



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO.

MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA
PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

DETERMINACIÓN DE LA EXCRECIÓN DE *Mycobacterium avium*
paratuberculosis A PARTIR DE HECES DE BOVINO, EMPLEANDO PCR EN
TIEMPO REAL.

TESIS
PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS
PRESENTA

Adriana Guadalupe Martínez Covarrubias

Tutor interno:

Beatriz Arellano Reynoso

Comité Tutorial:

Marco Antonio Santillán Flores

Gabriela Bárcenas Morales



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

**“Cuando un hombre se apiade de todas las criaturas vivientes,
solo entonces será noble”**

Buda

DEDICATORIA

“El hombre posee un gran razonamiento, pero en su mayor parte vano y falso; los animales lo tienen menor, pero útil y verídico, y más vale una pequeña certeza que un gran engaño”

Leonardo da Vinci.

A mi madre. Por estar siempre a mi lado, por tu apoyo durante todos y cada uno de los días de mi vida y por siempre hacerme sentir segura y capaz de lograr lo que me propongo. Este logro es, de nuevo, también tuyo.

A mi padre. Por tu cariño y por apoyarme en todos mis planes, caprichos, malviajes, etapas, etc.

A mi hermana. Por los días llenos de risas, burlas y buenos momentos. Por hacerme infinitamente más feliz.

A Aldo. Por convertirte en mi familia. Por todo tu amor, por confiar en mí, por ser mi apoyo en todo momento. Eres lo mejor que me ha pasado, simplemente TE AMO :)

A mi otra familia: mis amigos Claudia, Fabiola y Berenice. Porque sin ustedes los días no tendrían el mismo sentido.

A mis amigos, Raúl, Charly, Socorro, Fabiola, Maritere, Rodrigo, Caro, Alejandra, Aboites, Armando, Stivalis, Betito, Olga y Josi. Por marcarme y cambiar mi vida de una u otra forma.

A toda mi familia, a mis primos, tios y abuelos.

AGRADECIMIENTOS.

“Indecencia, vulgaridad, obscenidad...estas están estrictamente confinadas al hombre; él las inventó. Entre los animales superiores no hay rastro de ellas, no esconden nada, no están avergonzados”.

Mark Twain.

Al doctor Marco. Por su paciencia, por tranquilizarme en los momentos de pánico y sobre todo por las enseñanzas que me ha dado durante estos seis años.

A las doctoras Gabriela Bárcenas y Beatriz Arellano, por sus consejos e ideas en la elaboración de esta tesis.

A Soni. Por toda su ayuda durante este tiempo.

A los doctores Efrén, Fernando Díaz, Miguel Ángel Quiroz y Jaime Campuzano por las aportaciones realizadas a este trabajo.

A los doctores Jesús Vazquéz y Dionicio. Por la enorme ayuda que me brindaron durante mi trabajo experimental.

A la UNAM. Por permitirme seguir preparándome profesionalmente en esta bellísima carrera.

Al INIFAP. Por permitirme realizar mi trabajo experimental.

A Betito y Olga, por las pláticas y ayuda durante mi estadía en el laboratorio.

A todos los maravillosos maestros con los que me encontré durante mi maestría.

CONTENIDO

	Página
RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	3
Definición y etiología.....	3
Genoma de Mapt.....	6
Importancia económica.....	8
Enfermedad de Crohn.....	9
Transmisión.....	12
Signos clínicos.....	14
Patogenia.....	16
Lesiones.....	19
Tratamiento.....	21
Prevención y control.....	21
Vacunación.....	22
Prevalencia.....	23
Campaña voluntaria.....	24
Diagnóstico.....	25
PCR en tiempo real (Q-PCR).....	28
JUSTIFICACIÓN.....	34
HIPÓTESIS.....	35
OBJETIVO GENERAL.....	36
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	36
MATERIAL Y MÉTODOS.....	37

Obtención de las muestras.....	37
Extracción de ADN.....	38
Estandarización de la Q-PCR.....	39
Determinación de la sensibilidad y especificidad de la Q-PCR.....	40
Cuantificación de la unidades formadoras de colonias (UFC).....	40
Cultivo bacteriológico.....	41
ELISA.....	42
RESULTADOS.....	44
Estandarización de la Q-PCR.....	44
Resultados del procesamiento de las muestras.....	45
Determinación de la sensibilidad y especificidad de la Q-PCR.....	49
Cuantificación de las unidades formadoras de colonias (UFC).....	50
Cultivo bacteriológico.....	53
ELISA.....	53
Q-PCR.....	54
DISCUSIÓN.....	56
CONCLUSIONES.....	63
REFERENCIAS.....	65

Trabajo parcialmente financiado por CONACYT-SAGARPA 48176

Convocatoria 2006

Alumno becario.

RESUMEN.

La paratuberculosis es una enfermedad infecciosa de curso crónico, causada por *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, que se caracteriza por diarreas que no responden a tratamiento. El objetivo de este trabajo fue estandarizar una prueba cuantitativa de reacción en cadena de la polimerasa (Q-PCR) para el diagnóstico de paratuberculosis en bovinos. Se trabajaron con 21 muestras de ADN provenientes de cultivo de Maptb, los iniciadores se probaron a diferentes concentraciones, de 0.3 μM , 0.2 μM , 0.1 μM y 0.05 μM , la cantidad de ADN se probó a 2 μl , 3 μl y 5 μl (con una concentración en promedio de 44.13 ng/ μL) modificando la cantidad de agua para tener un volumen final en la reacción de 25 μl . Se llevó a cabo mediante un método de SYBR-Green. La concentración de ADN que mejor dio resultado para la estandarización de la Q-PCR fueron 132.39 ng de ADN y las condiciones para 22 μl de premezcla fueron 12.5 μl de SYBR Green, 0.05 μM del iniciador de ptb FP, 0.05 μM del iniciador de ptb RP y 9 μl de agua. Para determinar la sensibilidad y especificidad de la prueba se trabajó con 110 sueros de bovinos, a lo largo de cuatro muestreos, los cuales se compararon con un ELISA y con el cultivo bacteriológico utilizando los sueros y heces de los mismos animales, las pruebas fueron evaluadas mediante la prueba de Kappa o índice de concordancia. La sensibilidad, especificidad e índice de concordancia promedio al compararla con el ELISA fue de 83%, 90% y 0.525, respectivamente y al compararla con el aislamiento fue de 87.5%, 87% y 0.5035, la concordancia obtenida en ambas pruebas es aceptable, los resultados obtenidos muestran que la Q-PCR propuesta detectó a los animales positivos a paratuberculosis, por lo que puede ser considerada como una alternativa para el diagnóstico en bovinos

ABSTRACT.

Paratuberculosis is an infectious chronic disease, caused by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, that is characterized by diarrheas that do not respond to treatment. The objective of this study was the standardization of a quantitative polymerase chain reaction test (Q-PCR) for the diagnosis of bovine paratuberculosis. Twenty-one DNA samples from a Maptb culture were studied.

Primers were tested at different concentrations, 0.3 mM, 0.2 mM, 0.1 mM and 0.05 mM, the amount of DNA was tested at 2 μ l, 3 μ l and 5 μ l (with an average concentration 44.13 ng / μ L) modifying the amount water for a final volume of 25 μ l reaction. The DNA concentration at which best results for Q-PCR standardization were obtained was 132.39 ng together with the following concentrations in a 22 μ l premix: 5 μ l of SYBR Green, 0.05 μ M each of the ptb FP and RP primers and 9 μ l of water. In order to determine the sensitivity and specificity of the test 110 bovine sera, from four samplings, were used and compared with an ELISA that used protoplasmatic antigen, as well as with bacteriological culture using the feces of the same animals; the tests were evaluated by Kappa test or concordance index. Sensitivity, specificity and average concordance index when compared with ELISA were 83%, 90% and 0.525, respectively and when compared to bacterial isolation were 87.5%, 87% and 0.504. The concordance obtained in both tests is acceptable and the results obtained show that the proposed Q-PCR detected animals that were positive to paratuberculosis, therefore it can be considered as an alternative for diagnosis in bovines.

INTRODUCCIÓN.

DEFINICIÓN Y ETIOLOGIA.

La enfermedad de Johne o paratuberculosis es una enteritis de origen infecciosa y de curso crónico, causada por *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* (*Mapt*), que afecta de forma natural a rumiantes domésticos y silvestres como: vacas, borregos, cabras, así como rumiantes de vida libre como antílopes, camellos, búfalos de agua, llamas y yaks. De forma experimental, los ratones y hámsteres son susceptibles, razón por la cual son empleados en trabajos de investigación. También se ha demostrado que esta micobacteria puede infectar y multiplicarse en caballos y mulas, sin provocar la enfermedad; sin embargo, pueden excretar y diseminar la bacteria. (1, 2, 3). La distribución de *Mapt* es mundial, presentándose más en animales bajo condiciones de estabulación, y su prevalencia varía de 5% a 25% (1, 2, 4).

Actualmente los aislamientos de *Mapt* se clasifican en tres tipos (2):

- Tipo I: “*sheep type*”, comprende aislamientos pigmentados y no pigmentados obtenidos de ovinos en Marruecos, Escocia, Sudáfrica, Australia y Nueva Zelanda; también se han sido aislados a partir de bovinos en Australia e Islandia y algunos otros aislamientos caprinos de Nueva Zelanda y Noruega (2).
- Tipo II: “*cattle type*”, asociados principalmente con bovinos, pero también puede ser aislada de una gran cantidad de hospederos, incluyendo el humano (2).

- Tipo III: “*intermediate type*”, ha sido descrito en algunos aislamientos de ovinos de Sudáfrica, Canadá e Islandia; aislamientos de porcinos de Canadá así como en aislamientos de caprinos y bovinos en España (2).

La paratuberculosis es una enfermedad que se caracteriza clínicamente por que los animales presentan diarreas crónicas persistentes o recurrentes que no responden a ningún tratamiento (5, 6). De acuerdo con la Oficina Internacional de Epizootias (OIE), esta enfermedad se encuentra dentro de la lista B donde están categorizadas todas las “enfermedades transmisibles de importancia socioeconómica y/o para la salud pública en ciertos países y que son significativas en el mercado internacional de animales y sus productos” (7). En México, de acuerdo con la Secretaría de agricultura, ganadería, desarrollo rural, pesca y alimentación (SAGARPA), la paratuberculosis esta en el grupo 3, constituido por aquellas enfermedades enzoóticas, pero que representan un menor riesgo desde el punto epidemiológico, económico, de salud pública y de comercio nacional e internacional, son de notificación mensual obligatoria a las autoridades competentes de sanidad animal del país (8).

La enfermedad fue descrita por primera vez en 1895 por Johne y Frothingham, quienes demostraron la relación entre la enteritis en bovinos con la presencia de un bacilo en secciones de la mucosa del intestino (3). En México se diagnosticó por primera vez en ganado bovino en 1936, mediante pruebas de intradermorreacción realizadas por Unzueta y aislada por primera vez en ganado lechero en 1979 por Ramírez y col (9).

El Mapt es bacilo ácido-alcohol resistente cuya característica la confiere su compleja pared celular, la cual es relativamente resistente al agua y rica en ácidos micólicos, péptidoglicano y arabinogalactano (lípidos) (6). Es anaerobio facultativo, intracelular (1) con un prolongado periodo de incubación, por lo que su desarrollo y crecimiento puede ir desde cuatro hasta dieciséis semanas, mide de 1.5 a 2 μm de largo por 0.5 μm de ancho, inmóvil, produce colonias redondas de 1 a 5 mm de diámetro que pueden ser firmes y suaves, lisas o rugosas con una variación en su color que va del amarillo al naranja (9). El medio de elección para su crecimiento es el de Herrold adicionado con yema de huevo y micobactina (10).

El bacilo está clasificado dentro del complejo *Mycobacterium avium-intracellulare*, en el cual se encuentran: *M. avium* subsp. *avium* (M.a.avium), *M. avium* subsp. *paratuberculosis*, *M. avium* subsp. *silvaticum* y *M. intracellulare* y se diferencia de las otras subespecies del complejo por su dependencia de micobactina para su crecimiento *in vitro* y la estimulación de su crecimiento con piruvato (10, 11, 12). Es una bacteria resistente a condiciones ambientales y a algunos desinfectantes, puede permanecer viable 270 días en aguas estancadas como charcos y 47 meses en materia orgánica desecada, sin embargo, es relativamente susceptible a la luz solar, concentraciones elevadas de calcio y pH alcalino del suelo (2, 6).

El bacilo es eliminado por heces de forma intermitente. Existen factores de riesgo para que se infecten y/o enfermen los animales, como lo son: la cría de animales en forma intensiva, una mala nutrición, estrés, lactancia prolongada (2, 6), regiones con bajo pH del suelo y alto contenido de hierro (10), así como una elevada producción láctea, posparto, acumulación de heces, contaminación de

alimento y agua con heces, introducción de animales provenientes de hatos con presencia de paratuberculosis (9).

GENOMA DE Mapt.

Mapt, tiene un genoma con 4,829,781 pb y un contenido total de guanina citocina (GC) del 69.3% (13).

Como se mencionó, esta micobacteria es dependiente de micobactina para su crecimiento *in vitro*; las micobactinas son moléculas lipídicas de elevado peso molecular a las cuales se une el hierro, se encuentran presentes únicamente en los géneros *Mycobacterium* y *Nocardia*, excepto en Mapt. La producción de micobactina se encuentra a cargo de un grupo de 10 genes llamado *mtbA-J*, descrito en *M. tuberculosis*, los cuales se han identificado ser homólogos en Mapt, sin embargo el análisis de este genoma mostró un espacio de 6,6 kb entre los genes *mbtJ* y *mbtI* y un espacio de 19,3 kb entre los genes *mbtA* y *mbtJ*, esta característica podría ser la responsable de la dependencia a la micobactina de Mapt, de no ser porque también aparecen en el genoma de *M. a. avium*, la cuál es capaz de producirla (13).

Otra explicación podría deberse a que la proteína *mbtA* de Mapt es más corto (400 aminoácidos (aa) con respecto a *M. tuberculosis* (565 aa) y *M.a. avium* (551 aa), dado que el truncamiento de este gen, el cual tiene una función crucial en la producción de micobactina, se cree que la producción de micobactina se encuentra atenuada en Mapt (13).

Existen proteínas relacionadas a la patogénesis de esta micobacteria, como las proteínas miembros de la familia PE/PPE, que presenta en su dominio amino terminal los aa prolina-ácido glutámico y prolina-prolina-ácido glutámico, respectivamente, específicas del género *Mycobacterium*; en el caso de *Mapt*, cuenta con un total de seis proteínas pertenecientes a la familia PE y 36 PPE (1% del total del genoma), las cuales son homólogas a las de *M. tuberculosis*; por ejemplo, en un estudio realizado en el 2005, se demostró que algunas de las proteínas PPE se han visto involucradas en la virulencia de cepas de *M. a. avium* en ratones y en el crecimiento intracelular de este microorganismo en macrófagos. Existen trabajos donde se han demostrado otros genes implicados en la virulencia de las cepas, como se demostró en un estudio realizado en el 2006, donde las cepas mutantes de *Mapt* con mutaciones en los genes *fabG2_2*, *gcpE*, *impA*, *kdpC*, *papA2*, *pstA* o *umaA1*, en modelo murino, mostraron disminución en la colonización de tejidos (13). Otro gen de importancia es el gen *pstA*, implicado en la formación de *biofilms* y la invasión intestinal de *Mapt* en bovinos.

Existen genes que destacan por su importancia, son los que pertenecen a la familia *mce* (*mammalian cell entry genes*), estos genes se encuentran distribuidos a lo largo de todo el genoma de *Mapt* en siete grupos y aunque su mecanismo de función no está completamente dilucidada, la pérdida de estas regiones en cepas patógenas puede afectar severamente la virulencia de estas al retrasar el inicio de la infección y la formación de granulomas, por lo anterior se sabe que las proteínas MCE (*mammalian cell entry*), son esenciales para la entrada celular y supervivencia en el interior de los macrófagos (13, 14).

IMPORTANCIA ECONÓMICA.

En todo el mundo, la enfermedad de Johne, causada por Mapt, es una de las enfermedades más frecuentes y económicamente más importantes del ganado y de otros rumiantes (15), ya que impacta de manera importante la producción animal al generar disminución en la producción de leche, desechos precoces de animales y al relacionarse con problemas de baja fertilidad y predisposición a mastitis (9), menor valor comercial de canales y elevados costos de los programas de control (16).

Estudios recientes han mostrado que más del 20% de los rebaños lecheros y el 8% de los establos de engorda en Estados Unidos están infectados con Mapt, incluso un estudio realizado en el 2010 menciona que la micobacteria se encuentra en más del 68% de estos establos (17) (provocando pérdidas económicas anuales estimadas en más de 200 millones de dólares (de 40 a 227 dólares por vaca) (15, 18, 19). En México se evaluó el impacto económico de esta enfermedad en el Complejo Agropecuario Industrial de Tizayuca, Hidalgo (CAIT) y se concluyó que representa pérdidas anuales de \$10,174 por animal infectado, debiéndose principalmente a la disminución de la producción láctea atribuible a la paratuberculosis (20, 21).

ENFERMEDAD DE CROHN

La enfermedad de Crohn (EC) y la colitis ulcerativa son dos enfermedades del tracto gastrointestinal en humanos, comúnmente conocida como enfermedad inflamatoria idiopática intestinal, se cree que la inflamación es resultado de la

inapropiada activación del sistema inmune innato y adaptativo de la mucosa en pacientes genéticamente susceptibles y que la microflora entérica juega un papel central en el inicio y mantenimiento de la enfermedad (22, 23).

No hay duda que Mapt causa una enfermedad entérica en animales, es su posible papel zoonótico el que permanece sin resolver. El primer aislamiento de Mapt viable de un paciente con EC fue realizado aproximadamente hace 25 años. Wynne et al, recientemente demostraron que el bacilo se identificó por PCR partir de biopsias de mucosa y/o células mononucleares de sangre periférica en el 47% de pacientes pediátricos con EC que no recibían ningún tratamiento, en comparación con el 11% que se encontró en el grupo control (24).

También se sabe que *E.coli* es la bacteria Gram negativa dominante de la flora gastrointestinal de pacientes sanos, la relación entre esta bacteria y la enfermedad inflamatoria idiopática del intestino se describió en 1978 cuando Tabaqchali et al, demostró que los pacientes con esta enfermedad presentaban altos títulos de anticuerpos contra el antígeno O de esta bacteria. Otro estudio realizado en 1998 demostró que *E.coli* era aislado de la mucosa de un gran número de pacientes con enfermedad inflamatoria idiopática del intestino, mostrando una aumentada habilidad de adhesión a las células del epitelio intestinal, así como la habilidad de desorganizar la barrera intestinal mediante la producción de alfa haemolisina, además esta bacteria invade y puede sobrevivir dentro de las células epiteliales de forma similar a como lo hace *Salmonella*. Un nuevo patotipo ha sido propuesto para esta *E. coli*: “*E. coli* adhesiva e invasiva” (25).

Se han realizado estudios donde se observa a *E.coli* dentro de macrófagos y células gigantes en tejidos de pacientes con EC, en un estudio de

inmunohistoquímica el 57% de muestras de tejido mostraron contener *E. coli*, este microorganismo se encontró en úlceras, alrededor de abscesos, dentro de la lamina propia del intestino y en los centros germinales de linfonodos mesentéricos, en otro estudio que utilizaba PCR esta bacteria fue encontrada en el 80% de los granulomas en pacientes con la enfermedad. Además, existen reportes donde se menciona haber encontrado una prevalencia elevada de *E. coli* adhesiva e invasiva en la mucosa del íleon en pacientes con EC, pero no en pacientes con colitis ulcerativa ni en individuos controles, también se ha demostrado que esta *E. coli* invasora solo se presenta en órganos con inflamación y que el número de bacterias registrado en las biopsias está directamente asociado a la gravedad de la enfermedad (25, 26).

La relación entre la enfermedad de Crohn y Mapt fue postulada por primera vez por Dalziel en 1913, cuando notó que la enfermedad de Johne en rumiantes mostraba muchas similitudes con la enfermedad de Crohn, sin embargo no se logró cultivar micobacterias de pacientes con EC hasta 1978 cuando Burnham informo sobre el cultivo de *Mycobacterium kansasii* de los ganglio linfáticos de una paciente con EC (27). Mapt es aislado a partir de cultivos de biopsias en alrededor del 42% de pacientes con la enfermedad y en el 9% de los pacientes control; en un estudio realizado por Sanderson et al, se demostró que Mapt fue identificado en 26/40 pacientes con EC (65%), 1/23 con colitis ulcerativa (4.3%) y 5/40 en pacientes control libres de la enfermedad (4.3%), las muestras positivas a Mapt de los pacientes infectados fueron tomadas del intestino delgado y colon, sin embargo solo fueron tomadas muestras de colon en los pacientes control (25, 28).

Otros estudios demuestran que el Mapt aislado de humanos (Mapt-h) muestra una marcada diferencia en la expresión de proteínas con respecto a el Mapt aislado de bovinos (Mapt-b), Maptb-h mostró una mayor expresión de seis proteínas comparado con Mapt-b, dos de estas proteínas fueron: PepA que es una proteasa serina y ModD que es una proteína de unión a fibronectina, necesaria para la internalización e invasión de Mapt a las células epiteliales, lo cual se cree le confiere ventaja a Mapt para causar infección (25).

Adicionalmente a los factores microbianos e inmunes, la EC está asociada con mutaciones genéticas, como: receptores de reconocimiento de patrón (NOD2/CARD15, TLR4, CARD9); autofagia (ATG16L1, IRGM, LRRK2), diferenciación de linfocitos ((IL-23R, JAK2, STAT3, CCR6, ICOSLG). Mutaciones en NOD2/CARD15 pueden causar un desarrollo anormal de las placas de Peyer así como una deficiente producción de defensinas por las células de Paneth, interesantemente un estudio reciente a demostrado que pacientes con la enfermedad de Crohn con mutaciones en NOD2 muestran un reconocimiento no efectivo a Mapt (29, 30).

Este microorganismo se encuentra presente en la carne y leche, pero la presencia de ADN de la micobacteria en pacientes con EC no es suficiente para establecer a esta micobacteria como el agente causal, además los tratamientos contra el microorganismo no produce una cura. Se ha propuesto un nuevo modelo para la EC en el cual Mapt, un microorganismo de baja virulencia, infecta a una gran proporción de la población, pero solo causa o exacerba la enfermedad en personas genéticamente susceptibles, por ejemplo, en aquellos que tienen una

actividad disfuncional de IF- γ , lo cual puede causar un fallo en modular la transición entre el sistema inmune específico e innato (25, 31).

TRANSMISIÓN.

Los animales (bovinos) más susceptibles a infectarse con Mapt son los menores de seis meses de edad, la paratuberculosis tiene un periodo de incubación largo, por lo que, los signos clínicos se observan en animales entre tres y cinco años, sin embargo, este límite de edad no debe emplearse como un criterio de diagnóstico confiable, ya que en algunas circunstancias, por ejemplo, en becerros alimentados por madres infectadas, la enfermedad puede presentarse entre los 12 a 18 meses, incluso en animales jóvenes de 4 meses de edad (2, 32).

La principal fuente de infección es por la vía oral, la cual puede ser a través de pastos, agua y/o alimento contaminados con heces ya que los animales clínicamente enfermos excretan en forma masiva al agente con las heces durante 15 a 18 meses antes de presentar algún signo clínico (la concentración bacteriana en heces de animales infectados puede exceder 10^8 bacilos/ gramo de heces) (2, 3), y la dosis infectante necesaria para becerros es de 50 a 1000 unidades formadoras de colonias (UFC) (33) o bien durante la lactancia, a causa de la contaminación de la ubre con heces y por la eliminación del microorganismo a través de la leche y calostro (9).

Se ha aislado el microorganismo de genitales y semen de toros infectados, además de que sobrevive a la congelación y a los antibióticos convencionales, por lo que no puede excluirse una transmisión por semen o embriones infectados,

pero tendría un papel secundario. Se tienen indicios de infección intrauterina, en especial cuando el animal gestante se encuentra clínicamente enfermo, ya que el bacilo puede aislarse a partir de tejidos fetales y cotiledones de vacas (2, 9, 10). La prevalencia de la infección intrauterina varía del 4.4% al 57.3% en fetos de vacas clínicamente enfermas y del 1.2% al 44.4% en animales con enfermedad subclínica, aún así no parece ser una causa significativa de la infección natural (2, 33).

Se estima que por cada caso clínico hay 25 casos subclínicos, de aquí la importancia de contar con pruebas de diagnóstico que puedan detectar a los animales infectados que aún no manifiestan la enfermedad (6).

Aún cuando existen grandes avances en el conocimiento de la enfermedad, no se puede contestar en forma definitiva si Mapt puede ser considerado como una fuente de infección para el hombre (10). Así mismo, se ha informado el posible papel etiológico del bacilo en la EC en humanos como una enfermedad inflamatoria intestinal asociada a Mapt, la cual ha sido evidenciada a través de estudios moleculares donde se demuestra la secuencia de inserción IS900, específica de esta micobacteria, por lo que estos estudios sugieren una mayor participación de este microorganismo en la enfermedad en humanos (34).

SIGNOS CLÍNICOS.

Aunque la infección usualmente ocurre en los primeros cinco meses de vida, los signos clínicos solo se desarrollan después de un largo periodo de incubación por lo que generalmente aparecen entre los dos y cinco años de edad; sin embargo,

los signos han sido observados en animales menores a 18 meses y mayores a diez años de edad. A este largo periodo de incubación se le atribuye el difícil control de la enfermedad, ya que los animales con infección subclínica comienzan a excretar y diseminar la micobacteria en las heces antes de presentar los signos clínicos característicos de la enfermedad (12, 35).

El microorganismo es fagocitado por macrófagos, que a su vez proliferan en gran número e infiltran la submucosa intestinal, ocasionando un proceso inflamatorio de tipo crónico lo que origina disminución de la absorción de los nutrientes y diarrea crónica. La cual es al principio intermitente y más tarde permanente, hay pérdida de la condición corporal aunque el apetito se mantiene, así como una drástica disminución de la producción de leche (1, 2). Existe una reducción en la absorción de proteínas y escape de proteínas hacia la luz del yeyuno. En bovinos la pérdida de proteínas origina desgaste muscular, hipoproteïnemia y edema submandibular (que desaparece generalmente al comenzar la diarrea). En ovinos, un aumento compensatorio de la producción de proteína en el hígado enmascara su pérdida y los signos clínicos aparecen sólo cuando falla este mecanismo compensatorio (2). En vacas altas productoras se puede observar una aparente indigestión e inapetencia en la etapa temprana de la enfermedad debido a una hipoproteïnemia y una relativa deficiencia de calcio disponible. Una complicación que se puede presentar es el desplazamiento del abomaso, en la etapa moderada a severa de la enfermedad, y aunque la causa exacta de este desplazamiento es desconocida, pero la atonía gastrointestinal provocada por la hipocalcemia y la reducción en la ingestión de materia seca, pueden contribuir a esta condición (2, 12).

A medida que progresa la enfermedad, la pérdida de peso provoca que la masa muscular disminuya y el pelaje se torne seco. La producción láctea desaparece por completo y el animal muestra inapetencia y deshidratación (1). La temperatura corporal y signos vitales, se mantienen normales (10, 12). La única anomalía detectada en el suero, por pruebas de laboratorio clínico, es la hipoalbuminemia. (12).

En ovinos y caprinos la enfermedad se manifiesta principalmente por adelgazamiento, aunque a veces se observa caída de la lana en ovejas. La diarrea no es evidente, aunque las heces pueden ser blandas, perdiendo su forma característica (2).

Se considera que los animales que estuvieron en contacto con el bacilo pueden pasar por cuatro fases durante el desarrollo de la enfermedad (2, 36):

- Etapa I: animales resistentes no infectados: nunca se infectaron o desarrollaron inmunidad activa protectora que resultó en la eliminación completa de la enfermedad.
- Etapa II: animales portadores: estos animales desarrollan resistencia rápidamente, controla la infección y se convierte en portador, son aquellos que son detectados por pruebas serológicas o cultivo a partir de heces. Desarrollan Inmunidad celular y principios de inmunidad humoral.
- Etapa III: diseminadores esporádicos: en este grupo la infección no se controla por completo, algunos animales controlan parcialmente la infección pero eliminarán el microorganismo de forma intermitente, otros se convertirán en casos intermedios que se encuentran incubando la bacteria y

se convertirán en portadores de la enfermedad, no muestran signos excepto por disminución en la producción, hay respuesta inmune humoral y celular intermedia. A medida que avanza la infección, aumenta la excreción, aumentan los anticuerpos y disminuye la inmunidad celular.

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

PATOGENIA.

La infección de Mapt es principalmente por vía oral, a partir de alimento o agua contaminados con heces, después de la ingestión, la micobacteria penetra por endocitosis a las células M de las placas de Peyer en el íleon y son transportados en vacuolas dentro de los macrófagos. Los ácidos micólicos, el péptidoglicano y el arabinogalactano, presentes en la pared celular de la bacteria, juegan un papel crucial en la resistencia a la degradación intracelular, lo que permite su multiplicación dentro del macrófago, los cuáles se encargan de llevar a Mapt hasta los linfonodos mesentéricos (6).

Las células presentadoras de antígeno (CPA) como los macrófagos y células dendríticas del sistema inmune innato son capaces de detectar la invasión de la micobacteria por medio de receptores de patrones de reconocimiento, entre los que se encuentran los receptores tipo Toll (TLR) los cuáles reconocen

componentes microbianos específicos conocidos como patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), en el caso de Mapt, estos PAMPs se refieren a los ácidos micólicos, peptidoglicano y el arabinogalactano (37, 38). Cuando la bacteria es degradada dentro de la CPA, ésta expone péptidos que derivan del antígeno proteico, también llamado determinante antigénico, en su complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) tipo II para que pueda ser reconocido por el receptor de los linfocitos T CD4+, estas CPA también presentan dos proteínas más, como las proteínas coestimuladoras, que se unen a receptores complementarios de la superficie del linfocito T y las moléculas de adhesión célula-célula que permiten al linfocito T permanecer unido a la CPA el tiempo necesario para ser activado (38).

La característica común y principal de todas las reacciones de inmunidad celular mediadas por linfocitos T, que en esencia provee inmunidad protectora y previenen el progreso de la enfermedad, es la presencia de linfocitos y macrófagos activados en la zona de depósito del antígeno (33).

Los subconjuntos mejor definidos de linfocitos T efectoras de la estirpe cooperadora CD4⁺ son los linfocitos Th1 y Th2; el interferón γ (IFN- γ) es una de las citocina que caracteriza a los Th1, mientras que la interleucina 4 e IL-5 son las que definen a los Th2. El IFN- γ secretado por los linfocitos Th1 estimula una mayor diferenciación de linfocitos Th1 e inhibe la proliferación de linfocitos Th2. Por otro lado, la IL-4 producida por los linfocitos Th2 estimula la diferenciación de linfocitos Th2 e IL-10, también sintetizada por las células Th2 e inhibe la activación de los linfocitos Th1. El IFN- γ producido por los linfocitos Th1 también estimula la actividad microbicida de los fagocitos, lo que favorece la destrucción

intracelular de los microorganismos fagocitados; por otro lado algunas citocinas sintetizadas por las células Th2, en especial IL-4, IL-3 e IL-10, antagonizan las acciones del IFN- γ e inhibe la activación de los macrófagos, ésta es la razón de que el desarrollo de una respuesta Th2, se asocie a una inmunidad celular deficiente frente a las infecciones por microorganismos intracelulares (39).

El reclutamiento de células en el sitio de infección es modulado por un complejo conjunto de citocinas y quimiocinas producidas por múltiples tipos de células, incluyendo macrófagos y células dendríticas. El factor de necrosis tumoral α (TNF- α) es una citocina que parece ser crítica en el mantenimiento de la estructura del granuloma, los macrófagos y células dendríticas con una importante fuente de TNF- α el cual actúa como una señal de retroalimentación positiva para que macrófagos y células dendríticas infectadas secreten más TNF α y citocinas, incluyendo IL-1 e IL-18. Estos mediadores proinflamatorios provocan un reclutamiento de linfocitos TCD4+ y CD8+, monocitos, neutrófilos y células *natural killer* (NK). El reclutamiento de estas células promueve la activación y producción de las citocinas y quimosinas para amplificar la cascada de infiltración celular del sitio de infección y provoca la formación del granuloma. El TNF α coordina la cascada de infiltración celular (40).

Los animales con infección de tipo subclínica eliminan de forma intermitente a la bacteria en las heces. Después de varios años el animal desarrolla la fase clínica de la enfermedad, este proceso está asociado con una reactividad de células T Th1 y Th2, pero las causas aun no están bien conocidas. El grado en el cual la respuesta inmune determina la duración del período subclínico no está muy claro

aunque parece que la presencia de anticuerpos en el estado avanzado de enfermedad no es protectora (33).

La respuesta a la infección por *M. paratuberculosis* tiene una fuerte respuesta inmune mediada por células, debido a que se trata de una bacteria intracelular, durante la etapa temprana y subclínica y una fuerte respuesta humoral durante las etapas finales de la enfermedad (33).

LESIONES.

Las lesiones macroscópicas por *M. paratuberculosis*, se presentan sobre todo en el intestino delgado, principalmente en el íleon, y se caracterizan por un engrosamiento de la pared intestinal (hasta tres o cuatro veces más respecto a su grosor normal), plegamiento de la mucosa, con apariencia granular (2, 6, 9). Los nódulos linfáticos mesentéricos e ileocecales se encuentran hiperplásicos y edematosos, en ovinos puede haber necrosis, caseificación y calcificación (2).

En los ovinos las lesiones quedan restringidas a la parte posterior del aparato digestivo y nódulos linfáticos cercanos. Suelen estar afectados la porción terminal del intestino delgado, el ciego y la primera parte del colon, en casos avanzados las lesiones se extienden desde el recto hasta el duodeno. Puede observarse una pigmentación amarilla intensa de la pared intestinal y aunque el plegamiento de la mucosa no es un hallazgo común, la pared puede encontrarse engrosada. Las lesiones de las cabras son semejantes a las de los bovinos (2).

En el caso de fetos infectados, no se producen lesiones pero el microorganismo puede ser aislado a partir de vísceras, así como en la placenta y útero (2).

Las lesiones histológicas se localizan principalmente en el intestino delgado a nivel del íleon y yeyuno (9), microscópicamente estas lesiones corresponden con una reacción inflamatoria granulomatosa (10) que se caracterizan por la presencia de una gran cantidad de histiocitos, macrófagos y células epitelioides con ausencia de necrosis y fibrosis (9, 32).

Las lesiones granulomatosas se dividen en dos tipos: a) multibacilar (lepromatoso), que se caracteriza por carencia de organización, con una gran cantidad de macrófagos con abundantes bacilos e infiltración desorganizada de linfocitos, y b) el paucibacilar (tuberculoide), que se caracteriza por lesiones nodulares organizadas y rodeadas y delimitadas por tejido conectivo fibroso; en su interior existen abundantes células gigantes multinucleadas, macrófagos y linfocitos y escasas micobacterias. Los granulomas de tipo multibacilar son característicos de lesiones entéricas que se desarrollan durante una infección con *Mapt*, estos granulomas pueden expandir la pared intestinal, provocando la pérdida eventual de la función de la mucosa intestinal (9, 41).

TRATAMIENTO.

Para fines prácticos, los animales que desarrollan la fase clínica de la enfermedad deben ser enviados a sacrificio, debido a la disminución en la producción de leche, desechos precoces de animales, al relacionarse con problemas de baja fertilidad, predisposición a mastitis (9), menor valor comercial de canales y elevados costos de los programas de control (51), y deben implementarse medidas de manejo para el control del hato.

Se considera que los únicos antibióticos que pudieran tener un efecto contra la paratuberculosis, son los mismos utilizados para controlar la tuberculosis en humanos, por lo que no es recomendable dar tratamiento en animales, ya que se corre el riesgo de generar resistencia a los antibióticos y económicamente no es costeable.

PREVENCIÓN Y CONTROL.

Los animales que nacen de madres infectadas con Mapt, deben nacer en áreas de maternidad limpias y desinfectadas, ser alejados de la madre inmediatamente o en un periodo de 6 a 12 horas y alojados en corrales de crianza limpios, teniendo alojamientos separados para animales jóvenes y adultos. La alimentación de los becerros se llevará a cabo con calostro proveniente de vacas negativas a Mapt, cuando se recolecte el calostro se debe limpiar y desinfectar bien la ubre para evitar la contaminación con heces (1, 10, 12), y evitar en extremo la contaminación del alimento con excretas utilizando comederos tipo canoa y evitar utilizar el mismo equipo para manejar el alimento en la remoción de las excretas (1).

La OIE recomienda a los servicios veterinarios de los países importadores, solicitar un certificado internacional de sanidad animal en los rumiantes domésticos, donde conste que: 1) el día de la exportación no presentaba signos clínicos de paratuberculosis; 2) que provienen de establecimientos en los que en los últimos cinco años antes de la exportación no se han comprobado oficialmente casos de paratuberculosis y 3) en las pruebas realizadas 30 días antes a la exportación el resultado fue negativo (10).

La base del control de esta enfermedad es la identificación y eliminación de los animales infectados, sin embargo, el carácter subclínico de la enfermedad y la baja sensibilidad de los métodos de laboratorio dificultan el diagnóstico, no existiendo hasta el momento, ningún método 100% seguro para detectar a todos los animales infectados, especialmente a los jóvenes (16).

VACUNACIÓN.

Existe una bacterina, la cual no sustituye a las medidas sanitarias antes mencionadas ni a las pruebas diagnósticas. Se aplica en los músculos del pecho entre el primer y el día 35 de edad del ternero, se utiliza en países de Europa y América del norte (1). En forma experimental ha mostrado tener más del 90% de efectividad para prevenir la enfermedad clínica (33), aunque no evita la infección, pero genera una respuesta inmunitaria humoral y celular por la que los animales dan resultados positivos en pruebas de diagnóstico. Puesto que la bacterina se basa en la estimulación de linfocitos T para controlar la infección, puede continuar produciendo respuesta celular y es posible que los animales respondan a las pruebas de interferón gamma, intradermoreacción (9) o comprometa la especificidad de la prueba de tuberculina. Además la aplicación de la vacuna ocasiona la formación de un nódulo en el sitio de aplicación, que puede variar en tamaño (2 a 10 cm), el cual deberá debridarse eliminando el exudado caseoso (9). Se debe tener en cuenta que mediante la vacunación no se puede eliminar la infección en el establecimiento, pero se reduce notablemente el número de casos clínicos (10).

En el caso de México no se lleva a cabo la vacunación contra paratuberculosis, debido a que existe una campaña nacional contra la tuberculosis bovina, siendo la prueba de tuberculina la prueba diagnóstica utilizada, al inmunizar animales contra Mapt se generarían reacciones cruzadas con *Mycobacterium bovis*, dando resultados falsos positivos (4).

PREVALENCIA.

En un monitoreo realizado en Italia del 2000 al 2011 en hatos lecheros, se encontró que el 65% de los hatos muestreados fueron positivos a la infección, con una prevalencia de 3.5% animales positivos a paratuberculosis, en Nueva Zelanda en el 60% de los hatos lecheros se encontraba la infección (2008) y en Estados Unidos el 21.6% (1996). En el 2001 se reportaba una incidencia del 10.2% de la enfermedad (4)

En el caso de México en 1994 se encontró una prevalencia de paratuberculosis en toros de Lidia del 30% (42), en el 2003 Santillán et al, reportó una prevalencia del 30.6% en ganado lechero y de 25% en ganado de doble propósito en el estado de Guanajuato (43), en los estados de Aguascalientes y San Luis Potosí se menciona una prevalencia del 13.43% y 31.3%, respectivamente (44, 45). En un muestreo realizado en cabras en las regiones de la Mixteca y Libres del estado de Puebla, se menciona que el 76.74% de los rebaños se encuentran infectados con Mapt con una prevalencia del 23.76% (46).

CAMPAÑA VOLUNTARIA.

El Consejo Técnico Consultivo Nacional de Sanidad Animal (CONASA), a través del Comité No. 1 Salud y producción bovina, ha recomendado a la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) llevar a cabo acciones de atención al problema causado por la paratuberculosis en México. Se ha presentado una propuesta para la implementación de un programa para la prevención y el control de la paratuberculosis en México, debido a su amplia distribución y creciente diseminación, así como el incremento de la prevalencia, especialmente en ganado lechero; países como Estados Unidos, Canadá, Australia, Italia, Francia, España, Holanda, República Checa, Suecia e Israel cuentan con este programa de control y erradicación, por lo que la iniciativa en nuestro país es de gran relevancia.

Existen algunas limitaciones que se pueden producir en México derivadas de la falta de atención al problema, como:

1. Reducción de las exportaciones por causa de barreras comerciales de índole sanitaria.
2. Limitación al mejoramiento genético.
3. Pérdidas económicas.
4. Posibilidad de la enfermedad se trate de una zoonosis, debido a su relación con la enfermedad de Crohn.

Con base a lo anterior el presente plan estratégico se enfoca a la atención de esta problemática mediante la implementación de cuatro iniciativas que están

relacionadas con el objetivo de lograr que en nuestro país, los rumiantes domésticos tengan una baja prevalencia de Paratuberculosis:

1. Conocimiento de la enfermedad
2. Programa voluntario de prevención y control.
3. Control de movilizaciones e importaciones
4. Operación de un sistema de vigilancia epidemiológica

Solo a través de un Programa Nacional Voluntario para el control de la Paratuberculosis será posible la detección, planeación y ejecución de las diferentes estrategias sanitarias que permitan avanzar permanentemente hacia el control de esta enfermedad (47).

DIAGNÓSTICO.

El diagnóstico se realiza por varios métodos, siendo el cultivo bacteriológico la prueba más utilizada y confirmatoria, puede realizarse a partir de heces para identificar a los animales excretores y que son fuente potencial de infección para el resto de los animales, se sabe que posee una especificidad del 100% porque no produce resultados falsos positivos (9) y una sensibilidad estimada del 38% (18), esto último puede estar asociado al proceso de descontaminación de las muestras (la cual se requiere para remover la mayoría de los organismos de la flora intestinal) pudiendo afectar la viabilidad de las micobacterias (3). El crecimiento y desarrollo de las colonias puede tardar de cuatro a dieciséis semanas.

La evaluación microscópica (frotis y tinción de Ziehl-Nielsen) de heces y de la mucosa rectal, tiene la ventaja de ser una técnica fácil de realizar, sin embargo,

los resultados generalmente no son exactos (32) y el éxito de la prueba depende de la cantidad de micobacterias presentes en las heces (3).

La biopsia de la mucosa rectal se utiliza en casos clínicos avanzados, con un éxito que varía del 20% al 100%, pero tiene la desventaja de que es una técnica difícil de realizar y que requiere mucho tiempo, lo que significa un problema cuando se tienen una gran cantidad de animales para diagnosticar (32).

Otra prueba que se utiliza para el diagnóstico es la prueba de Jonhina con derivado proteico purificado (PPD) de Mapt, aunque esta prueba no se realiza en México, o también se puede emplear la prueba de tuberculina doble comparativa utilizando el PPD bovino y PPD aviar, ambas pruebas poseen una especificidad de 54% y una sensibilidad de 79 % (9). Una de las limitantes de esta prueba son las reacciones cruzadas que se puedan presentar debido a la presencia de micobacterias saprófitas.

La primer respuesta a la infección por Mapt es mediada por células, las cuales pueden ser detectadas con citocinas en muestras de sangre, la presencia de IFN- γ puede ser medida con una ELISA, y la respuesta humoral puede ser revelada por pruebas serológicas como fijación del complemento o ELISA, que detectan anticuerpos circulantes (48).

Las pruebas basadas en la respuesta inmune humoral no resultan factibles durante etapas tempranas de la infección porque no se producen anticuerpos contra Mapt (18), pero su sensibilidad y especificidad son relativamente altas en animales clínicamente afectados (48).

Otra prueba diagnóstica es el análisis inmunoenzimático (AIE), ELISA por sus siglas en inglés (Enzyme Linked Immunosorbent Assay), que permite determinar la

concentración de un antígeno o anticuerpo mediante el uso de uno de ellos en solución y el otro en la fase sólida (40), está dividido en a) heterogéneo, donde el antígeno o anticuerpo conjugado con la enzima es separado del complejo enzima-antígeno-conjugado, antes de medir la actividad enzimática y b) homogéneo, en el cual la actividad enzimática del antígeno marcado es medida en presencia del complejo antígeno-anticuerpo. Las técnicas de ELISA pueden ser clasificadas en competitivas y no competitivas, dependiendo de que el antígeno libre y el antígeno ligado a una enzima o fijado a una fase sólida compita por un número limitado de sitios activos de anticuerpos (49).

El diagnóstico mediante ELISA se ha utilizado para la detección de animales con paratuberculosis, principalmente en bovinos, siendo una buena opción ya que en el caso del paquete comercial (IDEXX), cuenta con una sensibilidad del 83% y una especificidad del 89% (32), además de que es una prueba fácil de establecer en el laboratorio. Existen trabajos donde se considera que la sensibilidad del ELISA comercial es de 8.9 a 32.1% en animales que eliminan una pequeña cantidad de bacilos en las heces y de 47.1 a 62.9 en animales que eliminan mayor cantidad (15). En un trabajo previo de nuestro equipo de investigación en donde se evaluó un ELISA con antígeno protoplasmático, en el que se obtuvo una sensibilidad y una especificidad del 86% y 90%, respectivamente (50). Se sabe que *Mapt* comparte un amplio rango de componentes antigénicos con otras especies de micobacterias y con otros microorganismos relacionados como *Corynebacterium*, *Nocardia* y *Rhodococcus*, dando resultados falsos positivos; para evitar esto los sueros de los animales se diluyen en una solución que contiene *Mycobacterium phlei*, esto para mejorar la sensibilidad de la prueba. Finalmente las respuestas

falsas negativas se deben a la tolerancia y anergia, esto que ocurre más frecuentemente durante los estadios terminales de la enfermedad, aunque pudieran ocurrir en cualquier estadio de la infección crónica (2, 51).

Actualmente se han implementado pruebas moleculares para el diagnóstico de la enfermedad, como es el caso de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), los iniciadores que más se han estudiado son los diseñados a partir de la secuencia de inserción 900 (IS900), la cual es específica de *M. avium* subsp. *paratuberculosis* (52), esta prueba tiene la ventaja de que los resultados se obtienen en menos de una semana.

PCR EN TIEMPO REAL.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se ha aplicado principalmente como un método cualitativo, por lo que, la prueba de PCR en tiempo real o PCR cuantitativa (Q-PCR), es una variación de la PCR estándar utilizada para la cuantificación de ADN o ARN mensajero (mRNA) de una muestra. Utilizando iniciadores específicos de secuencia, es posible determinar el número de copias o la cantidad relativa de una determinada secuencia de ADN o ARN (53, 54). La mayoría de los protocolos de PCR para la detección de Mapt amplifican la secuencia de inserción 900 (IS 900), por lo tanto ha sido aceptada como un marcador estándar de Mapt. La IS 900 es una secuencia de 1451 pares de bases, que codifica para una transposasa hipotética de 399 aminoácidos, se han encontrado de 14 a 20 copias de la IS 900 en el genoma de Mapt y se inserta dentro de una región consenso en loci altamente conservados en el genoma.

Pertenece a la misma familia de secuencias de inserción que la IS 901, IS 902 e IS1110, descritas en *M. avium* subsp. *avium*, *M. avium* subsp. *silvaticum* y *M. avium* subsp. *avium*, respectivamente, (existen especies de micobacterias muy relacionadas genéticamente, como el caso de *M. scrofulaceum* y *M. marinum*, las cuales mantienen una homología del 71 al 79% con respecto a Mapt, en la región IS 900 (55, 56), *M. a. avium* y *M. intracellulare*, son las especies micobacterianas más relacionadas desde el punto de vista genético (56)), además de que tiene la ventaja de mejorar la sensibilidad en la detección de esta micobacteria; sin embargo en recientes años, se han encontrado algunas secuencias homólogas a la IS 900 (genes IS 900-*like*) en especies de micobacterias ambientales, aunque también se ha demostrado que es extremadamente raro que cepas diferentes a Mapt contengan este transposon, por lo que se han comenzado a trabajar con elementos alternativos, como las secuencias F57, IS*Mav2* y Hsp X. La F57 y Hsp X se encuentran en copias sencillas, mientras que al menos tres copias de IS*Mav2* están presentes en el genoma de Mapt. Aunque estos marcadores no son tan sensibles como la IS 900, son más específicos, lo que disminuye resultados falsos positivos (13, 57, 58, 59, 60, 61).

A continuación se describen las secuencias arriba mencionadas:

- F57: Secuencia de 620 pb con un contenido de GC del 58,9%. Se encuentra presente en una sola copia en el genoma de Mapt, este elemento provee una alta especificidad para la identificación de esta micobacteria, sin embargo, la presencia de solo una copia hace que su sensibilidad sea muy reducida.

- *ISMav2*: Es una secuencia de inserción específica de *Mapt*, se han detectado al menos tres copias de esta secuencia en el genoma de *Mapt*. Sin embargo, la especificidad de esta secuencia para la identificación específica de la micobacteria es reducida, ya que un estudio mencionó la amplificación de esta secuencia por PCR en *M. fortuitum*, *M. smegmatis*, así como en dos especies no pertenecientes a este género.
- *HspX*: Este gen también se encuentra en una sola copia en el genoma de *Mapt*, por lo que se reduce su sensibilidad para la identificación del microorganismo.

Una de las ventajas principales de la PCR en tiempo real es que el proceso completo se realiza en el termociclador, lo que ayuda a disminuir el riesgo de una posterior contaminación en el laboratorio, no es necesario realizar un gel de agarosa para visualizar los productos de amplificación, los resultados se obtienen en el momento en el que la amplificación está ocurriendo, lo que se traduce en un ahorro de tiempo. Este sistema incluye dos componentes: elementos ópticos integrados al termociclador y marcadores fluorescentes que proporcionan información acerca de la amplificación a lo largo de los ciclos de la PCR, de forma que a mayor producto mayor fluorescencia se emitirá (53, 54).

La línea base se refiere a los ciclos iniciales en los que no hay cambios detectables en la cantidad de fluorescencia y solo detecta la fluorescencia basal, el Threshold es el umbral en el que se produce un cambio significativo en la fluorescencia, los valores umbral de ciclo (Ct), son determinados por la identificación del ciclo de corte entre el threshold y la curva de amplificación (figura 1) (53).

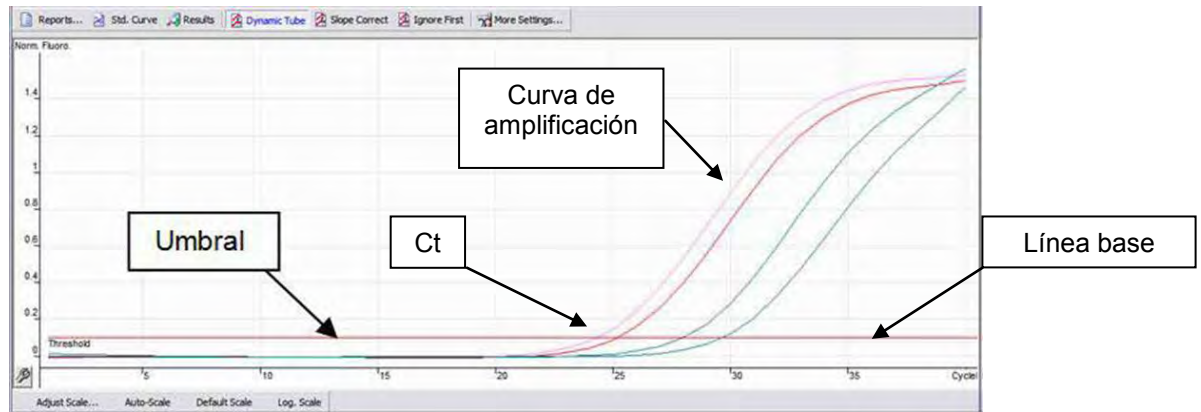


Figura 1. Gráfico de la Q-PCR, donde se muestra la línea base, el ciclo umbral (Ct) y la curva de amplificación.

Fases de la PCR.

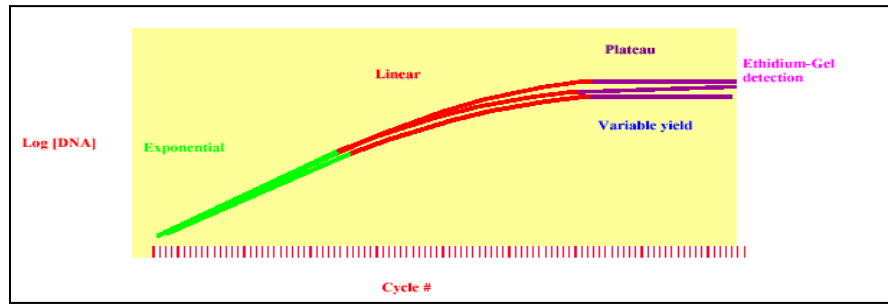


Figura 2. Gráfico en donde se muestra cada una de las fases de una curva de amplificación, fase exponencial, lineal y meseta, observadas en la Q-PCR.

- Exponencial: En cada ciclo se aumenta al doble la cantidad de producto.
- Lineal: Los componentes de la reacción se empiezan a consumir, la reacción es lenta y los productos se comienzan a degradar.
- Meseta (detección del producto en geles por métodos tradicionales): La reacción para, degradación de productos (Figura 2) (62).

Marcadores fluorescentes.

Por su menor costo, el método más utilizado son los fluoróforos que se unen a ADN de doble cadena, como el SYBR Green (genéricos), éstos no son específicos, ya que se unen a toda molécula de ADN de doble cadena, el uso de este colorante implica un diseño muy cuidadoso de los iniciadores con el fin de evitar la amplificación de ADN genómico contaminante; una vez que el colorante se une al ácido nucleico formado en la reacción, éste emite una señal fluorescente que se procesa en tiempo real. Otra alternativa, de mayor costo pero recomendada, es el uso de sondas específicas fluorescentes, como las sondas TaqMan (específicos), que emplean sondas de ácidos nucleicos que se unen a amplicones específicos (productos de PCR) evitando así posibles secuencias inespecíficas presentes en el producto de PCR, esta sonda lleva adherida una molécula fluorescente y otra molécula que inhibe dicha fluorescencia (“quencher”), de tal forma que solo cuando la sonda es desplazada de su sitio por acción de la ADN polimerasa la molécula fluorescente se libera de la acción del “quencher” y emite fluorescencia al ser iluminada con un láser (53, 54, 62).

La cuantificación de la fluorescencia emitida durante cada ciclo de la PCR será proporcional a la cantidad de ADN que se está amplificando. Para que esta técnica sea válida se requiere realizar en paralelo una curva patrón en las mismas condiciones para conocer la cantidad total de ADN que se está amplificando (63).

Generalmente se emplean dos estrategias para la cuantificación de los productos: cuantificación absoluta y cuantificación relativa.

- Cuantificación absoluta: relaciona la señal obtenida con la PCR en tiempo real al número de copias fijo de una secuencia estándar utilizando una curva de calibración.
- Cuantificación relativa: No requiere estándares con concentraciones determinadas. Esta técnica se utiliza para obtener la magnitud de los cambios fisiológicos en los niveles de expresión genética de un gen en estudio en comparación con uno o más genes de referencia. Se basa en cálculos comparando los valores de Ct. (53).

JUSTIFICACIÓN.

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

HIPÓTESIS.

La Q-PCR mejorará el diagnóstico en bovinos infectados o sospechosos a paratuberculosis durante la fase subclínica de la enfermedad.

OBJETIVO GENERAL.

Mediante la Q-PCR, detectar en hijas de vacas infectadas con paratuberculosis la excreción de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* a través de las heces.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- Estandarizar una prueba de PCR en tiempo real para el diagnóstico de paratuberculosis en bovinos, comparándola con aislamiento bacteriológico y ELISA, para así determinar su sensibilidad y especificidad.
- Establecer y comparar la excreción de Mapt a través de las heces con la presencia de anticuerpos en los animales estudiados.
- Determinar la utilidad de la Q-PCR en un hato de animales lecheros con historia de paratuberculosis.

MATERIAL Y MÉTODOS.

OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS.

Se obtuvieron muestras de sangre de 200 animales de la cuenca lechera de Tizayuca, Hgo (Rancho 1) a los que se les realizó un ELISA para detectar la presencia de paratuberculosis en el hato, a partir de los animales con resultado positivo se localizó a sus hijas de un año de edad (Rancho 2), muestreándolas de sangre y heces, cada tres meses, esto para determinar la excreción del bacilo a través de las heces y compararlo con la presencia de anticuerpos en el suero.

Muestreos del Rancho 2.		
Muestreo	Edad promedio.	Animales muestreados
I	12 meses	40
II	15 meses	38
III	18 meses	22
IV	21 meses	10
Total		110

Tabla 1. Número de animales muestreados en el rancho 2, en cada uno de los 4 muestreos.

La sangre fue tomada de la vena caudal y centrifugados a 180 xg por 10 minutos para la obtención del suero; las heces fueron tomadas en guantes de palpación directamente del recto y mantenidas en refrigeración hasta su utilización.

No se logró muestrear el mismo número de animales durante los cuatro muestreos, debido a que al ser un rancho de producción existe la movilización de animales y pérdidas de aretes.

EXTRACCIÓN DE ADN.

Se realizó de acuerdo con la técnica de Garrido *et al* (64).

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

Se tomaron 20 ml del sobrenadante y se centrifugó a 180 xg por 10 minutos. A la pastilla obtenida se le realizaron 3 lavados con 5 ml de PBS.

Se resuspendió la pastilla en 1.5 ml de PBS y se transfirió a microtubos, para centrifugarlo a 1260 xg durante 5 minutos, se eliminó el sobrenadante y la pastilla fue resuspendida en 500 µl de TE-Tritón X100 y transferido a criotubos de 1.5 ml.

Las muestras se colocaron en nitrógeno líquido (-80°C) a intervalos de 5 minutos y en seguida en calor seco a 100°C también por 5 minutos, para la lisis celular.

A cada muestra se le colocaron 450 µl de isotiocianato de guanidina (5M) y 250 µl de acetato de amonio (7.5 M pH 6.3) y se mantuvieron en hielo por 15 minutos.

Las muestras se transfirieron a microtubos, donde se le colocaron 500 µl de cloroformo-alcohol isoamílico (1:24), se mezcló durante 10 segundos y se centrifugó a 1260 xg durante 15 minutos. La fase acuosa fue transferida a un microtubo y se repitió esta operación.

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

Las muestras se centrifugaron a 1260 xg durante 15 minutos, se realizaron 2 lavados a la pastilla con un ml de etanol al 70%.

La pastilla se dejó secar a temperatura ambiente, para posteriormente resuspenderlo en 100 µl de agua bidestilada libre de DNAsas.

Las muestras de ADN se mantuvieron a -20°C hasta su utilización en la Q-PCR (52).

ESTANDARIZACIÓN DE LA Q-PCR.

Se realizó con 21 muestras de ADN provenientes de cultivo de Mapt, provenientes del cepario del laboratorio de Tuberculosis del CENID-microbiología, INIFAP.

Se utilizaron iniciadores para amplificar la IS900, la cuál es específica para detectar Mapt (PTB FP 5'AATGACGGTTACGGAGGTGGT 3' y PTB RP 5'GCAGTAATGGTCGGCCTTACC 3') (65).

Los iniciadores se probaron a diferentes concentraciones, de $0.3\ \mu\text{M}$, $0.2\ \mu\text{M}$, $0.1\ \mu\text{M}$ y $0.05\ \mu\text{M}$, la cantidad de ADN se probó a $2\ \mu\text{l}$, $3\ \mu\text{l}$ y $5\ \mu\text{l}$ (con una concentración en promedio de $44.13\ \text{ng}/\mu\text{L}$) modificando la cantidad de agua para tener un volumen final en la reacción de $25\ \mu\text{l}$. Se llevó a cabo mediante un método de SYBR-Green.

La amplificación se realizó utilizando el software del equipo SmartCycler PCR en tiempo real, con el siguiente programa: un ciclo a 95°C por 10 minutos, 40 ciclos a 95°C por 15 segundos, 60°C por un 30 segundos, a 72°C por 10 segundos y un ciclo final a 72°C por 30 segundos (65). Los resultados de Q-PCR se analizaron de acuerdo a lo descrito en el manual del termociclador (SmartCycler).

Se trabajaron muestras de ADN de otras especies de micobacterias como *Mycobacterium phlei*, *M. vaccae*, *M. avium*, *M. tuberculosis*, *M. bovis* y *M. bovis* BCG (Bácilo de Calmette-Guérin), para demostrar que no generaban resultados falsos positivos debidos a una reacción cruzada con Mapt.

DETERMINACIÓN DE LA SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DE LA Q-PCR.

Se calculó la sensibilidad y especificidad de la prueba con los resultados obtenidos de la Q-PCR a partir de los animales del rancho 2, utilizando la concentración de iniciadores y ADN en la que se obtuvieron los mejores resultados durante la estandarización. Estos resultados se evaluaron con una prueba de Kappa (k) o índice de concordancia para medir la asociación con los resultados obtenidos en el cultivo y el ELISA a partir de las heces y suero de los mismos animales, respectivamente. Se determinó la sensibilidad y especificidad de la prueba utilizando un cuadro de 2 x 2. Se estableció si había o no diferencia estadística entre ambas pruebas mediante la prueba de X^2 de Pearson, en donde si el valor de X^2 es menor de 0.05 quiere decir que existe diferencia estadística.

Todos estos cálculos se realizaron para cada uno de los cuatro muestreos de los animales del rancho 2.

CUANTIFICACIÓN DE LAS UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS (UFC).

Para poder cuantificar la excreción de bacilos a través de las heces por medio de la Q-PCR, se llevó a cabo la realización de una curva estándar y se trabajó con un aislamiento de Mapt, obtenido a partir de un bovino positivo a Q-PCR, el cual se creció en medio líquido de Proskauer & Beck durante cuatro semanas. Para cuantificar el crecimiento se tomó 1 ml de éste, y se realizó la lectura a 650 nanómetros (nm) en un espectrofotómetro, hasta ajustar una lectura a 0.682 densidades ópticas (OD), lo que equivale a 6.82×10^5 UFC / ml. A partir de esta muestra se realizaron cuatro diluciones décuples y cada una de ellas fue sembrada en 2 cajas de petri con agar Middlebrook. Las cajas de Petri se

dividieron en cuatro y en cada cuadrante se colocó una gota de 20 μl de la muestra correspondiente, por último se realizó el conteo de las colonias, obteniendo los siguientes resultados: 6.82×10^5 , 6.82×10^4 , 6.82×10^3 y 6.82×10^2 UFC /ml. Se realizó la extracción de ADN de estas 4 muestras, utilizando el método de Garrido et al (64), para posteriormente realizar la Q-PCR, bajo las mismas condiciones que se trabajaron las muestras de heces problema.

CULTIVO BACTERIOLÓGICO.

Se realizaron siembras por duplicado a partir de heces de todos los animales del estudio, mantenidas en refrigeración a 4°C, de acuerdo a la técnica de *Payeur* (66), en medio sólido de Herrold adicionado con yema de huevo y micobactina; manteniéndolas en incubación a 37 °C, durante 6 meses (18, 66).

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

En un tubo se agregaron 5 ml del sobrenadante y de la fase intermedia, se centrifugó a 180 xg durante 10 minutos, se decantó el sobrenadante y a la pastilla obtenida se le colocaron 3 ml de cloruro de benzalconio (Zephiran) al 3%, dejándolo en reposo por 30 minutos, posteriormente se centrifugó a 180 xg durante diez minutos. Se decantó el sobrenadante conservando aproximadamente un ml, en el cual se homogenizó la pastilla y con esta solución se realizó la siembra por duplicado en medio de Herrold adicionado con yema de huevo con y sin micobactina, dejando incubar las muestras a 37°C, los cultivos se revisaron semanalmente durante 6 meses (66, 67).

ELISA.

Las muestras de suero se mantuvieron en congelación y se trabajaron por duplicado de acuerdo a lo descrito por Martínez en el 2009 (50). Se colocaron 100 µl de antígeno protoplásmico de Mapt (61) a una concentración de 1.25 µg/100 µl, diluido en solución amortiguadora de carbonatos (0.1 M pH 9.6) por pozo en la placa, se mantuvieron en incubación a 37 °C, durante 24 horas (68), se lavaron 4 veces con 300 µl de solución de lavado PBS-Tween 20 (0.1% pH 7.4) y se colocaron 100 µl de solución de bloqueo (Albúmina 1%, Fluka Biochemika), se incubó a 37°C durante una hora y pasado ese tiempo se le realizaron 4 lavados con PBS-Tween 20. Las placas se mantuvieron a 4°C hasta su utilización.

Se trabajó con un suero control positivo de Mapt (Allied Monitor, INC.) y con un suero control negativo, diluidos en una solución al 0.02% de *M. phlei* (Allied Monitor, INC.) en una solución amortiguadora de fosfatos que contiene 0.1% de gelatina y 0.05% de Tween 80 (60) a una concentración de 1:160, esto para evitar reacciones cruzadas.

En cada pozo se colocaron 100 µl de los sueros controles negativos, positivos y sueros problema (1:160), se incubaron a temperatura ambiente por 30 min, se lavaron con 300 µl de PBS-Tween 20 4 veces, se aplicaron 100 µl de conjugado anti IgG bovino (Peroxidasa de rábano, SIGMA) (1:2000), en cada pozo, se incubó a temperatura ambiente por 30 min, se eliminó el contenido de la placa y se lavó con PBS-Tween 20 4 veces, se agregaron 100 µl de solución de sustrato 2-2' azino-di-(3-etil-benzothiazol-sulfona-6)-(diamonio) (ABTS) (AMPRESKO), se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente y se realizó la lectura a 650 nm en un espectrofotómetro (BioTek) (50).

El punto de corte fue de 0.22 desviaciones ópticas (OD) y se estableció con dos desviaciones estándar y 95 % de confianza.

RESULTADOS.

ESTANDARIZACIÓN DE LA Q-PCR.

Las cantidades que mejor dieron resultado para realizar la estandarización de la Q-PCR fueron 132.39 ng de ADN y las condiciones para 22 μ l de premezcla fueron 12.5 μ l de SYBR Green, 0.05 μ M de ptb FP, 0.05 μ M de ptb RP y 9 μ L de agua; siendo el volumen final a 25 μ l.

Al realizar la Q-PCR con la concentración de los primers a 0.3 μ M, se observó una amplificación de todas las muestras evaluadas, incluyendo el control negativo. Esto se corrigió al disminuir la concentración de los primers a 0.05 μ M, en donde se observó la amplificación de las muestras, mientras que el control negativo se mantuvo sin mostrar amplificación (Figuras 3 y 4).

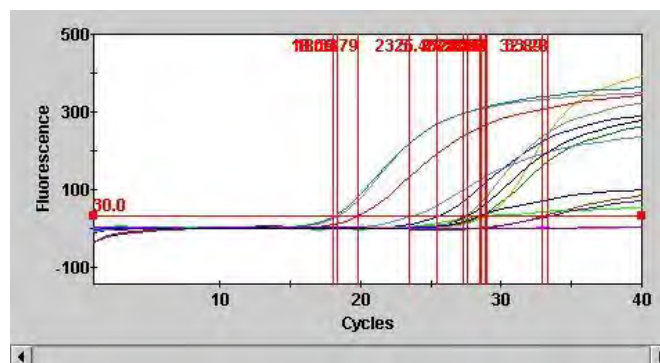


Figura 3. Q-PCR donde se muestra la curva de amplificación de las 21 muestras de ADN provenientes de cultivo de Mapt, utilizadas para la estandarización utilizando una concentración de los iniciadores de 0.05 μ M.

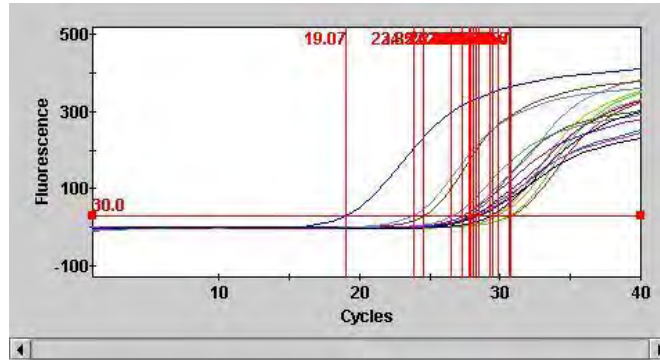


Figura 4. Q-PCR donde se muestra la curva de amplificación de las 21 muestras de ADN provenientes de cultivo de Mapt, utilizadas para la estandarización utilizando una concentración de los iniciadores de $0.3 \mu\text{M}$.

La Q-PCR realizada con ADN de *M.bovis*, *M. avium*, *M. vaccae*, *M. phlei*, *M. tb*, y BCG, no mostró ninguna curva de amplificación, lo que indica que la prueba no emite resultados falsos positivos al evaluar muestras de ADN de otras especies de micobacterias. Se utilizaron las mismas concentraciones de iniciadores antes mencionadas (Figura 5).

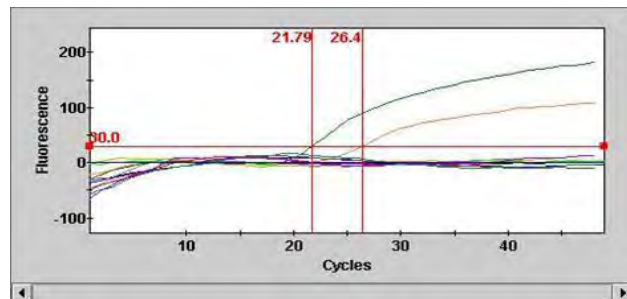


Figura 5. Q-PCR con ADN de *M.bovis*, *M. avium*, *M. vaccae*, *M. phlei*, *M. tb*, y BCG, utilizando una concentración de los iniciadores de $0.05 \mu\text{M}$.

RESULTADO DEL PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS.

En el muestreo realizado en el rancho 2, (hijas de madres positivas y algunas al azar), se obtuvieron muestras de sangre y heces de 40 animales, esto para observar la excreción del el bacilo a través de las heces y compararlo con la

cantidad de anticuerpos. En los siguientes tres muestreos no se encontraron a todos los animales, ya que muchos de ellos carecían de arete de identificación ó había sido movilizados a un rancho diferente. Los datos obtenidos a partir del ELISA, cultivo y Q-PCR, de los cuatro muestreos, se presentan en la tabla 2.

Muestreos del rancho 2.				
	Muestreo I (n=40)	Muestreo II (n=38)	Muestreo III (n=22)	Muestreo IV (n=10)
ELISA positivos	2	3	3	2
Q-PCR positivos	5	6	2	3
Cultivo positivos	2	4	2	1

Tabla 2. Resultados positivos a ELISA, Q-PCR y cultivo obtenidos en los cuatro muestreos del rancho 2.

Al finalizar los 4 muestreos se detectaron 10 animales positivos a ELISA, 16 animales positivos a Q-PCR y 9 positivos a cultivo, sin embargo no en todos los casos se trataban de los mismos animales. Los resultados de las becerras que coinciden en sus resultados positivos a una, 2 o 3 de las pruebas diagnósticas se muestran en la Figuras 6, 7, 8 y 9.

Muestreo 1 (n=40).

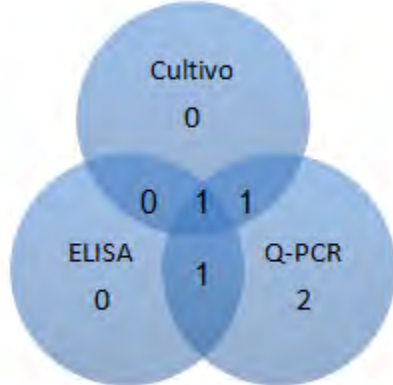


Figura 6. Se muestran los animales que mostraron resultados positivos a una, 2 o 3 pruebas diagnósticas en el primer muestreo: 2 animales positivos a Q-PCR, pero negativos a ELISA y cultivo, uno positivo a cultivo y Q-PCR, uno positivo a ELISA y Q-PCR y un animal con resultado positivo a las 3 pruebas (ELISA, Q-PCR y cultivo).

Muestreo 2 (n=38).

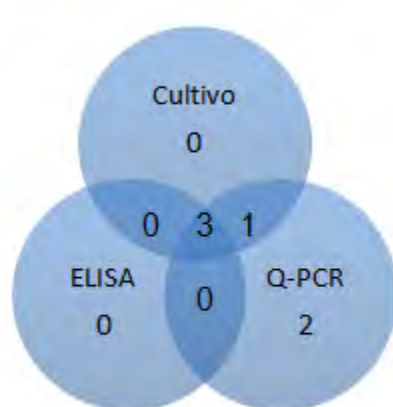


Figura 7. Se muestran los animales que mostraron resultados positivos a una, 2 o 3 pruebas diagnósticas en el segundo muestreo: 2 animales positivos a Q-PCR, pero negativos a ELISA y cultivo, uno positivo a cultivo y Q-PCR, un animal con resultado positivo a las 3 pruebas (ELISA, Q-PCR y cultivo).

Muestreo 3 (n=22).

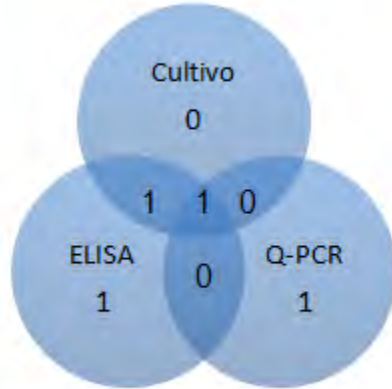


Figura 8. Se muestran los animales que mostraron resultados positivos a una, 2 o 3 pruebas diagnósticas en el tercer muestreo: 1 animal positivo a Q-PCR, un animal positivo a ELISA, uno positivo a ELISA y cultivo y un animal con resultado positivo a las 3 pruebas (ELISA, Q-PCR y cultivo).

Muestreo 4 (n=10).

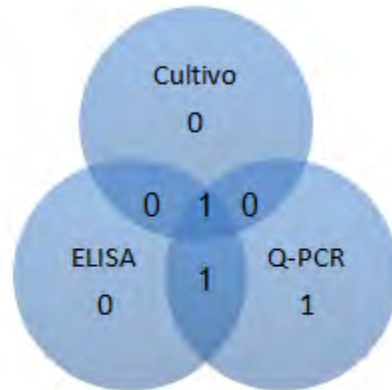


Figura 9. Se muestran los animales que mostraron resultados positivos a una, 2 o 3 pruebas diagnósticas en el cuarto muestreo: 1 animal positivo a Q-PCR, un animal con resultado positivo a ELISA y Q-PCR y un animal con resultado positivo a las 3 pruebas (ELISA, Q-PCR y cultivo).

En el primer muestreo realizado en el rancho 1 se obtuvieron muestras de sangre 200 animales adultos, de entre cinco y siete años de edad, esto para conocer

cuántos animales tenían anticuerpos contra Mapt, obteniendo 24 animales con resultado positivo a esta prueba.

DETERMINACIÓN DE LA SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DE LA Q-PCR.

Los resultados de la sensibilidad y especificidad de la prueba, así como los valores de kappa y X^2 con los resultados obtenidos de la Q-PCR para cada muestreo, se muestran en las tablas 3 y 4; se utilizaron las mismas condiciones en las que se obtuvieron los mejores resultados durante la estandarización. Todos estos cálculos se realizaron para cada uno de los cuatro muestreos de los animales del rancho 2.

Estos análisis estadísticos se obtuvieron con el programa Software Intercooled Stata 7.0.

K= índice de concordancia.

VP+ = valor predictivo positivo

Se= sensibilidad

VP- = valor predictivo negativo.

Esp= especificidad

Pr= Valor de X^2

Q-PCR comparado con ELISA						
No. de Muestreo	K	Se %	Esp %	VP+ %	VP- %	Pr
I (n=40)	0.53	100	92	40	100	0.0001
II (n=38)	0.62	100	91	50	100	0.0000
III (n=22)	0.22	33	89	33	89	0.1424
IV (n=10)	0.73	100	87	66	100	0.0079

Tabla 3. Resultados de índice de concordancia, sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo, valor predictivo negativo y X^2 , de los cuatro muestreos del rancho 2, al comparar la Q-PCR con el ELISA.

Q-PCR comparado con Cultivo						
No. de Muestreo	K	Se %	Esp %	VP+ %	VP- %	Pr
I (n=40)	0.538	100	92	40	100	0.0001
II (n=38)	0.771	100	94	66	100	0.0000
III (n=22)	0.294	50	85	33	92	0.1131
IV (n=10)	0.411	100	77	33	100	0.0537

Tabla 4. Resultados de índice de concordancia, sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo, valor predictivo negativo y X^2 de los cuatro muestreos del rancho 2, al comparar la Q-PCR con el cultivo.

CUANTIFICACIÓN DE LAS UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS (UFC).

Se obtuvieron 3 curvas de amplificación a partir de las 4 diluciones con las que se trabajó.

Las diluciones correspondientes a 6.82×10^5 , 6.82×10^4 y 6.82×10^3 UFC/ g de heces, mostraron una curva de amplificación en los ciclos 26.81, 29.77 y 35.62, respectivamente (Figura 10).

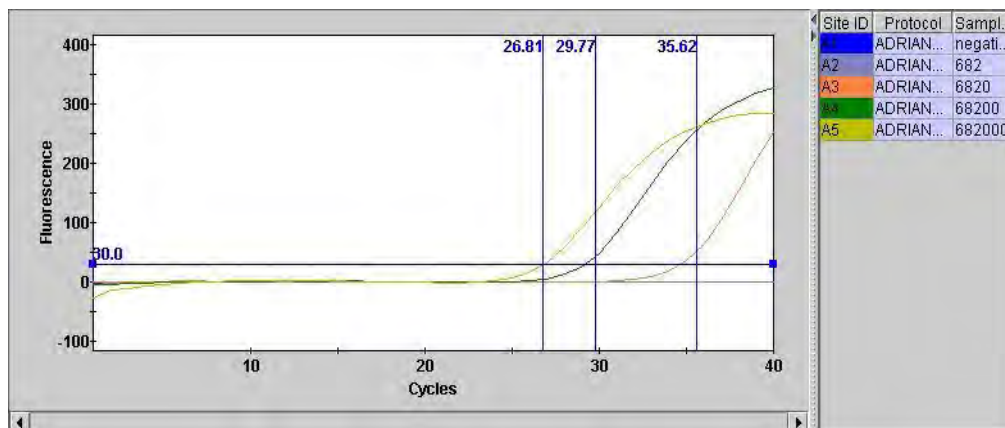


Figura 10. Q-PCR donde se muestran las curvas de amplificación correspondientes a las diluciones 6.82×10^5 , 6.82×10^4 y 6.82×10^3 UFC de Mapt/g de heces.

A partir de la gráfica anterior (Figura 10) se obtuvo la curva estándar o curva patrón, la cual debe mostrar una pendiente con un valor mayor a 0.95 para ser válida y utilizada en la cuantificación de muestras problema.

En el caso de nuestra curva estándar el valor de la pendiente fue de 0.965, por lo que pudo ser utilizada en la cuantificación de las muestras de ADN. El punto más alto de la recta corresponde a la dilución de 6.82×10^5 UFC/g de heces y el punto medio y más bajo a 6.82×10^4 y 6.82×10^3 UFC/g de heces, respectivamente. (Figura 11).

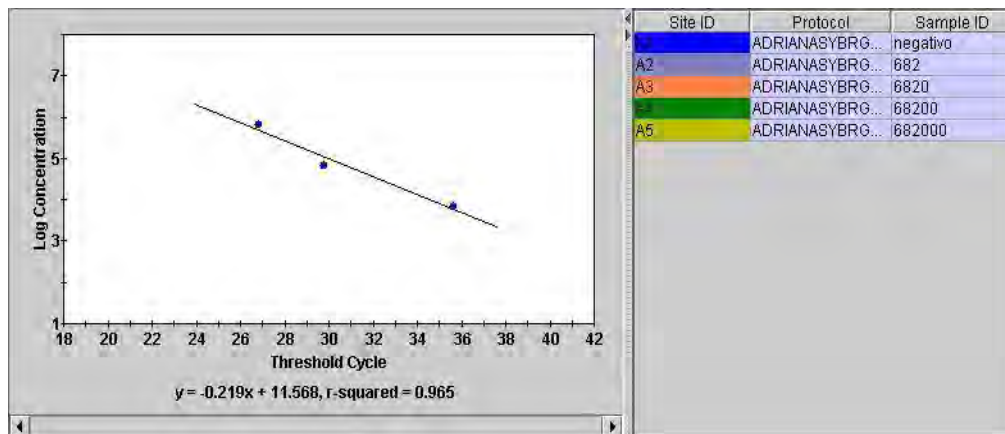
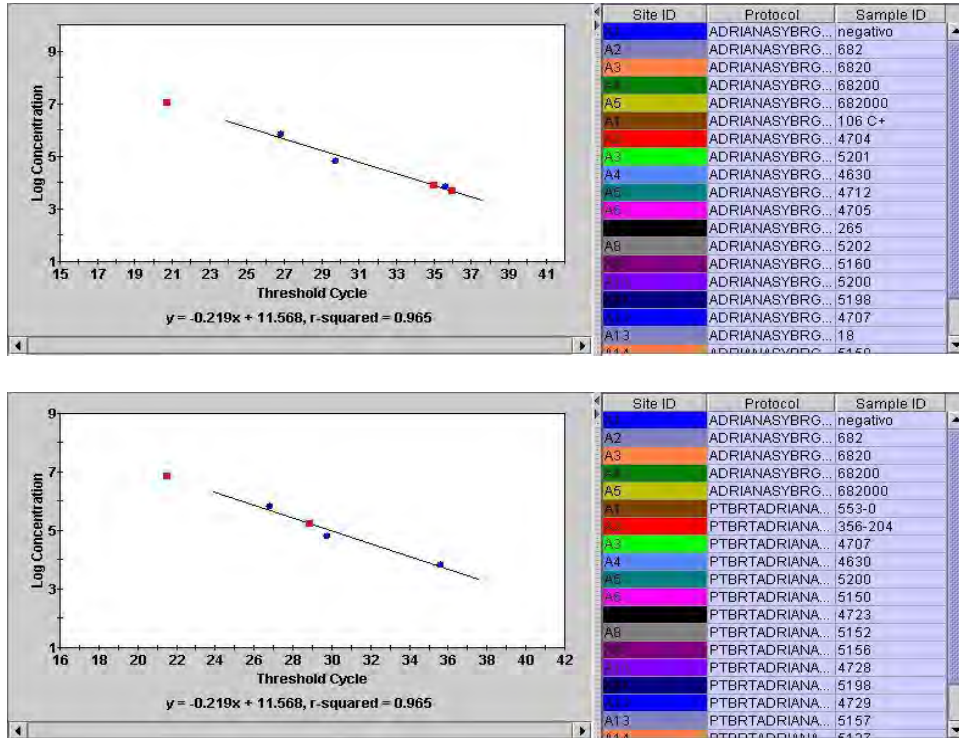


Figura 11. Q-PCR donde se muestra la curva estándar obtenida en este trabajo. El punto más alto de la recta corresponde a la dilución de 6.82×10^5 UFC/g de heces y el punto medio y más bajo a 6.82×10^4 y 6.82×10^3 UFC/g de heces, respectivamente.

Esta curva estándar fue importada a todas las gráficas de Q-PCR de muestras provenientes de los cuatro muestreos del rancho 2, observando una alineación de dichas muestras de ADN con la curva estándar (Figura 12 y 13). Posteriormente se realizaron los cálculos para determinar la cantidad de UFC/g de heces que se excretan a través de las heces de estos animales (tabla 5).



Figuras 12 y 13. Alineación de las muestras de ADN del rancho 2 de diferentes muestreos (puntos rojos), con respecto a la curva estándar (puntos azules), a partir de la cual se obtiene la cantidad de UFC excretadas a través de las heces.

Muestreo	Cantidad promedio de UFC excretadas/g de heces
I	No se pudo determinar
II	<ul style="list-style-type: none"> • 5.11×10^4 • 5.11×10^4
III	<ul style="list-style-type: none"> • 1.10×10^6 • 2.03×10^5
IV	<ul style="list-style-type: none"> • 1.40×10^6 • 7.92×10^4 • 4.77×10^4

Tabla 5. Resultados obtenidos de la excreción de UFC/g de heces de dos animales en el muestreo II, dos animales en el III y tres animales en el muestreo IV, realizados en el rancho 2.

CULTIVO BACTERIOLÓGICO.

El crecimiento de las colonias bacterianas fue observado a partir de la octava semana de incubación en medio de Herrold adicionado con yema de huevo y micobactina. La afinidad tintorial y morfología bacteriana se confirmó mediante la tinción de Ziehl-Nielsen, donde se observaron bacilos ácido alcohol-resistentes.

Los resultados del cultivo del rancho 2 se muestran en la tabla 8:

No. de Muestreo	Positivos	Negativos	Edad promedio (meses)
I (n=40)	2 (5%)	38	12
II (n=38)	4 (10.52%)	34	15
III (n=22)	2 (13.63%)	19	18
IV (n=10)	1 (11.11%)	9	21

Tabla 8. Número de animales que mostraron un resultado positivo y negativo al cultivo por muestreo, así como el porcentaje de resultados positivos.

ELISA.

El punto de corte utilizado en esta prueba fue de 0.22 OD y se determinó mediante el uso de dos desviaciones estándar y 95% de confianza, por lo tanto los animales con lecturas igual a mayores a 0.22 OD fueron considerados como positivos y los animales con lecturas menores a 0.22 fueron considerados como negativos.

Se realizó el ELISA a 200 animales del rancho 1, obteniendo 24 resultados positivos (12%).

Los resultados de ELISA del rancho 2 se muestran en la tabla 6:

No. de Muestreo	Positivos	Negativos	Edad promedio (meses)
I (n=40)	2 (5%)	38	12
II (n=38)	3 (7.89%)	35	15
III (n=22)	3 (13.63%)	19	18
IV (n=10)	2 (20%)	8	21

Tabla 6. Número de animales que mostraron un resultado positivo y negativo a ELISA por muestreo, así como el porcentaje de resultados positivos.

Q-PCR.

Los resultados de la Q-PCR del rancho 2 se muestran en la tabla 7:

No. de Muestreo	Positivos	Negativos	Edad promedio (meses)
I (n=40)	5 (12.5%)	35	12
II (n=38)	6 (15.78%)	32	15
III (n=22)	2 (9.09%)	20	18
IV (n=10)	3 (30%)	7	21

Tabla 7. Número de animales que mostraron un resultado positivo y negativo a la Q-PCR, por muestreo, así como el porcentaje de resultados positivos.

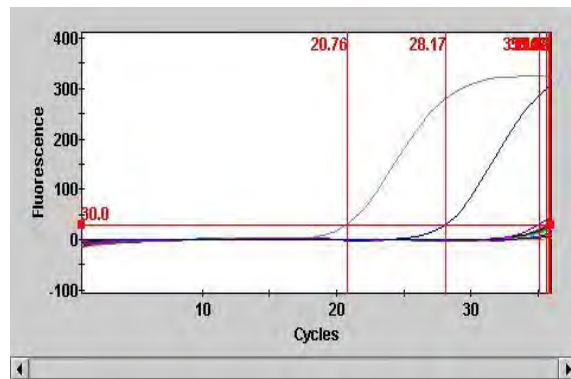
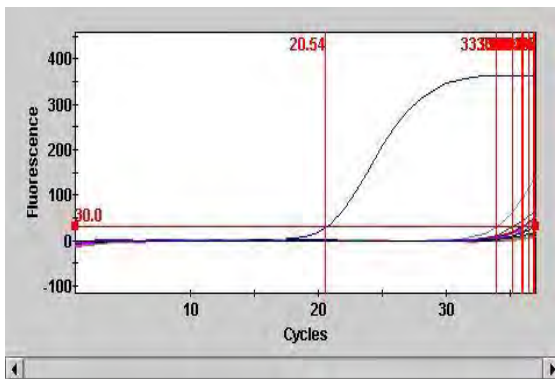


Fig 14 y 15. Q-PCR donde se muestran las curvas de amplificación de algunos animales pertenecientes al rancho 2.

Los resultados obtenidos a partir de ELISA, Q-PCR y cultivo, son similares a los reportes que mencionan que la prevalencia de la paratuberculosis va de un 5 a un 25% (1).

Con los resultados obtenidos a partir de los cuatro muestreos realizados en este trabajo se logró determinar la velocidad con la que se disemina esta enfermedad, se determinó que en un hato con 200 animales con una prevalencia del 12 %, se presentó una incidencia de dos animales cada dos meses, por lo que es importante contar con pruebas diagnósticas que nos permitan identificar a los animales en la etapa subclínica y de esta manera poder tomar las medidas de control necesarias.

DISCUSIÓN.

En un estudio realizado en Estados Unidos en el 2002 por Fang et al (69), en donde se evalúa una PCR en tiempo real, utilizando muestras de heces de 41 bovinos, se menciona que al comparar su prueba con el cultivo bacteriológico, obtienen una kappa de 0.94, una sensibilidad del 93% y una especificidad del 92% (69). La sensibilidad, especificidad y kappa promedio de la Q-PCR estandarizada en este trabajo, al comparar con el cultivo bacteriológico, corresponden al 87.5%, 87% y 0.5035, respectivamente, y al compararla con un ELISA, se obtiene una sensibilidad del 83%, una especificidad del 90% y un índice de concordancia de 0.525, la concordancia obtenida con ambas pruebas es aceptable, por lo que la Q-PCR puede ser utilizada como una prueba diagnóstica en paratuberculosis. En el trabajo realizado por Fang et al, mencionan el uso de sondas (molecular beacons), a comparación de este trabajo donde se utilizó un método con SYBRGreen, esto podría explicar el porqué sus resultados de sensibilidad, especificidad y concordancia fueron más altos a diferencia de los obtenidos en esta tesis.

Los valores de sensibilidad, especificidad y kappa son mayores en el muestreo 1, 2 y 4 donde la sensibilidad es del 100%, la especificidad va del 89 al 92% y la kappa del 0.53 al 0.73, en comparación con el muestreo 3 donde se obtuvo una sensibilidad, especificidad y kappa del 33%, 89% y 0.22, respectivamente, lo anterior puede ser explicado porque en esta enfermedad la excreción del bacilo es intermitente y al momento de la toma de la muestra no se estaba eliminando, tampoco se puede descartar un error durante los procedimientos, como una toma de muestras, una extracción de ADN, Q-PCR o ELISA no adecuadas o una

contaminación en las muestras (70), además de que en este muestreo se detectaron una menor cantidad de animales positivos a ELISA y cultivo bacteriológico.

En este estudio se observó que algunos becerros, con promedio de edad de 12 meses al primer muestreo y 24 meses en el último, que fueron muestreados tanto de heces como sangre durante un año para realizar el diagnóstico de paratuberculosis por Q-PCR y ELISA, tuvieron resultados negativos a ELISA (muestreo I), pero fueron detectados como positivos a la Q-PCR a partir del muestreo I, esto porque al ser *Mapt* una bacteria intracelular y la paratuberculosis una enfermedad crónica, la respuesta inmune humoral, detectada por el ELISA, aparece en las etapas más tardías de la infección (etapa clínica), mientras que en la etapa subclínica predomina una inmunidad de tipo celular y el bacilo comienza a ser excretado de forma intermitente (33, 69).

Se realizaron cuatro muestreos, cada tres meses, para detectar la excreción de *Mapt* a través de las heces; se detectó excreción de *Mapt* a partir del primer muestreo, en animales de un año de edad promedio. En un estudio realizado en España en 2009 por Juste et al (27), se menciona una excreción de 4.70×10^6 UFC/día/ 100 bovinos, en un hato con problemas de paratuberculosis y de 1.92×10^6 UFC/día/100 bovinos, en animales vacunados contra la enfermedad, estos datos son mucho menores a los obtenidos en este trabajo, ya que un solo animal de los que se evaluaron en este trabajo excreta 1.10×10^6 UFC/g de heces, en comparación con las 4.70×10^6 UFC/día/ 100 bovinos que reportan Juste et al; se realizó un estudio de prevalencia en León, España en el 2009 donde se menciona

una prevalencia de paratuberculosis del 1%, esto podría ser la explicación a la gran diferencia en excreción de UFC entre ambos trabajos (27, 71). Otro estudio realizado en 2010 por Khol (70), en el que trabajaron con un bovino, infectado naturalmente con Mapt, de 2.5 años al que le realizaron 9 muestreos de heces durante 380 días y que fueron evaluadas por Q-PCR, concluyen que el número de copias de IS900 que detectaron, aumenta conforme los muestreos avanzan, con excepción del tercer muestreo donde se observa una disminución en el número de estas, y que a partir del cuarto muestreo aumentan (10^5 a 10^7 copias de IS900/g de heces), también aclaran que en el caso de las UFC, en cultivo, estas eran demasiado numerosas para poder contarlas; Los resultados obtenidos en este trabajo, muestran que la excreción de Mapt comienza en etapas tempranas de la infección (fase subclínica), antes de que el animal infectado sea positivo a la prueba serológica y que las cantidades de excreción varían; cabe hacer mención que al realizar los muestreos en un rancho de producción, donde existía el movimiento de animales, no se lograron realizar los cuatro muestreos en todos los animales, sin embargo se logró observar un comportamiento similar, debido a que en los muestreos de ambos trabajos se observa un aumento en el número de copias de IS900/g de heces lo cual podría reflejar el número de UFC/g de heces (27, 70).

Se detectaron 10 animales positivos utilizando un ELISA, 16 animales con la Q-PCR y 9 animales a partir del cultivo bacteriológico, estos datos muestran que la Q-PCR detecta más animales que las otras dos pruebas diagnósticas, lo cual es importante ya que al tratarse de animales jóvenes pueden ser detectados como

positivos incluso en la etapa subclínica de la enfermedad y en cuanto comienzan a eliminar el bacilo, lo cual permite la toma de decisiones para el control y erradicación de la enfermedad, como la separación de los animales infectados de los sanos (52).

Utilizando el ELISA se lograron obtener 10 animales positivos de las 110 muestras evaluados, lo que representa un 9.09%, estos resultados corresponde a los reportes que mencionan que la prevalencia de la paratuberculosis va de un 5 a un 25% y a estudios de tipo epidemiológicos transversales realizados en ganado bovino de los Estados de Guanajuato, Aguascalientes y San Luis Potosi que indican que existe una seroprevalencia de paratuberculosis del 10.25 %, 13.43% y 31.3 %, respectivamente (1, 44, 45).

En este estudio se observó que la cantidad de animales positivos a la Q-PCR, ELISA y cultivo fue aumentando conforme avanzaban los muestreos, ya que la presencia de anticuerpos contra los antígenos de Mapt está relacionada con el número de bacterias presentes y con su eliminación a través de las heces durante el transcurso de la enfermedad (52).

De las 110 muestras trabajadas, 16 fueron positivos a la Q-PCR y se lograron obtener 9 aislamientos de Mapt, lo que equivale al 14.54 % y 8.18%, respectivamente, estos resultados coinciden con lo descrito por *Erume et al* (72), quienes detectaron una mayor cantidad de animales positivos a paratuberculosis a partir de heces, utilizando la PCR anidada y una menor cantidad mediante el aislamiento bacteriológico, esto puede deberse a la capacidad de la Q-PCR de

detectar bacterias no viables ni cultivables, también es posible que los cultivos negativos sean resultado de una pequeña cantidad de Mapt eliminado por las heces, ya que los nueve animales a partir de los cuales se obtuvieron los aislamientos pueden ser considerados excretors bajos, puesto que solo se observaron menos de 10 colonias por tubo, esto de acuerdo a lo publicado en el 2009 por Juste et al, donde menciona que existen excretors bajos (< 10 UFC, en promedio 2 UFC por tubo), excretors medio (10 a 50 UFC, en promedio 20 UFC por tubo) y excretors altos (> 50 UFC, en promedio 200 UFC por tubo) (64), o a una disminución en la viabilidad de la bacteria durante la descontaminación de las muestras; también encontramos animales que mostraron cultivo positivo y Q-PCR negativo (70).

El cultivo bacteriológico a partir de muestras de tejidos, heces, leche, semen, entre otros, es considerado como la prueba de oro para el diagnóstico de paratuberculosis en bovinos, aunque presenta algunas limitantes, ya que cuenta con una especificidad del 100% pero tiene una sensibilidad muy baja, esto debido a la excreción tardía del microorganismo a través de las heces, leche y semen, la excreción intermitente del bacilo y/o la también tardía aparición de Mapt en los linfonodos regionales y otros órganos (70), además que el procedimiento requiere de ocho a 16 semanas de incubación como mínimo para el aislamiento de Mapt. Otra desventaja que presenta el cultivo es la contaminación de las muestras con otros microorganismos, principalmente hongos. Utilizando la Q-PCR los resultados se pueden obtener en 24 horas, lo que representa una ventaja de tiempo en comparación con el aislamiento bacteriológico, además de que tiene la posibilidad de cuantificar las UFC/g de heces (52, 70).

En la Q-PCR desarrollada en este trabajo, se utilizaron iniciadores para amplificar la IS900 ya que al encontrarse de 14 a 18 copias de esta secuencia dentro del genoma de la micobacteria mejora la sensibilidad en la detección Mapt; en años recientes, se han encontrado algunas secuencias homólogas a la IS900 (genes IS 900-*like*) en especies de micobacterias ambientales (sin embargo, se ha demostrado que es extremadamente raro que cepas diferentes a Mapt contengan este transposón) por lo que se han comenzado a trabajar con elementos alternativos, como las secuencias SF57, ISMav2 y Hsp X. La SF57, aunque se cree que es más específica en la detección de Mapt, la presencia de una sola copia en el genoma de la micobacteria disminuye su sensibilidad, al compararla con la IS900; una forma de mejorar la especificidad al utilizar iniciadores para la IS900, es mediante el diseño de iniciadores que amplifiquen regiones cercanas a la región 5' de ésta secuencia de inserción (región más conservada), aumentando de ésta manera la especificidad de la prueba. (28, 57, 58, 59, 60, 61, 70).

En el presente trabajo también se realizó una Q-PCR a extracciones de ADN de distintas especies de micobacterias como *Mycobacterium phlei*, *M. vaccae*, *M. avium*, *M. tuberculosis*, *M. bovis* y *M. bovis* BCG (Bacilo de Calmette-Guérin), para demostrar que no generaban resultados falsos positivos debido a una amplificación inespecífica; Al realizar la prueba a estas muestras se demostró que la Q-PCR no genera resultados positivos para ninguna de ellas y por lo tanto puede ser utilizada como herramienta en el diagnóstico de paratuberculosis en bovinos (59).

La paratuberculosis es una enfermedad que ocasiona grandes pérdidas económicas en nuestro país y en todo el mundo, la mayoría de los casos clínicos se observan en animales de tres a seis años de edad mientras que los animales más jóvenes generalmente no muestran casos clínicos y son muy pocas las pruebas diagnósticas capaces de detectar la infección en esta etapa, aunque ya se eliminan organismos infecciosos en este periodo (70), por lo tanto es muy importante contar con pruebas diagnósticas que detecten la eliminación del bacilo en la etapa subclínica del animal, lo anterior con la finalidad de evitar la diseminación de la enfermedad e implementar las medidas necesarias de control y erradicación.

Con la evaluación de la Q-PCR, fue posible desarrollar una prueba que logró detectar la excreción de bacilos en bovinos infectados antes de que pudieran ser diagnosticados como positivos por pruebas serológicas, además de que se obtuvieron una sensibilidad, especificidad e índice de concordancia aceptables, por lo que se pudo comprobar la hipótesis de esta trabajo. La Q-PCR es una técnica que puede cumplir con las características antes mencionadas.

CONCLUSIONES.

- Con la Q-PCR, fue posible desarrollar una prueba que logró detectar la excreción de bacilos en bovinos infectados antes de que pudieran ser diagnosticados como positivos por pruebas serológicas, además de que se obtuvieron una sensibilidad, especificidad e índice de concordancia aceptables, por lo que se pudo comprobar la hipótesis de esta trabajo.
- Utilizando la Q-PCR se logró detectar la eliminación de Mapt en animales provenientes de ranchos positivos a la enfermedad, esto es importante ya que a partir de esto se puede evitar la diseminación de la enfermedad e implementar las medidas necesarias de control y erradicación.
- La sensibilidad, especificidad y kappa promedio de la Q-PCR estandarizada en este trabajo, al comparar con el cultivo bacteriológico, corresponden al 87.5%, 87% y 0.5035, respectivamente, lo cual es satisfactorio ya que son similares a las encontradas en estudios publicados.
- Utilizando la Q-PCR estandarizada en este trabajo se obtuvieron 16 animales positivos de los 110 animales evaluados, lo que corresponde al 14.54%.
- Mediante el ELISA con antígeno protoplasmático de Mapt se obtuvieron 10 animales positivos, lo que equivale al 9.09%
- Se obtuvieron 9 cultivos bacteriológicos, lo que corresponde al 8.18%.
- Se logró cuantificar la excreción de UFC a través de las heces, obteniendo resultados similares a los reportados en la literatura.

- Se requiere continuar haciendo estudios con la Q-PCR, como la utilización de extracciones de ARN para diferenciar entre microorganismos viables y no viables, para así contar con una prueba de mejor calidad que permita un diagnóstico adecuado.

REFERENCIAS

1. Disney PR, Villaroel NR. Paratuberculosis: una amenaza emergente para la ganadería tropical. Manual de Ganadería Doble Propósito. Maracaibo-Venezuela. Departamento Médico Quirúrgico. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad de Zulia. 2005: 370-376.
2. Blood DC, Radostitis OM. Medicina Veterinaria. Enfermedades causadas por bacterias. Séptima Edición, McGraw-Hill Interamericana. 1992, 777-785.
3. Cocito C, Gilot P, Coene M, De Kesel M, Poupart P, Vannuffel P. Paratuberculosis. Clinical Microbiology Reviews, American Society for Microbiology 1994 ;7 :328-345.
4. Avila GJ, Blando GE, Cruz HGE. Paratuberculosis. http://fmvzenlinea.fmvz.unam.mx/file.php/67/Unidad_6/Paratuberculosis.pdf. consultado el 05/12/2011.
5. Andrews AH, Blowey RW, Boyd H, Eddy RG. Bovine Medicine, Diseases and husbandry of cattle. United Kingdom: Blackwell Publishing, 2004:857-858.
6. Abalos P. Actualidad en Paratuberculosis. TECNOVET 2001 Diciembre; 7 (3). <http://www.tecnovet.uchile.cl> consultado el 23/05/2009.
7. www.oie.int/hs2/ci_maladie.asp?ord=1. Consultado el 13/05/2009.
8. www.sagarpa.gob.mx/ganaderia/DOF/2007/ac_exoticas_200907.pdf. Consultado el 17/05/2009.

9. Rodríguez VRI. Enfermedades de importancia económica en producción animal. México: McGraw-Hill, 2005: 393-401.
10. Gerrit D, Dirksen K, Gründer HD. Medicina Interna y Cirugía del Bovino. Buenos Aires, República Argentina: Iner Médica Editorial, 2005: 533-538, volumen I.
11. Stevenson K, Hughes VM, de Juan L, Inglis NF, Wright F. Molecular characterization of pigmented and nonpigmented isolates of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. Journal of Clinical Microbiology 2002; 40: 1798-1804.
12. Rebhun WC. Diseases of Dairy Cattle. USA: Ed. Lippincott Williams and Wilkins, 1995:208-213.
13. Castellanos RE. Caracterización molecular de aislados de *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis*. Mapa epidemiológico en España (Tesis de doctorado). Madrid: Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Veterinario: 2010.
14. Castellanos E, Aranaz A, Gould KA, Linedale R, Stevenson K, Álvarez J, Dominguez L, de Juan L, Hinds J, Bull TJ. Discovery of Stable and Variable Differences in the *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* Type I, II and III Genomes by Pan-Genome Microarray Analysis. Applied and Environmental Microbiology. 2009; 75(3): 676-686.
15. Eda S, Bannantine JP, Waters WR, Mori Y, Whitlock RH, Scott MC, Speer CA. A Highly Sensitive and Subspecies-Specific Surface Antigen Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Diagnosis of Johne's Disease. Clinical and Vaccine Immunology. 2006; 13 (8): 837-844.

16. Soto JP, Kruze J, Leiva S. Comparación de tres métodos de diagnóstico de Paratuberculosis bovina en rebaños lecheros infectados. Instituto de Microbiología, Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile. Arch. Med. Vet. XXXIV. 2002; 2; 265-273.
17. Aly SS, Mangold BL, Whitlock RH, Sweeney RW, Anderson RJ, Jiang J, Schukken YH, Hovingh E, Wolfgang D, Kessel JAS, Karns JS, Lombard E, Smith JM, Gardner IA. Correlation between Herrold egg yolk medium cultura and real-time quantitative polymerase chain reaction results for *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in pooled fecal and environmental samples. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation. 2010; 22: 677-683.
18. Speer CA, Scott MC, Bannantine JP, Waters WR, Mori Y, Whitlock RH, Eda S. A Novel Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Diagnosis of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* Infections (Johne's Disease) in Cattle. Clinical and Vaccine Immunology. 2006; 13(5): 535-540.
19. Christopher-Hennings J, Dammen MA, Weeks SR, Epperson WB, Singh SN, Steinlicht GL, Fang Y, Skaare JL, Larsen JL, Payeur JB, Nelson EA. Comparison of two DNA extractions and nested PCR, real-time PCR, a new commercial PCR assay, and bacterial cultura for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in bovine feces. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation. 2003; 15: 87-93.

20. Favila HLC. Detección de *Mycobacterium avium paratuberculosis* en leche de vacas y cabras seropositivas del centro de México (Tesis de Maestría). México D.F: FMVZ-UNAM: 2007.
21. Miranda BMV, Trueta SR, Chávez GG. Importancia económica de la Paratuberculosis bovina: Una revisión bibliográfica de los últimos 10 años. XXVIII Congreso Buiatría 2004. Morelia, Michoacán.
22. Pierce ES. Ulcerative colitis and Crohn's disease: is *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* the common villain? BioMed Central. 2010; 2 (21): 1-11.
23. Mendoza JL. *Mycobacterium avium* and Crohn's disease. World Journal of Gastroenterology. 2010; 16 (36): 4558-4563.
24. Wynne JW, Bull TJ, Seemann T, Bulach DM, Wagner J, Kirkwood CD, Michalski WP. Exploring the Zoonotic Potential of *Mycobacterium avium* Subspecies *paratuberculosis* through Comparative Genomics. PlosONE. 2011; 6(7): 1-15.
25. Friswell M, Campbell B, Rhodes J. The Role of Bacteria in the Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease. Gut and Liver. 2010; 4(3): 295-306.
26. Abraham C, Cho JH. Bugging of the Intestinal Mucosa. The New England Journal of Medicine. 2007; 357 (7): 708-10.
27. Juste RA, Alonso-Hearn M, Molina E, Geijo M, Vazquez P, Sevilla IA, Garrido JM. Significant reduction in bacterial shedding and improvement in milk production in dairy farms after the use of a new inactivated paratuberculosis vaccine in a field trial. BMC Research Notes 2009; 2

- (233). <http://www.biomedcentral.com/1756-0500/2/233> consultado el 13/11/2011.
28. Sanderson JD, Moss MT, Tizard MLV, Hermon-Taylor J. Mycobacterium paratuberculosis DNA in Crohn's disease tissue. Gut. 1992; 33: 890-896.
29. Van Limbergen J, Wilson DC, Satsangi J. The genetics of Crohn's disease. Annual Review of Genomics and Human Genetics. 2009; 10: 89-116.
30. Barreau F, Meinzer U, Chareyre F. CARD15/NOD2 is required for Peyer's patches homeostasis in mice. PLoS One. 2007; 2: e523.
31. Juste RA, Elguezabal N, Pavón A. Association between Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis DNA in blood and cellular and humoral immune response in inflammatory bowel disease patients and controls. International Journal of Infectious Diseases. 2009; 13: 247-254.
32. Kreeger JM. Ruminant paratuberculosis a century of progress and frustration. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation. 1991; 3: 373-382.
33. Craven JA, Morgan IR. Epidemiology and Pathogenesis of Paratuberculosis in Cattle. A Literature Survey Prepared for Animal Health Australia. 2000.
34. Sung N, Collins MT. Effect of three factors in cheese production (pH, Salt and Heat) on *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* viability. Applied and Environmental Microbiology 2000; 66: 1334-1339.

35. Park KT, Ahn J, Davis WC, Koo HC, Kwon NH, Jung WK, Kim JM, Hong SK, Park YH. Analysis of the seroprevalence of bovine paratuberculosis and the application of modified absorbed ELISA to field sample testing in Korea. *Journal of Veterinary Science*. 2006; 7(4): 349-354.
36. Abalos P. Actualidad en paratuberculosis. Departamento de medicina preventiva animal. Facultad de ciencias veterinarias y pecuarias, Universidad de Chile. 2006
37. Takeda K, Akira S. Toll-like receptors in innate immunity. *International immunology*. 2005; 17 (1): 1-14.
38. Paul-Clark MJ, McMaster SK, Sorrentino R, Sriskandan S, Bailey LK, Moreno L, Ryffel B, Mitchel JA. Toll-like Receptor 2 Is Essential for the Sensing of Oxidants during Inflammation. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2009; 179: 299-306.
39. Abbas AK, Lichtman AH. *Inmunología celular y molecular*. Elsevier España S.A. Quinta edición. 2004: 298-316.
40. Margni RA. *Inmunología e Inmunoquímica. Fundamentos*. Argentina. Editorial Médica PANAMERICANA. Cuarta edición. 1990: 571-586 y 284-294.
41. Lei L, Plattner BL, Hostetter JM. Live *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis and a Killed-Bacterium Vaccine Induce Distinct Subcutaneous Granulomas, with Unique Cellular and Cytokine Profiles. *Clinical and Vaccine Immunology*. 2008; 15 (5): 783-793.
42. Morales RH. Frecuencia de Paratuberculosis en ganado de lidia. Tesis de Licenciatura. FMVZ-UNAM. México. 1994.

43. Santillán FMA, Córdoba LD, Guzmán RCC. Situación Epidemiológica de la Paratuberculosis en ganado bovino del estado de Guanajuato, México (Datos preliminares). Reunión Nacional de la Investigación Pecuaria. México 2003.
44. Limón GMM, Favila HLC, Herrera LE, Santillán FMA, Lozano DRR, Córdoba LD, Guzmán RCC. Prevalencia de paratuberculosis en bovinos lecheros de Guanajuato y Aguascalientes: Resultados preliminares. Reuniones nacionales de investigación e innovación pecuaria, agrícola, forestal y acuícola-pesquera. México. 2011.
45. Córdoba LD, Santillán FMA, Favila HLC, Urrutia MJ, Gámez VH, Guzmán RCC, Rivera NP, Cabello FE. Paratuberculosis bovina en San Luis Potosí. Reuniones nacionales de investigación e innovación pecuaria, agrícola, forestal y acuícola-pesquera. México. 2011.
46. Gallaga MEP. Determinación de la seroprevalencia y factores de riesgo de la paratuberculosis en las regiones caprinas de Libres y la Mixteca en el Estado de Puebla. Tesis de Maestría. FMVZ-UNAM. México 2011.
47. Plan estratégico del programa para la atención de la paratuberculosis en ganado bovino, ovino y caprino en México. <http://www.conasamexico.org.mx/conasa/pdf/20101007-Programas%20especiales%20a%20solicitud%20de%20la%20SAGARP A.-%20Avance.pdf>. Consultado el 05/12/2011.
48. Klausen J, Huda A, Ekeröth L, Ahrens P. Evaluation of serum and milk ELISAs for paratuberculosis in Danish dairy cattle. Preventive Veterinary

- Medicine. 2003; 171-178. www.elsevier.com/locate/prevetmed. consultado el 15/04/ 2011.
49. Morilla A, Bautista C. Manual de Inmunología. México: editorial Diana, 1986: 128-144.
50. Martínez CAG. Desarrollo de una ELISA para el diagnóstico de paratuberculosis en bovinos. (Tesis de Licenciatura). México D.F: FMVZ-UNAM: 2009.
51. Yokomizo Y, Yugi H, Merkal RS. A Method for Avoiding False-Positive Reactions in an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) for the Diagnosis of Bovine Paratuberculosis. Japanese Society of Veterinary Science. 1985; 47(1): 111-119.
52. Jaimes MNG. Aplicación de la PCR anidada para el diagnóstico de Paratuberculosis a partir de heces de ovinos (tesis de licenciatura). México: FESC -UNAM, 2006.
53. Vinueza-Burgos C. PCR en tiempo Real: la nueva era de la información genética celular. Revista Electrónica de Veterinaria. 2009; 10 (2).
54. Análisis de expresión génica mediante PCR a tiempo real o Q-PCR. www.ehu.es/SGIker/.../expresion_genica/.../analisis_de_expresion.pdf. Consultado el 09/05/2010.
55. Cook KL, Britt JS. Optimization of methods for detecting *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in environmental samples using quantitative, real-time PCR. Journal of Microbiological Methods. 2007; 69: 154-160.

56. Kim SG, Shin SJ, Jacobson RH, Miller LJ, Harpending PR, Stehman SM, Rossiter CA, Lein DA. Development and application of quantitative polymerase chain reaction assay base don the ABI 7700 system (TaqMan) for detection and quantification of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. Journal of Veterinary Investigation. 2002; 14: 126-131.
57. Tasara T, Stephan R. Development of an F57 Sequence-Based Real-Time PCR Assay for Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Milk. Applied and environmental Microbiology. 2005; 71 (10): 5957-5968.
58. Cook KL, Britt JS. Optimization of methods for detecting *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in environmental samples using quantitative, real-time PCR. Journal of Microbiological Methods. 2007; 69: 154-160.
59. Kim SG, Shin SJ, Jacobson RH, Miller LJ, Harpending PR, Stehman SM, Rossiter CA, Lein DA. Development and application of quantitative polymerase chain reaction assay base don the ABI 7700 system (TaqMan) for detection and quantification of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation. 2002; 14: 126-131.
60. Herthnek D, Bölske G. New PCR systems to confirm real-time PCR detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. BMC Microbiology. 2006; 6 (87): 1-8.

61. O'Mahony J, Hill C. Rapid Real-Time PCR Assay for Detection and Quantitation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* DNA in Artificially Contaminated Milk. *Applied and Environmental Microbiology*. 2004; 70 (8): 4651-4658.
62. Real-Time PCR Vs. Traditional PCR. Applied Biosystems. www.appliedbiosystems.com/.../real-time-pcr/real-time-pcr-vs-traditional-pcr.printable.html. Consultado el 09/05/2010
63. PCR EN TIEMPO REAL. Introducción. Cultek. www.cultek.com/inf/otros/soluciones/Soluciones-Q-PCR-Introduccion.pdf. Consultado el 09/05/2010.
64. Garrido J, Cortabarría N, Oguiza J, Juste R. Use of a PCR method on fecal samples for diagnosis of sheep paratuberculosis. *Veterinary Microbiology*. 2000; 77(3-4): 379-386.
65. Kim SG, Shin SJ, Jacobson RH, Miller LJ, Harpending PR, Stehman SM, Rossiter CA, Lein DA. Development and application of quantitative polymerase chain reaction assay based on the ABI 7700 system (Taqman) for detection and quantification of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 2002; 14: 126-131.
66. Payeur JB, Jarnagin JL, Marquardt JG, Schaper LA, Martin BM. *Laboratory Methods in Veterinary Microbiology for the Isolation and Identification of Mycobacteria*. Iowa, USA: United States Department of Agriculture Animal and plant health inspection service. National Veterinary Service Laboratories, 1993: 39-40.

67. Hernández COA. Obtención de un antígeno protoplasmático de *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* para el diagnóstico de la enfermedad de Johne en ovinos (tesis de Licenciatura). México: FESC-UNAM: 2006.
68. Díaz E, Hernández L, Valero G, Arellano B. Diagnóstico de Brucelosis Animal. SAGARPA, Inifap PRODUCE, 2001: 92-94.
69. Fang Y, Wu W-H, Pepper JL, Larsen JL, Marras SAE, Nelson EA, Epperson WB, Christopher-Hennings J. Comparison of Real-Time, Quantitative PCR with Molecular Beacons to Nested PCR and Culture Methods for Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Bovine Fecal Samples. *Journal of Clinical Microbiology* 2002; 40(1): 287-291.
70. Khol JL, Kralik P, Slana I, Beran V, Aurich C, Baumgartner W, Pavlik I. Consecutive Excretion of *Mycobacterium avium* Subspecies *paratuberculosis* in Semen of a Breeding Bull Compared to the Distribution in Feces, Tissue and Blood by IS900 and F57 Quantitative Real-Time PCR and Culture Examinations. *Journal Veterinary Medicine Sci.* 2010; 72 (10): 1283-1288.
71. La prevalencia de la paratuberculosis en vacuno de raza parda en León se sitúa en el 1%. <http://www.dicyt.com/noticias/la-prevalencia-de-la-paratuberculosis-en-vacuno-de-raza-parda-en-leon-se-situa-en-el-1>. Consultado el 06/12/2011.

72. Erume J, Spargser J, Rosengarten R. Rapid detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* from cattle and zoo animals by Nested PCR. *African Health Sciences*. 2001; 1: 83-89.