 1000 ml |
| Solución B: Citrato sódico tribásico    | 29.4 g  |
| Agua destilada                          | 1000 ml |

Mezclar 600 ml de Solución A + 479 ml de Solución B, agregando agua destilada c.b.p. 2 L.

Ajustar el pH a 4 al momento de utilizarlo

-Antígeno

|                                     |            |
|-------------------------------------|------------|
| Antígeno PPA-3 (Lab. Allied)        | 0.04 mg/ml |
| Antigeno de Maa. (PRONAVIBE)        | 2mg/ml     |
| Solución amortiguadora de carbonato | 1 ml       |

-PBS-TG (Phosphate buffered saline- Tween gelatine)

|   |          |
|---|----------|
| NaCl  | 8 g      |
| KCl   | 0.2 g    |
| Fosfato dibásico de sodio (Golden Bell. Mexico.México)    | 1.44 g   |
| Fosfato monobásico de Potasio (Baker. Edo de Méx, México) | 0.24 g   |
| Agua destilada  | c.b.p.1L |

Ajustar el pH a 7.4

|                                       |       |
|---------------------------------------|-------|
| Tween 80 (Merck. Hohenbrunn,Germany ) | 0.5ml |
|---------------------------------------|-------|

Esterilizar en autoclave a 125°C/25 minutos

|                           |     |
|---------------------------|-----|
| Gelatina (Bloxon. México) | 1 g |
|---------------------------|-----|

-Sustrato ABTS

|                       |         |
|-----------------------|---------|
| ABTS (Sigma, Mo. USA) | 5.48 mg |
|-----------------------|---------|

|                     |       |
|---------------------|-------|
| Amortiguadorcitrato | 50 ml |
|---------------------|-------|

Añadir 19 µl de la solución : 1:25 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ( 10 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de 30% v/v en 120 µl de agua destilada)



## ANEXO 2

### Lista de abreviaturas

ABTS: 2-2' azino-di-(3-etilbenzothiazol- sulfona-6) – (diamonio)

Ag-Ac: antígeno-anticuerpo

CEIEPAA: centro de enseñanza, investigación y extensión en producción animal en altiplano

D.O.: densidad óptica

Di-CL: diagnóstico clínico

Di-PC: diagnóstico por punto de corte

ELISA: Ensayo de inmunoadsorción ligado a enzimas

E.U.A.: Estados unidos de América

FAP: proteína de acoplamiento de fibronectina

FC: fijación del complemento

g: gramos

GM-CSF: factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos

h: hora

H-E: tinción hematoxilina-eosina

IDGA: Inmunodifusión en gel de agar

IF  $\gamma$ : interferón gamma

IL-1: interleucina-1

IL-2: interleucina-2

IL-4: interleucina-4

IL-5: interleucina-5

IL-6: interleucina- 6

IL-10: interleucina-1

K: kappa

kDa: kilodalton

Km: kilómetro

L: litro

LAM: lipoarabinomanano

LB: linfocitos B

LT: linfocitos T

M: molar

*Maa: Mycobacterium avium subsp avium*

MAC: *Mycobacterium avium-intracelulare*

Map: *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis*

*Mas: .Mycobacterium avium subsp. silvaticum*

mg: miligramo

ml: mililitro

µl: microlitro

*M. phlei: Mycobacterium phlei*

nm: nanómetro

OMS: organización mundial de la salud

ORF's: marcos de lectura abierta

PPA-3: proteína protoplásmica cepa 18 de *M. avium subsp. paratuberculosis*

PBS-TG: amortiguador fosfato salino- tween gelatina

PC: punto de corte

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

PRONVIBE: productora nacional de biológicos veterinarios

PTB: paratuberculosis

Qro: Querétaro

r: correlación

SIDA: síndrome de inmunodeficiencia adquirida

t.a: temperatura ambiente

Th1: linfocitos cooperadores tipo 1

Th2: linfocitos cooperadores tipo 2

TNF- $\alpha$ : factor de necrosis tumoral

USEDICO: unidad de servicios de diagnóstico y constatación

°C: grados Celsius

$\geq$ : mayor que, igual que

## REFERENCIAS

1. Shinnick, TM., Good, RC. Mycobacterial taxonomy. *Eur J Clin.Microbiol Infect Dis* 1994 ;(13): 884-901.
2. Pinedo PJ, Rae DO, Williams JE, Donovan GA, Melendez P,Buergelt CD. Association among results of serum ELISA, faecal culture and nested PCR on milk, blood and faeces for the detection of paratuberculosis in dairy cows. *Transbound Emerg Disesease* 2008; 50: 125-133.
3. Nigou J; Gilleron M; Puzo G. Lipoarabinomannans: from structure to biosynthesis. *Biochimie* 2003; 85(1-2): 153-166.
4. Daffé M y Reyrat, JM. The mycobacterial cell envelope. *American Society for Microbiology*. 2008.
5. Beran M, Havelkova J, Kaustova L, Dvorska I. Cell wall deficient forms of mycobacteria: a review. *Vet Med*, 2006; 51(7): 365–389.
6. Schwartz BD, De Voss JJ. Structure and absolute configuration of mycobactin J .*Tetrahedron Letters* 2001; 42: 3653-3655.
7. Juste RA, Aduriz G, Bascones M, Foley E, Bargar TW y Barletta RG . Effect of iron on mycobactin production and dependence in Mycobacteria. *Proc.74th Annu.Meet.CRWAD*. Chicago, IL, USA 1993; 63.

8. Ratledge C. 1982. Nutrition, Growth and Metabolism. En: Ratledge, C. y Stanford, J. editores. Physiology, Identification and Classification. The Biology of the Mycobacteria.. Academic Press. London 1982; 185-271.
9. Thorel MF, Krichevsky MI y Levy-Frebault VV. Numerical taxonomy of mycobactin-dependent mycobacteria, emended description of *Mycobacterium avium*, and description of *Mycobacterium avium* subsp. *avium* subsp. nov., *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* subsp. nov., and *Mycobacterium avium* subsp. *silvaticum* subsp. nov. Int.J.Syst.Bacteriol 1990; 40(3):254-260.
10. Hurley SS, Splitter GA, Welch RA Development of a diagnostic test for Johne's disease using a DNA hybridization probe. J. Clin. Microbiol 1989; 27:1582-1587
11. Bannantine, JP, Baechler E, Zhang Q, Li L, Kapur V. Genome scale comparison of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* with *Mycobacterium avium* subsp. *avium* reveals potential diagnostic sequences. J. Clin. Microbiol 2002; 40:1303-1310.
12. Bannantine JP; Zhang Q, Li LL, Kapur V. Genomic homogeneity between *Mycobacterium avium* subsp. *avium* and *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* belies their divergent growth rates. BMC Microbiol. 2003; 3:10
13. Goodfellow M y Magee JG. Taxonomy of mycobacteria. En: Gangadharam, P.R. y Jenkin, P. A. editores. Mycobacteria I: basic aspect. International Thomson Publishing. New York 1998; 1-71.

14. Whittington RJ, Marshall DJ, Nicholls PJ, Marsh IB, Reddacliff LA. Survival and dormancy of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in the environment. *Appl Environ Microbiol.* 2004; 70: 2989-3004.
15. Whittington RJ, Marsh IB y Reddacliff LA. Survival of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in dam water and sediment. *Appl. Environ. Microbiol.* 2005; 71(9):5304-5308.
16. Mura M, Bull TJ, Evans H, Sidi-Boumedine K, McMinn L, Rhodes G, Pickup R y Hermon-Taylor J. Replication and longterm persistence of bovine and human strains of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* within *Acanthamoeba polyphaga*. *Appl. Environ. Microbiol* 2006; 72(1):854-859.
17. Grant IR, Ball HJ y Rowe MT. Incidence of *Mycobacterium paratuberculosis* in bulk raw and commercially pasteurized cows' milk from approved dairy processing establishments in the United Kingdom. *Appl. Environ. Microbiol* 2002; 68(5):2428-2435.
18. Koets AP, Adugna G, Janss LL, van Weering HJ, Kalis CH, Wentink GH, Rutten VP y Schukken YH. Genetic variation of susceptibility to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 2000; 83(11):2702-2708.
19. Clarke CJ.; Colston, A, Little D.; Kay J, Alzuherri H; Sharp M. and Burrells C. The immune response in paratuberculosis infection of small ruminants. *Vet Immunol-Immunopathology* 1996; 54: 321.

20. Chávez GG. Control de paratuberculosis en ovinos y caprinos .En línea (consultado el 14 de abril de 2012) [www.conasamexico.org/mesa4Introduccion](http://www.conasamexico.org/mesa4Introduccion).
21. Manning EJ, Collins MT. *Mycobacterium avium* subsp.*paratuberculosis*: pathogen, pathogenesis and diagnosis. Rev. Sci. Tech. 2001; 20 (1): 133-50.
22. Momotani E, Whipple DL, Thiermann AB y Cheville NF. Role of M cells and macrophagos in the entrance of *Mycobacterium paratuberculosis* into domes of ileal Peyer's patches in calves. Vet.Pathol.1988; 25:131-137
23. García Marín JF, Benazzi S, Pérez V y Badiola JJ. Study of the entrance of *M. paratuberculosis* in the lamb intestinal mucosa using immunohistochemical methods for antigen detection. En: Chiodini y Kreeger editores. Proc. 3rd Int.Coll.Paratub.. AP, Providence, RI, USA 1992; 371-377.
24. Bannantine JP, Huntley JF, Miltner E, Stabel JR y Bermudez LE. The *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* 35 kDa protein plays a role in invasion of bovine epithelial cells. Microbiology 2003; 149(Pt 8):2061-2069.
25. Secott TE, Lin TL y Wu CC. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* fibronectin attachment protein facilitates M-cell targeting and invasion through a fibronectin bridge with host integrins. Infect.Immun. 2004; 72(7):3724-3732.
26. Tessema MZ, Koets AP, Rutten VP y Gruys E. How does *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* resist intracellular degradation? Vet.Q.2001; 23(4):153-162.

27. Tizard IR, Introducción a la inmunología Veterinaria. Elsevier 8ª ed. España 2009; 243:290-291:513-515.
28. Bannantine JP y Stabel JR. Killing of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* within macrophages. BMC Microbiol. 2002;2:2.
29. Weiss DJ, Evanson OA, Deng M y Abrahamsen MS. Gene expression and antimicrobial activity of bovine macrophages in response to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. Vet.Pathol. 2004; 41(4):326-337.
30. Paolicchi F, Romano MI. Paratuberculosis. Consultado el 13 de mayo de 2012. [http://www.vet.unicen.edu.ar/html/Areas/Prod\\_Animal/Documentos/2012/Sanidad%20Ganadera/2\\_42\\_ParaTBC%20ultima%20version.pdf](http://www.vet.unicen.edu.ar/html/Areas/Prod_Animal/Documentos/2012/Sanidad%20Ganadera/2_42_ParaTBC%20ultima%20version.pdf).
31. Kaufmann SH. How can immunology contribute to the control of tuberculosis? Nat.Rev.Immunol. 2001 1(1):20-30.
32. Lambeth C, Reddacliff LA, Windsor P, Abbott KA, McGregor H y Whittington RJ. Intrauterine and transmammary transmission of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in sheep. Aust.Vet.J.2004; 82(8):504-508.
33. Chiodini RJ y Davis W. The cellular immunology of bovine paratuberculosis: the predominant response is mediated by cytotoxic gamma/delta T lymphocytes which prevent CD4+ activity. Microb.Pathog. 1992;13:447-463.
34. Zur LS, Goethe R, Darji A, Valentin-Weigand P y Weiss S. Activation of macrophages and interference with CD4+ T-cell stimulation by *Mycobacterium*



*avium* subspecies *paratuberculosis* and *Mycobacterium avium* subspecies *avium*.  
Immunology 2003;108(1):62-9.

35. Saunders BM, Cooper, AM. Restraining mycobacteria: role of granulomas in mycobacterial infections. Immunol. Cell Biol. 2000; 78: 334-341.

36. Ellner, JJ, Wallis, RS. Immunologic aspects of mycobacterial infections. Rev. Infect. Dis. 1989;11: 455-459.

37. Bernardelli A, Cicuta ME, Nicola A, Roibón WR, Boehringer SI, Benítez MC, Barceló MC, *et al.* Paratuberculosis ovina en Corrientes, Argentina. Rev Sci Tech Off Int Epiz 2000;19(3):800- 809.

38. García Marín JF, Pérez V, García de Jalón JA, De las Heras M, Barberá M, Fernández de Luco D y Badiola JJ. 1994. Diagnóstico de casos clínicos de paratuberculosis ovina y caprina. Med.Vet., 1994; 11(9):491-502

39. Allen WM, Patterson DS y Slater TF. 1974b. A biochemical study of experimental Johne's disease. I. Protein metabolism in sheep and mice. J.Comp.Pathol. 1974; 84:391-398..

40. Beutler, B, Cerami, A. The biology of cachectin/TNF- a primary mediator of the host response. Annu. Rev. Immunol. 1989; 7, 625-655.

41. Clarke CJ. The pathology and pathogenesis of paratuberculosis in ruminants and other species. J.Comp.Pathol. 1997;116:217-261.

42. Pérez V, Corpa JM, García Marín JF. El cuadro clínico y lesional de la paratuberculosis bovina. *Bovis* 93, 2000, 39-47.
43. Committee on Diagnosis and Control of Johne's Disease, and Board on Agriculture and Natural Resources. *Diagnosis and control of Johne's disease* Washington, D.C, The National Academies Press ,2003.
44. De Juan FL. Paratuberculosis caprina: aportaciones a su diagnóstico, epidemiología molecular y control (tesis de doctorado). Madrid España : Universidad Complutense de Madrid, 2005.
45. Clarke CJ y Little D. The pathology of ovine paratuberculosis: gross and histological changes in the intestine and other tissues. *J. Comp .Pathol.* 1996; 114(4):419-437.
46. Jubb KVF, Kennedy PC y Palmer N.. Mycobacterial enteritis. En: Jubb, K. V. F., Kennedy, P. C. y Palmer, N. editores. *Pathology of Domestic Animals.* Academic Press Inc. London, UK 1985; 155-159.
47. González J. Caracterización lesional y evaluación de técnicas diagnósticas de la paratuberculosis bovina. (tesis de doctorado).Universidad de León, Castilla y León, España. 2003.
48. Corpa JM, Garrido JM, García Marín JF y Pérez V. Classification of lesions observed in natural cases of paratuberculosis in goats. *J.Comp.Pathol.* 2000; 122(4):255-265.

49. Stevenson K., Hughes, VM., De Juan L., Inglis N.F, Wright, F, Sharp JM. Molecular characterization of pigmented and nonpigmented isolates of *Mycobacterium avium* subsp.*paratuberculosis*. J. Clin. Microbiol.2002; 40:1798-1804.
50. Mahmoud, OM, Haroun EM., Elfaki MG, Abbas, B. Pigmented paratuberculosis granulomata in the liver of sheep. Small Rum. Res. 2002; 43:211-217.
51. González J, Geijo MV, García-Pariente C, Verna A, Corpa JM, Reyes LE, Ferreras MC, Juste RA, Garcia-Marin JF y Pérez V. Histopathological classification of lesions associated with natural paratuberculosis infection in cattle. J.Comp.Pathol. 2005; 133(2-3):184-196.
52. Pérez V, García Marín JF y Badiola JJ. Description and classification of different types of lesion associated with natural paratuberculosis infection in sheep. J.Comp.Pathol. 1996; 114(2):107-122.
53. Pierce ES. Where are all the *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in patients with Crohn's disease? PLoS Pathog 2009; 5 (3): e1000234.
54. Machackova M, Svastova P, Lamka J, Parmova I, Liska V, Smolik J, Fischer OA y Pavlik I. Paratuberculosis in farmed and free-living wild ruminants in the Czech Republic (1999-2001). Vet.Microbiol 2004;101(4):225-234.

55. Ellingson JL, Stabel JR, Radcliff RP, Whitlock RH y Miller JM. Detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in free-ranging bison (*Bison bison*) by PCR. *Mol.Cell.Probes* 2005; 19(3):219-225.
56. Sivakumar P, Tripathi BN y Singh N. Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in intestinal and lymph node tissues of water buffaloes (*Bubalus bubalis*) by PCR and bacterial culture. *Vet.Microbiol* 2005; 108(3-4):263-270.
57. Deutz A, Spargser J, Wagner P, Rosengarten R y Kofer J. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in wild animal species and cattle in Styria/Austria. *Berl.Munch.Tierarztl.Wochenschr* 2005; 118(7-8):314-320.
58. Lucas JN, Cousins DV, Mills AJ y Van Wijk JG. Identification of *Mycobacterium avium* subsp. *avium* in an alpaca with lesions resembling paratuberculosis. *Aust.Vet.J.* 2003; 81(9):567-569.
59. Motiwala AS, Amonsin A, Strother M, Manning EJ, Kapur V y Sreevatsan S. Molecular epidemiology of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolates recovered from wild animal species. *J.Clin.Microbiol.* 2004;42(4):1703-1712.
60. Stevenson, K, Álvarez J, Bakker D, Biet, de Juan L, Denham S. Occurrence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* across host species and European countries with evidence for transmission between wildlife and domestic ruminants. *BMC Microbiol.* 2009; 9: 212

61. Kopečna M, Ondrus S, Literak I, Klimes, J, Horvathova A, Moravkova M. Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in two brown bears in the central European Carpathians. *J Wildl Dis.* 2006; 42: 691-695.
62. Mura M, Bull TJ, Evans H, Sidi-Boumedine K, McMinn L, Rhodes G, Pickup R y Hermon-Taylor J. Replication and longterm persistence of bovine and human strains of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* within *Acanthamoeba polyphaga*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2006; 72(1):854-859.
63. Danelishvili L, Wu M, Stang B, Harriff M, Cirillo SL, Cirillo JD. Identification of *Mycobacterium avium* pathogenicity Island important for macrophage and amoeba infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104 (26): 11038-11043.
64. Sweeney RW. Transmission of paratuberculosis. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 1996; 12(2):305-312.
65. Glawischnig W, Awad-Masalmeh M, Khaschabi D y Schonbauer M. 2004. Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from the testicles of a clinically infected breeding animal. *Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr.*, 2004; 117(3-4):136-139.
66. Kennedy DJ, Benedictus G. Control of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in agricultural species. *Rev. Sci. Tech* 2001; 20: 151-179.

67. Paolicchi F. Paratuberculosis: Métodos de diagnóstico y control. Implicación Zoonótica con la Enfermedad de Crohn. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria 2009; 1-8.
68. Sevilla IA .Caracterización molecular, detección y resistencia de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. (tesis doctoral) . España Universidad del país Vasco 2007.
69. Santillán FMA, Córdova LD, Guzmán RC, Hernández CA, Jaimes MN. Situación epidemiológica de la paratuberculosis ovina en el estado de Guanajuato. Resultados Preliminares.. Congreso Nacional de Buiatría, 2006.
70. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Agropecuarias (INIFAP), Córdova López Dionicio, Folleto técnico Tuberculosis y Paratuberculosis en el Edo. de Guanajuato, 2006.
71. Fondo Mixto para la Investigación Científica y Tecnológica- CONACYT- Gobierno del Estado de San Luis Potosí (FMSLP -2005-C01-19) Memoria técnica del proyecto "Epidemiología y factores de riesgo asociados a aborto. San Luis Potosí ,2005.
72. Chávez GG. Taller de planeación enfocado a la atención de la paratuberculosis en México. Tequisquiapan, Querétaro 2009.
73. OIE. Manual de test diagnósticos y vacunas para animales terrestres, 6ª Edición. *Organización Internacional de Epizootias* (OIE) 2008; 1-9.

74. Zimmer K, Drager KG, Klawonn W., Hess RG. Contribution to the diagnosis of Johne's disease in cattle. Comparative studies on the validity of Ziehl-Neelsen staining, faecal culture and a commercially available DNA-Probe test in detecting *Mycobacterium paratuberculosis* in faeces from cattle. Zentralbl Veterinarmed 1999; 46, 137-140.

75. González J, Geijo MV, García-Pariente C, Verna A, Corpa JM, Reyes LE, Ferreras MC, Juste RA, Garcia-Marin JF y Pérez V. Histopathological classification of lesions associated with natural paratuberculosis infection in cattle. J.Comp.Pathol. 2005; 133(2-3):184-196.

76. Garrido JM, Aduriz G, Juste RA y Geijo MV. Los métodos de diagnóstico de la paratuberculosis en el ganado vacuno. En: Juste editor. Paratuberculosis. Bovis, Aula Veterinaria, Vol.93, Luzan 5, Madrid, España 2000; 49-61.

77. Castellanos ER, Caracterización molecular de aislados de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. Mapa epidemiológico de España (tesis de doctorado). Madrid España : Universidad Complutense de Madrid, 2010.

78. Mathews CK; Van Holde KE et Ahern, KG. *Bioquímica*. 3a. ed.2003;.204.

79. Bull TJ, Hermon-Taylor J, Pavlik I, El Zaatari F y Tizard M. Characterization of IS900 loci in *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and development of multiplex PCR typing. Microbiology 2000;146:2185-97.

80. Kalis CH, Collins MT, Hesselink JW. Y Barkema HW. 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. *Vet. Microbiol.* 2003; 97(1–2):73–86.

81. Robbe-Austerman S, Stabel JR y Palmer MV. Evaluation of the gamma interferon ELISA in sheep subclinically infected with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* using a whole-cell sonicate or a johnin purified-protein derivative. *J.Vet.Diagn.Invest.* 2006; 18(2):189-94.

82. González J. Caracterización lesional y evaluación de técnicas diagnósticas de la paratuberculosis bovina. (tesis de doctorado).Universidad de León, Castilla y León, España. 2003.

83. Huda A, Jungersen G, Christoffersen AB y Lind P. Diagnosis of bovine paratuberculosis by interferon-gamma (IFN-gamma) test. *Acta Vet.Scand.*2003;(44):281.

84. FMVZ-UNAM. Manual de prácticas. Practicas de Inmunología. 2ª. Ed. México D.F. 2007; 106-108.

85. García Marín JF, Tellechea J, Corpa JM, Gutiérrez M y Pérez V. Relation between ovine paratuberculosis lesions and cellular and humoral immune responses in diagnostic tests. En: Manning y Collins editores. Proc.6th Int.Coll.Paratub. IAP Madison, WI, USA1999; 593-598.

86. Sockett DC, Conrad TA, Thomas CB, Collins MT. Evaluation of four serological tests for bovine paratuberculosis. *J. Clin. Microbiol.*, 1992; 30, 1134- 1139.



87. Yokomizo Y, Merkal RS y Lyle PAS. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of bovine immunoglobulin G antibody to a protoplasmic antigen of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Am. J. Vet. Res.* 1983; 44:2205–2207.
88. Yokomizo Y, Yugi H, Merkal RS. A method for avoiding false-positive reactions in an enzymelinked immunosorbent assay (ELISA) for the diagnosis of bovine paratuberculosis. *Nippon Juigaku. Zasshi* 1985; 47, 111-119.
89. Collins MT, Wells SJ, Petrini KR, Collins JE, Schultz RD y Whitlock RH. Evaluation of five antibody detection tests for diagnosis of bovine paratuberculosis. *Clin.Diagn.Lab.Immunol.* 2005; 12(6):685-592.
90. McKenna SL, Keefe GP, Barkema HW y Sockett DC .Evaluation of three ELISAs for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* using tissue and fecal culture as comparison standards. *Vet.Microbiol.* 2005; 110(1-2):105-111.
91. Soto JP, Kruze J, Leiva S, Comparación de tres métodos de diagnóstico de Paratuberculosis bovina en rebaños lecheros infectados. *Arch. Med. Vet.* , 2002; 34(2):1-10.
92. Whittington RJ, Fell S, Walker D., McAllister S, Marsh I, Sergeant E, Taragel CA, Marshall DJ, Links IJ. Use of pooled fecal culture for sensitive and economic detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in flocks of sheep. *J. Clin. Microbiol.* 2000; 38:2550-2556.

93. Jayarao BM, Pillai SR, Wolfgang DR, Griswold DR, Rossiter CA, Tewari D, Burns CM y Hutchinson LJ. Evaluation of IS900-PCR assay for detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection in cattle using quarter milk and bulk tank milk samples. *Foodborne.Pathog.Dis*, 2004;1(1):17-26.
94. Gwozdz JM, Reichel MP, Murray C, Manktelow W, West DM y Thompson KG. Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in ovine tissues and blood by the polymerase chain reaction. *Vet.Microbiol.* 1997; 51:233-44.
95. Clark Jr. DR, Koziczowski JJ, Radcliff RP, Carlson RA and . Ellingson JLE. Detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*: comparing fecal culture versus serum enzyme-linked immunosorbent assay and direct fecal polymerase chain reaction. *J. Dairy Sci.* 2008; 91:2620–2627
96. Juste, R.A., Adúriz, J.J. Diagnóstico. Paratuberculosis Ovina. *Ovis*, 1990. 7, 49-62.
97. Nielsen SS, Nielsen KK, Huda A, Condrón R, Collins MT. Diagnostic techniques for paratuberculosis. *Bulletin of the international dairy federation. IDF*, 2001.
98. Pérez V, Tellechea J, Badiola JJ, Gutiérrez M, García Marín JF. Relation between serologic response and pathologic findings in sheep with naturally acquired paratuberculosis. *Am. J. Vet. Res.* 1997; 58: 799-803.
99. Nielsen SS, Houe H, Thamsborg SM y Bitsch V. Comparison of two enzyme-linked immunosorbent assays for serologic diagnosis of paratuberculosis (Johne's

disease) in cattle using different subspecies strains of *Mycobacterium avium*. J.Vet. Diagn. Invest. 2001; 13(2):164-166.

100. Whitlock RH, Wells SJ, Sweeney RH, VAN TIEM. J. ELISA and fecal culture for paratuberculosis (Johne's disease): sensitivity and specificity of each method. Vet. Microbiol., 2000; 77: 387-398.

101. Beyerbach M, Ortmann G, Gerlach GF, Homuth M, Strutzberg K y Kreienbrock L. Considerations concerning diagnostic certainties and cut-off values for a bulk milk ELISA for *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*. Dtsch.Tierarztl.Wochenschr. 2004; 111(5):220-225.

102. Lombard JE, Byrem TM, Wagner BA y McCluskey BJ. Comparison of milk and serum enzyme-linked immunosorbent assays for diagnosis of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection in dairy cattle. J.Vet.Diagn.Invest.. 2006; 18(5):448-458.

103. Hendrick SH, Duffield TE, Kelton DE, Leslie KE, Lissemore KD y Archambault M. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays performed on milk and serum samples for detection of paratuberculosis in lactating dairy cows. J.Am.Vet.Med.Assoc. 2005; 226(3):424-428.

104. Kudahl A, Nielsen SS y Sorensen JT. Relationship between antibodies against *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* in milk and shape of lactation curves. Prev.Vet.Med. 2004; 62(2):119-134.

105. Harris NB y Barletta RG. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in veterinary medicine. Clin.Microbiol.Rev. 2001;14 (3):489-512.
106. St Jean G. Treatment of clinical paratuberculosis in cattle. Vet. Clin. North Am, Food Anim. Pract.1996; 12, 417-430.
107. Hendrick SH, Kelton DF, Leslie KE, Lissemore KD, Archambault M, Bagg R, Dick P y Duffield TF. Efficacy of monensinsodium for the reduction of fecal shedding of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in infected dairy cattle. Prev.Vet.Med., 2006; 75(3-4):206-220.
108. Juste RA y Aduriz JJ. Diagnóstico. En: Juste editor.Paratuberculosis. Ovis, Aula Veterinaria Luzán 5, Madrid,España.1990; 49-62.
109. Aduriz G, Juste RA, Garrido JM y Geijo MV. Epidemiología y control de la paratuberculosis bovina. En: Juste editor. Paratuberculosis. Bovis, Aula Veterinaria, Luzan 5, Madrid, España, 2000; 93: 63-93.
110. Carpenter T, Gardner IA, Collins MT y Whitlock RH. Effects of prevalence and testing by enzyme-linked immunosorbent assay and fecal culture on the risk of introduction of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*-infected cows into dairy herds. J. Vet. Diagn. Invest., 2004; 16(1):31-38.
111. Groenendaal H, Nielen M y Hesselink JW.Development of the Dutch Johne's disease control program supported by a simulation model. Prev. Vet. Med., 2003; 60(1):69-90.

112. Pérez V, Verna A, Muñoz M, García-Pariente C, Benavides J, Ferreras MC y García Marín JF. Immunohistochemical detection of TGF- $\beta$  in paratuberculosis granulomatous lesions. En: Manning y Nielsen editores. Proc.8th Int. Coll. Paratub., AP, Madison, WI, USA., 2006; 122-6.

113, García-Pariente C, González J, Ferreras MC, Fuertes M, Benavides J, Reyes LE, Moreno O, García Marín JF y Pérez V. Paratuberculosis vaccination of adult animals in two flocks of dairy sheep. En: Juste, Geijo, y Garrido editores. Proc.7<sup>th</sup> Int.Coll.Paratub., IAP, Madison, WI, USA, 2003; 507-510.

114. García-Pariente C, Pérez V, Geijo MV, Moreno O, Muñoz M, Fuertes M, Puentes E, Doce J, Ferreras MC García Marín JF. The efficacy of a killed vaccine against paratuberculosis (SILIRUM®) in cattle. A field study. En: Manning y Nienseneditores. Proc.8th Int.Coll.Paratub.,. IAP, Madison, WI, USA,, 2006; 260.

115. Reddacliff L, Eppleston J, Windsor P, Whittington R y Jones S. Efficacy of a killed vaccine for the control of paratuberculosis in Australian sheep flocks. Vet.Microbiol., 2006; 115(1-3):77-90.

116. Garrido, J.M., Aduríz, G., Garcia, M. J., Pérez, V., Chávez, G. Juste, R. A. Mejora del ELISA indirecto para el diagnóstico de la paratuberculosis ovina. Produccion Ovina y Caprina XXIII, 198: 287-290

117. Peláez MI. Medidas de asociación. En: Rev. Métodos Estadísticos de enfermería Nefrológica .(Sociedad Española de Enfermería Nefrológica). España, 2006 ; (13) 185-194.
118. Tarabla H. Epidemiología Diagnóstica. Edit. Centro de Publicaciones, Secretaría de Extensión. Universidad Nacional del Litoral, Santa Fé, Argentina, 2000.
119. Cortés RE, Rubio RJ, Gaitán DH. Métodos Estadísticos de Evaluación de la concordancia y la reproducción de pruebas diagnósticas. Rev. Colomb. de Obst.y Ginecol, 2010: 61(3) 247-255.
120. Fernández SP, Pértega DS. Relación entre variables cuantitativas Unidad de Epidem. Clin. y Bioest.. Complex. Hospit Juan Carlos Canalejo. Cad. Aten. Primaria. Coruña, 2001; 4:141-144.
121. Paustian ML, Kapur V y Bannantine JP. Comparative genomic hybridizations reveal genetic regions within the *Mycobacterium avium* complex that are divergent from *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolates. J.Bacteriol., 2005; 187(7):2406-2415.
122. Chiodini RJ. Abolish *Mycobacterium paratuberculosis* strain 18. J Clin Microbiol. 1993; 31:1956–1958.
123. Nielsen SS, Houe H, Thamsborg SM y Bitsch V. Comparison of two enzyme-linked immunosorbent assays for serologic diagnosis of paratuberculosis (Johne's

disease) in cattle using different subspecies strains of *Mycobacterium avium*. J.Vet.Diagn.Invest. 2001; 13(2):164-6.

124. . Sweeney RW, Whitlock RH, Buckley CL y Spencer PA. Evaluation of a commercial enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of paratuberculosis in dairy cattle. J.Vet.Diagn.Invest. 1995; 7(4):488-93.

125. Speer CA, Scott MC, Bannantine JP, Waters WR, Mori Y, Whitlock RH y Eda S. A novel enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infections (Johne's Disease) in cattle. Clin.Vaccine Immunol. 2006; 13(5):535-40.

126. Martínez Covarrubias AG, Santillán Flores MA, Guzmán Ruiz CC, Favila Humara LC, Córdova López D, Díaz Aparicio E, Hernández Andrade L, Blanco Ochoa MA. Desarrollo de un inmuno-ensayo enzimático (ELISA) para el diagnóstico de paratuberculosis en bovinos. Rev. Mex. Cienc. Pecu. 2012; 3(1):1-18

127. Olsen I, Tryland M, Wiker HG, Reitan LJ. AhpC, AhpD, and a secreted 14-kilodalton antigen from *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* distinguish between paratuberculosis and bovine tuberculosis in an Enzyme –Linked Immunosorbent Assay. Clin. Diagn. Lab. Immunol.. 2001; 8: 797-801.

128. Koets AP, Rutten VP, de Boer M, Bakker D, Valentin-Weigand P y van Eden W. Differential changes in heat shock protein-, lipoarabinomannan-, and purified

protein derivative-specific immunoglobulin G1 and G2 isotype responses during bovine *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection. *Infect.Immun.* 2001; 69(3):1492-8.

129. Shin SJ, Yoo HS, McDonough SP y Chang YF. Comparative antibody response of five recombinant antigens in related to bacterial shedding levels and development of serological diagnosis based on 35 kDa antigen for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *J.Vet.Sci.* 2004 5(2):111-7.

130 Willemsen PT., Westerveen J, Dinkla A, Bakker D, Van Zijderveld FG, Thole JE(2006). Secreted antigens of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* as prominent immune targets. *Vet. Microbiol.* 2006; 114, 337-344.

131. Cobb AJ, Frothingham R. (1999). The GroEs antigens in *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium paratuberculosis*. *Vet. Microbiol.* 1999; 67, 31-35.

132. El-Zaatari FAK., Naser SA, Engstrand L, Burch PE, Hachem CY, Whipple D.L.,Graham D.Y. Nucleotide sequence analysis and seroreactivities of the 65K heat shock protein from *Mycobacterium paratuberculosis*. *Clin. Diagn. Lab.Immunol.* 1995; 2:657-664.