

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS VETERINARIAS



**RESPUESTA INMUNE HUMORAL EN OVINOS  
EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS CON PARATUBERCULOSIS**

TESIS

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE:  
MAESTRO EN CIENCIAS VETERINARIAS

PRESENTA

MVZ. ELIZAMA PONCE BARRAZA

DIRECTORA

DRA. SAWAKO OSHIMA

Mexicali, Baja California, México

Enero 2014

## COMITÉ ASESOR

Esta tesis se realizó bajo la dirección del Comité de Tesis indicado, ha sido revisada y aceptada por el mismo, como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias Veterinarias.

---

Dra. Sawako Oshima  
DIRECTORA

---

Dr. Gerardo Enrique Medina Basulto  
ASESOR

---

Dr. Gilberto López Valencia  
ASESOR

---

Dr. Víctor Manuel González Vizcarra  
ASESOR

---

Dra. Adriana Morales Trejo  
ASESORA

## **AGRADECIMIENTOS**

A dios por acompañarme en cada paso de mi vida.

Al Consejo Nacional en Ciencia y Tecnología (CONACyT), por otorgar la beca para la realización de mis estudios de maestría.

Al Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias, por permitirme realizar mis estudios de maestría.

Al Instituto en Ciencias Agropecuarias por permitirme utilizar sus instalaciones.

A la Dra. Sawako Hori, por su confianza, entusiasmo y dedicación en la realización del trabajo, por compartir sus conocimientos incondicionales, por su paciencia, y por su gran apoyo en la realización de la tesis.

Al Dr. Gerardo Medina, por el apoyo brindado en el procesamiento de las muestras, por sus enseñanzas y consejos.

Al Dr. Shigetoshi Eda, por brindarme la oportunidad de trabajar en su laboratorio, por sus enseñanzas y sobretodo por la paciencia dedicada en mi estancia.

## DEDICATORIA

A mis padres Onoria Barraza y Juan Ponce, por siempre estar en cada peldaño de mi vida, por su apoyo, confianza y amor, los amo.

A mi familia, por estar conmigo en las buenas y en las malas.

A mi novio, David, por tu ayuda incondicional, por impulsarme a ser mejor cada día. Te amo.

A la Dra. Sawako, por su confianza, por su apoyo y por todo el conocimiento brindado durante todo este tiempo.

Al Dr. Alfredo Estrada, por creer en mí.

Al MC. Martín López, por haber puesto las bases sobre lo que hoy es mi maestría, por todo el conocimiento y el apoyo brindado.

A mis amigos a los cuales considero mi familia, a Fer, Jeny, Javier, Luisito, Tomás, gracias por cada momento.

# ÍNDICE

	Página
ÍNDICE DE FIGURAS.....	vi
ÍNDICE DE CUADROS .....	vii
RESUMEN .....	x
ABSTRACT .....	xi
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA .....	2
2.1. Paratuberculosis .....	2
2.1.1. Etiología.....	2
2.1.2. Patogenia .....	4
2.1.3. Diagnóstico.....	7
2.1.4. Control y prevención.....	13
2.1.5. Modelos experimentales de paratuberculosis .....	19
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	27
3.1. Área de estudio.....	27
3.2. Diseño del estudio .....	27
3.3. Animales.....	27
3.3.1. Criterio de inclusión .....	28
3.3.2. Criterio de exclusión .....	28
3.3.3. Inoculación .....	28
3.4. Toma de muestras y almacenamiento .....	28
3.5. Mycobacterium avium subespecie paratuberculosis (Map) .....	29
3.6. Cultivo bacteriológico fecal.....	29
3.7. Preparación del antígeno lipídico de Map .....	30
3.8. ELISAs.....	30
3.8.1. ELISA comercial .....	30
3.8.2. Etanol-Vortex ELISA (EVELISA).....	31
3.9. PCR .....	31

3.9.1. Extracción de DNA en heces .....	31
3.9.2. PCR cuantitativo (qPCR) .....	32
IV. RESULTADOS .....	34
4.1. Condición General .....	34
4.2. Excreción fecal de Map en etapa inicial de infección .....	35
4.3. qPCR directo fecal de Map .....	37
4.4. Serología .....	40
V. DISCUSIÓN .....	42
VI. CONCLUSIONES.....	48
VII. LITERATURA CITADA .....	49
ANEXOS.....	63

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Título	Página
1	Corral de experimentación de la paratuberculosis IICV....	27
2	Cronograma de toma de muestras.....	28
3	Animales infectados experimentalmente a los 30 meses post-infección.....	34
4	Observación de cultivo bacteriológico.....	36
5	Estandarización del PCR gen IS900 de Map.....	37
6	Patrones de amplificación en muestras de ADN extraído a partir de heces.....	38
7	Resultados de la placa de ELISA comercial y EVELISA.....	40

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Título	Página
1	Vacuna actual vs. vacuna ideal.....	15
2	Características de PTB en bovinos y ovinos.....	16
3	Modelos experimentales de paratuberculosis.....	19
4	Modelos ovinos de la PTB.....	24
5	Resultado de cultivo fecal hasta 10 meses post- infección.....	35
6	Excreción de Map determinada por qPCR.....	39
7	Resumen de resultados de ELISA comercial.....	41
8	Resumen de S/P en una placa de EVELISA.....	41

## LISTA DE ABREVIACIONES

- ADN**= Ácido desoxirribonucleico
- AGID**= Inmunodifusión en gel agar
- ARNr** = Ácido ribonucleico ribosomal
- BAAR**= Bacilo ácido alcohol resistente
- CONASA**= Consejo nacional de salud
- EDTA**= Ácido etilendiamino-tetra-acético
- ELISA**= Ensayo por Inmunoabsorción ligado a enzima
- EVELISA**= Etanol-Vortex ELISA
- HCl**= Ácido clorhídrico Tris
- INFg**= Interferón gamma
- IP**= Intra-peritoneal
- JD**= Enfermedad de Johne
- Map**= *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis*
- MJ**= Mycobactin J
- µg**= Miligramo
- µl**= Microlitro
- NaCl**= Cloruro de Sodio
- NaOH**= Hidróxido de sodio
- OADC**= Complejo de ácido oleico albúmina dextrosa
- PBST**= Tampón fosfato salino de Tween
- PCR**= Reacción en cadena de la polimerasa
- PI**= Post-Infección
- PTB**= Paratuberculosis
- P/S**= Relación de muestras y control positivo. (S, muestra; P, control) positivo)
- qPCR**= Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativo
- SDS**= Dodecil sulfato de sodio

**Se**= Sensibilidad

**Sp**= Especificidad

**TB**= Tuberculosis bovina

**Th1**= Linfocito T ayudador tipo 1

**Th2**= Linfocito T ayudador tipo 2

**TMB**= 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina

**TNF- $\alpha$** = Factor de necrosis tumoral

**UFC**= Unidades formadoras de colonias

## RESUMEN

La paratuberculosis (PTB) es una enteritis granulomatosa de curso crónico en rumiantes ocasionada por *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* (Map). Para el control eficaz de la enfermedad se requiere de pruebas diagnósticas sensibles junto con estrategias de “detección y eliminación”, sin embargo las pruebas serológicas disponibles no cuentan con la suficiente sensibilidad (Se)(15-40%) debido a la leve respuesta inmune humoral desarrollada en animales en etapas tempranas de la infección. Considerando la reciente detección de la PTB en ovinos de Baja California, existe la necesidad de desarrollar una prueba serológica con alta Se con un costo accesible para productores de pequeños rumiantes. El objetivo del presente estudio fue desarrollar un modelo de infección experimental de paratuberculosis ovina y determinar el patrón temporal de la respuesta humoral contra un antígeno lipídico de Map como candidato a antígeno con alta sensibilidad en etapas tempranas de la infección. Se infectaron por vía oral 3 ovinos machos raza Katahdin de 3 meses de edad, los cuales fueron muestreados durante 30 meses post infección (PI). Mediante cultivo bacteriológico o qPCR se confirmó la excreción fecal de Map en el periodo de la infección inicial (hasta 3 meses PI) y en 26-30 meses PI. Debido a la pérdida de gran parte de las muestras no se pudo dar el seguimiento serológico como inicialmente se contempló. Los tres animales fueron negativos a una prueba comercial de ELISA hasta la conclusión del estudio, concordando con la literatura, en la cual se reportan las bajas sensibilidades del ELISA comercial para detectar animales infectados en estado sub-clínico. Los resultados de ELISA con antígeno lipídico (EVELISA; Etanol Vortex- ELISA) no fueron concretos debido a la falta de optimización de los parámetros utilizados en la prueba, incluyendo la selección de cepas de Map para la preparación del antígeno. El modelo experimental obtenido en el presente estudio servirá en investigaciones de la inmunopatología de la PTB y proporcionará bases para el desarrollo y la aplicación óptima de la prueba serológica para la detección oportuna de la PTB ovina.

## ABSTRACT

Paratuberculosis (PTB) is chronic granulomatous enteritis in ruminants caused by *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* (Map). To accomplish effective disease control, sensitive diagnostic tests are required to be used together with the “detection and elimination”. However, the available serological tests for PTB have limited sensitivities (Se) (only 15-40%) due to weak humoral immune responses developed in the animals in the early stage of infection. Considering the recent propagation of PTB in sheeps in Baja California, there is demand to develop a highly sensitive serological test with accessible cost for the local small ruminants producers. The objective of this study was to develop experimental models of ovine paratuberculosis and to determine the temporal pattern of humoral immune responses to a Map lipid antigen, as a candidate of highly sensitive antigen in early stage of infection. Three Katahdin lambs with 3 months age were infected orally by Map and were sampled during 30 months post infection. By using bacteriological culture or qPCR, fecal Map excretion was confirmed in period of initial infection by 3 months post-infection (PI), and later in 26-30 months PI. Due to the loss of mayor part of stored samples, we could not perform the monitoring by serology as planned originally. Three animals were negatives to a commercial ELISA test by the time this study was concluded, which is consistent with the literature where the lower sensitivities of ELISA are reported for the detection of animals with sub-clinical stage of PTB. The results of ELISA with lipid antigen (EVELISA; Etanol Vortex- ELISA) were not concrete mainly because the insufficient optimization of test parameters, including the choice of Map strain used for the antigen preparation. The experimental models obtained in the present study are valuable for the immunopathological research on ovine paratuberculosis, and provide a basis for the development and optimal application of new serological tests for the disease detection.

## I. INTRODUCCIÓN

La paratuberculosis (PTB) o enfermedad de Johne (JD) es una enfermedad infecto contagiosa, producida por *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* (Map). Afecta el intestino delgado produciendo una enteritis y linfadenitis granulomatosas, principalmente en rumiantes domésticos y silvestres, provocando disminución en la producción de leche, baja fertilidad y eliminación precoz de los animales del rebaño. Para el diagnóstico de la PTB no es posible utilizar un solo método, dado los diferentes estadios del agente en el huésped (Berdadelli, 2000). Las estrategias de control de la PTB por vacunación, quimioprofilaxis y diagnóstico han demostrado ser extremadamente difíciles, principalmente debido a la naturaleza subclínica de la enfermedad. Map reside en el interior de los macrófagos, causando una infección latente por 2-10 años o más, dando como resultado una respuesta inmune humoral reducida en etapas subclínicas, lo cual desfavorece a las pruebas serológicas como ELISA (Se 20-40%), que detectan solo el 50% de los animales excretores de Map. La bacteriología de heces no es apropiada para uso convencional por su alto costo (\$35 USD/muestra), largo tiempo de análisis (4 meses o más) y falta de personal capacitado para el proceso. Es de suma importancia contar con ELISAs más sensibles para un diagnóstico oportuno, especialmente para etapas tempranas de la infección y el empleo de prácticas de manejo apropiado para la gestión del rebaño en la prevención de la transmisión de Map.

Un antígeno lipídico de la superficie de Map, que ha mostrado tener alta sensibilidad en bovinos (Eda *et al.*, 2006), podría ser inmunoreactivo también en ovinos en infección temprana. Estudios longitudinales de la respuesta inmune humoral en modelos ovinos serán de gran utilidad para el desarrollo de nuevas pruebas serológicas.

Por lo anterior, el objetivo del presente estudio fue el desarrollo de un modelo experimental de ovinos con paratuberculosis y la determinación del patrón temporal de la respuesta inmune humoral contra antígeno lipídico de Map.

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1. Paratuberculosis

La paratuberculosis (PTB) o enfermedad de Johne fue descrita por primera vez en 1895 cuando H. A. Johne y L. Frothingham hallaron la presencia de microorganismos ácido-alcohol resistentes a partir de frotis de material intestinal, durante un brote de diarrea bovina en Alemania, sin poder identificar taxonómicamente al agente. En 1923 Bergey *et al.*, otorgaron el nombre de *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* (Map) al microorganismo causante de la enfermedad, como en la actualidad se le identifica. La PTB afecta principalmente a ovinos, bovinos, caprinos y otras especies de rumiantes, provocando signos como emaciación progresiva del animal y diarrea cada vez más grave (Abalos, 2010).

La PTB es endémica a nivel mundial, con altos niveles de prevalencia, fuerte impacto económico e importancia en salud pública por la asociación entre Map y la enfermedad de Crohn. Las pérdidas económicas acarreadas por la infección afectan hatos de bovinos de carne, lecheros y mixtos, por el descenso en la producción láctea, alteraciones reproductivas, mayor incidencia de mastitis, eliminación prematura de animales, pérdida de valor del animal al sacrificio, pérdida de potencial genético, etc. (Kennedy y Bennedictus, 2001; Kudahl y Nielsen, 2009). La PTB es considerada por SAGARPA como una de las dos prioridades de salud animal junto con la leptospirosis y se ha propuesto implementar un programa nacional para el control de la PTB, debido que en México las pérdidas económicas por PTB en el ganado lechero, han sido calculadas en 800 dólares por vaca al año (CONASA, 2010).

#### 2.1.1. Etiología

El agente etiológico de la paratuberculosis, *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis*, es un bacilo gram positivo, aerobio, de un tamaño entre 1,0-2,0  $\mu\text{m}$  de longitud por 0,5  $\mu\text{m}$  de ancho. Su temperatura óptima de crecimiento es de 37°C (Chiodini, 1986), es una bacteria de

crecimiento lento, difícil de cultivar y que requiere un aporte externo de micobactina (Cocito *et al.*, 1994; Taylor, 1949). En medio de cultivo sólido forma colonias pequeñas (1-5 mm), rugosas y generalmente no pigmentadas visibles a las 4-8 semanas (Chiodini *et al.*, 1984) aunque puede alargarse incluso hasta los 6 meses.

La estructura de la pared celular es común en todas las micobacterias y está formada por cuatro capas. La más interna es el glicopéptido o peptidoglicano con moléculas de N-acetilglucosamina y ácido-N-glucolilmurámico (en lugar del habitual N-acetilmurámico) con cadenas cortas de alanina. Esta capa es el esqueleto de la bacteria que le da forma y rigidez. A continuación hay una capa compuesta por polímeros de arabinosa y galactosa que es la responsable de mantener en contacto los peptidoglicanos con la siguiente capa formada por ácidos micólicos. Éstos son ácidos grasos derivados de 60 a 90 átomos de carbono en cadenas ramificadas y con un punto de fusión muy alto (Goodfellow *et al.*, 1982), son de gran importancia taxonómica en micobacterias y otros géneros relacionados como *Nocardia*, siendo además los principales responsables del ácido-alcohol resistencia de este grupo bacteriano. La capa más superficial está formada por glicolípidos y lipopolisacáridos. El LAM (lipoarabinomanano) juega un papel importante en la patogénesis de la tuberculosis (Barnes *et al.*, 1992a), lepra (Barnes *et al.*, 1992b) y paratuberculosis (Sugden *et al.*, 1989; McNab *et al.*, 1991). Se han descrito microorganismos con una pared celular deficiente (*Cell Wall Deficient*, CWD), denominado esferoplastos, aislados a partir de tejidos de pacientes con la enfermedad de Crohn (Chiodini, 1989) y en animales con la enfermedad de Johne (El Zaatari *et al.*, 2003).

Esta composición tan especial de la pared confiere a Map dos características muy importantes: 1) Ácido-alcohol resistencia gracias a la elevada composición lipídica de su pared que varía entre el 20-40% del peso celular seco (Smith, 1969). En las tinciones específicas como la tinción de Ziehl-Neelsen se observa la disposición específica de estos bacilos en agrupaciones formando grumos (o *clumps*). 2) Elevada capacidad de supervivencia en ambientes desfavorables durante períodos de tiempo

elevados, siendo uno de los factores que dificultan el control de la enfermedad. Varios informes describen la supervivencia de Map in vitro bajo diferentes condiciones físicas y ambientales, incluyendo la supervivencia en el agua, la orina y el estiércol a temperaturas extremas (Lombard *et al.*, 2006; Larsen *et al.*, 1956; Vishnevskii *et al.*, 1940). El organismo puede sobrevivir en el agua del estanque hasta 270 días en condiciones in vitro y hasta 246 días en heces bovinas en condiciones naturales donde la temperatura ambiente varió entre -3°C y 23°C (Lovel *et al.*, 1944). En donde se aislaron bacterias viables después de almacenar las mismas muestras de cinco meses a -14°C, después a 4°C durante cinco meses y finalmente a 38 °C durante ocho meses. Las bacterias almacenadas durante 12 meses a -14 °C y luego a 4°C durante cinco meses fueron también viable (Larsen *et al.*, 1956).

La pared celular de Map está implicada en los mecanismos de restricción de adsorción de nutrientes, ocasionando baja actividad metabólica que conlleva a una velocidad de crecimiento en condiciones óptimas 24 veces inferior que la de bacterias como *Escherichia coli* (Juste *et al.*, 1993).

### **2.1.2. Patogenia**

La fuente primaria de infección son los animales adultos infectados y los hatos que los albergan. La principal vía de transmisión es oro-fecal a través de pasturas y agua contaminada con materia fecal y de calostro o leche de animales infectados, así como en menor porcentaje, a través de placenta y semen. Los animales más susceptibles son los terneros menores de 30 días posiblemente debido a la extensa superficie que abarcan las placas de Peyer intestinales en los animales jóvenes, la cual va reduciéndose gradualmente, si bien los animales de más edad pueden infectarse dependiendo de su condición sanitaria y de la carga bacteriana (Gilardoni y Mundo, 2008). El sitio de infección primaria de esta bacteria son las mucosas intestinales, aunque algunos estudios hayan indicado que son las amígdalas y los ganglios retrofaríngeo (Payne y Rankin, 1961, Lugton, 1999).

El blanco de Map son los tejidos linfoides del hospedador asociados a las mucosas del tracto gastrointestinal superior del intestino, donde es

endocitado por las células M epiteliales, mediado por receptores de integrinas y fibronectinas (Sigurdardottir *et al.*, 2005, Secott *et al.*, 2004), que recubren las cúpulas de las placas de Peyer del íleon y yeyuno y posteriormente es fagocitado por los macrófagos subepiteliales e intraepiteliales (Momotami *et al.*, 1988, Lugton 1999).

Sin embargo, parece ser que las células M no son el único sitio de entrada de Map, al menos en cabras, se ha encontrado que en esta especie, la entrada de Map a la mucosa intestinal esta restringida a los enterocitos yeyunales no asociados a las placas de Peyer (Sigurdardottir *et al.*, 2005).

Map se localiza y reside preferentemente en los fagosomas o endosomas inmaduros de los macrófagos del hospedador, con predominio de aquellos asociados a las placas de Peyer ileales y yeyunales (Momotami *et al.*, 1988, Corpa *et al.*, 2000). Los bacilos de Map, son capaces de sobrevivir intracelularmente inhibiendo la acidificación del fagosoma e impidiendo su maduración a fagolisosoma (Cheville *et al.*, 2001). Map es resistente a la degradación por las enzimas lisosómicas, el óxido nítrico y además mecanismos bactericidas que producen los macrófagos, debido entre otros mecanismos a su envoltura celular lipídica (Zhao *et al.*, 1997, Harris y Barleta, 2001, Tessema *et al.*, 2001). Los macrófagos epiteliales activados, estimulan a las dos subpoblaciones celulares (Th1 y Th2) de las células T ayudadoras que a su vez estimulan diferentes tipos de respuestas inmunes en el huésped. La infección por Map parece seguir los patrones observados en *M. tuberculosis*, *M bovis* y *M. leprae*; estos patrones implican una respuesta inmune inicial de tipo celular (Th1) o tuberculoide, en donde la producción de citocinas causan la formación de un granuloma intestinal para contener la infección (Coicito *et al.*, 1994, Lugton, 1999). La respuesta Th1 también se caracteriza por la producción de gamma interferón (INF $\gamma$ ) una de las primeras citocinas detectables en la infección por Map, así como la Interleucina 2 (IL-2) y el Factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ). Estas citocinas dirigen las funciones inmunitarias mediadas por células que son necesarias para contener la infección intracelular.

Durante la etapa subclínica temprana de la infección por Map, la actividad de la respuesta celular Th1 parece predominar. Esta etapa puede durar meses o años durante la cual los bacilos permanecen microscópicos dentro de los macrófagos y granulomas; las células T de memoria y su respuesta es requerida para controlar la diseminación y el daño del tejido ocasionado por la infección; debido a esto se cree que este tipo de respuesta es protectora. A medida que la enfermedad avanza, la respuesta inmune celular disminuye, reflejando un cambio de respuesta de Th1 a Th2 (Chiodini, 1996). Cuando los animales entran a la etapa de infección lepromatosa o Th2, comienza a manifestar signos clínicos inespecíficos de la infección, tales como pérdida de peso, en algunos casos diarrea y excreción intermitente de la bacteria (Koets, *et al.*, 1990). El cambio de respuesta inmune Th1 a Th2, se ha asociado con la progresión de la PTB del estado subclínico al clínico (Stabel, 2010). Th2 estimula la producción de las citocinas reguladoras IL-4, IL-5 e IL-10 las cuales activan la respuesta inmune humoral caracterizándose por la expansión de los linfocitos B, la secreción de inmunoglobulinas, y el control de la respuesta mediada por Th1. A diferencia de la respuesta celular, el tipo de respuesta humoral no es protectora y no tiene la progresión ni la patología de la infección. En la etapa avanzada de la enfermedad, la afluencia de células inflamatorias hace que la pared intestinal del animal se engrose hasta hacerlo no funcional, ocasionando deficiencia en la absorción de nutrientes que desencadena una enteropatía (Patterson *et al.*, 1967). A medida que la infección progresa, los fagocitos infectados diseminan las micobacterias por otros órganos del cuerpo, los cuales son transportados por los vasos sanguíneos y linfáticos (Merkal 1984, Van der Giessen *et al.*, 1995, Lugton, 1999).

De acuerdo a la relación huésped agente que se presente los animales afectados pueden dividirse en tres fases:

**Fase I: *Infección silenciosa.*** Esta fase se caracteriza por la ausencia de signos clínicos de la enfermedad, desarrollan rápidamente resistencia a la bacteria, controlan la infección y no se vuelven portadores contaminantes.

**Fase II. *Fase subclínica.*** La infección no está completamente controlada, algunos animales la controlan parcialmente pero excretan la bacteria de

forma intermitente, mientras que otros incuban la enfermedad y excretan grandes cantidades de bacterias. La mayoría de los animales infectados en una explotación se encuentran en esta fase. En la cual no muestran signos clínicos evidentes de la enfermedad, aunque si lesiones microscópicas (Pérez *et al.*, 2000), también pueden presentar anticuerpos circundantes o respuestas inmunes celulares alteradas. En esta fase los animales comienzan a perder productividad, en el caso de los bovinos se disminuye la producción láctea entre el 4-14% (Wilson *et al.*, 1997), adicionalmente en esta etapa se observa la aparición de síntomas inespecíficos como la disminución de la fertilidad y la mastitis (Valentin-Weigand *et al.*, 1998).

**Fase III. Fase clínica.** Esta fase sólo se desarrolla tras varios años de infección por Map, en bovinos puede comenzar entre los 3-4 años y en pequeños rumiantes el inicio de la enfermedad puede empezar antes de los 2 años; en ambos casos esto coincide con los partos y el inicio de la lactancia (Manning y Collins., 2001, García *et al.*, 1994). Los signos clínicos característicos que se presentan son diarrea intermitente, que afecta principalmente a los bovinos, la cual no responde a tratamiento debido a que el agente persiste en la mucosa intestinal, las bacterias son fagocitadas por los macrófagos, los cuales proliferan e infiltran la submucosa del intestino, provocando una menor absorción, se reduce la absorción de nutrientes; lo que provoca en la vaca hipoproteïnemia, disminución de la masa muscular y edema. En ovinos y caprinos no es común la presencia de diarrea, aunque esta puede aparecer en algunos casos en la fase final de la enfermedad, cuando las lesiones afectan ampliamente el intestino.

**Fase IV. Fase final.** A esta fase pertenecen los animales en estado clínico avanzado, cuyas características principales son, debilidad, emaciación, diarrea acuosa o profusa, caquexia extrema, edema intramandibular y deshidratación que conduce a la muerte del animal.

### 2.1.3. Diagnóstico

El diagnóstico de la paratuberculosis es difícil debido a su naturaleza fundamentalmente subclínica, el diagnóstico se puede llevar a cabo mediante el uso de pruebas serológicas como ELISA, las cuales son

utilizadas como pruebas tamices, posteriormente se confirman demostrando la presencia de Map en las heces mediante microscopía, cultivo o empleando sondas de ADN y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (OIE, 2008).

#### **2.1.3.1. Serología**

Los animales clínicamente infectados son grandes excretores y tienen una respuesta inmune humoral detectable por las técnicas inmunoenzimática (ELISA), inmunodifusión en gel de agar (AGID) y fijación de complemento (CFT) (Gilardoni y Mundo, 2008). La sensibilidad de estas pruebas es más alto para los animales con lesiones lepromatosas, con signología clínica o aquellos que excretan un gran número de bacterias. Esto es debido a que en los estadios tempranos de la enfermedad, la excreción del bacilo es baja y las inmunoglobulinas específicas son producidas en cantidades no detectables. Durante la infección por Map, los animales desarrollan dos tipos de respuestas inmune, una de tipo celular que evoluciona a otra de tipo humoral. Sin embargo, identificar con precisión a animales en las primeras etapas de la infección es una limitante debido a que la respuesta humoral fuerte se produce hasta la última etapa de la enfermedad. Por el contrario, todas estas pruebas son altamente específicas, y los resultados falsos positivos ocurren con baja frecuencia.

##### **2.1.3.1.1. EVELISA (Etanol-Vortex ELISA)**

EVELISA es una prueba diagnóstica con mayor especificidad para la enfermedad de Johne's en el ganado la cual utiliza antígenos extraídos de la superficie de Map, esta prueba fue probada en el 2006 por el Dr. Eda *et al.* con el objetivo de mejorar la técnica de ELISA, y para identificar tanto animales de baja excreción como medios excretores, ya que una de las deficiencias de las ELISAs comerciales es tener baja sensibilidad en muestras de animales que cursan una etapa temprana de la enfermedad. En este estudio EVELISA fue capaz de identificar el 96.6% de los excretores fecales de bajo nivel y el 100% de los excretores de nivel medio y alto, mientras que ELISA comercial detectó el 13.7% de los animales de bajo nivel excretor y el 25% en excretores de nivel medio y 96.2% en los

excretores de alto nivel. Así EVELISA fue sustancialmente superior a ELISA comercia, especialmente en la detección de excretores de bajo y medio nivel. EVELISA podría ser la base para un ensayo específico y muy sensible para el diagnóstico de paratuberculosis.

### **2.1.3.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

Las regiones únicas del ADN genómico de MAP más ampliamente utilizados para PCR son el gen ARNr 16S y el elemento de inserción IS900. Esta técnica permitió grandes avances en el diagnóstico molecular de la PTB, debido a la rapidez en la detección de la bacteria, comparado con el tiempo requerido por el cultivo fecal (Whittington *et al.*, 1988, 2009). Map ha podido ser identificado por PCR aun antes de su aislamiento por cultivo, a partir de muestras fecales, (Kawaji *et al.*, 2007, Irenge *et al.*, 2009), leche (Djonne *et al.*, 2003, Kaur *et al.*, 2010), sangre y tejidos. Siendo una gran ventaja sobre todo para aquellas cepas difíciles de aislar como las del tipo I/III. A pesar de estas ventajas que representa, tiene como gran limitante la baja sensibilidad para identificar pequeñas cantidades de bacterias en comparación con el cultivo fecal (Collins *et al.*, 1993) y la presencia de inhibidores contenidos en los especímenes que se van a amplificar, particularmente cuando el ADN es preparado a partir de extractos fecales (Englund *et al.*, 1999).

### **2.1.3.3. Bacteriología**

La prueba de cultivo fecal aún es reconocido como el estándar de oro para el diagnóstico de la PTB, pero se requiere de 5 a 16 semanas para el crecimiento de colonias, tiene una sensibilidad del 38%, y al igual que la prueba de PCR no puede distinguir entre el paso a través de los bacilos y la colonización del tracto intestinal (Whitlock *et al.*, 2000). La histopatología puede identificar bacilos ácido-alcohol resistentes (BAAR) al utilizar las tinciones de Ziehl-Neelsen, la presencia de BAAR no asegura que sea Map, las inmunohistoquímicas llevadas a cabo en cortes de tejido que contienen BAAR no son específicas para Map y tampoco lo son las pruebas serológicas como ELISA. Map se define como un parásito obligado, por lo

que su identificación precisa por el cultivo, es el punto de referencia para el diagnóstico de la paratuberculosis a nivel del rebaño/manada y animal individual.

El cultivo de la MAP se basa en los métodos tradicionales para el cultivo de micobacterias de crecimiento lento a partir de muestras clínicas (Merkal et al, 1964; Gillespie, 1999). Hay cuatro pasos críticos:

1. La descontaminación de muestras clínicas para destruir o suprimir, los microbios en su mayoría irrelevantes y de rápido crecimiento, que incluyen bacterias y hongos. Los cuales se encuentran presentes en heces en gran cantidad.
2. Incubación prolongada en los medios de cultivos adecuados los cuales contienen antibióticos para suprimir cualquier contaminante restante.
3. Reconocimiento de colonias de Map en medios sólidos o un signo particular de crecimiento en medios de caldo.
4. Identificación de Map por medio de fenotipificación y/o genotipificación.

#### **2.1.3.3.1. Medios sólidos y líquidos**

Ambos medios, se pueden utilizar para cultivar Map. Los medios sólidos son probablemente más utilizados, ya que son más baratos, se requiere menos instrumentación y la identificación del organismo puede ser más simple. Los medios de cultivo para Map deben incluir nutrientes esenciales, a menudo incluyen antimicrobianos para desalentar el crecimiento de contaminantes y pueden incluir colorantes para ayudar al reconocimiento de las colonias. Muchos medios evaluados por los primeros trabajadores en micobacteriología llevaron al refinamiento progresivo de sesgos a base de huevos, como medio Dubos, pero estos han caído en desgracia y no parecen haber sido utilizado por más de 20 años (Saxegaard, 1985). En lugar de ello, se llegó a un consenso en dos medios más adecuados: medio de Lowenstein Jensen (LJ ), y medio de yema de huevo de Herrold (HEYM).

Middlebrook 7H10 o 7H11 agar y 7H9 caldo también son la base para medios, pero, para el crecimiento óptimo de las Map, hay que añadir la yema de huevo. En la mayoría de las circunstancias micobactina J es un componente esencial de los medios de cultivos primarios de Map.

#### **2.1.3.4. Necropsia**

El diagnóstico por necropsia se lleva a cabo para la búsqueda de lesiones patognomónicas de la enfermedad en los intestinos (Anon, 1985), o simplemente con la demostración de los típicos microorganismos ácido-alcohol resistentes en frotis de impresión de las lesiones o histológicamente (Argente, 1988), y mediante el aislamiento de Map en cultivo.

La paratuberculosis no se puede diagnosticar a través de un examen superficial de los intestinos buscando lesiones de engrosamiento. Los intestinos deben abrirse desde el duodeno al recto para exponer la mucosa (OIE, 2008). No siempre existe una relación estrecha entre la gravedad de los signos clínicos y la extensión de las lesiones intestinales. Se inspecciona la mucosa, especialmente la del íleon terminal, para detectar el plegamiento y el engrosamiento patognomónicos. Las lesiones tempranas se ven manteniendo el intestino hacia la luz; entonces pueden visualizarse las placas discontinuas. En los ciervos con paratuberculosis se ha observado hiperemia, erosiones y petequias en las mucosas. Las primeras lesiones se manifiestan como el engrosamiento y el encadenamiento de los vasos linfáticos. Los nódulos linfáticos mesentéricos se encuentran habitualmente prominentes y edematosos. Los frotis de la mucosa afectada y los cortes superficiales de los nódulos linfáticos deben teñirse por el método de Ziehl–Neelsen y examinarse microscópicamente para observar los microorganismos ácido alcohol resistente que tienen la morfología característica de Map. Sin embargo, los microorganismos ácido-resistentes no están presentes en todos los casos. Por lo tanto es mejor confirmar el diagnóstico colectando muestras múltiples de la pared intestinal y de los nódulos linfáticos mesentéricos en un fijador (solución salina con formol al 10%) para el subsiguiente examen histológico. Deben examinarse las

secciones teñidas con hematoxilina- eosina y las secciones teñidas según el método de Ziehl–Neelsen. Las lesiones típicas de la paratuberculosis consisten en la infiltración de la mucosa y submucosa intestinal, las placas de Peyer y la corteza de los nódulos linfáticos mesentéricos con grandes macrófagos, también conocidos como células epiteloideas, y células multinucleadas gigantes, en las que se encuentran habitualmente, pero no invariablemente, bacilos ácido-resistentes en agregados o de forma aislada.

#### **2.1.3.5. Histopatología**

El análisis macroscópico de los tejidos procedentes de animales sospechosos es un diagnóstico presuntivo debido a que existen casos en los que no se observa ninguna alteración aparente en la mucosa intestinal a pesar de que los animales presenten semiología (Buergelt *et al.*, 1978). A pesar de esto, en estos casos el diagnóstico se puede complementar con un estudio histopatológico del tejido intestinal, sobre todo de la válvula ileocecal (Carrigan y Seaman, 1990). Esta metodología tiene la ventaja de identificar no sólo animales con lesiones graves sino que también con lesiones focales asociadas a fases subclínicas de la enfermedad (Corpa *et al.*, 2000; Pérez *et al.*, 1996). Para poder identificar correctamente las lesiones es muy importante la realización de una correcta obtención de muestras incluyendo siempre tejido linfoide intestinal que es donde se localizan las lesiones iniciales y latentes de la paratuberculosis (Juste *et al.*, 1994; Nisbet *et al.*, 1962). Para la observación de las lesiones histológicas se ha empleado de forma rutinaria la técnica convencional de la Hematoxilina-Eosina siempre en combinación con la tinción de Ziehl-Neelsen para la observación de bacilos ácido-alcohol resistentes. Sin embargo, en algunos casos con lesiones visibles en las muestras el número de bacilos es escaso o incluso nulo (Buergelt *et al.*, 1978; Stamp y Watt, 1954). La sensibilidad de la técnica histopatológica varía según los distintos autores, hay algunos que la consideran inferior al cultivo microbiológico (Se 55%) sobre todo en ganado bovino (De Lisle *et al.*, 1980), y otros por el contrario han identificado un mayor número de animales con lesiones características de paratuberculosis en ganado ovino y caprino comparándolo con el diagnóstico microbiológico

(Dimareli-Malli y Sarris, 2001; Pérez *et al.*, 1996). Esta disparidad de resultados se debe principalmente a las características de los aislados de Map ya que en concreto los procedentes de pequeños rumiantes son muy difíciles de cultivar y requieren condiciones especiales para su aislamiento en laboratorio. El principal inconveniente de esta metodología es el requerimiento del animal muerto, aunque en algunos casos se ha propuesto la aplicación en animales vivos mediante el análisis de biopsias pero es muy costoso, y además requiere un manejo especializado de los animales.

La histología puede complementarse con técnicas como la inmunohistoquímica. La técnica emplea anticuerpos específicos frente a Map y posteriormente con una reacción enzimática se pone de manifiesto la presencia de antígenos en secciones histológicas. Esta técnica tiene mayor capacidad de detección de micobacterias que otras tinciones y en este caso también se identifican los bacilos con la integridad de su pared afectada (Coetsier *et al.*, 1998; Massone *et al.*, 1990; Navarro *et al.*, 1991).

Las muestras se fijan en formol al 10% y se realiza la inclusión en parafina, se hacen cortes en micrótopo, con un espesor de 4 micras y se tiñen con Hematoxilina-Eosina y Ziehl-Neelsen.

A la observación microscópica se puede ver un infiltrado de células epiteloides en el corion de la mucosa y de la submucosa, deformación de las vellosidades con engrosamiento de la mucosa, comprimiendo las criptas de Lieberkün.

En los cortes teñidos con Ziehl-Neelsen se visualizan gran cantidad de células epiteloides que contienen dentro de cada una de ellas, bacilos ácido-alcohol resistentes, principalmente en el corion de la mucosa y en los ganglios mesentéricos.

#### **2.1.4. Control y prevención**

Las medidas de control comprenden buenas prácticas sanitarias, identificación oportuna de animales infectados en el rebaño, eliminación de animales infectados y una vigilancia constante de animales adultos (Meyer, 1994). La vacunación se considera una muy buena alternativa para disminuir la presencia de esta enfermedad en los ovinos y caprinos de nuestro país (CONASA, 2010). La implementación de un conjunto de medidas rigurosas

son necesarias para tener éxito en el control de la paratuberculosis. 1) Realizar un manejo separado de los terneros y animales jóvenes. Los animales adultos pueden compartir pasturas e instalaciones con los animales jóvenes a partir del año de edad nunca antes. 2) Evitar la entrada de animales infectados a la explotación. 3) Identificar animales infectados mediante la prueba de ELISA tomando una muestra estratificada por edad. De cada estrato se toma un número de animales de acuerdo con la prevalencia esperada y el tamaño del hato. 4) Confirmar el diagnóstico clínico o serológico por cultivo fecal. La implementación de estas medidas sanitarias y de manejo no solamente contribuyen a controlar la paratuberculosis, sino que evitan la transmisión de otras enfermedades causadas por micobacterias principalmente la tuberculosis (Whan, *et al.*, 2001).

La vacuna para la paratuberculosis ha sido comercialmente disponible por muchos años, pero por desgracia no es completamente eficaz en la prevención de la enfermedad. Los animales vacunados contra la paratuberculosis desarrollan tanto hipersensibilidad de tipo retardada como anticuerpos séricos, ayuda a prevenir la enfermedad clínica pero no evita necesariamente la infección. También interfiere con los programas de diagnóstico y de control de la tuberculosis bovina. Así, si se necesita diagnosticar la infección en animales vacunados, sólo se pueden utilizar pruebas de detección para Map en heces (Jorgense, 1984), por lo que las características de la vacuna ideal para PTB se observan en el cuadro 1.

**Cuadro 1.** Vacuna actual vs. vacuna ideal

<b>Características</b>	<b>Map total- aceite</b>	<b>Vacuna ideal</b>
Disminuir signos clínicos	Si	Si
Prevenir el establecimiento e infección	No	Si
Respuesta protectora a largo plazo	?	Si
Lesiones en el sitio de la inoculación	Si	No
Lesiones por auto inoculación	Si	No
Falsos positivos en pruebas inmunológicas de TB	Si	No
Falsos positivos en pruebas inmunológicas de la PTB	Si	No

Lisle GW (2010)

## 2.2. Epidemiología y patología de la PTB ovina

**Cuadro 2.** Características de la PTB en bovinos y ovinos

<b>Características</b>		<b>Bovinos</b>	<b>Ovinos</b>
<b>Signos</b>	<b>Diarrea</b>	Si	Rara vez
	<b>Edema</b>	Si	Rara vez
	<b>Emaciación</b>	Si	Si
<b>Lesiones histológicas</b>		Engrosamiento de la mucosa (íleo-cecal)	Engrosamiento de la mucosa (íleo, ciego, colon)
<b>Tipos de Map</b>		Tipo C (Tipo II)	Tipo S (Tipo I y III)
<b>Suceptibilidad genética</b>		Jersey	Merino
<b>Frecuencia (México)</b>		8.87 % (CONASA, 2010)	No disponible
<b>Estrategia de Control</b>		Práctica de manejo	Vacunación

La enfermedad de JD se encuentra ampliamente distribuida a nivel mundial en los rumiantes domésticos como vacas, oveja, camélido y caprino. La infección se ha confirmado en los ciervos, antílopes, alces y bisontes (Hines *et al.*, 2007). El estudio en el ganado ovino ha tenido muy poco interés en comparación con el ganado bovino. La dificultad de determinar la prevalencia de la enfermedad se ha visto agravado por la falta de pruebas diagnósticas con altos niveles de sensibilidad y especificidad y los altos costos que implica la identificación de la enfermedad en comparación con el bajo valor de la oveja (Sergeant, 2001; Sevilla *et al.*, 2005).

Ningún estudio ha determinado exhaustivamente si las diferentes razas de ovejas son más o menos susceptibles a la enfermedad de Johne. Aunque se ha observado mayor susceptibilidad en la cruce de Merino-Romney. En cuanto a estudio con relación a la edad y el sexo no ha habido publicaciones con respecto a la susceptibilidad a la infección.

La signología clínica en ovejas se limita a pérdida de peso crónica, que puede ocurrir a partir de los 2 años de edad. En la mayoría de los animales la enfermedad puede ocurrir a los 3-5 años de edad, el edema puede o no presentarse, en casos avanzados se presenta hipoalbuminemia y hipocalcemia (Jones y Kay, 1996). La diarrea no se considera una característica de paratuberculosis en los pequeños rumiantes, a excepción de las etapas terminales de su enfermedad (Cuadro 2). En la mayoría de las ovejas que mueren por paratuberculosis sus heces son normales. En un estudio de 50 ovejas con la enfermedad, la mayoría presentaba pérdida de peso, el 50% defecaba normal, el 30% presentaba diarrea moderada, y el 20% tenía diarrea severa. (Carrigan y Seaman, 1990). En casos avanzados en el ganado ovino suelen tener un engrosamiento de la mucosa del íleon terminal, la pared puede ser edematosa con forma de crestas transversales. El ciego y el colon también pueden estar implicados. En los casos descritos por Carrigan y Seaman (1990), la linfadenomegalia estuvo presente en el 38% de las ovejas. Histológicamente, la enteritis granulomatosa se fue de moderada a severa (94% de las ovejas) tiflitis (74%) y colitis (14%), el recto se vio involucrado en el 2%; la mayoría de las ovejas presentaron infiltrado linfocitario. En las secciones de tejido de los mismos animales, el 88% de las ovejas tenían abundantes bacilos ácido alcohol resistente (BAAR) y el 12 % tenían pocos BAAR. Esto lleva a describir dos formas distintas de la enfermedad en el ganado ovino: paubacilar y multibacilar. Clarke et al. (1996) utiliza un sistema de clasificación, las ovejas con una media de 0-10 BAAR por los macrófagos se llama paubacilar y aquellos con más de 10 fueron multibacilar. Los animales de ambos grupos mostraron emaciación y edema; los animales multibacilar fueron más propensos a tener lesiones macroscópicas destacables en el intestino y los ganglios linfáticos asociados. Histológicamente, el grupo paubacilar tiende a tener un infiltrado linfocitario con menos macrófagos en comparación con el grupo multibacilar (Clarke y Little, 1996).

La ruta más común de infección es la vía fecal-oral. La infección también puede propagarse por transmisión intrauterina y transmamaria. (Lembeth *et al.*, 2004). Los datos experimentales de infección han

demostrado que las ovejas infectadas por rutas alternativas se desarrollan alterando los perfiles inmunológicos de respuesta en comparación con los infectados por vía oral (Begg *et al.*, 2005). Los corderos infectados por vía oral en comparación con intraamigdalino habían aumentado el interferón gamma, la proliferación de linfocitos y los niveles de anticuerpos. Esto puede explicar en parte la gran variación en la respuesta inmune registrada en los grupos de animales infectados. Esto tiene implicaciones para el diseño de modelos de infección experimental y los resultados observados en este tipo de investigación.

Las placas de Peyer ileales en ovejas, a diferencia de los humanos, muestra la maduración prenatal, con antígenos independientes, linfopoyesis y una tasa de producción de linfocitos mayor que en el timo. El Peyer ilear en el ganado ovino es lo único que se requieren para el desarrollo de las células B y al igual que el timo involuciona con la edad (Landsverk *et al.*, 1991). Al nacer, las placas de Peyer son el principal tejido linfoide, lo que representa 1.2% del peso del cuerpo del cordero. A las 6 semanas de edad, las placas de Peyer ileal de un cordero se extenderá 2.5 m. a lo largo del íleon terminal. Desde las 12 semanas de edad, las placas de Peyer ileal comienzan a involucionar, con sólo unos pocos restantes a los 18 meses de edad. Las placas de Peyer ileal de los rumiantes neonatales se considera que es un objetivo primario para Map. Los folículos linfoides de las Peyer ileales contienen un gran número de células B, pero pocas células T (Landsverk *et al.*, 1991), mientras que las placas de Peyer yeyunales persisten en los animales adultos, que contienen grupos de células B y tienen numerosos CD4+ células T en el folículo linfoide asociado.

### 2.1.5. Modelos experimentales de paratuberculosis

La prevalencia en los rebaños se desconocen en la mayoría de los países pero la prevalencia de la infección está aumentando en países que no cuentan con programas de control obligatorio. Los modelos experimentales son fundamentales para evaluar a los candidatos potenciales de vacuna y estudiar las respuestas del huésped a la infección. Prácticamente todos los investigadores han desarrollado modelos de paratuberculosis de forma independiente de los demás (cuadro 4), dando como resultado un alto grado de variabilidad debido al uso de diferentes especies de animales, las dosis, cepas de MAP, y el intervalo de dosificación (Hines *et al.*, 2007).

**Cuadro 3.** Modelos experimentales de paratuberculosis

Condiciones	Especies			
	Bovino	Caprino	Ovino	Murino
Raza	Bos taurus	No específica	Merino	Balb/c, C57BL/6
Edad	< 8 semanas	<4 meses	<4 meses	< 6 meses
Vía de infección	Oral	Oral	Oral	(IP)
Cepa MAP	K-10	K-10	No específica	K-10
Dosis	100 mg peso húmedo. 2 días consecutivos (total $2.0 \times 10^9$ organismos)	100 mg peso húmedo. 2 días consecutivos (total $2.0 \times 10^9$ organismos)	100 mg peso húmedo; 3 días consecutivos (total $3.0 \times 10^9$ organismos)	10 mg peso húmedo dosis única
Necropsia	Si	Si	Si	Si
Histopatología	Si	Si	Si	Si
Cultivo de tejido	Si	Si	Si	Si
Cultivo fecal	Si	Si	Preferido	Preferido
Respuesta inmune	Preferido	Preferido	Preferido	Preferido
Enfermedad Clínica	Preferido	Preferido	Preferido	No aplica

### 2.1.5.1. Modelo en bovinos

Este modelo se utiliza para los estudios de eficacia de la vacunación, las intervenciones preventivas o terapéuticas, la patogénesis de largo plazo, la respuesta inmune, y la evaluación de los ensayos de diagnóstico. No hay informes publicados que proporcionen evidencia sobre la susceptibilidad entre las razas lecheras comunes, pero se tiene sugerencias de mayor susceptibilidad en el ganado Jersey a la infección natural. Debido a la diferencia en la presentación clínica de la paratuberculosis en las raza *Bos indicus*, se recomienda que las razas *Bos taurus* se utilicen exclusivamente para estudios de paratuberculosis en bovinos. En cuanto a la cepa la K-10 fue seleccionada como la cepa prototipo de modelos de infección en la especie bovina, ya que se sabe que es patogénica, y tiene un genotipo bien caracterizado. Sin embargo el estado de pasaje de los laboratorios de la cepa K-10 Map es desconocida.

Los tipos de inóculos administrados incluyen heces de un animal infectado, raspados de mucosa intestinal, ganglios linfáticos homogenizados, y Map cultivado in vitro. En estudios anteriores, Map se recogió a partir de medios sólidos (Herrold's Egg yolk, Middlebrook 7H11, Middlebrook 7H10, Taylor's, Dubos) o de caldos (Middlebrook 7H9). Los inóculos preparados a partir de tejido homogenizado intestinal, tejido linfoide, o heces no deben utilizarse ya que no pueden ser adecuadamente estandarizados debido a la aglutinación y que se almacenan en cantidades suficientes para numerosos estudios. Se recomienda caldo de Middlebrook 7H9, complementado con OADC, micobactina J, y 1% de glicerol para la propagación del inóculo (Hines *et al.*, 2007). El almacenamiento del inóculo a 4°C más de 4 semanas puede reducir la viabilidad. El almacenamiento del inóculo para 2 semanas a 4°C se considera aceptable. Sin embargo, el inóculo almacenado debe ser incubado a 37°C durante 2-3 horas antes de su administración para reactivar al organismo refrigerado. Todas las muestras dentro de un estudio deben ser tratadas de la misma manera. Las vías de inoculación, oral, intragástrica, y parenterales de han utilizado con éxito. Sin embargo, la vía oral se recomienda ya que esta imita más estrechamente la exposición natural (Hines *et al.*, 2007).

### 2.1.5.2. Modelo en caprinos

El modelo de exposición caprina es destinado principalmente al estudio de la patogénesis y la eficiencia de vacunas, sin embargo, también podría ser útil para otros estudios, incluyendo la evaluación de ensayos diagnósticos.

No hay una raza específica, cualquier raza local común es aceptable, ya que no se han realizado estudios para investigar la resistencia o susceptibilidad genética de la raza. Los animales deben ser sometidos a un proceso de selección certificando indicando que los animales están libres de la enfermedad. Los estudios de desafíos en cabras han utilizado con éxito Map aislados de cabras clínicamente infectadas, ganado vacuno y ovejas, así como los seres humanos. El 50% de los aislamientos de casos clínicos en el ganado caprino han sido de los genotipos de la especie bovina. En algunos estudios el inóculo consistió en MAP cultivado in vitro, mientras que en otros se preparó a partir de homogenizados de raspados de tejidos de mucosa intestinal de un animal clínicamente enfermo. En cuanto a la cepa se recomienda la K-10 bovina. El método para la preparación del inóculo y el almacenamiento es el mismo que se indicó para el modelo de bovinos. Las vías de administración han variado y esencialmente, todas las rutas ensayadas han tenido éxito en la infección. La vía oral se semeja más estrechamente a la exposición natural y se considera la mejor vía de administración. El tamaño de inóculo también ha variado ampliamente y va de 2.37 a 200 mg y de  $3 \times 10^7$  a  $8 \times 10^{10}$  UFC y fueron en general exitosas en el establecimiento de la infección. Dos dosis diarias consecutivas de  $1 \times 10^9$  organismos deben establecer la infección en la mayoría de los animales. La edad para inocular ha variado desde el día de nacimiento hasta los 10 meses de edad, no se sabe si la resistencia relacionada con la edad se produce en cabras. La edad de la administración dependerá del objetivo experimental y criterios de valoración, pero por lo general los machos cabríos no deben tener menos de 4 meses de edad. La enfermedad clínica se espera que se desarrolle en un bajo porcentaje de los animales en 9-10 meses después de la inoculación (Hines *et al.*, 2007).

### 2.1.5.3. Modelo en ovinos

Este modelo es principalmente para la patogénesis y estudios de eficacia de la vacuna, pero también podría ser utilizado para evaluar los ensayos de diagnóstico. El Merino, así como algunas razas lecheras pueden ser más susceptibles a Map que otras razas ovinas, pero la resistencia genética no ha sido comprobada. Por lo que la raza Merino es aceptable para el estudio. Los estudios de retos experimentales de la especie ovina han utilizado cepas de Map de bovinos, ovinos, fauna silvestre y los seres humanos. Las cepas más comunes de Map, JD clínica en ovejas pertenece al genotipo ovino. Por lo tanto para producir lo más cercano a la infección natural de la especie ovina, cualquier aislado clínico que puede ser cultivado in vitro se considera aceptable. Los medios de cultivo utilizados en los estudios de ovinos publicados, han incluido Middlebrook 7H11 caldo Middlebrook 7H10 agar, y BACTECTM 460 media con una concentración mayor de huevo. Middlebrook 7H11 caldo es el medio preferido para la preparación del inóculo, pero cualquier medio capaz de soportar el crecimiento de la cepa ovina de Map es aceptable. La manipulación y el almacenamiento es igual al descrito para el ganado bovino. La vía de administración oral ha utilizado solución salina o suspensiones de leche, pero otros protocolos también han sido utilizados con éxito. La vía oral se asemeja más a la exposición natural y se considera la mejor vía de administración. El inóculo de desafío ha oscilado entre 15 y 200 mg de peso húmedo de los organismos, de  $2.6 \times 10^1$  UFC y de 0.65 a 80 g de tejido macerado infectado de un caso clínico. La dosis más baja en general no ha sido efectiva en el establecimiento de la infección (Reddacliff *et al.*, 2004).

La vía y frecuencia de dosificación han variado ampliamente entre los estudios. Basado en la evidencia experimental reciente, tres dosis orales diarias consecutivas que constan de  $1 \times 10^9$  organismos por dosis (100 mg granulado peso húmedo/dosis, 300 mg en total) debe ser utilizada para establecer la infección (Begg y Griffin, 2005).

La edad a la inoculación ha variado desde el primer día de nacido hasta los 10 meses. En desafío experimental, en cualquier momento hasta los 4 meses de edad es apropiado, sin embargo, la edad estará influenciada por el objetivo experimental (Hines *et al.*, 2007).

Cuadro 4. Modelos ovinos de la PTB

Referencia	Edad	Cepa MAP	Dosis	Vía de infección	Duración del estudio	Enfermedad clínica	Cultivo fecal	Cultivo de tejido	Pruebas inmunológica	Histopatología
Reddaciiff y Whittington, 2003	3-4 meses	oveja aislar (heces)	$2.6 \times 10^1$	Oral		No	0/30	0/12	IFN- $\gamma$ + ELISA+	0/30
Kurade et al. 2004	2-3 meses	oveja clínica aislar (tejido)	$1 \times 10^{10}$	Oral	Hasta 330 días	Si	3/20	7/20	ELISA+	20/20
Stewart et al., 2004	6 meses	Bovino clínico aislar (tejido)	$1 \times 10^{10}$ 20	Oral	54 meses	Si	7/10	1/5	IFN- $\gamma$ + ELISA+	No reportado
	10 meses	oveja clínica aislar (tejido/cultivo)		Oral	35 meses	Si	5/10	1/5	ELISA+	
Begg et al., 2005	3 meses	Oveja clínica aislar (JD-tejido)	$1 \times 10^9$ 4X3 día	Oral	10 meses	No	No reportada	21/10	IFN- $\gamma$ + ELISA+	17/30
			$5 \times 10^8$ $1 \times 10^9$ 1X3 semanas	oral	13 meses	Si	No reportada	16/30		22/30
			$5 \times 10^7$	IT		No	No reportada	8/12		7/12
Begg y Griffin, 2005			$5 \times 10^8$	Oral	16 meses			8/12		9/12
	2.5 meses	Oveja clínica aislado-JD3	$5 \times 10^8$ 1X3 semanas	oral	Hasta 22 meses	Si	No reportada	No reportada	IFN- $\gamma$ + ELISA+	23/30

(Hines et al., 2007)

#### 2.1.5.4. Modelo en murinos

Los usos principales del modelo murino a largo plazo son la detección temprana de posibles vacunas o análisis preliminar de la patogénesis. Sin embargo, las características típicas de JD en el ganado (por ejemplo, diarrea, lesiones intestinales severas) no pueden ser reproducidas en ratones. Aunque, el modelo murino facilita el desarrollo de la vacuna para JD. A diferencia de las especies bovinas, caprinas, cérvidos o los modelos de las especies ovinas, muchos reactivos inmunológicos están bien desarrollados para los ratones. Además, los ratones con antecedentes genéticos variables están disponibles, permitiendo la investigación de las interacciones huésped-patógeno en un nivel molecular. La elección de la cepa está fuertemente ligada a la utilización prevista del modelo (por ejemplo la patogénesis o pruebas de la vacuna). Algunos estudios utilizaron ratones BALB/c o C57/BL6, que son inmuno competentes, pero susceptibles a la infección. Otros usaron ratones C3H, que son más resistentes. A pesar de la presencia de lesiones granulomatosas en ambas cepas susceptibles y resistentes de ratones, el número de lesiones y el grado de colonización bacteriana se redujo drásticamente en la cepa resistente, por lo que los investigadores deben considerar cuidadosamente la cepa de ratón antes de usar este modelo para probar la virulencia de un aislado o ensayar la eficiencia de una vacuna. Otros parámetros importantes son las dosis infecciosa y vía de administración. Por vía oral, de  $1 \times 10^{11}$  UFC/el animal produce lesiones granulomatosas en el 58 % de los ratones, pero las lesiones se limitan en ganglios linfáticos mesentéricos. Intraperitoneal (IP), la inyección de una baja dosis ( $1 \times 10^6$  UFC) indujo un pequeño número de granulomas epitelioides, pero granulomas multifocales, se produjo cuando se utilizaron  $10^8$  UFC. Por lo que se recomienda una dosis de  $1 \times 10^8$  UFC/animal (~10 mg) de K-10 o especie muy relacionada, administración IP (Hines *et al.*, 2007).

Hasta la fecha, la inoculación IP tiene la tasa de infección más reproducible (100%), en comparación con otras vías de suministro. En un formato de alto rendimiento. El análisis se centra en el hígado y el intestino, de los cuales se examinan histológicamente. A diferencia de otras especies, el hígado es el órgano más afectado después de la inyección IP (Mutwiri et al., 1992).

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Área de estudio

El estudio se realizó en las instalaciones del Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias de la Universidad Autónoma de Baja California; granja de ovinos, corral de experimentación, Laboratorio de Tuberculosis y Brucelosis y Laboratorio de Biología Molecular.



**Figura 1.** Corral de experimentación de la paratuberculosis - IICV

#### 3.2. Diseño del estudio

Estudio longitudinal (2.5años) no aleatorizado, en ovinos infectados experimentalmente con Map.

#### 3.3. Animales

Se utilizaron 3 borregos machos, raza Katahdin o cruce con Katahdin de 3 meses de edad aproximadamente, provenientes del corral de producción ovina del IICV-UABC. Inicialmente los animales fueron identificados con su número de arete; 389, 391, y 392. Tras la pérdida de aretes de identificación se maneja en algunos datos de la presente tesis como animal A, B y C.

### 3.3.1. Criterio de inclusión

Hijos de madres negativas a las pruebas de PTB, analizadas mediante las pruebas de ELISA.

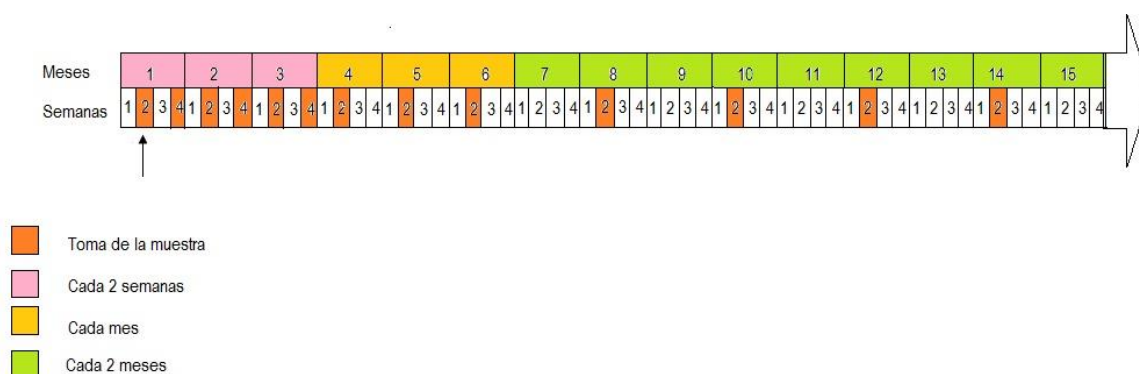
### 3.3.2. Criterio de exclusión

Crías de ovinos seropositivas.

### 3.3.3. Inoculación

Se prepararon inóculos de Map (cepa ATCC19698) mediante el cultivo líquido en medio Middlebrook 7H9 con 10% de OADC (ácido oleico-albumina-dextrosa- NaCl) y 2 µg/ml de Micobactina J (MJ). Cada dosis contuvo 1ml de la suspensión de Map ( $1.7 \times 10^7$  UFC) y 9ml de agua destilada estéril y se inoculó por vía oral introduciendo una sonda por el esófago. A inicio de junio de 2011 se infectaron en total 4 dosis por cada animal con un intervalo de 1 día después de la primera dosis.

## 3.4. Toma de muestras y almacenamiento



**Figura 2.** Cronograma de toma de muestras

La toma de muestras tanto de sangre como de heces, se realizó cada 2 semanas durante los meses uno, dos y tres, cada mes los meses cuatro, cinco y seis. Posteriormente se perdió el seguimiento del presente proyecto hasta el muestreo del mes 9.

Las muestras de sangre se centrifugaron durante 10 minutos a una velocidad mínima de 1500g para la obtención de el suero el cual se almaceno a -20°C para su posterior uso en las prueba serológica (EVELISA y ELISA comercial). Las muestras de heces fueron almacenadas a -80°C, posteriormente a -20°C.

**NOTA:**

*Debido a numerosos cambios de lugar de almacenamiento por la reconstrucción de laboratorios así también por fallos de congeladores se perdió seguimiento de muestras, sin encontrar hasta la fecha la mayoría de sueros muestreados. Además se perdió la identificación de animales en el proyecto inicial por la otra tesis se quedó suspendido hasta que se retoma por la presente tesis.*

**3.5. *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* (Map)**

La cepa de Map utilizada para la infección experimental y la preparación de antígeno de superficie fue la cepa de referencia; ATCC 19698, la cual se cultivó en medio líquido Middlebrook 7H9 con 10% de OADC y 2 µg/ml de MJ a 37°C hasta la observación del crecimiento exponencial de la bacteria, durante 3 meses.

**3.6. Cultivo bacteriológico fecal**

Las muestras de heces fueron procesadas para la realización de cultivos bacteriológicos, en medio sólido Middlebrook 7H10 (Becton Dickinson) suplementado con yema de huevo, para determinar la excreción de Map, según la metodología descrita por Harris *et al.*, (2009), modificando

la concentración del coctel de antibióticos (Anexo 3). Para la confirmación se utilizó el medio líquido Middlebrook 7H9 con 2 µg/ml de MJ lo cual nos permitió comparar los resultados de ambos medios. Se incubaron a 37°C y su crecimiento fue verificado hasta la observación de las colonias o turbidez del líquido.

### **3.7. Preparación del antígeno lipídico de Map**

Map fue cosechada de cultivos líquidos en fase estacionaria mediante la centrifugación en tubos de 50ml a 3,500 rpm durante 10 min utilizando la centrifugadora con rotor swing (Eppendorf 5804 R). El sedimento se pasó a un microtubo de 1.5ml y se resuspendió en etanol al 80% con una densidad celular de 80mg (peso mojado)/ml. Se agitaron con un agitador (VORTEX MIXER VM-300) a temperatura ambiente durante 1 min a la máxima velocidad, y se centrifugó a 10,000 rpm durante 10 min, el sobrenadante se colocó en un nuevo microtubo y se almacenó como antígeno lipídico extraído a -20°C, este antígeno puede ser almacenado a -20°C o -80°C durante varios meses sin perder su antigenicidad, (Eda *et al.*, 2006). El inmunoensayo en placas con el antígeno lipídico se refiere como una mezcla de etanol y órtice ELISA (EVELISA). Las placas EVELISA se prepararon un día antes del inmunoensayo mediante la inoculación de 50 µL de antígenos lipídico en cada pocillo de una placa de microtitulación de 96 pocillos (Nunc MaxiSorp® flat-bottom). Las placas fueron incubadas durante la noche con las cubiertas retiradas en una campana de extracción a temperatura ambiente para permitir que los antígenos extraídos se adhieran a las superficies de los pocillos por evaporación (Anexo 4).

### **3.8 ELISAs**

#### **3.8.1. ELISA comercial**

ELISA comercial (Institut Pourquier-IDEXX) se llevó a cabo según las instrucciones del fabricante (Anexo 7).

### **3.8.2. Etanol-Vortex ELISA (EVELISA)**

Cada pocillo de una placa recubierta con antígenos lipídicos de Map se incubo con 300 µl de buffer B (100 ml Superblok [Blocking Buffer in PBS, Thermo Scientific®], 10ml 10X PBS 800 ml de agua destilada y 500 µl de Tween 20) a temperatura ambiente durante 1 hora. Se descartó la solución, se lavaron dos veces con 100 µl de PBS 0.05% Tween 20 (Fosfato salino, que contiene 0,05% de Tween 20), los sueros fueron diluidos 1:100 en buffer B, en cada pozo se colocaron 50 µl de cada muestra, incluyendo los sueros controles, y se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora. Después se procedió a lavar los pocillos cuatro veces con 100 µl de PBS 0.05% Tween 20, posterior al lavado se añadió 50 µl/pozo del anticuerpo secundario cabra anti-bovina de inmunoglobulina G (IgG) diluida 1:500 en buffer B, se incubo durante 45 min. transcurrido el tiempos se procedio a lavar los pocillos cuatro veces con 100 µl de PBS 0.05% Tween 20, y se añadieron 50µl/pozo de TMB se incubó de 15-30 min, se añadió 100 µl/pozo de solución STOP (2M, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), se pocedio a realizar la lectura en un lector de ELISA a 450 nm (Eda, *et al.*, 2006) (Anexo 6).

### **3.8.3. Sueros controles**

Para las pruebas serológicas se incluyeron sueros controles positivos y negativos de los kits comerciales de ELISA de diferentes laboratorios (Porquier, Allied Monitor y Kyoritsu) así como los sueros de 9 animales positivos a PTB por cultivo fecal, originarios de Baja California y sueros de animales negativos del IICV.

## **3.9. PCR**

### **3.9.1. Extracción de DNA en heces**

Para la extracción de ADN de heces se utilizó el método de lisis-Guanidina Chelex según Zhang y Zhang (2011), En un tubo de 50 ml se colocó 1g de heces y 25 ml de NaOH 0.02N, se agitó vigorosamente con

Vortex hasta homogenizarse, posteriormente la mezcla se dejó reposar durante 30 min a temperatura ambiente y se transfirió 20 ml del sobrenadante a un tubo nuevo. Se centrifugó a 1800g por 30 min a 25 °C, se descartó el sobrenadante, se resuspendió el pellet en 25 ml de agua destilada estéril y se centrifugó con un rotor swing (Eppendorf 5804 R) a 1800g por 30 min a 25 °C, se descartó el sobrenadante, este paso se repitió dos veces. El pellet se resuspendió en 800 µl de solución de lisis (0.01M Ácido clorhídrico Tris [HCl] 5mM Ácido etilendiamino-tetra-acético [EDTA], 4M Tiocionato de guanidina, 0.25% Dodecil sulfato de sodio [SDS], 0.5% citrato de sodio). La suspensión se transfirió dentro de un micro tubo de 2 ml con 400 µl de Fenol saturado con Tris, 400 µl de cloroformo y 0.5 g de perlas de zirconio (Biospec Products) de 0.1mm de diámetro, el tubo se agitó en un Bead-Beater (Biospec 3110BX) a velocidad máxima durante 45 segundos, se enfrió en hielo y se centrifugó a 8000g por 5 min, después de centrifugar se tomaron 500 µl de sobrenadante y se mezcló con 500 µl de Chelex 100 Matrix (BioRad). Se incubó a 56 °C durante 30 minutos y a 100 °C por 10 minutos. La mezcla se centrifugó a 13,000g por 10 minutos a 4°C, se tomaron 800 µl de sobrenadante y se mezcló con 400 µl de etanol al 100%. Esta se pasó por una membrana de sílica, se lavó dos veces con la solución de lavado (2mM Ácido clorhídrico Tris [HCl] pH 7.5, 150mM, Cloruro de sodio [NaCl] en etanol al 80%. Y finalmente se eluyó con 50 µl de agua libre de nucleasas (Anexo 5).

### **3.9.2. PCR cuantitativo (qPCR)**

La detección molecular de Map fue realizada mediante la amplificación de un fragmento de 183pb de la secuencia de inserción IS900 con un par de cebadores específicos:

MP10-1: 5'-ATGCGCCACGACTTGCAGCCT-3'

MP11-1: 5'GGCACGGCTCTTGTGTAGTCG-3' (Kawaji et al., 2007).

La mezcla de reacción qPCR se llevó a cabo en un volumen total de 25µl. Contenía 2.5 µl de ADN plantilla, 12.5 µl de 2X PerfeCta SYBR Green

PCR Master Mix (Quanta Biosciences, Inc.), y 5 $\mu$ M de cada uno de los cebadores en agua libre de nucleasas. Las condiciones de reacción fueron las siguientes: etapa de activación inicial de 15 min a 95 °C, y 45 ciclos de amplificación por a 95 °C durante 30 s y 68 °C por 60 seg. (Kawaji *et al.*, 2007). Después del ciclo de amplificación se analizaron la curva de disociación de 60 a 95°C para verificar la amplificación específica de la secuencia IS900. Para obtener la curva estándar de la amplificación se utilizó la dilución en serie (1:1, 1:10, 1:100, 1:1000) del ADN genómico extraído del cultivo líquido de Map ATCC 19698 utilizando el kit comercial DNeasy tissue extraction kit (QIAGEN, Inc.).

## IV. RESULTADOS

### 4.1. Condición General



**Figura 3.** Animales infectados experimentalmente a 30 meses post-infección

Los animales infectados experimentalmente a 30 meses pos-inoculación, no muestran signos aparentes de la PTB como diarrea, emaciación y pérdida de peso. Se encuentran en buena condición corporal.

#### 4.2. Excreción fecal de Map en etapa inicial de infección

**Cuadro 5.** Resultados de cultivo fecal hasta 10 meses post infección.

ID	Meses post- inoculación					
	<1sem.	2 sem.	1	2	4	10
389	Pos(+++)	Pos(+++)	Pos*	Pos (+)	Pos(+)	Neg
391	Pos(+++)	Pos(+++)	Neg*	Pos*	Pos*	Neg
392	Pos(+++)	Pos(+++)	Neg	Pos*	Pos*	Neg

Neg: no hubo crecimiento de colonias ni turbidez del medio líquido.

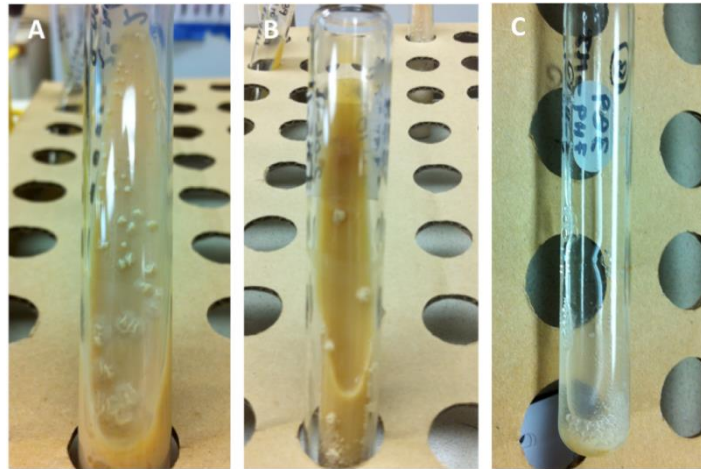
Pos: crecimiento de colonias y/o crecimiento en medio líquido.

(+) Menor a 10 colonias/tubo, (+++) Más de 100 colonias/tubo.

\* Resultados confirmados solo en medio de cultivo líquido 7H9

Los resultados negativos fueron determinados hasta 11 de diciembre del 2012 (7 meses post cultivo)

En el cuadro 5 se muestra el resumen de los resultados bacteriológicos de muestras fecales durante los primeros 10 meses post infección. Al confirmar la excreción fecal de Map post-inoculación (PI) en los tres animales infectados experimentalmente al observarse el crecimiento de colonias en las primeras dos semanas post-inoculación, lo que confirma la viabilidad de los bacilos administrados por vía oral. La excreción fecal de Map no fue continua posteriormente; en el mes 1 PI los dos animales 391 y 392 resultaron negativos a la excreción mientras que el animal 389 mostró la excreción detectable en los meses 2 y 4 PI. La intensidad de excreción no fue igual en las muestras positivas de los tres animales, sin embargo los tres animales han excretado Map a 2 semanas PI, lo que indica el establecimiento de infección en modelos experimentales (Hines et al. 2007). En el mes 10 PI los tres animales fueron negativos a la excreción fecal.



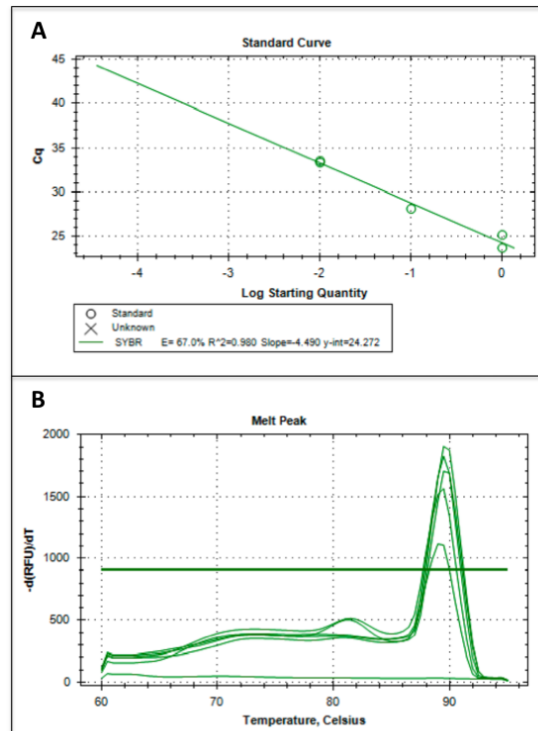
**Figura 4.** Observación de cultivos bacteriológicos

Ejemplos de crecimiento de Map en medios sólidos Middlebrook 7H10 suplementado con OADC, yema de huevo y MJ (**A** y **B**) y medio líquido Middlebrook 7H9 con OADC y MJ (**C**).

La figura 4 Se muestran algunos ejemplos de crecimiento de Map en los medios de cultivo. Los cultivos de muestras fecales de las primeras dos semanas post infección se observaron algunas colonias con el tamaño extendido (Figura 5-A,), mientras que las otras colonias se observan más pequeñas (1-5 mm), rugosas y no pigmentadas como fueron descritas en la literatura (Chioldini 1986) siendo visibles a las 8 semanas después del inicio del cultivo o hasta 6 meses. Observándose la disposición específica de estos bacilos en agrupaciones formando grumos (o *clumps*) (Gilardoni y Mundo, 2008)

### 4.3. qPCR directo fecal de Map

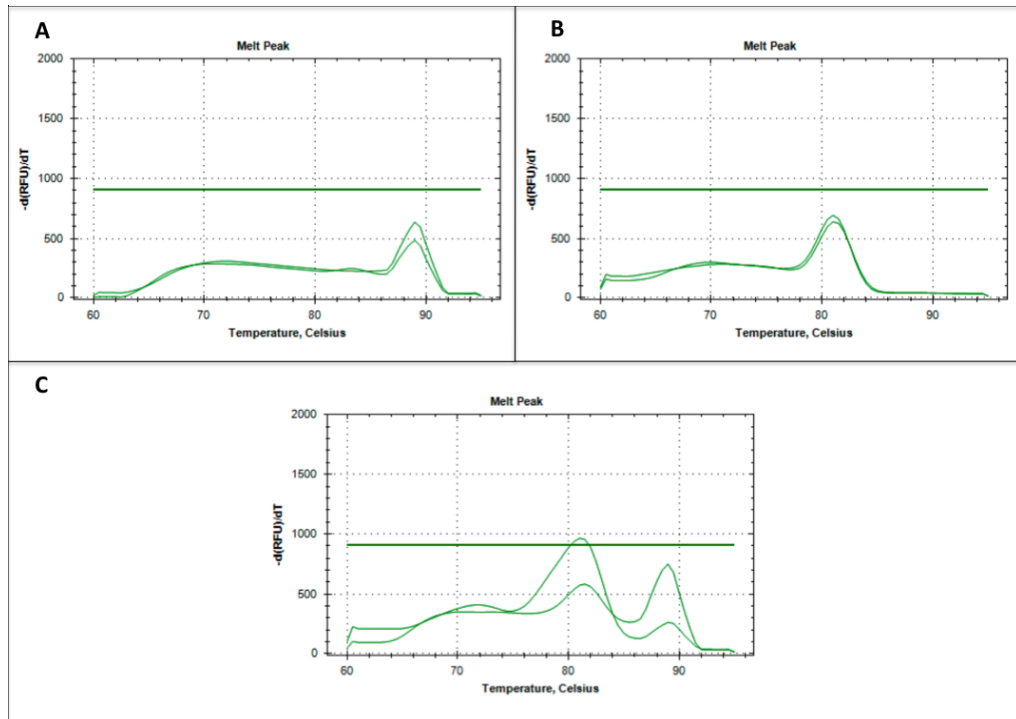
Se realizó qPCR directo de heces para detectar la excreción fecal de Map de los animales en el periodo 26-30 meses post-infección. La Figura 6. Muestra el resultado de la estandarización del qPCR según Kawaji et al. (2007) con un producto específico del gen IS900 de Map ATCC 19698.



**Figura 5.** Estandarización del PCR gen IS900 de Map

**(A).** Curva estándar de la amplificación del gen IS900 de Map (ADN genómico de Map cepa ATCC 19698). El límite de detección fue de 350 pg de DNA genómico de Map observándose una amplificación del fragmento.

**(B).** Análisis de la temperatura de desnaturalización del producto amplificado (183pb), donde se muestra la amplificación específica del fragmento de IS900 con una temperatura de desnaturalización de 89 °C, mostrando un pico en la gráfica.



**Figura 6.** Patrones de amplificación en muestras de ADN extraído a partir de heces

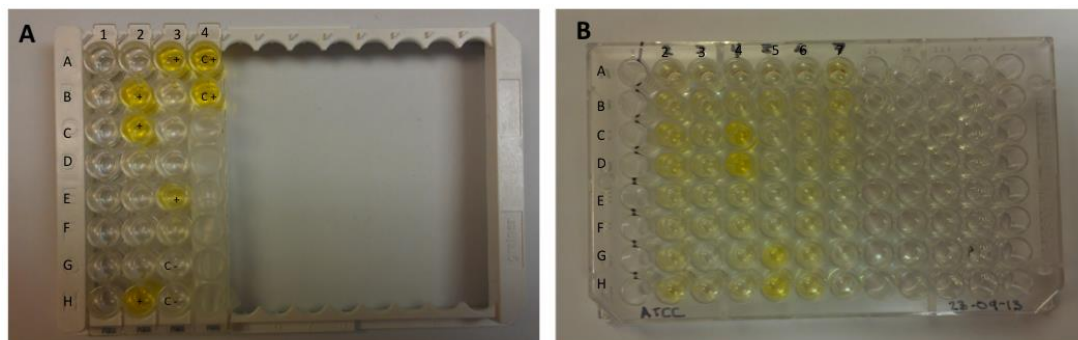
Los resultados de amplificación a partir de heces de ovinos experimentales presentaron patrones distintos presentados en la Figura 6; ej. Amplificación de un solo fragmento del gen IS900 (Figura 6-A, animal C-12-nov-13), amplificación de dímeros de primers solo (Figura, 6-B, animal B-12-nov-13collar azul), amplificación de ambos IS900 y dímeros de primers (Figura 7, C, animal B-14-ago-13). Todos los resultados que mostraron la presencia de picos a 89 °C, se consideraron como positivos a qPCR en este estudio. Las muestras con resultados sospechosos de qPCR (+/-) son muestras en las cuales una de las dos reacciones duplicadas fue positivo. Estos resultados fueron resumidos en el Cuadro 6.

**Cuadro 6.** Excreción de Map determinada por qPCR

Fecha ID	Meses post-infección (26-30 meses PI)		
	26 meses	29 meses	30 mese
A	+/-	-	+/-
B	+	-	+/-
C	+/-	+	+/-

+ Positivo; +/- Sospecho; - Negativo

#### 4.4. Serología



c+ Control positivo, c- Control negativo, + Positiva

**Figura 7. Resultados de la placa de ELISA comercial (A) y EVELISA (B)**

En la Figura 7-A se muestran resultados de la prueba de ELISA comercial (Institut Porquier-IDEXX) revelada, validada e interpretada según la instrucción del fabricante (Anexo 7). Muestras de sueros en etapa subclínica (11, 13, y 17 meses post-infección) se encuentran en las 2 primeras tiras de los pozos A1-H1y A2 con la lectura de Densidad Óptica ( $DO_{450}$ ) igual o menores de los promedios de los dos pozos de controles negativos (G3 y H3), todos con resultados negativos según el cálculo de ratio de S/P (anexo 10), resumido en el Cuadro 6.

De los sueros controles almacenados en el laboratorio, algunas muestras desarrollaron el color muy tenue (e.j. H1, D2, F3) mientras que otras muestras resultaron positivos con la mayor intensidad del color y un rango de S/P de 25-96% (marcados con “+”). Los dos controles positivos para la validación de la prueba se indican en los pozos A4 y B4.

En la Figura 7-B, se muestra una placa de EVELISA realizada para muestras de sueros en duplicado. Los valores de  $DO_{450}$  de sueros controles fueron muy variados y tenues, con el promedio de  $DO_{450}$  de 0.238 con desviación estándar de 0.134 (Anexo 11). Se observó que dos muestras controles #1 y #7 obtuvieron más alta  $DO_{450}$ , coincidiendo con los resultados de ELISA comercial, por lo que se tomaron estas dos muestras como referencias en el cálculo tentativo de S/P (S/P#1 y S/P#7). Los resultados

se resumen en el Cuadro 7, donde se toma el control #7 como referencia. Se identifica los valores de S/P relativamente altos, como la muestra del animal C- 13 meses post-infección y una muestra del 11 meses post-infección.

**Cuadro 7. Resumen de resultados de ELISA comercial**

ID	Meses post-infección		
	11*	13	17
A	Negativo	Negativo	Negativo
B	Negativo	Negativo	Negativo
C	Negativo	Negativo	Negativo

Fecha de toma de muestras; 11 meses PI (24/abr/12), 13 meses PI (31/jul/13), 17 meses (12/nov/13)

\*Muestras de 11 meses PI fueron identificados como 391, 392 y Collar, perdiendo la relación con etiquetas A,B,y C.

**Cuadro 8. Resumen de S/P en una placa de EVELISA**

ID	Meses post-infección				
	11*	13		17	
	(S/P#1, S/P#7)	S/P#1	S/P#7	S/P#1	S/P#7
A	(0.181, 0.295)	0.080	0.145	0.076	0.124
B	(0.484, 0.790)	0.137	0.224	0.082	0.134
C	(0.176, 0.287)	0.281	0.458	0.118	0.192

Fecha de toma de muestras; 11 meses PI (24/abr/12), 13 meses PI (31/jul/13), 17 meses (12/nov/13)

\*Muestras de 11 meses PI fueron identificados como 391, 392 y Collar, perdiendo la relación con etiquetas A,B,y C.

## V. DISCUSIÓN

En el presente estudio se desarrolló un modelo ovino de la paratuberculosis mediante la infección experimental de corderos de 3 meses de edad con Map cepa ATCC 19698 por vía oral. El enfoque inicial del proyecto fue la determinación de la inmunoreactividad de antígeno lipídico de superficie de Map en etapas tempranas de la infección, la cual no se pudo realizar debido a la pérdida de muestras de sueros. Sin embargo, se logró establecer la infección subclínica caracterizada por la excreción fecal de Map a 26-30 meses post-infección. Estos modelos experimentales de la paratuberculosis son útiles para estudios de la interacción de huésped-patógeno, la inmunidad local y sistémica del huésped, ayudando a la evaluación de ensayos diagnósticos, candidatos a vacunas y terapéuticos (Hines *et al.*, 2007).

Se han propuesto protocolos estándares para el desarrollo de modelos experimentales de la paratuberculosis como consenso de expertos en el área, entre los parámetros importantes se encuentran, especies animales, edad, cepas de Map, preparación del inoculó, dosis, frecuencia, vías, control de calidad, y duración del estudio (Hines *et al.*, 2007) (Cuadro 4). En modelos de ovinos reportados por otros autores, la raza Merino ha sido caracterizada más susceptible a la infección por Map que otras razas pero no se ha encontrado en la literatura el uso de la raza Katadhin como modelo experimental.

Existen varias cepas y aislados de Map, los cuales comúnmente se clasifican por sus genotipos como: “cepa ovina”, “cepa bovina” y “cepa bisonte”, independientemente donde se originó el aislado (Stevenson, 2010.). La “cepa ovina” fue el genotipo más comúnmente aislado en ovinos clínicamente infectados con PTB. (Motiwala *et al.*, 2004, Sevilla *et al.*, 2005, Sevilla *et al.*, 2007), y ha sido utilizado para retar animales con homogenizado de tejido con Map “cepa ovina” o su cultivo *in vitro* con menor

número de pasajes (Gwozdz *et al.*, 2000 a,b; Steward *et al.*, 2004; Begg *et al.*, 2005). Aunque el uso de homogenizado de tejido linfoide proveniente de animales con presentación clínicas de la PTB ovina parece el mejor método para reducir la infección ovina (Kluge *et al.*, 1968; Merkal *et al.*, 1968 a,b; Gwozdz *et al.*, 2000 a,b; Gwozdz *et al.*, 2001, Kurade *et al.*, 2004) no se considera como estándar del protocolo debido a la dificultad de caracterización y cuantificación de Map utilizada, siendo poco comparable con los resultados de diferentes autores. En el presente trabajo se utilizó una cepa de referencia de Map (ATCC 19698) que pertenece a “cepa bovina” y conocida como cepa no-virulenta comparada con la cepa de referencia altamente virulenta K-10. En Baja California, hasta la fecha no se ha podido aislar “cepa ovina” de Map, principalmente por la dificultad técnica del cultivo. Se conoce la presencia de infección ovina con Map “cepa bovina” en algunos rebaños de Mexicali (Correa *et al.*, 2013), por lo que se consideró pertinente la selección de Map cepa de referencia ATCC 19698 en el presente estudio.

La vía de administración oral es la vía de exposición natural y se considera la mejor vía de administración en modelos experimentales ya sea la suspensión en solución salina o en leche (Hines *et al.*, 2001). Existen otros protocolos de administración por vías intravenosas que también han resultado exitosos (Kluge *et al.*, 1968; Merkal *et al.*, 1968 a,b). Respecto al tipo de medio que se utilizaron para la preparación del inóculo, así como la vía de administración, dosis y frecuencia son ampliamente variados en la literatura y las evidencias recientes sugieren utilizar un mínimo de  $1 \times 10^9$  bacilos/dosis por vía oral durante tres días consecutivos para establecer la infección (Begg y Griffin, 2005), los cuales fueron utilizados en el protocolo del presente estudio.

Las edades de los animales retados según el estándar propuesto (menores de 4 meses) y la excreción fecal de Map observada en 2 semanas o posteriormente fue considerada evidencia de la infección (Hines *et al.*, 2007). En este estudio el tamaño de algunas colonias de Map excretadas en la primera semana post infección resultaron muy grandes (Figura. 5-A)

probablemente reflejando los bacilos vivos del inoculo sin lograr la resuspensión homogénea de Map. La técnica de cultivo bacteriológico que se utilizó para la determinación de la excreción fecal fue basada al protocolo de USDA-NVSL con modificaciones en las concentraciones de antibióticos. Aunque no se ha validado la sensibilidad analítica de la técnica empleada en nuestro laboratorio, Espejo *et al.* (2008) reportaron que la dosis mínima detectada al utilizar los protocolos de la USDA-NVSL fue de  $1 \times 10^5$ - $1 \times 10^9$  UFC/g de heces dependiendo del genotipo de Map. En el presente estudio se observó la excreción fecal de Map hasta 4 meses post-infección (Cuadro. 5), lo que implica que en condiciones de campo los corderos recién infectados poseen la capacidad de excreción fecal activa de Map durante este periodo, causando la contaminación del medio ambiente y nuevas infecciones en el rebaño. Las estrategias actuales de control de la paratuberculosis están concentradas en la separación de animales jóvenes (susceptibles a la infección) de los animales adultos (posibles excretores de Map), sin considerar el riesgo de la transmisión entre animales jóvenes (USAHA 2007).

El PCR directo de heces tiene como ventaja la identificación rápida de excretores de Map, comparado con el cultivo el cual tarda alrededor de 4 meses permitiéndolo acelerar el proceso de control mediante la eliminación oportuna de los excretores. Sin embargo el PCR tiene como limitación la especificidad debido a la presencia de fragmentos similares al gen blanco (*IS900*) en otras micobacterias ambientales (Cousins *et al.*, 1999) así como tampoco diferencia entre bacilos vivos o muertos ingeridos y excretados. Esta excreción de Map adquirida del ambiente se considera como excreción pasiva y no debería interpretarse como evidencia de la infección (Fecteau *et al.*, 2010).

Se han comparado varios métodos caseros y Kits comerciales de extracción de ADN a partir de muestras fecales (Stabel *et al.*, 2004; Garrido *et al.*, 2000; Chui *et al.*, 2004). En el presente estudio con la intención de buscar el método de extracción de ADN más económico y eficaz, se empleó

el protocolo reportado por Zhang y Zhang (2011) el cual resultó una mejor opción al compararlo de manera preliminar con diferentes métodos (datos no mostrados). Este protocolo combina múltiples procedimientos incluyendo pretratamiento químico, lisis y extracción con perlas de zirconio utilizando un aparato homogenizador (bead-beater), absorción por matriz de Chelex-100 y purificación por columna con membrana de sílica. Según el protocolo de qPCR de Zhang y Zhang (2011) esta técnica de extracción les permitió detectar 3 UFC de Map en 1g de heces bovino. El ensayo de qPCR que se utilizó en este trabajo fue reportado con una sensibilidad analítica de 10 Map viables por gramo de heces de ovinos (Kawaji *et al.* 2007).

En este estudio se obtuvieron animales de etapa sub-clínica de infección con excreción fecal intermitente de Map. El principal problema en el control de la paratuberculosis es la contaminación de los rebaños por animales en la etapa sub-clínica de la infección. Ya que son aparentemente sanos y no todos desarrollan signos clínicos, solo algunos animales expuestos a ciertos disparadores, por ejemplo la gestación y parto, son los que desarrollan más fácilmente signos clínicos. En la literatura, algunos modelos de ovinos tardaron más de dos años para lograr casos clínicos de la paratuberculosis (Gwozdz y Thompson, 2002). Los tres animales del presente estudio son machos con buena nutrición y se consideran con riesgo menor de desarrollar sinología clínica, por lo que se requiere verificar la patología y estatus de infección de estos modelos mediante la combinación de necropsia, histopatología, y cultivo bacteriológico para determinar los niveles de la colonización de Map en tejidos y de esta forma clasificar las lesiones patológicas encontradas. Igualmente se requiere continuar el monitoreo de cierta proporción de animales hasta que desarrollen signos clínicos, dependiendo del propósito del estudio, cantidad de animales, metas y presupuestos del proyecto.

Los tres animales sub-clínicos fueron negativos a la prueba comercial de ELISA (Institut Pourquier-IDEXX), el kit comúnmente utilizado en países de Europa, América, y Asia, lo que confirma las limitaciones de baja

sensibilidad de esta prueba de ELISA convencional (Dargatz *et al.*, 2001, Sergeant *et al.*, 2003, Gumber *et al.*, 2006, Van Weering *et al.*, 2007). Estas pruebas convencionales de ELISA tienen alta sensibilidad en el diagnóstico de animales con signos clínicos de la enfermedad como diarrea, pérdida de peso y emaciación, con una especificidad mayor (97-100%), pero no son útiles para la detección temprana de la PTB o identificación de excretores de Map de la etapa sub-clínica, cuando la respuesta inmune humoral esta suprimida todavía. En la búsqueda de nuevos antígenos inmunodominantes en etapa inicial de la infección, el antígeno lipídico de Map fue reportado como antígeno prometedor en el serodiagnóstico de bovinos con PTB (Speer *et al.*, 2006, Eda *et al.*, 2006). En modelos de infección experimental de bovinos, el ELISA con antígeno lipídico mostró el potencial diagnóstico en etapas tempranas (40 semanas post-infección) mientras con el ELISA comercial (Institut Pourquier-IDEXX) la seropositividad fue confirmada hasta más de 2 años post-infección (Eda, comunicación personal).

En este estudio se ha intentado implementar la técnica de EVELISA para el diagnóstico de la PTB ovina basándose en el protocolo usado en bovinos, sin embargo se obtuvieron resultados incongruentes, aunque se ha logrado identificar puntos críticos que deben tomarse en cuenta en la realización del protocolo como las características, marcas y modelos de materiales y reactivos (placas de ELISA con alta absorbancia, marca de anticuerpos secundarios-conjugados a HRP y sus concentraciones, tipo de bloqueador (marca comercial) y la etapa de crecimiento de Map para la preparación de antígeno). Otro parámetro que parece ser el más importante es la selección de la cepa de Map para la detección de anticuerpos en sueros ovinos. Muestras de sueros ovinos provenientes de Mexicali, incluyendo las muestras tomadas del presente estudio, fueron analizadas con antígeno lipídico de múltiples cepas de Map, aparte de la cepa ATCC19698, todos con baja reactividades (Eda, comunicación personal). Cabe mencionar que el costo de consumibles de las pruebas de ELISA y EVELISA, excluyendo la mano de obra, muestreo y procesamiento de suero, fueron aproximadamente \$150 MN/muestra y \$70 MN/muestra,

respectivamente, los cuales no son accesibles para que se aplique rutinariamente en rebaños de pequeños rumiantes de Baja California.

Otros de los aspectos importantes del uso de antígeno lipídico es la discordancia de resultados con el ELISA comercial. En algunas muestras de animales con signos clínicos se ha observado una reactividad fuerte con antígeno protoplasmático (PPA) del ELISA comercial mientras casi nula reactividad con antígeno lipídico. Es posible que exista una ventana de periodo apropiado para la detección de anticuerpo contra antígeno lipídico, posteriormente se disminuye la respuesta humoral contra antígeno lipídico, si es el caso, se necesita utilizar la combinación de múltiples antígenos para abarcar el máximo periodo para la detección, o se requiere estudios extensos con mayor número de animales en los modelos experimentales para determinar el patrón temporal de la respuesta humoral contra antígeno lipídico.

## **VI. CONCLUSIONES**

Se estableció la infección experimental de la PTB en los tres ovinos de la raza Katahdin, verificándose la excreción fecal de Map en los tres animales hasta tres meses post-infección, además se confirmó la excreción fecal en dos animales a los 26-30 meses post-infección, proporcionando modelos experimentales en futuros proyectos de investigación de la inmunopatología y diagnóstico de la PTB ovina.

Los tres animales experimentados resultaron negativos a la prueba comercial de ELISA hasta la conclusión del presente estudio, lo que confirma la implicación de estos animales sub-clínicamente infectados en condiciones de campo como fuente de contaminación siendo aparentemente sanos.

Se requieren más estudios de optimización y validación para poder utilizar el antígeno lipídico de Map en serología de ovinos.

## VII. LITERATURA CITADA

Abalos, P. 2010. Actualidades en Paratuberculosis. Departamento de Medicina Preventiva Animal. Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias Universidad de Chile. Disponible en:

<http://www.ovinos-caprinos.com.ar/SANIDAD/Actualidad%20en%20Paratuberculosis.pdf>

Anon (1985). Johnin purified protein derivative. British Pharmacopoeia (Veterinary).

Barnes, P.F., Chatterjee, D., Abrams, J.S., Lu, S., Wang, E., Yamamura, M., Brennan, P.J., Modlin, R.L. 1992a. Cytokine production induced by Mycobacterium tuberculosis lipoarabinomannan. Relationship to chemical structure. J. Immunol. 149, 541-547.

Barnes, P.F., Chatterjee, D., Brennan, P.J., Rea, T.H., Modlin, R.L. 1992b. Tumor necrosis factor production in patients with leprosy. Infect. Immun. 60, 1441-1446.

Begg, D.J., Griffin, J.F.T., 2005. Vaccination of sheep against M. paratuberculosis: immune parameters and protective efficacy. Vaccine 23, 4999–5008.

Buergelt, C.D., Hall, C., McEntee, K., Duncan, J.R. 1978. Pathological evaluation of paratuberculosis in naturally infected cattle. Vet. Pathol. 15, 196-207.

- Carrigan, M.J., Seaman, J.T. 1990. The pathology of Johne's disease in sheep. *Aust. Vet. J.* 67, 47-50. Cajeme, Sonora.
- Clarke, C.J. 1997. The Pathology and Pathogenesis of Paratuberculosis in Ruminants and Other Species. Department of Veterinary Pathology, University of Edinburgh, Easter Bush, Roslin, Midlothian, EH25 9RG, UK.
- Cocito C, Gilot P, Coene M, De Kesel M, Poupart P, Vannuffel P. Paratuberculosis. *Clinical Microbiology Reviews* 1994; 7 (3): 328-345.
- Coetsier, C., Havaux, X., Mattelard, F., Sadatte, S., Cormont, F., Buergelt, K., Limbourg, B., Latinne, D., Bazin, H., Denef, J.F., Cocito, C. 1998. Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in infected tissues by new species-specific immunohistological procedures. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 5, 446-451.
- Consejo Técnico Constitutivo Nacional de Salud Animal (CONASA). 2010. Plan estratégico del programa para la atención de la paratuberculosis en Ganado bovino, ovino y caprino en México. Disponible en: <http://www.conasamexico.org.mx/conasa/pdf/>.
- Corpa, J.M., Garrido, J., García Marín, J.F., Pérez, V. 2000. Classification of lesions observed in natural cases of paratuberculosis in goats. *J. Comp.*
- Correa, M.M., Medina, B.G., Renteria, E.T., Monje, N.F., González, V.V., López, V.G. 2013. Caracterización molecular de *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* en bovinos y ovinos de Mexicali Baja California, México. *Rev Mex Cienc Pecu*;4 (4): 489-500.

- Cousins, D V., Whittington, R., Marsh, I., Masters, A., Evans, RJ & Kluver P. 1999. Mycobacteria distinct from *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolated from the faeces of ruminants possess IS900-like sequences detectable IS900 polymerase chain reaction: implications for diagnosis, Mol Cell Probes,3 431,
- Cheville, N., Hostelles, J., Thomsen, B., Simutis, T., Vanloubbeeck y Steadham, E. 2001. Intracellular trafficking of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in magrophages. Dtsch. Tierarztl. Wochenschr. 108(6):236-43.
- Chiodini, R.J. 1986. Biochemical characteristics of various strains
- Chiodini, R.J. 1989. Crohn's disease and the mycobacterioses: a review and comparison of two disease enterities. Clin. Microbiol. Rev. 2, 90-117.
- Chiodini, R.J., Van Kruiningen, H.J., Merkal, R.S. 1984. Ruminant paratuberculosis (Johne's disease): the current status and future prospects. Cornell Vet. 74, 218-262.
- Chui, LW., King, R., Lu,P., Manninen, K., Sim, J. 2004. Evaluation of four DNA extraction methods for the detection of *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* by polymerase chain reaction. Diag. Microbiol. Infect. Disease, Vol.48, 39-45.
- Dargatz, D.A., Byrum, B.A., Barber, L.K., Sweeney, R.W., Whitlock, R.H., Shulaw, W.P., Jacobson, R.H., Stabel, J.R. 2001. Evaluation of a commercial ELISA for diagnosis of paratuberculosis in cattle. Journal of the American Veterinary Medical Association 218, 1163-1166.
- De Lisle, G.W., Samagh, B.S., Duncan, J.R. 1980. Bovine paratuberculosis II. A comparison of fecal culture and the antibody response. Can. J. Comp. Med. 44, 183-191.

- Dimareli-Malli, Z., Sarris, K. 2001. Comparison of DNA probe test and cultivation methods for detection of *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* in caprine and ovine faeces. Aust. Vet. J. 79, 47-50.
- Djonne, B., Jensen, M. R., Grant, I.R. y Hostad, G. 2003. Detection by immunomagnetic PCR of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in milk from dairy goats in Norway. Vet. Microbiol. 92:135-143.
- Eda, S., Bannantine, J., Waters, W. Mori Y., Whitlock, R., Scott, M., and Speer. 2006. A highly sensitive and subspecies-specific surface antigen enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of Johne's disease. Clin and Vaccine Immunol. 13, 837-844.
- El Zaatari, F.A., Hulten, K., El-Zimaity, H.M., Collins, M.T., Graham, D.Y. 2003. Pathogenesis of Johne's disease; a possible role of cell-wall deficient forms of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. En: Proceedings of the Seventh International Colloquium on Paratuberculosis. Juste, R.A, Geijo, M.V., Garrido, J.M. Eds. Bilbao, España. 45-48.
- Englund, S., Ballagi-Pordany A, Bolske, G., y Johansson, K. E. 1999. Single PCR with a mimic molecule for detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 33:163-171.
- Espejo, L., Wells, S., Capsel, R., Sreevatson, S. 2008, Analytical sensitivity of fecal culture and PCR for detection of *Mycobacterium avium* subs. *paratuberculosis*. 4th JDIP Annual Conference Abstract , B10,
- García Marín, J., Pérez, V. García de Jalón, J. DE las Heras, M. Barberá, M. Fernández de Luco, D. y Badiola, J. 1994. Diagnóstico de casos clínicos de paratuberculosis ovina y caprina. Pathol. 122, 255-265.

- Garrido, JM., Cortabarría, N., Oguiza, JA., Aduriz, G., Juste RA. 2000. Use of PCR method on fecal samples for diagnosis of sheep paratuberculosis., *Veterinary Microbiology*, Vo. 77, 379-386.
- Gilardoni, M. V. y Mundo, S. L. 2008. Paratuberculosis Bovina. Infovet. Sitio Argentino de Producción Animal.
- Goodfellow, M., Weaver, C.R., Minnikin, D.E. 1982. Numerical classification of some Rhodococci, Corynebacteria and related organisms. *J. Gen. Microbiol.* 128, 731-745.
- Gumber, S., Eamens, G., Whittington, R.J. 2006. Evaluation of a Pourquier ELISA kit in relation to agar gel immunodiffusion (AGID) test for assessment of the humoral immune response in sheep and goats with and without *Mycobacterium paratuberculosis* infection. *Veterinary Microbiology* 115, 91-101.
- Gwozdz, J.M., Thompson, K.G., 2002. Antigen-induced production of interferon-g in samples of peripheral lymph nodes from sheep experimentally inoculated with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Vet. Microbiol.* 84, 243–252.
- Gwozdz, J.M., Thompson, K.G., Manktelow, B.W., 2001. Lymphocytic neuritis of the ileum in sheep with naturally acquired and experimental paratuberculosis. *J. Comp. Pathol.* 24, 317–320.
- Gwozdz, J.M., Thompson, K.G., Manktelow, B.W., Murray, A., West, D.M., 2000a. Vaccination against paratuberculosis of lambs already infected experimentally with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Aust. Vet. J.* 78, 560–566.
- Gwozdz, J.M., Thompson, K.G., Murray, A., Reichel, M.P., Manktelow, B.W., West, D.M., 2000b. Comparison of three serological tests and an

interferon-g assay for the diagnosis of paratuberculosis in experimentally infected sheep. *Aust. Vet. J.* 78, 779–783.

Harris, N. y Barletta, R. 2001. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in veterinary medicine. *Clin Microbiol Rev.* 14(3):489-512.

Irengue, L. M., Walravens, K. Govaerts, M. Gosfroid, J., Rosseels, V., Huygen, K., y Gala, J.L. 2009. Development and validation of a triplex real-time PCR for rapid detection and specific identification of *M. avium* subespecie *paratuberculosis* in fecal sample. *Vet. Microbiol.* 136: 166-172.

Jorgensen, J.B. 1984. The effect of vaccination on the excretion of *Mycobacterium paratuberculosis*. In: *Paratuberculosis: Diagnostic Methods, Their Practical Application and Experience with Vaccination*. Commission of the European Communities Agriculture Publication, Luxembourg, 131–136.

Juste, R .A., García Marín, J.F., Peris, B., Sáez de Ocariz, C.S., Badiola, J.J. 1994. Experimental infection of vaccinated and non-vaccinated lambs with *Mycobacterium paratuberculosis*. *J. Comp. Pathol.* 110,

Juste, R., Aduríz, J., BAscones, M., Foley, E., Bargar, T., Barletta, R. 1993. Effect oron on mycobactin production and dependence in mycobacteria. *Proc. 74<sup>th</sup> Annu. Meet. CRWAD*, p.64. Chicago, IL, USA.

Kaur, P., Fila, G.,Singh, S. V., Patil., y Sandhu, K.S. 2010. Moleculas detection and typing of *Mycobacterium avium* subespecies *paratuberculosis* from milk sample of dary animals. *Trop Anim. Heakth Prod.* 42(5):1031-5.

- Kawaji S., Taylor, D., Mori y Whittington, R. 2007. Detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in ovine feces by direct quantitative PCR has similar or greater sensitivity compared to radiometric culture. *Vet. Microbiol.* 125: 36-48.
- Kennedy, D., Benedictus, D. 2001. Control of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in agriculture species. *Rev Sci Tech* 20: 151-179.
- Kluge, J.P., Monlux, W.S., Kopecky, K.E., Lehmann, R.P., 1968. Experimental paratuberculosis in sheep after oral, intratracheal, or intravenous inoculation: lesions and demonstration of etiologic agent. *Am. J. Vet. Res.* 29, 953–962.
- Koets, A., Rutten, V. Hoek, A., Bakker, D., Van Zijderveld, F., Müller, K. y Van Eden, W. 1990. The T(h) 1 to T(h) 2 shift in bovines paratuberculosis and the role of apoptotic cell death. In *Proc. 6<sup>th</sup> International Colloquium on paratuberculosis* (E.JB. Manning & M.T. Collins, eds) 14-18 February, Melbourne. International Association for Paratuberculosis, Madison, Wisconsin, 585-592.
- Kudah, A., Nielsen, S., y OStergaard, S. 2008. Economy efficacy, and feasibility of a risk-based control program against paratuberculosis. *J of Dairy Sci.* 91, 4599-4609.
- Kurade, N.P., Tripathi, B.N., Rajukumar, K., Parihar, N.S., 2004. Sequential development of histologic lesions and their relationship with bacterial isolation, fecal shedding, and immune response during progressive stages of experimental infection of lambs with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Vet. Pathol.* 41, 378–387.

- Larsen, A. B., Merkal, R. S., and Vardaman, T. H. 1956. "Survival time of *Mycobacterium paratuberculosis*," American Journal of Veterinary Research, vol. 17, no. 64, pp. 549–551.
- Lombard, J. E., Wagner, B. A., Smith, R. L. 2006. "Evaluation of environmental sampling and culture to determine *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* distribution and herd infection status on US dairy operations," Journal of Dairy Science, vol. 89, no. 11, pp. 4163–4171.
- Lovel, R., Levi, M. and Francis, J. 1944. "Studies on the survival of Johne's bacilli," Journal of Comparative Pathology, vol. 54, pp. 120–129.
- Lugton, I. 1999. Mucosa-associated lymphoid tissues as sites for uptake, carriage and excretion of tubercle bacilli and other pathogenic mycobacteria. Immunol. Cell Biol. 77(4): 364-72.
- Manning, E. J. y Collins, M. T. 2001. *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis* Pathogen, Pathogenesis and diagnosis: Rev. Sci. Tech 20: 133-150.
- Marie-Eve Fecteau, Robert H. Whitlock, Claus D. Buergelt, and Raymond W. Sweeney. 2010, Exposure of young dairy cattle to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) through intensive grazing of contaminated pastures in a herd positive for Johne's disease. Can Vet J. 2010 February; 51(2): 198–200.
- Martínez, A., Santillán, M., Guzmán, C., Favila, L., Córdova, D., Díaz, E., Hénandez, L., Blanco, M. 2012. Desarrollo de un Inmuno-ensayo enzimático (ELISA) para el diagnostic de la paratuberculosis 3n bovinos. Rev Mex Cienc Pec 3: 1-18.

- Massone, A.R., Martin, A.A., Ibarcayen, G.S., Gimeno, E.J. 1990. Immunohistochemical methods for the visualization of *Mycobacterium paratuberculosis* in bovine tissues. Zentralbl. Veterinarmed. [B] 37,
- McNab, W.B., Meek, A.H., Martin, S.W., Duncan, J.R. 1991. Associations between dairy production indices and lipoarabinomannan enzyme-immunoassay results for paratuberculosis. Can. J. Vet. Res. 55, 356-361.
- Merkal, R. 1984. Paratuberculosis. Advances in cultural. Serologic and vaccination methods. J Am Vet Med Assoc. 184(8):939-43.
- Merkal, R.S., Kluge, J.P., Monlux, W.S., Larsen, A.B., Kopecky, K.E., Quinn, L.Y., Lehmann, R.P., 1968b. Experimental paratuberculosis in sheep after oral, intratracheal, or intravenous inoculation: histochemical localization of hydrolase activities. Am. J. Vet. Res. 29, 985–994.
- Merkal, R.S., Larsen, A.B., Kopecky, K.E., Kluge, J.P., Monlux, W.S., Lehmann, R.P., Quinn, L.Y., 1968a. Experimental paratuberculosis in sheep after oral, intratracheal, or intravenous inoculation: serologic and intradermal tests. Am. J. Vet. Res. 29,963–969.
- Meyer, L. A. & Hall, H.H. 1994. Economic Analysis of the Impact of Paratuberculosis on the Kentucky Cattle Industry. University of Kentucky. Department of Agricultural Economics. 7 pp.
- Momotani, E., Whipple, D., Thiermann, A., y Cheville, N. 1988. Role of M cells and macrophagos in the entrance of *Mycobacterium paratuberculosis* into domes of ileal Peyer's patches in calves. Vet Pathol. 25:131-7.
- Motiwala, A.S., Strother, M., Amonsin, A., Byrum, B., Naser, S.A., Stabel, J.R., Shulaw, W.P., Bannantine, J.P., Kapur, V., Sreevatsan, S., 2004. Molecular epidemiology of *Mycobacterium avium* subsp.

paratuberculosis: evidence for limited strain diversity, strain sharing and identification of unique targets for diagnosis. *J. Clin. Microbiol.* 41, 2015–2026.

Motiwala, A.S., Strother, M., Amonsin, A., Byrum, B., Naser, S.A., Stabel, J.R., Shulaw, W.P., Bannantine, J.P., Kapur, V., Sreevatsan, S., 2004. Molecular epidemiology of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: evidence for limited strain diversity, strain sharing and identification of unique targets for diagnosis. *J. Clin. Microbiol.* 41, 2015–2026.

Mutwiri, G.K., Butler, D.G., Rosendal, S., Yager, J. 1992. Experimental infection of severe combined immunodeficient Beige mice with *Mycobacterium paratuberculosis* of bovine origin. *Infect. Immunol.* 60, 4074–4079

Navarro, J.A., Bernabe, A., Gomez, M.A., Sanchez, J., Gomez, S. 1991. Mycobacterial antigen detection by immunohistochemistry in goat paratuberculosis. *Zentralbl. Veterinarmed. [B]* 38, 231-237.

Nisbet, D.I., Gilmour, N.J.I., Brotherston, J.G. 1962. Quantitative studies of *Mycobacterim johnei* in tissues of sheep. *J. Comp. Pathol.* 72, 80-91.

OIE. 2008. Manual de Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres. Paratuberculosis Enfermedad de Johne.

Patterson, D. y Berrett, S. 1969. Malabsorption in Johne's disease in cattle: and in vitro study of L-histidine uotake by isolated intestinal tissue preparations. *J Med Microbiol.* 2:327-334.

Payne, J. y Rankin, J. 1961. The pathogenesis of experimental Johne's disease in calves. *Res Vet Sci.* 2:167-74.

- Peréz, V., Corpa, J. y García- Marin, J. 2000. El cuadro clínico y lesional de la paratuberculosis bovina. En: Juste editor. Paratuberculosis, Bovis, Aula Veterinaria, Vol. nº93, pp. 39-47. Luzan 5, Madrid, España.
- Pérez, V., García Marín, J.F., Badiola, J.J. 1996. Description and classification of different types of lesion associated with natural paratuberculosis infection in sheep. J. Comp. Pathol. 114, 107-122.
- Secott, T., Lin, T., y Wu. C. 2004. *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* fibronectin attachment protein facilitates M-cell targeting and invasion though a fibronectin bridge with host integrins. Infect. Immun. 72(7):3724-32.
- Sergeant, E.S.G., Marshall, D.J., Eamens, G.J., Kearns, C., Whittington, R.J. 2003. Evaluation of an absorbed ELISA and an agar-gel immuno-diffusion test for ovine paratuberculosis in sheep in Australia. Preventive Veterinary Medicine 61, 235-248.
- Sevilla, I., Garrido, J.M., Geijo, M., Juste, R.A. 2007. Pulsed-field gel electrophoresis profile homogeneity of *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* isolates from cattle and heterogeneity of those from sheep and goats. BMC Microbiol (manuscript ID 2111313386117098).
- Sevilla, I., Singh, S.V., Garrido, J.M., Aduriz, G., Rodríguez, S., Geijo, M.V., Whittington, R.J., Saunders, V., Whitlock, R.H., Juste, R.A., 2005. Molecular typing of *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* strains from different hosts and regions. Rev. Sci. Technol. 24 (3), 1061–1066.
- Sigurdardottir, O., Cakke-McKellp, A. Djonne, B., y Evensen, O. 2005. *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* enters the small intestinal mucosa of goat kids in areas with ad without Peyer'spathes as demonstrated with the everd sleeve method. Comp Immunol Microbiol Infec Dis. 28 (3):223-30.

- Smith, K. 1969. Electron microscopical observations on *Mycobacterium johnei*. Res. Vet. Sci. 10, 1-3.
- Stabel, J. 2010. Immunology of Paratuberculosis, Infection and Disease. Book. Paratuberculosis, Organism, Disease, Control/edited by Marcel A. Behr and Desmond M. Collins. CAB International.
- Stabel, JR., Bosworth, IL., Kirkbride, IA., Forde RI., and Whitlock, RH. 2004. A simple, rapid and effective method for the extraction of *Mycobacterium paratuberculosis* DNA from fecal samples for polymerase chain reaction. J.Vet. Diagn. Invest. 16, 22
- Stamp, J.T. y Watt, J.A. 1954. Johne's disease in sheep. J. Comp. Pathol. 64, 26-40.
- Stevenson. 2010. Comparative differences between strains of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. In Paratuberculosis, Behr and Collins (eds), CAB International. Cp. 12, p.126-137.
- Sugden, E.A., Corner, A.H., Samagh, B.S., Brooks, B.W., Turcotte, C., Nielsen, K.H., Stewart, R.B., Duncan, J.R. 1989. Serodiagnosis of ovine paratuberculosis, using lipoarabinomannan in an enzyme-linked immunosorbent assay. Am. J. Vet. Res. 50, 850-854.
- Taylor, A.W. 1949. Observations on the incidence of infection with *M. johnei* in cattle. Vet. Rec. 61, 539-540.
- Tessema. M., Koets, A., Rutten, V. y Gruys, E. 2001. How does *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* resist intracellular degradation?. Vet Q. 23(4)153-62.

- USAHA (USAHA, United States Animal Health Association). 2007. Johne's Committee, Handbook for Veterinarians and Dairy Producers-A guide for John's Disease risk assessment and management plans for dairy herds.
- Valentin-Weignd, P. y Goethe R. 1999. Pathogenesis of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infections in ruminants: still more questions than answers. *Microbes Infect.* 1(13):1121-7.
- Van der Giessen, J. Van Dijk, L., Bleumink-Pluym, N., Eger, T., Haagsma, J., Van der Zeijls, B. 1995. The spatial distribution of *Mycobacterium paratuberculosis* in infected cattle. Implications for pathogenesis and diagnosis en: Chiodini, Collins y Cassey editores. Proc 4<sup>th</sup> Int Coll Paratub. Pp 61-6 IPA, Rehoboth, MA, USA.
- Van Weering, H., van Schaik, G., van der Meulen, A., Waal, M., Franken, P., van Maanen, K. 2007. Diagnostic performance of the Pourquier ELISA for detection of antibodies against *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in individual milk and bulk milk samples of dairy herds. *Veterinary Microbiology* 125, 49-58.
- Vishnevskii, P. P., Manatsev, E. G., Chernyshev, V. V., and Ustoichivost, N. S. 1940. "Paratuberkuliznykh batsill lone," *Soviet Veterinary*, vol. 11-12, pp. 89-93.
- Whan, L.B., Grant,I.R., Ball, H.J., Scott, R. & Rowe, M.T. 2001. Bactericidal effect of chlorine on *Mycobacterium paratuberculosis* in drinking water. *Letters in Applied Microbiology*.
- Whitlock, R. H., S. J. Wells, R. W. Sweeney, and J. Van Tiem. 2000. ELISA and fecal culture for paratuberculosis (Johne's disease): sensitivity and specificity of each method. *Vet. Microbiol.* 77:387-398.

- Whittington, R. J. 2009 Factors Affecting isolation and identification of *Mycobacterium avium subespecies paratuberculosis* from fecal and tissue samples in a liquid culture system. J. Clin. Microbiol. 47 (3): 614-622.
- Wilson, D., Rossiter, C., Han, H. y Sears, P. 1997. Financial Effects of *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* on mastitis, Culling and milk production in clinically normal dairy cattle. En: Chiodini, Hines y Collins Editores.
- Zhao, B., Collins , M. y Czuprynsky. C. 1997. Effects of gamma interferon and nitric oxid on the interaction of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* whit bovine monocytes. Infect. Immune. 65(5):1761-6.

## **ANEXOS**

- **ANEXO 1.** Medio de cultivo Middlebrook 7H9 caldo
- **ANEXO 2.** Medio de Cultivo Middlebrook 7H10 agar
- **ANEXO 3.** Aislamiento de Map a partir de heces
- **ANEXO 4.** Preparación de antígeno lipídico Map
- **ANEXO 5.** Extracción de ADN mediante el Método lisis-Guanidina
- **ANEXO 6.** EVELISA
- **ANEXO 7.** ELISA POURQUIER-IDEXX
- **ANEXO 8.** Datos de animales experimentados
- **ANEXO 9.** Sueros controles utilizados
- **ANEXO 10.** Valores de DO<sub>450</sub> y P/S en ELISA Comercial
- **ANEXO 11.** Valores de DO<sub>450</sub> y P/S en EVELISA

## ANEXO 1

### Medio de cultivo Middlebrook 7H9 Caldo

#### Ingredientes:

1 L	½ L	Ingredientes	Concentración	Concentración final
900 ml	450 ml	Agua purificada		
4.7 g	2.35 g	Middlebrook 7H9		
2 ml	1 ml	Glicerol	100%	0.2%
500 µl	250 µl	Tween 80	100%	0.5%

#### Procedimiento:

1. Mezclar, Middlebrook, el agua purificada, glicerol y Tween 80 en una botella mientras se agita
2. Meter la mezcla en la autoclave en escape lento durante 30 min.
3. Esperar a que la se botella enfríe hasta que se pueda manejar cómodamente
4. Una vez enfriado, añadir 10% 100 ml/L de Olaic Acid-Albumin-Dextrose-Complex (OADC)
5. Finalmente añadir la Micobactin J

Nota: Para Map resuspender 2 mg de Micobactin J en 1 ml de etanol y añadir a 1 L. Los pasos 4 y 5 se realizan bajo campana.



## ANEXO 2

### Medio de cultivo Middlebrook 7H10 agar

#### Ingredientes:

1 L	½ L	Ingredientes	Concentración	Concentración final
900 ml	450 ml	Agua purificada		
19 g	9.5 g	Middlebrook 7H9		
5 ml	2.5 ml	Glicerol	100%	0.2%
500 µl	250 µl	Tween 80	100%	0.5%

#### Procedimiento:

1. Mezclar, Middlebrook, el agua purificada, glicerol y Tween 80 en una botella mientras se agita
2. Meter la mezcla en la autoclave en escape lento durante 30 min.
3. Colocar el vaso precipitado en baño maría a 50°C para equilibrar la solución.
4. Una vez equilibrada la solución, añadir 10% 100 ml/L de Olaic Acid-Albumin-Dextrose-Complex (OADC),
5. Finalmente añadir la micobactina

**Nota:** Para Map resuspender 2 mg de Micobactin J en 1 ml de etanol y añadir a 1 L. Los pasos 4 y 5 se realizan bajo campana.



## ANEXO 3

---

### Aislamiento de Map a partir de heces

---

#### Procedimiento:

#### Día 1

1. Pesar 2 gramos de heces y colocarlas en un tubo falcon de 50 ml.
2. Añadir 35 ml de agua destilada.
3. Agitar manualmente o con vortex rigurosamente durante 5 minutos.
4. Dejar reposar 30 minutos a temperatura ambiente.
5. Transferir 5ml de sobrenadante (liquido) a un nuevo tubo Falcon de 50 ml
6. Agregue 25 ml de HCP (Cetylpyridinium choride) al 0.9 % y agite mediante vortex durante 15 segundos.
7. Coloque los tubos a 37 grados centígrados durante toda la noche o 24horas.

#### Día 2

8. Centrifugue los tubos a 900xg o 2300rpm durante 30 minutos a 27 °C.
9. Descarte el sobrenadante (liquido).
10. Agregar 1ml de antibiótico VAN (Vancomicina, Anfotericina B y Ácido nalidixico).
11. Mezcle con vortex vigorosamente durante 15 segundos
12. Coloque los tubos a 37 grados centígrados durante toda la noche o 24 horas.

#### Día 3

13. Mezcle mediante vortex vigorosamente durante 15 segundos.
14. Inocule (con micropipeta) los tubos con medio de cultivo con 100 a 200 ml de la resuspensión.
15. Guarde los tubos con medios de cultivo a 37 °C hasta que evapore el agua con la tapa rosca floja (no cerrada completamente para que evapore el exceso de agua) y deje el tubo inclinado.
16. Cierre completamente la tapa rosca e incube nuevamente.

0.9% HCP

Ingredientes	Cantidad
Agua destilada estéril	1,000 ml
HCP (Cetylpyridinium choride) (Sigma # C5460)	9 g

Preparación de coctel de antibióticos VAN (1:10)

Ingrediente
Agua destilada estéril
1% Acido Nalidixico
1% Vancomicina
Amfotericina B (Disolver 50 mg in 5ml agua estéril)

## ANEXO 4

---

### Preparación de Antígeno lipídico de Map

---

#### Procedimientos:

1. Pesar un tubo Falcon de 50 ml
2. Transferir 20 ml de cultivo en fase estacionaria.
3. Centrifugar a 3500 rpm por 10 min y descartar el sobrenadante
4. Añadir 20 ml de 1X PBS
5. Centrifugar a 3500 rpm por 10 min (repetir este paso) y descartar el sobrenadante, la finalidad de este paso es retirar todo el líquido posible.
6. Pesar el tubo con MAP y calcular el peso húmedo de los bacilos.
7. Suspender el pellet de bacteria en etanol al 80% recién preparado, a la densidad celular de 80mg/ml. Transferir la suspensión a un microtubo.

$(\text{Peso de los bacilos} / 80) = \text{cantidad de etanol requerido (ml)}$
--

- Agite la suspensión con vortex durante 1 min a la máxima velocidad
8. Centrifugue a 10000 rpm por 10 min
  9. Transferir el sobrenadante a un microtubo tubo nuevo
  10. Rotular y guardar a -20°C.

## ANEXO 5

---

### Extracción de ADN mediante el Método lisis-Guanidina

---

#### Procedimientos:

1. Pesar 1 gr de heces y mezclarlo con 25 ml de NaOH [0.02 N] (Hidróxido de sodio 0.02 normal) Dejar reposar durante 30 minutos a temperatura ambiente
2. Trasferir 20 ml del sobrenadante a un tubo nuevo.
3. Centrifugar a 18,000 Xg durante 30 minutos a 25°C
4. Descartar el sobrenadante
6. Resuspender el pellet en 25 ml de agua destilada.
7. Centrifugar a 18,000 Xg durante 30 minutos a 25°C
8. Descartar el sobrenadante
9. Repetir los pasos 7 y 8
10. Resuspender el pellet en 800 µl de buffer de lisis
11. Transferir la suspensión dentro de un tubo de 2 ml para Bead-Beater con:
  - 400 µl de fenol saturado con Tris
  - 400 µl de Cloroformo
  - 0.5 g de perlas de zirconio de 0.1 mm de diámetro
12. Agitar el tubo en un Bead-Beater a máxima velocidad durante 45 seg.
13. Enfriar el tubo en hielo
14. Centrifugar a 8,000 Xg durante 5 minutos
15. Tomar 500 µl de sobrenadante y mezclarlo con 500 µl de Chelex 100 Matrix.
16. Incubar a 56°C por 30 min y a 100°C por 10 min
17. Centrifugar la mezcla a 13,000 Xg por 10 min a 4°C
18. Tomar 800 µl de sobrenadante y mezclarlo con 400 µl de etanol al 100%
19. Parar la mezcla a una Columna con membrana de silica
20. Lavar 2 veces con 700 µl de Buffer de lavado.
21. Eluir con 50 µl de agua libre de DNasa y RNasa
22. Almacena a -20°C.

**Preparación de soluciones****• Buffer de lisis**

<b>Ingrediente</b>	<b>Concentración</b>
Tris-hydrochloric acid (HCl)	0.01 M
Ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA)	0.005 M
Guanidine thiocyanate	4 M
Sodium dodecyl sulfate (SDS)	0.25%
Sodium citrate	0.5%

En agua destilada

**• Buffer de lavado**

<b>Ingrediente</b>	<b>Concentración</b>
Tris-hydrochloric acid (HCl) pH 7.5	2mM
Cloruro de sodio (NaCl)	150 mM

En etanol al 80%

## ANEXO 6

---

### EVELISA

---

#### Procedimiento:

1. Preparación de la placa:
  - Diluir el antígeno lipídico de Map 1:80
  - Depositar 50  $\mu$ l del antígeno diluido en cada pocillo de la microplaca
  - Colocar bajo la campana con la cubierta retirada durante toda la noche.
2. Colocar 200  $\mu$ l de Buffer B en cada pocillo e incubar durante 45 min a 1h.
3. Lavar con PBS-0.5% Tween 20, 100  $\mu$ l por pozo (repetir un total de 4 lavadas)
4. Diluir los sueros 1:100 en Buffer B
5. Colocar 50  $\mu$ l del suero diluido en el pocillo correspondiente e incubar de 45 min a 1h.
6. Lavar con PBS-0.5% Tween 20, 100  $\mu$ l por pozo (repetir un total de 4 lavadas)
7. Diluir el conjugado en Buffer B y colocar 50  $\mu$ l en cada pozo (La dilución dependerá del conjugado a utilizar). Incubar durante 45 min-1h.
8. Lavar con PBS-0.5% Tween 20, 100  $\mu$ l por pozo (repetir un total de 5 lavadas)
9. Añadir 100  $\mu$ l de solución TMB, esperar 15-30 min fuera de la luz
10. Añadir 100  $\mu$ l de solución STOP (ácido sulfurico, [H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 N]).
11. Leer la microplaca, con un lector de ELISA, a una densidad óptica de 450 nm.

## ANEXO 7

---

### ELISA POURQUIER-IDEXX

---

**1.** Diluir los controles, suero y plasma a 1:20 en «dilución buffer N° 12» en microtubos o tubos de hemólisis. Agitar e incubar durante 15 minutos a 21°C ( $\pm 5^{\circ}\text{C}$ ).

**2.** Depositar 100  $\mu\text{l}$  de suero diluido en el pozo correspondiente ( 100  $\mu\text{l}$  de control negativo diluido en el pozo A1, 100  $\mu\text{l}$  de control positivo diluido en B1 y C1.

**3.** Cubra la placa (con una tapa de aluminio o de cinta adhesiva) y se incuba durante 45 min ( $\pm 3$  min) a 21°C ( $\pm 5^{\circ}\text{C}$ ) o de la noche a la mañana a 5°C ( $\pm 3^{\circ}\text{C}$ )

**4.** Lavados:

a) Diluir un frasco de concentrado de solución de lavado (X 20) en 1900 ml de agua destilada. Esta solución en lo sucesivo será denominada “solución de lavado”. La dilución puede llevarse a cabo antes de la eliminación de los cristales que aparecieron a +5°C ( $\pm 3^{\circ}\text{C}$ ), siempre y cuando todo el frasco de 100 ml haya sido utilizado.

b) Vaciar el contenido de la placa por sacudida o bien por un método manual o automático.

c) Introducir todos los pozos de la placa con la solución de lavado, a continuación, vacíe de nuevo.

d) Repita el paso “c” dos veces (un total de 3 lavados).

**5.** Depósito del conjugado:

a) La dilución del conjugado depende del modo de incubación usado para las muestras:

- SI SE UTILIZA LA INCUBACIÓN CORTA DE LAS MUESTRAS (45 MINUTOS A 21°C,  $\pm 5^{\circ}\text{C}$ ) Diluir el conjugado a 1:100 “con la solución buffer 1 “ y se distribuyen 100  $\mu\text{l}$  de este conjugado diluido por pozo
- SI SE UTILIZA LA INCUBACIÓN LARGA DE LAS MUESTRAS (1 NOCHE A +5°C,  $\pm 3^{\circ}\text{C}$ ) Diluir el conjugado a 1:200 “con la Dilución Buffer 1” y se distribuyen 100  $\mu\text{l}$  de este conjugado diluido por pozo.

**6.** Cubra la placa (con una tapa de aluminio o de cinta adhesiva) y se incuba durante 45 min ( $\pm 3$  min) a 21°C ( $\pm 5^{\circ}\text{C}$ ) o de la noche a la mañana a 5°C ( $\pm 3^{\circ}\text{C}$ )

**7.** Lavado

a) Vaciar el contenido de la placa por «sacudida» o por otro método manual o automático.

b) Introducir todos los pozos en la placa con la solución de lavado, a continuación, vacíe de nuevo.

c) Repita el paso d) dos veces (un total de 3 lavados)

**8. Revelación:**

- a) Colocar 100 µl de «solución de revelación N° 2» por pozo.
- b) Incubar la placa a 21°C (±5°C) durante 10 minutos (fuera de la luz).
- c) Colocar 100 µl de “solución fijadora” por pozo.
- d) Agitar suavemente la placa hasta que la solución quede de color homogéneo. Limpie cuidadosamente la parte inferior de la placa.

**9. Lectura:**

Leer las densidades ópticas a 450 nm (OD<sub>450</sub>). El lector de microplacas debe ser ajustado al aire.

**10. Criterio de validación:**

Los resultados se pueden considerar confiables en caso de que:

- El control positivo, tenga una media mínima OD<sub>450</sub> de 0,350.
- La relación entre la media OD<sub>450</sub> del control positivo y el valor OD<sub>450</sub> del control negativo sea mayor o igual a 3.

**11. Interpretación**

Calcular para cada muestra, la relación S/P:

*Donde:*

*S= muestra*

*P= control positivo*

$$S/P = 100 \times \frac{(OD_{450} \text{ de la muestra} - OD_{450} \text{ del control negativo})}{(\text{media } OD_{450} \text{ del control positivo} - OD_{450} \text{ del control negativo})}$$

Para suero y plasma (ganado bovino, ovino y caprino):

- Cualquier muestra con un S/P igual o inferior al 60% se considera de un animal, que no ha sido infectado por el Mycobacterium paratuberculosis.
- Cualquier muestra con un S/P entre el 60% y el 70% se considera dudosa. Una segunda prueba será necesaria para confirmar su estado.
- Cualquier muestra con un S/P igual o mayor que 70% se considera procedente de un animal, que ha sido infectado por Mycobacterium paratuberculosis (Shin *et al.*, 2008).

## ANEXO 8

---

### DATOS DE ANIMALES EXPERIMENTALES

---

Identificación Inicial de animales Experimentales

<b>ID</b>	<b>Fecha de Nacimiento</b>	<b>ID de la Madre</b>	<b>Peso al Nacimiento (g)</b>
389	21/feb/11	16	3,400
391	28/feb/11	61	3,100
392	01/mar/11	62	3,300

Identificación posterior

<b>ID en corral</b>	<b>ID en Tesis</b>
Collar amarillo	A
Collar azul	B
Sin collar	C

## ANEXO 9

---

### SUEROS CONTROLES UTILIZADOS

---

Sueros controles probados en ELISA comercial y EVELISA

*Nota: para ELISA comercial, también se utilizaron los controles del Kit.*

ID en placa	ID en tubo
1	Ovino 1
2	Blanca
3	Rosve
4	14-oct 2t
5	21-Oct 2P
6	P4
7	27-07-10 ovino 2
8	Ovino 4
9	10 afect
10	Ovino 5
11	Ovino 3
12	2P
13	Necropsia

## ANEXO 10

### VALORES DE DO<sub>450</sub> Y P/S EN ELISA COMERCIAL

ID	D.O <sub>450</sub>	PS
collar	0.060	-1.79
391-1	0.072	-0.81
392-1	0.052	-0.02
sin collar-2	0.051	-2.52
amarillo-2	0.075	-0.57
azul-2	0.07	-0.98
sin collar-3	0.074	-0.65
amarillo-3	0.082	0.00
azul-3	0.056	-2.12
1	1.267	96.42
2	0.625	44.18
3	0.095	1.06
4	0.089	0.57
5	0.07	-0.98
6	0.075	-0.57
7	1.235	93.82
8	0.575	40.11
9	0.105	1.87
10	0.058	-1.95
11	0.065	-1.38
12	0.394	25.39
13	0.13	3.91
C.NEG	0.079	
C. NEG	0.085	
C. POS	1.306	
C. POS	1.316	

## ANEXO 11

---

### VALORES DE DO<sub>450</sub> EN EVELISA

---

ID	D.O <sub>450</sub>	PROMEDIO	S/P#1	S/P #7		
collar-1	0.185	0.202	0.1808	0.2952	abril	
	0.218					
391-1	0.338	0.355	0.4842	0.7903	abril	
	0.372					
392-1	0.214	0.199	0.1759	0.2871	abril	
	0.184					
sin collar-2	0.219	0.252	0.2806	0.4581	julio	C
	0.285					
amarillo-2	0.129	0.155	0.0889	0.1452	julio	A
	0.181					
azul-2	0.175	0.180	0.1374	0.2242	julio	B
	0.184					
sin collar-3	0.169	0.170	0.1176	0.1919	noviembre	C
	0.17					
amarillo-3	0.111	0.149	0.0761	0.1242	noviembre	A
	0.186					
azul.3	0.11	0.152	0.0820	0.1339	noviembre	B
	0.193					

ID	D.O <sub>450</sub>	PROMEDIO	
1	0.562	0.616	pos
	0.67		
2	0.188	0.195	pos
	0.202		
3	0.196	0.200	
	0.204		
4	0.109	0.174	
	0.239		
5	0.195	0.161	
	0.126		
6	0.126	0.129	
	0.131		
7	0.412	0.420	pos
	0.428		
8	0.134	0.155	pos
	0.176		
9	0.19	0.177	
	0.163		
10	0.205	0.206	
	0.207		

11	0.232	0.251	
	0.269		
12	0.201	0.228	pos
	0.254		
13	0.211	0.178	
	0.144		
NEG	0.12		
NEG	0.118		