

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS VETERINARIAS



EVALUACION DE TRES PRUEBAS ELISA Y UNA PRUEBA INMUNODIFUSION DE GEL DE AGAR PARA LA DETECCION DE LA PARATUBERCULOSIS OVINA EN UN REBAÑO DE MEXICALI BAJA CALIFORNIA.

TESIS:

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

PRESENTA:

M.V.Z. TOMAS CARDENAS REYNA

DIRECTOR DE TESIS:

DRA. SAWAKO OSHIMA

ASESORES:

DR. GERARDO ENRIQUE MEDINA BASULTO

DR. GILBERTO LOPEZ VALENCIA

M. EN C. ALFONSO DE LA MORA VALLE

Mexicali, Baja California, México

Agosto de 2014

Evaluación de tres pruebas ELISA y una prueba Inmunodifusión gel de agar para la detección de la paratuberculosis ovina en un rebaño de Mexicali, Baja California, Tesis presentada por Tomás Cárdenas Reyna como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias Veterinarias, que ha sido aprobada por el comité parcial indicado:

Dra. Sawako Oshima
Director de tesis

Dr. Gerardo Enrique Medina Basulto
Asesor

Dr. Gilberto López Valencia
Asesor

M. en C. Alfonso De La Mora Valle
Asesor

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a mi tutora la Dra. Sawako Oshima por su apoyo en momentos difíciles y agradables, aceptarme como tutorado y enseñarme a ser tanto analítico como crítico.

Al Dr. Gilberto López Valencia y al Dr. Gerardo E. Medina Basulto, por el valioso apoyo personal y profesional brindado.

Al CONACYT por el apoyo financiero.

Al Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias por aceptarme en la Maestría, de esta manera continuar superándome como profesionista y como persona.

A mis profesores, amigos y compañeros, por ofrecerme su apoyo en la realización de mi proyecto.

A mis Padres, hermanos y familiares que nunca perdieron su fe en mí.

Sin olvidar a todas aquellas personas que directa e indirectamente contribuyeron en mi desarrollo personal y profesional en el transcurso de la maestría e hicieron que la culminación de estos estudios fuera posible.

ÍNDICE

INDICE DE CUADROS	VII
INDICE DE FIGURAS	VIII
ANEXOS	IX
RESUMEN	XI
ABSTRACT	XII
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	3
2.1. Diagnostico	4
2.1.1. Cultivo bacteriológico	4
2.1.2. Necropsia e histopatología	5
2.1.3. ELISA	6
2.1.4. Inmunodifusión en gel de Agar (IDGA)	10
2.1.5. PCR	10
2.2. Control y prevención	11
III. JUSTIFICACION	12
IV. HIPOTESIS	12
V. OBJETIVO	13
5.1. Objetivo general	13
5.2. Objetivo específico	13
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	14

6.1. Área de estudio	14
6.2. Animales	14
6.3. Criterio de inclusión	15
6.4. Criterio de exclusión	15
6.5. Muestras de heces	15
6.6. Muestras de suero	16
6.7. Necropsia e histopatología	16
6.8. Cultivo bacteriológico de Map a partir de muestras de heces	16
6.9. Extracción de DNA a partir de heces	17
6.10. Detección del gen IS900 de MAP mediante QPCR	17
6.11. ELISA (Pourquier)	18
6.12. EVELISA	19
6.13. ELISA PPA	20
6.14. Inmunodifusión en gel de agar (IDGA)	21
6.15. Análisis de datos	21
VII. RESULTADOS	22
7.1. Antecedentes de la paratuberculosis ovina en el rebaño	22
7.2. Selección de animales subclínicos excretores de Map.	26
7.3. Determinación de la capacidad diagnostica de 4 pruebas serológicas.	30
7.3.1. ELISA Comercial	30

7.3.2. ELISA propia con antígeno proteico protoplasmático (PPA).	30
7.3.3. ELISA propia con antígeno lipídico de Map (EVELISA)	36
7.3.4. Inmunodifusión del gel de agar (IDGA)	36
VIII. DISCUSIONES	39
IX. CONCLUSIONES	42
X. LITERATURA CITADA	43

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1	Resumen de resultados de cultivo bacteriológico fecal	28
Cuadro 2	Resumen de resultados del PCR de IS900 con muestras fecales	28
Cuadro 3	Resultados de ELISA comercial	31
Cuadro 4	Clasificación cruzada de resultados de ELISA PPA y ELISA comercial con punto de corte de 0.4745	35
Cuadro 5	Clasificación cruzada de resultados de ELISA PPA y ELISA comercial con punto de corte de 0.3979	35
Cuadro 6	Parámetros de EVELISA optimizados	37

INDICE DE FIGURAS

Figura 1	Casos de paratuberculosis en ovinos en el rebaño estudiado.	23
Figura 2	Cortes histológicos de intestino de una animal clínico.	24
Figura 3	Cultivo y tinción.	25
Figura 4	Patrones de amplificación del fragmento IS900 de Map de 183 pb.	29
Figura 5	Resultados de ELISA con PPA propia.	32
Figura 6	Análisis de ROC de ELISA con PPA propia.	33
Figura 7	Punto de corte propuesto para ELISA con PPA propia.	34
Figura 8	Ejemplo de reacciones no específicas de EVELISA.	37
Figura 9	Resultados de IDGA.	38

ANEXOS

Anexo1.	Protocolo de extracción de DNA por el método lisis –Guanidina.	55
Anexo 2.	Protocolo de preparación de medios de cultivo bacteriológico.	56
Anexo 3	Resultados de PCR-IS900 de heces.	58
Anexo 4	Resultados de ELISA comercial (Pourquier/ IDEXX).	59
Anexo 5	Animales grupo control positivo seleccionado por la excreción fecal de Map (cultivo bacteriológico o qPCR-IS900) y resúmenes de resultados.	61
Anexo 6	Resultados de ELISA propio con antígeno protoplasmático (PPA).	62

ABREVIACIONES

DNA: Acido desoxirribonucleico.

ELISA: Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas.

FC: Fijación del complemento.

FCM: Citometría de flujo.

IDGA: Inmunodifusión en gel de agar.

LP5: lipopentapeptido.

Map: Mycobacterium avium subespecie paratuberculosis.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.

PFGE: Electroforesis en gel con campo pulsante.

PPA: Antígeno protoplasmático.

QPCR: Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real.

RFLP: Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción.

Se: Sensibilidad.

Sp: Especificidad.

RESUMEN

La paratuberculosis es una enteritis granulomatosa de curso crónico en rumiantes ocasionada por *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* (Map). En Baja California se han detectado problemas severos de paratuberculosis en algunos rebaños de ovinos de Mexicali y Tecate. Hemos utilizado distintas herramientas de diagnóstico para las actividades de investigación tanto para servicios, sin embargo no se ha validado ninguna prueba para usarse con animales en la región. El objetivo del presente estudio fue desarrollar y estandarizar pruebas serológicas propias de nuestro laboratorio y evaluar su capacidad diagnóstica en un rebaño de ovinos de Mexicali. Se obtuvieron muestras de suero del grupo control positivo (n=40) provenientes de un rebaño del Valle de Mexicali con antecedentes de casos clínicos de paratuberculosis. Estos animales no presentaron signos clínicos visibles y fueron positivos a PCR fecal de IS900. Muestras del grupo control negativo (n=43) fueron obtenidas del rebaño del IICV-UABC, de corderos menores a 3 meses de edad con o sin seronegatividad de madres. Se determinó la capacidad diagnóstica de la prueba comercial de ELISA, ELISA propia con PPA, e Inmunodifusión de gel de agar (IDGA), que fue de 5% (2/40), 20-40% (8/40 -16/40, dependiendo del punto de corte empleado; promedio+3SD, promedio+2SD) y 0% (0/40), respectivamente. No se logró estandarizar la prueba de ELISA propia con antígeno lipídico debido a reacciones no específicas intensas en sueros controles negativos. En el análisis de la curva ROC de la ELISA propia con PPA, el área bajo la curva (AUC) de función relativa=0,798 (95%CI, 0.695-0.878, $p < 0.0001$). El análisis de kappa para las dos pruebas de ELISA comercial y ELISA propia con PPA no encontró la correlación entre las dos pruebas (kappa=0.024). La serología es una prueba rápida económica para la confirmación de casos clínicos o animales en etapa terminal, mientras, se propone el uso de PCR fecal para la detección rápida de animales excretores de Map los cuáles son significativos en el programa de control pero comúnmente son seronegativos.

ABSTRACT

Paratuberculosis is a chronic granulomatous enteritis in ruminants caused by *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (Map). In Baja California, we have detected severe problems of paratuberculosis in several sheep herds in Mexicali and Tecate. Although we have used different diagnostic tools for research activities and for public diagnosis services, the diagnostic performance of those tests for animals in Baja California has never been validated. The aim of this study was to develop and standardize in-house serological tests and evaluate their diagnostic capabilities in a sheep flock in Mexicali. Positive control sera were obtained from animals (n=40) of a sheep flock in the Mexicali Valley with a history of clinical cases of paratuberculosis. These animals did not show clinical signs and were positive by fecal IS900 PCR assay. Negative control sera were obtained from lambs (n=43) in the herd of IICV-UABC, with or without of negative test results of mothers by ELISA. The diagnostic capability of the commercial ELISA test were determined, own ELISA with PPA, and agar gel Immunodiffusion (AGID) was 5% (2/40), 20-40% (8/40 16/40). depending on cut-off points; (mean negative+3SD, mean negative promedio+2SD) and 0% (0/40), respectively. In-house ELISA with Map lipid antigen could not be standardized due to strong non-specific reactions in negative control sera. The ROC curve analysis of in-house ELISA test with PPA antigen resulted the area under the curve (AUC) of relative function = 0, 798 (95% CI 0.695-0.878, $p < 0.0001$). The analysis of kappa for two commercial ELISA and in-house ELISA with PPA found no correlation between two tests (kappa = 0.024). Serology is rapid economic test for confirmation of clinical cases or animals in the terminal stage, while we propose the use of the fecal PCR for rapid detection of animals shedding Map, those are significant in the control program but are mostly seronegative.

I. INTRODUCCIÓN

La paratuberculosis es una enfermedad crónica de los rumiantes producida por *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* (Map), que afecta a bovinos, ovinos, caprinos y animales silvestres, provocando enteritis crónica granulomatosa, actualmente asociada a la enfermedad de Crohn en los humanos (Sechi y col., 2001), esta infección ocurre principalmente en animales jóvenes por vía fecal-oral aunque se ha demostrado la vía intrauterina. La paratuberculosis bovina es reconocida en algunas regiones de nuestro país, pero en términos generales existe desconocimiento general del problema. Esta enfermedad causa pérdidas económicas a los productores e industria cárnica y láctea. Se ha señalado, el riesgo potencial de infección inter-especies, destacando el hallazgo de una cepa no descrita antes a nivel mundial, así como encontrar diversas cepas en pequeñas áreas geográficas que sugiere la contaminación de varios orígenes mediante el ingreso no regulado de animales a los hatos o rebaños en el país.

Debido a las pérdidas económicas causadas por esta enfermedad en el país, es necesario el diagnóstico oportuno de laboratorio. En la práctica se disponen de métodos básicos y técnicas de biología molecular, sin embargo debido a que *M. paratuberculosis* constituye un grupo homogéneo de bacterias que no son posibles identificar claramente por métodos básicos, los métodos moleculares son de gran utilidad para estudios epidemiológicos de esta especie. Para el diagnóstico de la PTB no es posible utilizar un solo método, dado los diferentes estadios del agente en el huésped (Jorge y col., 2000). El cultivo a partir de heces en medio sólido es capaz de detectar entre el 30 y el 40% del ganado infectado, ya que únicamente detecta animales que excretan más de 100 unidades formadoras de colonias por gramo de heces (Whitlock y col., 2000), es decir, éste método únicamente identifica a los animales en un estadio clínico de la enfermedad avanzado (donde alcanza un 100% de sensibilidad) siendo detectados tan sólo unos pocos animales en los

estadios iniciales (Whitlock y col., 2000). La detección de Map mediante PCR en muestras fecales ha mejorado vastamente en años recientes, conduciendo a un incremento en la sensibilidad de detección de bajos excretores, incluyendo un reporte a un nivel de detección de 1 unidad formadora de colonia por gramo de heces (Stabel y col., 2004). Por otra parte se ha reportado que la sensibilidad de ELISA Pourquier en ovinos y cabras fue de 34.9% y 56.4%, con una especificidad de 98.8% y 100.0%, respectivamente y la sensibilidad de IDGA fue de 13.8% para ovinos y 39.5% para cabras, con especificidad de 100.0% para ambas especies, por lo tanto, la sensibilidad de ELISA en ovinos depende de la categoría de las lesiones histológicas según (Gumber y col., 2006), en contraste, según reporta (Robbe-Austerman y col., 2006) las sensibilidades para ELISA fueron 8.0% (6.0–10.4%), 10.6% (8.3–13.1%), y 16.3% (13.5–19.4%) usando puntos de corte de 0.20, 0.15, y 0.10 respectivamente y para IDGA las sensibilidades estimadas fueron de 8.3% (6.2–10.7%). Por otro lado, según (Eda y col., 2006) encontraron que utilizando antígeno de superficie de Map extraído mediante vortex y etanol, fue posible obtener una sensibilidad de 94.7% y una especificidad de 100% para etanol-vortex-ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (EVELISA) en el diagnostico de paratuberculosis en ganado bovino.

Por lo anterior el objetivo de este estudio fue la evaluación de tres pruebas ELISA y una prueba Inmunodifusión gel de agar para la detección de la paratuberculosis ovina en un rebaño de Mexicali, baja california, utilizando antígeno lipídico y protoplasmático, para el diagnostico de la paratuberculosis en un rebaño de ovinos en Mexicali B.C.

II. ANTECEDENTES

El control de la paratuberculosis es difícil, debido a la naturaleza de la infección por Map donde los animales llegan a ser infectados tempranamente en su vida pero la enfermedad clínica se desarrolla en la etapa adulta (Lilenbaum y col., 2007), por lo tanto, los animales permanecen en una etapa de excreción peubacilar y subclínica por un periodo de tiempo bastante largo, excretando bajo número de bacilos o ninguno en heces y leche. En estos animales la respuesta inflamatoria es muy característica de infección por Map, pero los organismos son difíciles de demostrar (Lilenbaum y col., 2007; Pérez y col., 1997). Los estadios o fases de la paratuberculosis según (Whitlock y Buergelt, 1996; Committee on Diagnosis and Control of Johne's Disease, 2003), son descritas a continuación:

Fase I. Infección silente, caracterizada por ausencia de signos clínicos, se encuentra presente principalmente en terneros y novillas, aunque en ocasiones se ha descrito en ganado adulto.

Fase II. La fase subclínica se encuentran principalmente animales adultos portadores de Map. Durante esta fase los animales no presentan signos clínicos algunos de la enfermedad, pero en ocasiones pueden presentar anticuerpos circulantes o respuestas inmunes celulares alteradas, el cultivo de heces de la mayoría de estos animales resulta negativo, a pesar de esto los animales excretan intermitentemente una carga microbiana baja en heces.

Fase III. La fase clínica sólo se desarrolla tras varios años de infección por Map. Los signos clínicos iniciales y característicos de esta fase son: caída de la producción láctea, pelo hirsuto, pérdida de peso y diarrea.

Fase IV. La fase clínica avanzada se presenta solo unas pocas semanas, durante las cuales los animales entran en un estado de letargo, debilidad y emaciación, se presenta edema inter-mandibular debido a hipoproteinemia, además de caquexia, diarrea profusa y deshidratación severa.

Cabe mencionar que los signos clínicos de la enfermedad en ovejas y cabras son similares a los descritos en vacas, aunque la presencia de diarrea es menos frecuente que en vacas y la aparición de la enfermedad se presenta en animales más jóvenes (Stehman, 1996). A pesar de que las pruebas diagnósticas disponibles cuentan con una sensibilidad relativamente baja y son incapaces de detectar la enfermedad subclínica, puede realizarse el diagnóstico acompañado de buenas prácticas de manejo, mediante las cuales se excluirán del establo los animales positivos y reducirá el riesgo de transmisión de la enfermedad.

2.1. Diagnóstico

2.1.1. Cultivo bacteriológico

Una de las pruebas diagnósticas disponibles es el cultivo fecal, que aun se reconoce como el estándar oro, con una sensibilidad aproximada de 38% en ganado infectado, debido a que solamente detecta animales que excretan más de 100 unidades formadoras de colonias por gramo de heces (Whitlock y col., 2000; Committee on Diagnosis and Control of Johne's Disease, 2003). Este método, es el que presenta 100% especificidad, no dando lugar a falsos positivos (OIE, 2008). Asimismo puede diagnosticar aproximadamente el 80% de excretores medios en un hato, en los animales en un estadio clínico de la enfermedad avanzado, alcanza un 100% de sensibilidad, siendo detectados tan sólo unos pocos animales en los estadios iniciales de infección y al igual que la detección de un fragmento de IS900 mediante PCR para DNA extraído a partir de heces, estas pruebas no distinguen entre la excreción por el paso del bacilo a través de tubo digestivo y la que se produce por su colonización (Whitlock y col., 2000). La principal desventaja que presenta el cultivo, es el crecimiento lento característico de *Map* que ya que se requieren de 5 a 16 semanas para obtener resultados (especialmente en el caso de las cepas del tipo I y III), ya que se han clasificado Cepas de *M. avium* subsp.

paratuberculosis dentro de tres grupos, basadas en las características de cultivo y caracterización molecular por PFGE e IS900-RFLP (tipos I, II y III) (Collins y col., 1990, de Juan y col., 2005, Pavlik y col., 1999, Stevenson y col., 2002), además de la presencia de formas no cultivables de *Map* (Gunnarsson y Fodstad, 1979; Whittington y col., 2000). Los dos medios sólidos que se recomiendan para el aislamiento de cepas tipo I / III de *M. avium* subsp. *paratuberculosis* en ganado vacuno y cabras son Lowenstein Jensen con micobactina y Middlebrook 7H11 con micobactina. En cuanto a las cepas de tipo II, Herrold's egg yolk con piruvato de sodio y micobactina fue el medio en el que más cepas se aislaron (De Juan y col., 2006). El cultivo se considera la única técnica definitiva y fundamental para el diagnóstico de la enfermedad de Johne (Chiodini y col., 1984, Whittington y col., 1999, Motiwala y col., 2005,) y es un paso esencial para la posterior aplicación de técnicas de tipificación molecular estandarizadas como polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción de IS900 (IS900-RFLP) (Pavlik y col., 1999) y electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE) (Stevenson y col., 2002). La caracterización de las cepas es necesaria para entender la patogenicidad y epidemiología de esta bacteria fastidiosa.

2.1.2. Necropsia e Histopatología

Para diagnosticar la presencia de la *paratuberculosis* en un animal individual clínicamente sospechoso, pueden utilizarse varias pruebas de laboratorio dentro de las cuales están incluidas la necropsia e histopatología. En la necropsia se inspeccionan los nódulos linfáticos mesentéricos que se encuentran habitualmente prominentes y edematosos y la mucosa intestinal, especialmente la del íleon terminal, para detectar el plegamiento y el engrosamiento patognomónicos. Las lesiones histológicas en intestino típicas de la *paratuberculosis* consisten en la infiltración de la mucosa y submucosa intestinal, las placas de Peyer y el córtex 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.(OIE. 2008b.) Las lesiones asociadas con la enfermedad en pequeños rumiantes han sido categorizadas sobre la base de su localización en relación al tejido linfoide intestinal, intensidad, tipos de células inflamatorias y numero de micobacterias presentes según reporta (Pérez y col., 1996; Corpa y col., 2000), y relacionadas al estatus clínico. En animales que muestran signos clínicos de la enfermedad, las lesiones difusas con dos principales formas patológicas fueron descritas como peubacilares o de primer grado en las cuales el infiltrado inflamatorio estuvo compuesto de linfocitos con algunos macrófagos con pocas o ninguna micobacteria y forma multibacilar o grado 2 en la cual se observaban macrófagos como la principal célula inflamatoria con numerosas micobacterias presentes según (Carrigan y Seaman, 1990; Pérez y col., 1996; Clarke y col., 1997; Corpa y col., 2000). En ovejas o cabras sin signos clínicos o sin lesiones macroscópicas, las lesiones intestinales focales, estaban formadas por granulomas pequeños bien delimitados localizados exclusivamente en el tejido linfoide intestinal como lo describe(Pérez y col., 1996; Corpa y col., 2000). estas clasificaciones de lesiones han sido exitosamente empleadas como referencia para la evaluación de pruebas serológicas (Clarke y col., 1996; Pérez y col., 1997, 1999).

2.1.3. ELISA

En general las ELISAs comerciales son capaces de identificar aproximadamente el 50% de los animales encontrados positivos por cultivo fecal, mostrando una sensibilidad de 8.9 a 32.1% para animales excretores bajos y 47.1 a 62.9% para animales excretores medios (Sockett y col., 1992). Sin embargo un reciente estudio longitudinal sugiere que las ELISAs comerciales pueden tener un nivel aun bajo de sensibilidad de 13.5% (Sweeney y col., 1996). Entre las principales ventajas de esta técnica destacan la automatización, la repetitividad, el elevado número de muestras que es

capaz de analizar y la objetividad de los resultados (Manning y col., 2001; Sergeant y col., 2003; OIE, 2008). En la actualidad es una de las pruebas que más se emplea para la determinación del nivel de infección en los rebaños (Nielsen y col., 2001). Debido a lo anterior se ha enfatizado en desarrollar una prueba rápida y económicamente viable además de mayor sensibilidad y especificidad tal como ELISA para detectar animales excretores bajos medios y altos (National Research Council, 2003). Varios kits comerciales de ELISA para PTB bovina están disponibles, y múltiples estudios han comparado su precisión (Fry y col., 2008; Collins y col., 2005). Sin embargo la principal limitante de estas pruebas serológicas es su incapacidad de identificar con precisión animales en etapas tempranas de infección (Sugden y col., 1997). Además reacciones cruzadas de anticuerpos han sido observadas en bovinos con otras micobacterias diferentes de Map (Bannantine y col., 2008). por otra parte la serología para el diagnostico de Map utilizando antígenos totales obtenidos de bacterias afines a Map pueden inducir reacción cruzada debido a la sensibilización de animales con estas bacterias (Leroy y col., 2009).

Recientemente, ha sido encontrado que cepas de Map producen LP5, un lipopentapeptido que es un blanco de respuesta humoral específica en animales infectados por Map (Biet y col., 2008), además estudios mencionan una sensibilidad de 37%, y especificidad de 100% para ELISA que utiliza anticuerpos contra L5P, teniendo la capacidad de diferenciar animales con PTB y TB así como animales naturalmente expuestos a otras micobacterias y animales sanos (Costanzo y col., 2012). Una mezcla de proteínas como la preparación del antígeno protoplasmático (PPA-3) ha sido usado en varios reportes en el diagnostico de la paratuberculosis, y ELISA-PPA-3 ha sido recomendado como una prueba de screening para identificar hatos infectados (Nielsen y Toft, 2008; Ferreira y col., 2002). El diagnostico de PTB donde ELISA basado en antígeno PPA-3 (Allied Monitor) para la detección de vacas afectadas, tiene un rango de sensibilidad de 0.40 a 0.80 con una especificidad de 0.90 a 0.95 en la mayoría de los estudios donde se evaluó (Nielsen and Toft, 2008). Varios investigadores han tratado de buscar dicho

antígeno, y han concluido que la prueba diagnóstica más eficaz será obtenido con una combinación de antígenos purificados.(Bannantine y col., 2008; Leroy y col., 2009). ELISA ha mostrado la más alta sensibilidad en pruebas serológicas para Map (Harris y Barletta, 2001). Sin embargo, la inmunoreactividad depende de la unión de antígeno a la superficie de los pocillos de la placa. Varias proteínas de Map han sido identificadas y probadas por su inmunogenicidad, pero su diagnóstico potencial aun esta por validarse con el apropiado tamaño de muestra (Mikkelsen y col., 2011a). Los resultados de ELISA (Pourquier, France) detectaron la excreción ovinos con infección multibacilar destacando su valor en el diagnóstico de los casos clínicos donde se detectaron 77.7% de todos los casos, con un 100% de detección en infección multibacilar y 25% en ovinos con infección peubacilar (Sonawane,y Tripathi, 2013) que concuerda con estudios reportados con sensibilidades de 10 a 87% (Clarke y col., 1996; Pérez y col., 1997; Tripathi y col., 2006). Se ha reportado 48% de ovinos positivos de 62 con paratuberculosis en ELISA con absorción y defiende la cercana relación existente entre los hallazgos patológicos y la respuesta serológica.(Pérez y col., 1997).

Recientemente se ha descubierto que el método de citometría de flujo (FCM) puede ser usado para el diagnóstico de la enfermedad en etapas tempranas así como las crónicas a través de los anticuerpos en suero contra Map (Eda y col., 2005), la FCM ha diagnosticado a niveles de sensibilidad y especificidad mayores de 95% y fue capaz de detectar la Paratuberculosis 6 a 44 meses de edad más temprano que el cultivo y de 17 a 67 meses de edad más temprano que ELISA.

Después de encontrar que los antígenos de superficie son la clave de la alta sensibilidad y especificidad de subespecie, para la detección de la infección de Map Mediante FCM, estos antígenos fueron extraídos con formalina y sonicación corta y usados para el diagnóstico de la paratuberculosis en una ELISA que tuviera niveles de especificidad y sensibilidad similares a FCM (Speer y col., 2006). A partir de lo anterior (Eda y col., 2006) Desarrollaron una prueba ELISA donde antígenos de superficie de Map fueron extraídos

mediante etanol y vortex (EVELISA). Reportaron que el más alto nivel de unión de IgG en muestras de suero control positivo a Map fue observado cuando se utilizó etanol al 80 % en la extracción del antígeno de superficie de Map, asimismo encontraron que bajos niveles de uniones no específicas ocurren cuando el antígeno es agitado mediante vortex durante 30 segundos. También encontraron que EVELISA identificó 96.6% de bajos excretores y 100% de medios y altos excretores mientras ELISA(Biocr) detectó solo el 13.7% de bajos excretores, 25% de medios excretores y 96.2 % de altos excretores cuando se probaron 64 sueros de vacas positivas a cultivo de heces, categorizadas como bajos(< 10 colonias; n = 29), medios (10 a 50 colonias; n= 8) y altos (> 50 colonias; n= 27) excretores según (Rankin, J.D., 1961). Por lo tanto EVELISA cuenta con rangos de 96.9 % de sensibilidad y 100% de especificidad además pueden las placas con el antígeno conservarse hasta durante 7 semanas sin que afecte la viabilidad de la prueba (Eda y col., 2006). Las pruebas disponibles en la actualidad para el diagnóstico de paratuberculosis no son adecuados para la detección de todas las vacas infectadas en un solo punto en tiempo.(Collins y col., 1996, Sockett, D.C., 1994, Whitlock y col., 1999), la identificación de excretores MPTB se logra más eficazmente mediante el cultivo de muestras fecales, 25 pero esta técnica es costosa y requiere por lo menos 16 semanas para obtener resultados.(Collins y col., 1996, Jorgensen, J.B.,1984, Kalis y col., 1999, Whittlock y col., 1999, De Juan y col., 2005). Las pruebas serológicas son menos costosas, más rápidas y más fáciles de realizar, pero en general los resultados se consideran menos fiables debido a resultados de falsos positivos y falsos negativos, (Aalund,O.,1984, Benedictus,G.,1984, Jorgensen, J.B.,1984, Rankin, J.D., 1961). Las pruebas serológicas más frecuentemente utilizados son el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas con Mycobacterium phlei-absorbida (ELISA absorbida) y prueba de fijación de complemento (CFT). (Kalis y col., 2002,)

2.1.4. Inmunodifusión en gel de Agar (IDGA)

La principal prueba serológica utilizada para evaluar rebaños de ovinos en Australia es el ensayo de Inmunodifusión en gel de agar (IDGA). Las pruebas serológicas son menos costosas, rápidas y de fácil desarrollo comparadas con el cultivo fecal pero también, la edad y el nivel de excreción de bacilos influye sobre ellas (Kalis y col., 2002). Se ha reportado que la sensibilidad de ELISA y IDGA fue significativamente alta en animales con estatus conocido de enfermedad que en cabras expuestas a *M. paratuberculosis*, pero de estatus desconocido de infección. La sensibilidad de AGID fue de 13.8 % para ovejas y 39.5 % para cabras, con una especificidad de 100 % para ambas especies (Gumber y col., 2006). Otros tres notables hallazgos fueron que la sensibilidad de la prueba fue más alta cuando las ovejas fueron preseleccionadas por baja condición corporal, existió solo moderada concordancia entre pruebas serológicas y no existieron resultados falsos positivos en la prueba de IDGA (Hope y col., 2000). Según (Clarke y col., 1996 y Pérez y col., 1997), observaron que las ovejas con lesiones difusas o multi-bacilares de paratuberculosis fueron más probables de ser positivas en la prueba de IDGA que las ovejas con lesiones localizadas conteniendo pocos o ningún bacilo.

2.1.5. PCR

Las pruebas moleculares desde el descubrimiento del gen IS900 (Green y col., 1989) han sido una gran promesa como ensayos diagnósticos sensibles y específicos para la detección de la infección por Map. Mientras los ensayos de PCR convencional proveen rápido método de evaluación cualitativa, el PCR en tiempo real cuantitativo (qPCR) cuenta con una alta sensibilidad y ayuda a determinar la carga de infección en muestras ambientales, heces, leche y cultivos de Map (Kawaji, y col., 2007; O'Mahony y Hill 2004).

2.2. Control y prevención

Las medidas de control comprenden buenas prácticas sanitarias y de gestión, en los animales nuevos para identificar y eliminar a los animales infectados y una vigilancia constante de los animales adultos (Meyer, 1994). La implementación de un conjunto de medidas enérgicas y continuas que se detallan en seguida, 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 a los animales infectados por 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 y col., 2001). La vacuna contra la paratuberculosis ha estado comercialmente disponible por muchos años, pero por desgracia no es completamente eficaz en la prevención de la enfermedad. Estudios realizados, demuestran una reducción significativa en el número y la gravedad de lesiones intestinales, número de cultivos fecales positivos y la severidad de signos clínicos en animales vacunados. Por lo tanto, más ensayos clínicos con parámetros bien definidos son necesarios para confirmar los resultados positivos más recientemente sobre los efectos de la vacunación.

III. JUSTIFICACION

Las pruebas de ELISA comercial han mostrado ser de rápido desarrollo para evaluar la prevalencia de la paratuberculosis en el ganado. La sensibilidad y especificidad han mostrado ser diferentes por región geográfica y especie y se ha observado que la sensibilidad ha sido baja, por lo tanto es necesario el desarrollo de nuevas ELISA's que sean estandarizadas en laboratorio propio, mas económicas que las pruebas comerciales y con una mayor sensibilidad para el diagnostico de la paratuberculosis en el ganado.

IV. HIPOTESIS

Si el diagnostico de la paratuberculosis con ELISA comercial en un grupo de animales es de fácil desarrollo disminuyendo costos, obteniendo resultados en un periodo de tiempo corto y si EVELISA ha mostrado alta sensibilidad para el diagnostico paratuberculosis en bovinos, entonces es posible que la estandarización de ELISA propia de laboratorio utilizando antígeno protoplasmático, resulte ser más eficiente, disminuyendo considerablemente costos de producción, obteniendo resultados comparables con las pruebas comerciales. También es posible que estandarizando EVELISA propia de laboratorio utilizando antígeno lipídico, se obtenga una sensibilidad alta para el diagnostico de paratuberculosis en ovinos con significativa reducción de costos .

V. OBJETIVO

5.1. Objetivo general

Evaluar la sensibilidad de cuatro pruebas serológicas para la detección de la paratuberculosis como herramienta de diagnóstico económica en un rebaño de ovinos de Mexicali Baja California.

5.2. Objetivos específicos

- Describir el antecedente de la paratuberculosis así como evidencias de casos clínicos en un rancho comercial en Mexicali.
- Crear un registro de animales y realizar muestreo de heces y sangre.
- Seleccionar los animales subclínicos excretores de *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* (Map) mediante el análisis de heces.
- Con los sueros de animales subclínicos realizar 4 pruebas serológicas: una ELISA comercial, dos ELISAs desarrolladas en nuestro laboratorio, e Inmunodifusión de gel de agar (IDGA).
- Determinar la capacidad de las 4 pruebas en la detección de anticuerpos específicos a Map en suero.
- Evaluar el comportamiento de pruebas propias de nuestro laboratorio utilizando qPCR fecal como prueba de oro.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Área de estudio

El estudio se llevo a cabo en el Laboratorio de Biología Molecular y de Patología del Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias de la Universidad Autónoma de Baja California.

6.2. Animales

Se estudiaron ovinos de un rebaño de 200 cabras y ovinos, cruza de Kathadin-Dorper, siendo el objeto la venta para cebadero y considerados infectados naturalmente con paratuberculosis. El rebaño está ubicado en Parcela # 177, CP 21229 en el ejido Tula, con coordenadas 320° 35' 18", N115°10'30"W, en Mexicali B.C. El rebaño presentó historial de paratuberculosis desde 2007 y cuenta con aproximadamente 150 animales en existencia hasta 2014. 192 animales fueron identificados mediante implante de arete numerado en la oreja, posteriormente se elaboro un registro para su monitoreo. En el registro se anotó el número de arete, edad en base a dentadura, las fechas de toma de muestras las cuales fueron el 6 de octubre de 2012, 3 de Noviembre de 2012, 2 de Febrero de 2013 y 25 de Agosto de 2013. Los resultados de las pruebas de ELISA, cultivo, y necropsia, desparasitaciones y vacunaciones que se realizaron al rebaño también fueron registrados. Como el grupo control negativo se utilizaron 15 corderos cruza de Kathadin y Dorper cuyas madres fueron negativas a la enfermedad mediante ELISA IDEXX y 27 ovinos raza Kathadin menores de 6 meses de edad, provenientes de la unidad de producción ovina del Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias de la UABC, la cuál esta certificado libre de enfermedades por SAGARPA sin historial de la paratuberculosis.

6.3. Criterio de inclusión

Ovinos hembra de 6 meses de edad en adelante del rebaño estudiado de Valle de Mexicali. De estos animales se seleccionaron animales del grupo control positivo, mediante como únicamente fueron seleccionados animales subclínicos excretores de Map mediante cultivo bacteriológico de heces y/o PCR en tiempo real.

6.4. Criterio de exclusión

Se excluyeron los ovinos menores a 6 meses de edad ovinos en etapa de engorde, y ovinos con signos clínicos de la paratuberculosis.

6.5. Muestras de heces

Las muestras de heces de 192 animales se obtuvieron mediante la colecta manual directamente del recto del ovino, utilizando un guante de látex por cada animal, posteriormente cada muestra se transfirió a tubo falcón de 50 ml, y se conservaron a 4°C para su procesamiento para el cultivo no mas tardar 1 semana. El resto de muestra de heces para la detección por PCR se almacenaron a -20 °C hasta la extracción de ADN (Ver anexo 1).

6.6. Muestras de suero

El muestreo de sangre en cada ovino para la obtención del suero, se realizo mediante punción de la vena yugular utilizando tubos para colectar sangre sin anticoagulante (BD Vacutainer). Se enumero el tubo con el número

correspondiente al arete del animal. Se separaron sueros inmediatamente llegar al laboratorio (o después de incubar a 4°C por una noche para completar la coagulación) mediante la centrifugación durante 10 minutos a una velocidad de 3200 *g*. El suero sobrenadante se conservo a -20°C para las posteriores pruebas serológicas.

6.7. Necropsia e histopatología

Para ovinos con signos sugerentes a paratuberculosis tal como emaciación y caquexia, se llevo a cabo en el laboratorio de patología del Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias de la UABC, donde se realizaron cortes histológicos de íleo, específicamente de válvula ileocecal, posteriormente se realizaron tinciones Hematoxilina-Eosina y Ziehl-Neelsen para el diagnostico mediante histopatología, con el objeto de obtener controles positivos de campo provenientes del mismo rebaño .

6.8. Cultivo bacteriológico fecal

Se realizo esta técnica mediante el protocolo descrito en el Manual para aislamiento e identificación de *M. paratuberculosis* USDA-APHIS- VS-NVSL v3.0 2009 (ver anexo 2) como sigue: Se pesaron 2 gramos de heces, se colocaron en un tubo falcon de 50 ml y se añadió 35 ml de agua destilada, después se agito manualmente o con vortex rigurosamente durante 5 minutos y se dejo reposar 30 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se transfirieron 5ml de sobrenadante (liquido) a un nuevo tubo falcon de 50 ml y agrego 25 ml de HPC (1-hexadecylpyridinium chloride) al 0.9 % y agitó mediante vortex durante 15 segundos, finalmente se colocaron los tubos a 37 °C durante toda la noche o 24horas. Se centrifugaron los tubos a 900 *g* durante 30 minutos a 27 °C luego se descarto el sobrenadante (liquido) y agrego 1ml de antibiótico VAN (100 µg/ml de vancomicina, 100 µg/ml de

anfotericina B y 100 µg/ml de ácido nalidixico) después se mezcló con vortex vigorosamente durante 15 segundos y se colocaron los tubos a 37 °C durante toda la noche o 24 horas. Se mezclaron mediante vortex vigorosamente durante 15 segundos e inocularon los tubos con medio de cultivo Middlebrook 7H10 (CAT # 262710) modificado con yemas de huevo (ver anexo 2), OADC CAT # 211886 (10% v/v) y micobactina J (2µg/ml) con 100 a 200 µl de la resuspensión y se conservaron los tubos con medios de cultivo a 37 °C hasta que evaporó el agua con la tapa rosca floja y se dejó el tubo inclinado, finalmente después de una semana aproximadamente, se cerró completamente la tapa rosca e incubaron nuevamente.

6.9. Extracción de DNA a partir de muestras de heces

La extracción de DNA se realizó mediante el método de lisis-Guanidina, descrito por (Zhang y col., 2011), (ver anexo 1).

6.10. Detección del fragmento de IS900 de MAP mediante QPCR

Los oligonucleótidos mencionados por (Kawaji y col., 2007) fueron los siguientes:

MP 10-1 5` ATGCGCCACGACTTGCAGCCT-3

MP 11-1 5` GGCACGGCTCTTGTGTAGTCG-3 (MWG OPERON Inc.).

El volumen de la mezcla para cada muestra de DNA fue de 25 µl totales, entre los cuales incluye; 2.5 µl de ADN extraído a partir de heces, 12.5 µl de 2x BioRad SYBR supermix (CAT # 170-8882), 0.125 µl del oligonucleótido MP 10-1 a una concentración de 100 pmol/ µl, 0.125 µl del oligonucleótido MP 11-1 a una concentración de 100 pmol/ µl y 9.75 µl de agua grado molecular. Las condiciones para la amplificación descritas por (Kawaji y col., 2007) fueron 95°C durante 15 minutos como desnaturalización inicial y 45 ciclos a temperaturas de 95°C durante 30 segundos para desnaturalización, seguido

por una temperatura de 68°C durante 60 segundos para alineamiento y extensión. Se utilizó ADN extraído de cultivo de cepa ATTC de Map sin diluir y diluido en serie de; 1: 10, 1:100, 1:1000 como controles.

6.11. ELISA (Pourquier)

Adsorción de las muestras a probar por *M. phlei*: Se diluyeron los controles y suero 1:20 con buffer No.12 en tubos eppendorf y agitaron e incubaron durante 15 minutos a 21 °C. Se depositaron las muestras diluidas y los controles en su pocillo respectivo, después de homogenizar el contenido de los pozos agitando suavemente la placa, se cubrió la placa con aluminio e incubo durante 45 minutos a 21 °C. Se diluyo un frasco de solución de lavado 20X en 1900ml de agua destilada, que fue la solución de lavado de trabajo. Después se vació el contenido de la placa por sacudida manualmente o automáticamente, luego se agrego 200 µl de la solución de lavado a cada pozo y se vació de nuevo, y se repitió este paso dos veces más. Se diluyo el conjugado a 1:100 con la solución buffer 1 y distribuyo 100 µl de este conjugado diluido por pozo, después se cubrió la placa con papel aluminio e incubo durante 30 minutos a 21 °C. Se vació el contenido de la placa por sacudida e introdujo 200 µl de solución de lavado a cada pozo y se vació por sacudida y se repitió este paso 2 veces más. Después se coloco 100 µl de solución de revelado No.2 por pozo e incubo la placa fuera de la luz a 21 °C durante 10 minutos, posteriormente se coloco 100 µl de solución fijadora por pozo y agito suavemente la placa hasta que la solución quedo de color homogéneo. finalmente se realizo la lectura de la placa de poliestireno a una densidad óptica de 450 nm. El punto de corte se ajusto mediante el control positivo suministrado con el kit. Para las pruebas se incluyeron sueros controles positivos y negativos de los kits comerciales de ELISA de diferentes laboratorios (Pourquier, Allied Monitor y Kyoritsu).

6.12. EVELISA

Para la preparación del antígeno de superficie de Map, la bacteria fue cosechada de cultivos líquidos en fase estacionaria y se centrifugo a 1575 *g* durante 10 min, El sedimento se lavo 3 veces con 20 ml de PBS (CAT # 1000-3, SIGMA Inc.) por lavado, centrifugando a 1575 *g* durante 10 minutos, se calculo el peso del sedimento y se ajusto a una densidad celular de 80 mg/ml resuspendido en etanol al 80% , se agito con vortex a temperatura ambiente durante 1 min, y se centrifugo a 12857 *g* durante 10 min, el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo y se conservo a -20 °C hasta su uso, 50 µl de sobrenadante (50 µg/ml) de antígeno de ATCC de Map, se agrego en cada pocillo de una placa de poliestireno CAT # 25801. La placa fue incubada durante la noche en una campana de extracción a temperatura ambiente, para permitir que el antígeno extraído se fijara por adhesión a la superficie de los pocillos mediante evaporación del etanol. Se almacenaron las placas a 4°C sellada por una membrana plástica hasta la realización de la prueba.

Para la realización de EVELISA se incubo la placa durante la noche bajo campana de seguridad biológica, agregando a cada pocillo 200 µl de buffer B (4.4 g de PBS -CAT # 1000-3, SIGMA Inc., 450 ml de agua destilada, 50 ml de Superblock -CAT # 37516 y 225 µl de Tween 20 -CAT # 9005-64-5), se lavo cada pocillo 4 veces con 200 µl de PBST (PBS 1X y 0.05% de tween 20), posteriormente se agrego 50 ml de suero diluido con buffer B 1:100, luego se incubo durante 1 hora temperatura ambiente, después se lavo 4 veces cada pocillo con 200 µl de PBST. Después se agrego 50 µl de anticuerpo de conejo anti-IgG ovino (CAT # 14-23-06) diluido 1:2000 con buffer B y se Incubo durante 1 hora a temperatura ambiente. Después se lavo 5 veces con 200 µl de PBST cada pocillo y se agrego 100 µl de TMB (substrato peroxidasa) CAT# T0440 por pocillo y se realizaron lecturas en un lector de placas ELISA a una OD de 655 nm a los 2, 4, 8, 16 y 30 minutos, finalmente se añadió solución de

stop (H_2SO_4 1 N) y realizo lectura a una OD de 450 nm en el lector de placas ELISA modelo 3550.

6.13. ELISA con antígeno protoplasmático (PPA)

Se realizaron experimentos previos para optimizar esta prueba, en base a protocolo de literatura (Juste et. al., 2005) y se logro estandarizar el siguiente protocolo: Se diluyo el antígeno protoplasmático 10 mg/ml (Allied Monitor Inc. CAT # 65-0020) a una concentración de 1: 250 con buffer carbonato(CAT # C3041) 0.05 M a un pH de 9.6 y agrego 100 µl por pozo en la placa de poliestireno CAT # 25801 y conservo a 4°C toda la noche, posteriormente se lavo 1 vez la placa con buffer B (PBS 0.05% tween 20) y se bloqueo la placa durante una hora con 100 µl por pozo de buffer B. Se incubo suero con antígeno de *M. phlei* CAT # 67-0100 (5mg/ml) en proporción 1:1 (25µl de cada uno) e incubo durante 2 horas a temperatura ambiente agitando mediante vortex cada 10 minutos, se centrifugo a 1157 g durante 1 minuto y se recupero sobrenadante después se diluyo nuevamente el suero a una proporción final de 1:600 con buffer B, se deposito 100 µl por pozo e incubo durante 2 horas a temperatura ambiente, se lavo la placa con 200 µl PBST (0.05%) por pozo, tres veces, enseguida se agrego 100 µl por pozo de conjugado KPL diluido 1:1000 con buffer B, nuevamente se incubo a temperatura ambiente durante 2 horas, se lavo 3 veces con 200 µl PBST (0.05%) por pozo, se agrego 100 µl de TMB, se realizaron lecturas a 650 nm, se agrego 100 µl de solución stop y realizaron lecturas a 450nm en lector de placas ELISA modelo 3550.

6.14. Inmunodifusión en gel de agar (IDGA)

Se realizo según el método descrito por (Paolicchi y col., 2003). Para la preparación de una caja petri con gel de agar al 1% para la prueba se

necesitaron 20 ml de PBS 1X pH 7.5-8 y 0.2 g de agar noble y 1 ml de Azida de sodio (opcional). Se disolvió la suspensión en microondas, y se colocaron 15- 20 ml de la solución del gel en la caja petri y se dejó solidificar, se realizaron hoyos con sacabocado para 7 pozos, se colocaron 30 µl de antígeno protoplasmático (10 mg/ml) en el orificio central, el control positivo y las muestras en los orificios periféricos al del antígeno, finalmente, se incubó la placa a 37° C en una cámara húmeda y se realizó lectura a las 24 y 48 horas posteriores (antes de 48 horas). la interpretación de la prueba se realizó de la siguiente manera: Ausencia de líneas de precipitación = Negativo ; Una línea de precipitación claramente definida = 1+; Dos líneas = 2+ ; Tres líneas = 3+.

6.15. Análisis de datos

Se comparó la sensibilidad diagnóstica de las pruebas propias y la prueba ELISA comercial utilizando PCR fecal como prueba de oro (grupo positivo). Se realizó el análisis ROC y de correlación con el paquete estadístico MedCalc.

VII. RESULTADOS

7.1. Antecedentes de la paratuberculosis ovina en el rebaño

La observación de muertes por causas desconocidas en ovinos dentro del rebaño de ovinos en Mexicali, se comenzaron a presentar en el año 2007, según menciona el productor. Se sospechaba que el factor causante de las muertes fue la entrada de ovinos de otro rebaño que fueron encomendados cuidar. A partir de este acontecimiento, las muertes de ovinos se manifestaban frecuentemente. Los esfuerzos por minimizar las muertes mediante la administración de antibióticos no fueron de utilidad y estas continuaron de forma intermitente. En 2010 académicos del Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias realizaron diagnóstico de paratuberculosis en ovinos y bovinos mediante serología y cultivo fecal en bovinos del rancho. Desde 2012 técnicas diagnósticas tal como necropsia, histopatología, serología, PCR y cultivo fecal de ovinos, han sido realizadas, incluso se han implementado medidas de control y prevención de la enfermedad en el rancho, con la consecuente disminución de la incidencia y prevalencia de la enfermedad disminuyendo las pérdidas económicas al productor.

En la figura 1, se muestran corrales y animales del rancho en agosto de 2012. Se observan animales perteneciente al rebaño estudiado y los hallazgos de la necropsia de los ovinos con emaciación, a partir de los cuales se utilizó el tejido intestinal para realizar cortes histológicos que posteriormente se procesaron con tinciones Ziehl-Neelsen y Hematoxilina-Eosina, figura 2. La figura 3 muestra resultados confirmatorios de una animal en la fase final de paratuberculosis.

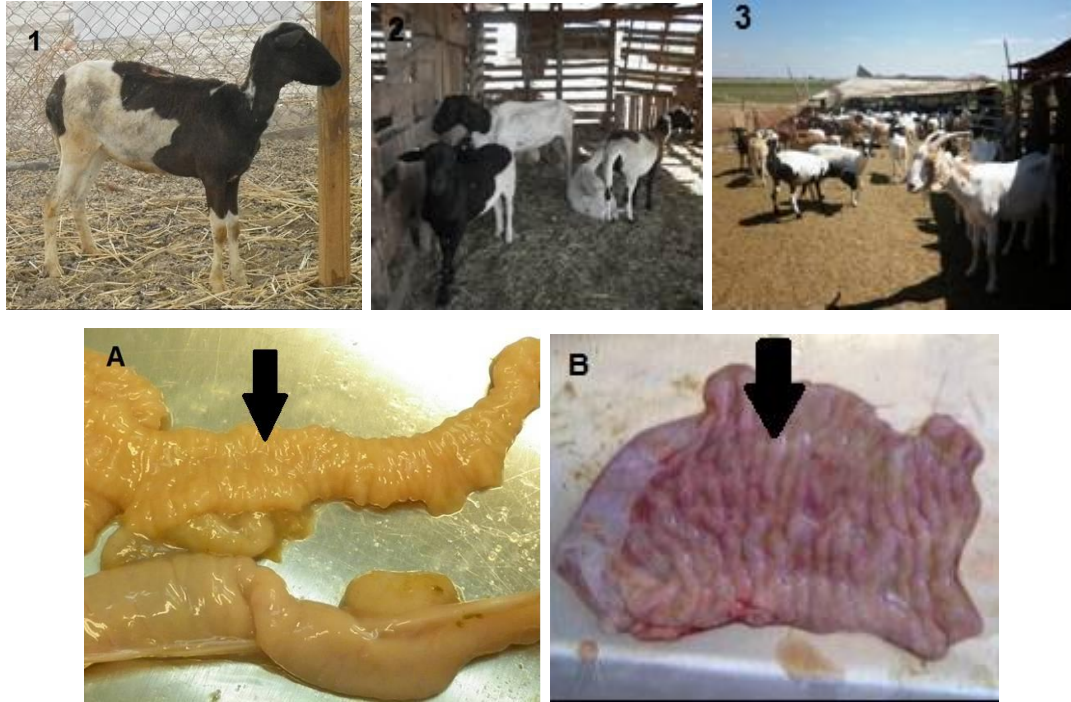


Figura 1. Casos de Paratuberculosis en ovinos en el rancho estudiado.

1. Ovino mostro emaciación grave y debilidad (15/Agosto/2012), correspondientes a la fase IV de la enfermedad. **2.** Ovinos en fase IV de la enfermedad en corral de cuarentena. **3.** Condiciones generales de instalaciones en las cuales se alojaron los ovinos. **A.B.** Ejemplo del intestino de animales clínicos del rancho con lesiones habituales de paratuberculosis como edema, inflamación y corrugación de la mucosa (flechas). **B.** Se observa pequeñas hemorragias.

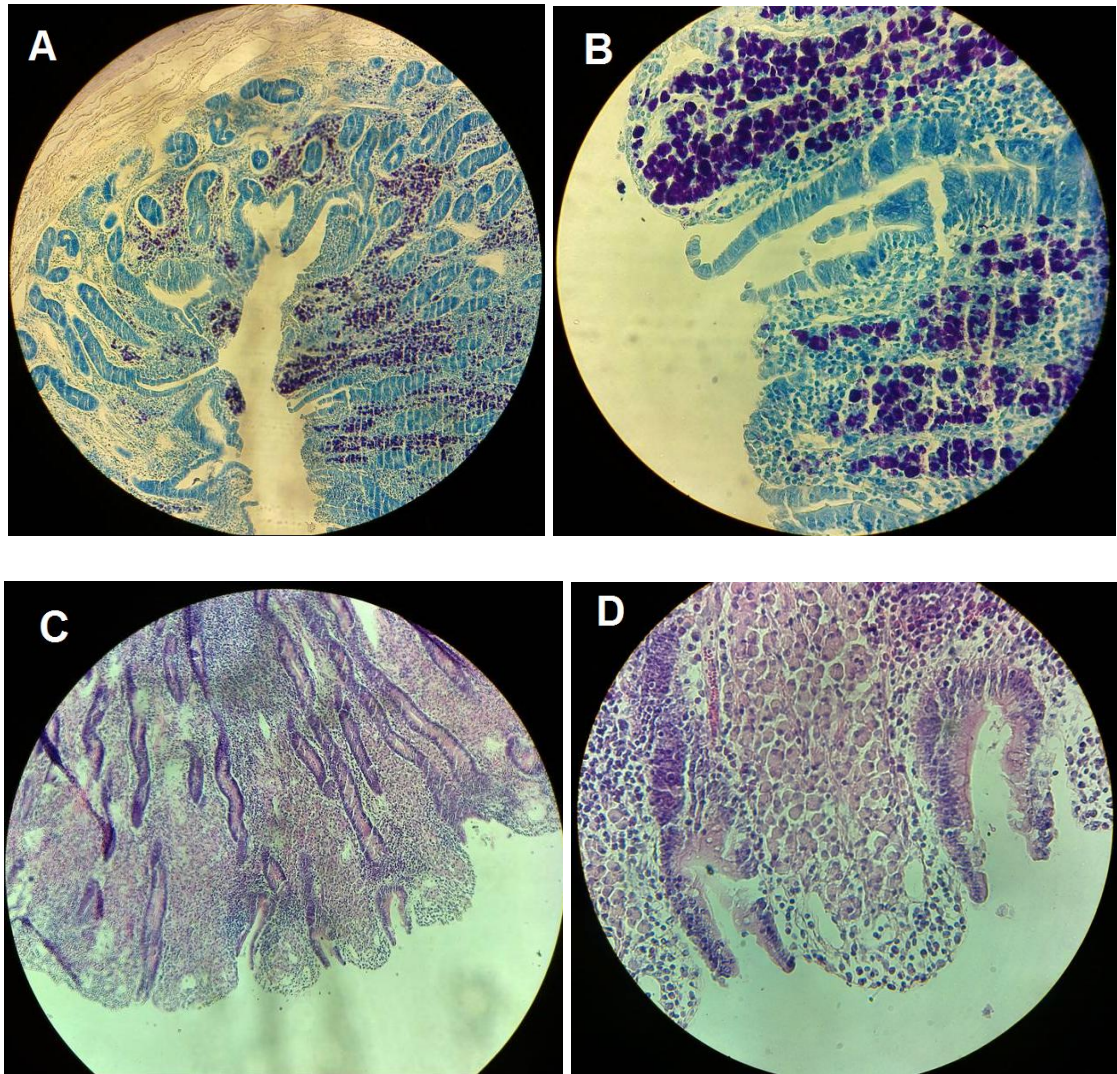


Figura 2. Cortes histológicos de intestino de un animal clínico

A.B. Tinción Ziehl-Neelsen de válvula ileocecal con objetivos 10× (A) y 40× (B). Se observa una enteritis granulomatosa difusa o lesión multibacilar difusa, asociada a la lamina propria con macrófagos repletos de enorme cantidad de micobacterias (coloración morada). **C.D.** Tinción Hematoxilina-Eosina de otro bloque del válvula ileocecal con objetivos 10× (C) y 40× (D). Se observa infiltración de macrófagos con destrucción de vellosidades intestinales. La cantidad de linfocitos es menor que tejidos normales (no mostrado).

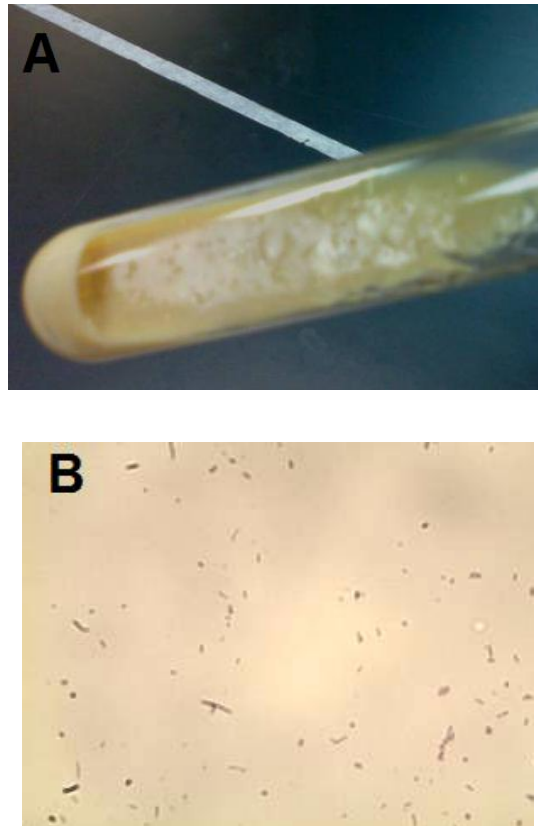


Figura 3. Cultivo y Tinción. **A.** Aislamiento de Map a partir de muestra de heces de un animal clínico. El periodo general de la incubación en medio solido Middlebrook 7H10 suplementado con micobactina J fue de 4 meses o más. **B.** Confirmación de aislados del cultivo mediante te Tinción Ziehl-Neelsen. Baar positivo, fueron observados con objetivo de 100×,

7.2 Selección de animales subclínicos excretores de Map.

Para la evaluación de pruebas serológicas se necesita obtener inicialmente paquetes de muestras de suero del grupo positivo y negativo identificados por pruebas que no se van a evaluar (ej. prueba de oro o combinaciones de pruebas no serológicas). En el presente estudio la definición del grupo positivo fue animales subclínicos con evidencias de la excreción de Map en heces. Inicialmente se emplearon dos herramientas de diagnóstico para detectar Map en heces: cultivo bacteriológico y PCR tiempo real de IS900 (ver anexo 3), para poder identificar mayor número de animales excretores.

En el Cuadro 1. se presenta resumen de resultados del cultivo bacteriológico fecal. En el primer muestreo en la etapa inicial de este estudio se recolectaron heces de 78 ovinos hembra reproductoras mayores a 6 meses para el cultivo bacteriológico y PCR fecal. Sin embargo, se perdieron aproximadamente 85% (66/78) de cultivos por accidentes en el laboratorio por causas ajenas de autores. De los 12 cultivos concluidos se confirmaron 58% (7/12) de animales como excretores de Map. Considerando el tiempo para obtener resultados de cultivos bacteriológicos (4-6 meses o mayor), y la dificultad de evitar la contaminación en cultivo durante incubación prolongada, se decidió no continuar los cultivos bacteriológicos para el fin de la selección de animales subclínicos. El criterio de selección de animales del grupo positivo de este estudio fue la amplificación del fragmento de IS900 de Map en heces mediante PCR tiempo real. El grupo positivo en este proyecto (ver anexo 5). En el Cuadro 1, de 12 cultivos fecales, 42% (5/7) fueron negativos. Estos 5 animales posteriormente fueron confirmados como positivos mediante PCR fecal.

La PCR de IS900 con los oligonucleótidos empleados (Kawaji et. al., 2007) amplificaron un fragmento de 183pb a partir de muestras de DNA extraído de heces. La amplificación fue confirmada en la grafica del análisis de disociación de productos de PCR como el pico en la temperatura de

disociación (T_m) de 90 °C (Figura 4). Todas las reacciones de PCR fueron por duplicado. Muestras que confirmaron la presencia del pico de 90 °C en dos tubos se clasificaron como positivos a Map. Las muestras que no confirmaron la amplificación en uno o dos pozos se repitieron en PCR por triplicado. Con la evidencia de la amplificación intensa (arriba de la línea del punto de corte) en un tubo acompañados con la amplificación en uno o dos más tubos, finalmente se seleccionaron 40 muestras como positivos (Cuadro 2).

	Cultivo fecal inicial (n=78)	Resultados	
		Positivo	Negativo
Incubación interrumpida	66	ND	ND
Incubación concluida	12	7	5
Total	78		

Cuadro 1. Resumen de resultados del cultivo bacteriológico fecal.

*Se realizaron todos los cultivos por duplicado.

	Heces procesadas (n=71)	Resultados	
		Positivo	Negativo
PCR tiempo real realizado	63	40	23
Muestras excluidas	8	ND	ND
Total	71		

Cuadro 2. Resumen de resultados de PCR de IS900 con muestras fecales.

Se identificaron 40 animales subclínicos excretores de Map mediante la técnica de PCR fecal.

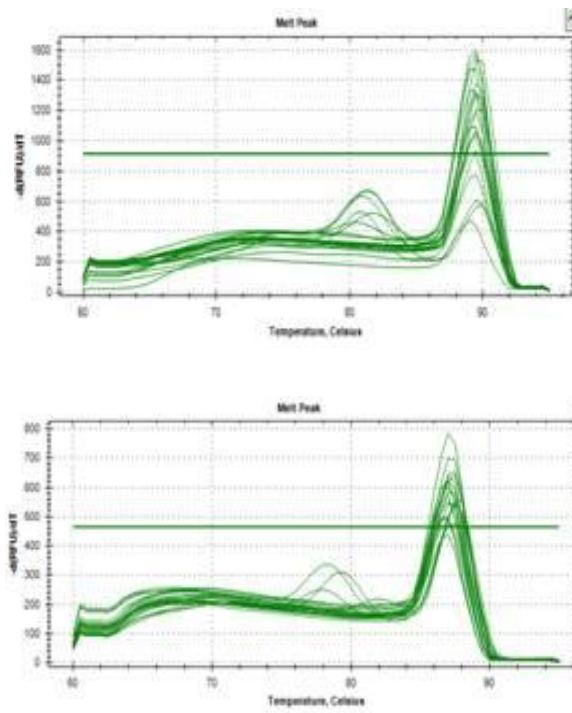


Figura 4. Patrones de amplificación del fragmento IS900 de Map de 183 pb.

7.3. Determinación de la capacidad diagnostica de 4 pruebas serológicas.

7.3.1. ELISA comercial.

La aplicación de ELISA comercial (marca Pourquier-IDEXX) resulto clasificar 5% (2/40) de animales del grupo subclínico como positivos a la paratuberculosis (ver anexo 4). 90% (36/40) del grupo subclínico se interpretaron como negativos por esta prueba y 5% (2/40) se clasificaron como sospechosos.

7.3.2. ELISA propia con PPA

Figura 5. Muestra resultados de la aplicación de ELISA propia de nuestro laboratorio con antígeno PPA (ver anexo 6). Se analizaron muestras del grupo negativo (n=43) y del grupo subclínico (n=40). En el gráfico de Dot plot, cada punto representa una muestra con el valor de S/P, donde $S/P = [(OD_{650-muestra} - OD_{650-blanco}) / (OD_{650-CtrlPostivo, promedio} - OD_{650-blanco})]$. Para el cálculo de S/P se utilizó el suero de un animal clínico de mismo rancho como el control positivo con previa verificación de su alta reactividad con antígenos de Map. Se muestra el punto de corte óptimo (0.2995) de acuerdo al análisis de ROC (Característica Operativa del Receptor) con sus respectivos valores de Sensibilidad (77.5%) y Especificidad (79.1%).

Figura 6. muestra resultados del análisis ROC. Se y Sp de la prueba en función de S/P se presenta en la Figura 6A. La curva ROC de la Figura 6B indica la calidad de la prueba con valores del área bajo la curva ROC (AUC) de función relativa=0,798 (95%CI, 0.695-0.878, $p < 0.0001$). Área bajo la curva ROC de PCR=0,685.

Experimento	Positivo	Negativo	Sospechoso	
1 (n=15)	1	14	0	
2 (n=19)	1	16	<u>2</u>	
3 (n=6)	0	6	0	
Total (n=40)	2	36	2	40

Cuadro 3. Resultados de ELISA comercial

La aplicación del ELISA comercial (marca Pourquier-IDEXX) resulto clasificar 5% (2/40) de animales del grupo subclínico como positivos a paratuberculosis. 90% (36/40) del grupo subclínico se interpretaron como negativos por esta prueba y 5% (2/40) se clasificaron como sospechosos.

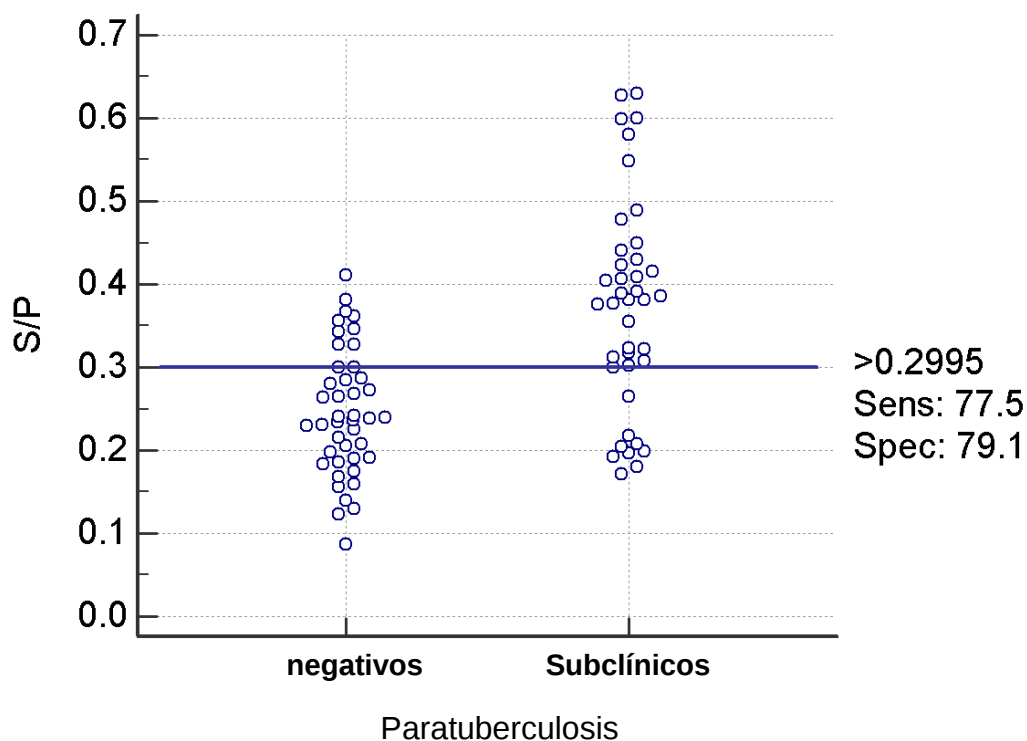
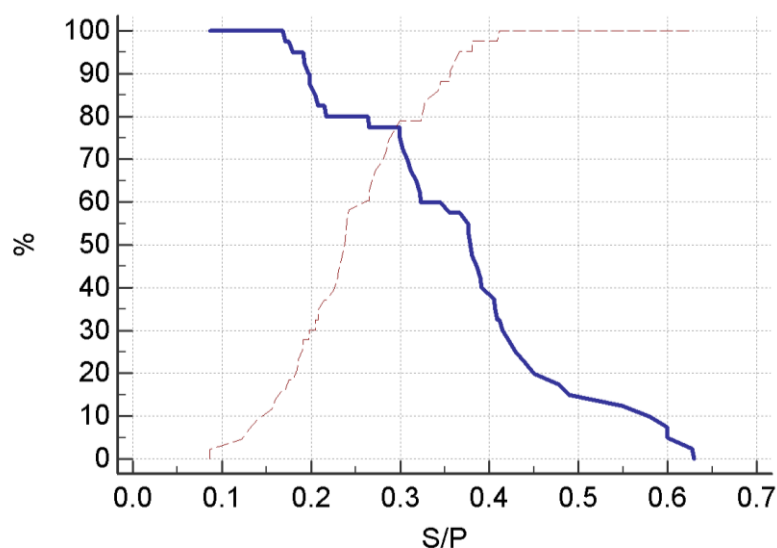


Figura 5 . Resultados de ELISA con PPA propia.

Resultados de la prueba de muestras del grupo negativo (n=43) y del grupo subclínico (n=40). En el gráfico de Dot plot, cada punto representa una muestra con el valor de S/P, donde $S/P = \frac{[(OD_{650\text{-muestra}} - OD_{650\text{-blanco}})]}{(OD_{650\text{-CtrlPositivo, promedio}} - OD_{650\text{-blanco}})}$. Para el cálculo de S/P se utilizó el suero de un animal clínico de mismo rancho como control positivo con previa verificación de su alta reactividad con antígenos de Map. Se muestra el punto de corte óptimo (0.2995) de acuerdo al análisis de ROC (Característica Operativa del Receptor) con sus respectivos valores de Sensibilidad (77.5%) y Especificidad (79.1%).

A.



B.

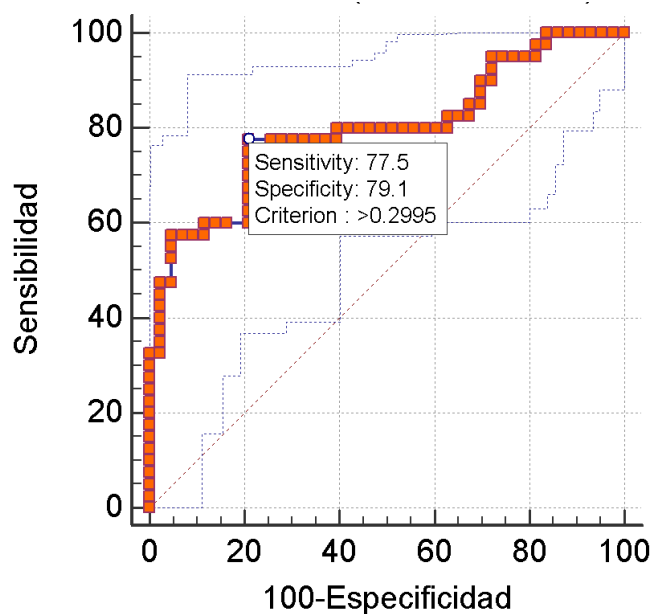


Figura 6 . Análisis de ROC de ELISA con PPA propia.

A. Se muestra comportamiento de la sensibilidad (Se) y la especificidad de la prueba en función del valor de punto de corte (S/P). **B.** Curva ROC de la sensibilidad y especificidad de ELISA propia con PPA. Área bajo la curva ROC (AUC) de función relativa=0,798 (95%CI, 0.695-0.878, $p < 0.0001$). Área bajo la curva ROC de PCR=0,685.

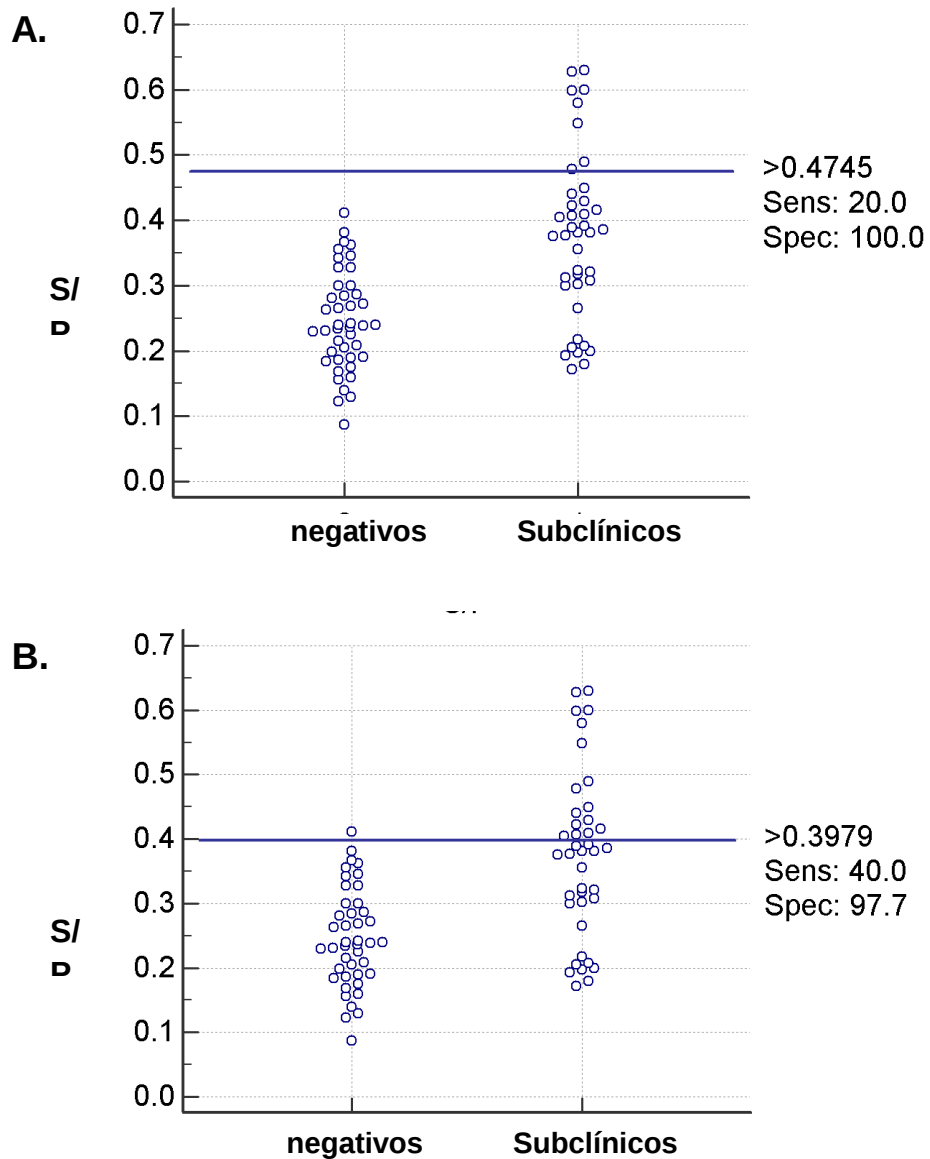


Figura 7 . Punto de corte propuesto para ELISA con PPA propia.

Punto de corte propuesto por el promedio de S/P y la desviación estándar en el grupo negativo ($n=43$, $M=0.2458$ 95%CI 0.2223-0.2692, $SD=0.07616$). **A.** La aplicación del punto de corte 0.4745 ($M+3SD$) resultó clasificar 20% (8/40) del grupo subclínico como positivo, con Se y Sp de 20% y 100%, respectivamente. **B.** La aplicación de punto de corte 0.3979 ($M+2SD$) resultó clasificar 40% (16/40) del grupo subclínico como positivo con Se y Sp de 40% y 97.7%.

ELISA PPA	ELISA Comercial		Total
	Negativo	Positivo	
Negativo	30	2	32(80.0%)
Positivo	8	0	8(20.0%)
Total	38 (95.0%)	2 (5.0%)	40

Cuadro 4. Clasificación cruzada de resultados de ELISA PPA y ELISA Comercial con punto de corte de 0.4745

ELISA PPA	ELISA Comercial		Total
	Negativo	Positivo	
Negativo	23	1	24(60.0%)
Positivo	15	1	16(40.0%)
Total	38 (95.0%)	2 (5.0%)	40

Cuadro 5. Clasificación cruzada de resultados de ELISA PPA y ELISA comercial con punto de corte de 0.3979

7.3.3. ELISA propia con antígeno lipídico de Map (EVELISA)

En la evaluación de la prueba de EVELISA se utilizó el protocolo anteriormente mencionado, sin embargo, se realizaron modificaciones al mismo, tales como cambios en la concentración de Buffer B, solución de lavado, conjugado anti-ovino y anti-bovino en sueros de bovino negativos la enfermedad, controles negativos sin suero de ovino, además se utilizaron dos soluciones de revelado, placas de poliestireno de unión alta y media, antígeno lipídico extraído de cepas ATCC y V23 de MAP (cuadro 6), a pesar de el desarrollo en la estandarización de la prueba, en toda ocasión, se observaron reacciones de unión antígeno-anticuerpo inespecíficas (figura 8) evitando de esta manera, establecer un punto de corte para la validación de la prueba. Por lo anterior se sospecha de una modificación en antígenos de superficie utilizados, que causa reacciones inespecíficas con componentes del suero de ovinos, así como bovino utilizados.

7.3.4. Inmunodifusión del gel de agar (IDGA)

En la Figura 9 se muestran los resultados de esta prueba, se observó que solo los altos títulos de anticuerpos en suero de animales, precipitan con el antígeno protoplasmático desafiado, observándose una banda de precipitación claramente visible. Las causas por las que no se observó precipitación en los sueros problema puede ser debido a que los animales se encuentran en una etapa silente o subclínica de la enfermedad. Aunque exista excreción intermitente del bacilo a través de heces y el diagnóstico mediante técnicas moleculares tal como PCR fecal fuera positivo, hasta que no se establezca una respuesta humoral, la presencia de anticuerpos en suero será nula o indetectable. Por lo tanto la detección de animales seropositivos a paratuberculosis mediante Inmunodifusión en gel de agar es recomendable cuando los animales se encuentren en etapas avanzadas de la enfermedad, de lo contrario los resultados pueden ser insatisfactorios.

Cuadro 6. Parámetros de EVELISA optimizados

Parámetros optimizados	Variables	Condición optima
Buffer de lavado	-PBS1x- tween 20 0.05% -PBS1x-tween 20 0.5%	PBS1x-tween 20 0.5%
Buffer de bloqueo	Superblock 10% Superblock 100%	Superblock 10%
Tipo de conjugado	Rabbit anti sheep IgG- KPL- HRP	Rabbit anti sheep IgG- KPL-HRP
Concentración de conjugado	1:1000 1:2000 1:3000 1:4000	1:2000
Tipo de placa	Fondo plano CAT# 25802 Fondo redondo CAT # 25801 Maxisorp fondo plano	Fondo plano CAT# 25802
Cepa de Map	ATCC V23	ATCC
Dilución de sueros	1:100 1:200	1:100

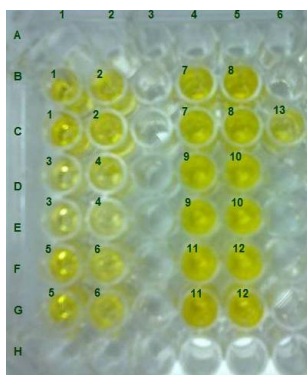


Figura 8. Ejemplo de reacciones no específicas de EVELISA, en sueros controles negativos de ovinos (1, 3, 4, 5 y 6) y bovinos (7, 8, 9, 10, 11 y 12), control positivo (2).

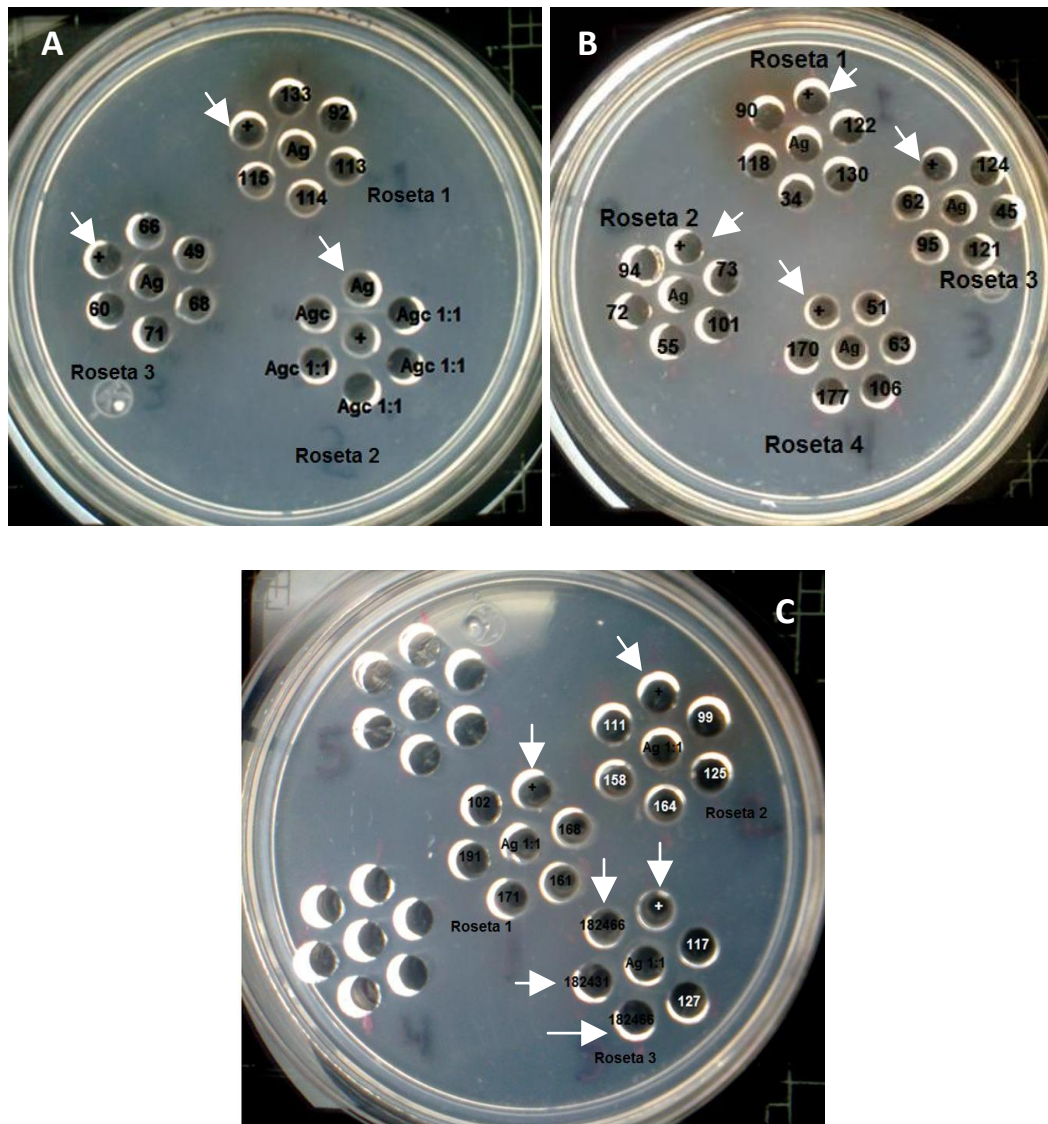


Figura 9. Resultados de IDGA En A y B se observan líneas de precipitación solo entre el antígeno protoplasmático (Ag, flechas blancas) y el control positivo (+) de la roseta 1-3 (flechas), mientras otros sueros no resultaron con bandas de precipitación visibles; en C se observan líneas de precipitación entre el antígeno protoplasmático (Ag 1:1) y control positivo (+), suero 182466, suero 182431, mientras dos sueros restantes resultaron sin bandas de precipitación visibles.

VIII. DISCUSIONES

En el presente estudio se evaluó el comportamiento de una prueba ELISA comercial y tres pruebas serológicas (2 ELISAs y IDGA) desarrolladas en nuestro laboratorio con antígeno proteico comercial (PPA) y antígeno lipídico preparado en nuestro propio laboratorio. Se logró estandarizar una ELISA propia y la prueba IDGA, ambas con antígeno PPA, mientras la estandarización de la prueba ELISA con antígeno lipídico (EVELISA) no se logró por las reacciones no específicas intensas por causas desconocidas. ELISA propia con PPA obtuvo mayor sensibilidad (40%) que la ELISA comercial (5%) con un punto de corte establecido, mientras la prueba IDGA no detectó ningún animal del grupo positivo, resultando una sensibilidad de 0%. Considerando que el suero control positivo del mismo rebaño obtuvo la precipitación del complejo Antígeno-Anticuerpo intensa, esta prueba podría utilizarse en la detección o confirmación de animales clínicos más que subclínicos. La sensibilidad de la prueba comercial ELISA fue sorprendentemente baja (5%), pero razonable, por la definición del grupo control positivo de este estudio, donde no se incluyeron animales clínicos con altos títulos de anticuerpos.

El número de animales de ambos grupos controles negativos (43) y positivos (40) estudiados fueron suficientes para la aproximación inicial, sin embargo, para la estimación de Se y Sp con mayor precisión se requiere analizar mayor cantidad de animales, alrededor de 100 o idealmente 200 por grupo, provenientes de múltiples rebaños (Gardner y col., 2000). La Se determinada en este estudio con animales subclínicos excretores es sobreestimada, debido a que la excreción fecal de Map es intermitente y la definición del grupo positivo subclínico fue sesgada por la excreción fecal. Por lo tanto no se puede explorar la Se obtenida en este estudio para ovinos en todas las etapas de la paratuberculosis. La verificación del estatus libre de

infección en todos los animales del grupo negativo es un proceso sumamente importante en este tipo de estudio para evitar la subestimación de la Sp. Es posible que nuestros animales del grupo negativo pudiesen estar infectados o expuestos a Map, que es el escenario más probable en México, con antecedentes de alta prevalencia de paratuberculosis. Sin embargo ELISA propia con PPA mantuvo alta Sp (97.7-100%) con valores de punto de corte establecidos en este estudio.

Greiner y col., (2000), reportaron que la precisión ELISA es más alta que la de IDGA en ovinos. El resultado del análisis de curva ROC de ELISA propia con PPA (AUC=0.787) fue comparable con el resultado de ELISA de Greiner y col., 2000), con (AUC=0.807) y mayor en IDGA de estos autores (AUC=0.569). En Australia, la Se y Sp de ELISA oscila de 21.9-41.5% y 99-95% respectivamente en ovinos, dependiendo de punto de corte (Sergeant y col., 2003). En otros estudios reportaron un rango más amplio de Se de 30% hasta 80% (Clarke y col., 1996, Dubash y col., 1995, Hilbink y col., 1994, Perez y col., 1997). Una explicación probable para estos hallazgos sería que los ovinos de estos estudios incluyeron animales en etapa avanzada de enfermedad con signos clínicos. Gumber y col., (2006) utilizaron animales predominantemente subclínicos como en nuestro estudio y reportaron Se y Sp de 31.5% y 99.0%, respectivamente, los cuales son similares a los valores obtenidos en nuestra ELISA con PPA (Se 40%, Sp 97.7%).

La baja sensibilidad de la serología en la paratuberculosis nos dificulta utilizar estas herramientas en la estrategia de control mediante la detección y eliminación, particularmente por su incapacidad de identificar animales en etapa temprana de infección (Sugden y col., 1997). Además las reacciones cruzadas de anticuerpos pueden ser observadas en animales infectados con otras micobacterias diferentes a Map (Bannantine y col., 2008). También las pruebas de ELISA dependen de la inmunoreactividad de unión del antígeno sobre la superficie plástica de las placas. Varias proteínas de Map han sido

identificadas y probadas para inmunogenicidad, pero su diagnostico potencial permanece para ser validado con apropiado tamaño de muestras. (Mikkelsen y col., 2011a). Estudios comparativos para las pruebas de FC, IDGA y ELISA, repetidamente mostraron discrepancias para identificar todos los animales infectados (Darcel, 1995; Darcel y Logan-Handseame, 1998; Hilbink y col., 1994; McNab y col., 1991; Sockett y col., 1992). Sugden y col., (1997) discutieron que las variaciones genéticas en los animales individuales o la carencia de antígenos inmunodominantes comunes en todas cepas de Map son factores que disminuyen la capacidad diagnóstica de las pruebas serológicas para el diagnostico de la paratuberculosis.

IX. CONCLUSIONES

Se evaluó la capacidad diagnóstica de 4 pruebas serológicas en la detección de ovinos subclínicos a paratuberculosis, obteniendo valores de sensibilidad y especificidad como parámetros importantes en estudios epidemiológicos de esta enfermedad en Baja California.

La prueba ELISA desarrollada en nuestro laboratorio con el antígeno PPA comercial obtuvo mayor sensibilidad, demostrando su potencial en la reducción de costos de diagnóstico futuro.

De acuerdo a las características de esta enfermedad el rango de sensibilidad de las pruebas serológicas determinadas en este estudio fue baja (0-40%), por lo que se recomienda seleccionar herramientas de diagnóstico eficaces para el propósito de prueba; la serología es una prueba rápida y económica para la confirmación de casos clínicos o animales en etapa terminal de la enfermedad, mientras que PCR fecal es ideal para la detección rápida de animales excretores de Map, los cuáles son significativos en el programa de control, pero comúnmente son seronegativos.

X. LITERATURA CITADA

Aalund O: 1984, Sensitivity, specificity and predictive value of diagnostic tests applied to animals with subclinical infections of paratuberculosis. *In: Paratuberculosis, diagnostic methods, their practical application and experience with vaccination*, ed. Jørgensen JB, Aalund O, pp. 9–39. Commission of the European Communities, Copenhagen, Denmark.

Bannantine, J.P., Paustian, M.L., Waters, W.R., Stabel, J.R., Palmer, M.V., Li, L., Kapur, V., 2008. Profiling bovine antibody responses to *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis infection by using protein arrays. *Infect. Immun.* 76, 2739–2749.

Bech-Nielsen S., Shulaw W.P., Frandsen P.L., Berg-Jorgensen J., Ahrens P., Feld N. C. (1992) Use of a dot enzyme-linked immunosorbent assay on absorbed sera for the diagnosis of bovine paratuberculosis. *Rev. Sci. Technol.* 12:617–627.

Bech-Nielsen S., Shulaw W. P., Frandsen P. L., Jorgensen J. B., Feld N. C., Ahrens P (1993) Comparison of subjective and objective test evaluations for use of *Mycobacterium phlei*-absorbed serum in a dot-enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of paratuberculosis in cattle. *Am. J. Vet. Res.* 53:1386–1391.

Benedictus G: 1984, Evaluation of organized control of bovine paratuberculosis in Friesland province, The Netherlands. *Tijdschr Diergeneeskd* 109:905–916.

Biet, F., Bay, S., Thibault, V.C., Euphrasie, D., Grayon, M., Ganneau, C., Lanotte, P., Daffe, M., Gokhale, R., Etienne, G., Reyrat, J.M., 2008,

Lipopentapeptide induces a strong host humoral response and distinguishes *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from *M. avium* subsp. *avium*. Vaccine 26, 257-268.

Carrigan, M.J., Seaman, J.T. 1990. The pathology of Johne's disease in sheep. Aust. Vet. J. 67, 47-50. Cajeme, Sonora.

Chiodini, R. J., H. J. Van Kruiningen, and R. S. Merkal. 1984. Ruminant paratuberculosis (Johne's disease): the current status and future prospects. Cornell Vet. 74:218–262.

Clarke C. J. (1994) Host responses to *Mycobacterium paratuberculosis*/*M. avium* infection. in Proceedings of the 4th International Colloquium on Paratuberculosis. eds Chiodini R. J., Collins M. T., Bassey E. O. (International Association for Paratuberculosis, Inc. East Providence, R.I), pp 345–354

Clarke CJ, Patterson AP, Armstrong KE et al. Comparison of the absorbed ELISA and agar gel immunodiffusion test with clinicopathological findings in ovine clinical paratuberculosis. Vet Rec 1996;139:618-621.

Clarke, C.J., 1997, The pathology and pathogenesis of paratuberculosis in ruminants and other species. J Comp Pathol 116, 217-261.

Collins, D. M., D. M. Gabric, and G. W. de Lisle. 1990. Identification of two groups of *Mycobacterium paratuberculosis* strains by restriction endonuclease analysis and DNA hybridization. J. Clin. Microbiol. 28:1591–1596.

Collins MT: 1996, Diagnosis of paratuberculosis. Vet Clin North Am Food Anim Pract 12:357–372.

Committee on Diagnosis and Control of Johne's Disease, and Board on Agriculture and Natural Resources. Diagnosis and control of Johne's disease (2003) Washington, D.C, The National Academies Press.

Collins, M.T., Wells, S.J., Petrini, K.R., Collins, J.E., Schultz, R.D., Whitlock, R.H., 2005, Evaluation of five antibody detection tests for diagnosis of bovine paratuberculosis. Clin Diagn Lab Immunol 12, 685-692.

Corpa, J.M., Garrido, J., Garcia Marin, J.F., Perez, V., 2000, Classification of lesions observed in natural cases of paratuberculosis in goats. J Comp Pathol 122, 255-265.

Costanzo, G., Pinedo, F.A., Mon, M.L., Viale, M., Gil, A., Illia, M.C., Gioffre, A., Arese, A., Traveria, G., Romano, M.I., 2012, Accuracy assessment and screening of a dairy herd with paratuberculosis by three different ELISAs. Vet Microbiol 156, 183-188.

Darcel C.(1995) Diagnosis of infection with *Mycobacterium paratuberculosis*. Can. Vet. J. 36:199–200.

Darcel C., Logan-Handsaeame B. (1998) ELISA testing for antibody to *Mycobacterium paratuberculosis*. Can. Vet. J. 39:335–336.

De Juan, L., A. Mateos, L. Domínguez, J. M. Sharp, and K. Stevenson. 2005. Genetic diversity of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* isolates from goats detected by pulsed-field gel electrophoresis. Vet. Microbiol. 106:249–257.

- De Juan, L., Alvarez, J., Romero, B., Bezos, J., Castellanos, E., Aranaz, A., Mateos, A., Dominguez, L., 2006, Comparison of four different culture media for isolation and growth of type II and type I/III *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* strains isolated from cattle and goats. *Appl Environ Microbiol* 72, 5927-5932
- Dubash K., Shulaw W. P., Bech-Nielsen S., Stills H. F. Jr., Slemons R. D. (1995) Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay licensed by the USDA for use in cattle for diagnosis of ovine paratuberculosis. *J. Vet. Diagn. Investig.* 7:347–351.
- Eda, S., B. Elliott, M. C. Scott, W. R. Waters, J. P. Bannantine, R. H. Whitlock, and C. A. Speer. 2005. New method of serological testing for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (Johne's disease) by flow cytometry. *Foodborne Pathog. Dis.* 2:250–262.
- Eda, S., Bannantine, J.P., Waters, W.R., Mori, Y., Whitlock, R.H., Scott, M.C., Speer, C.A., 2006, A highly sensitive and subspecies-specific surface antigen enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of Johne's disease. *Clin Vaccine Immunol* 13, 837-844.
- Ferreira, R., Fonseca, L., Lilenbaum, W., 2002, Comparison between a commercial and an in-house ELISA for anti-*M. avium* paratuberculosis antibodies detection in dairy herds in Rio de Janeiro, Brazil. *Rev Latinoam Microbiol* 44, 129-132.
- Fry, M.P., Kruze, J., Collins, M.T., 2008, Evaluation of four commercial enzyme-linked immunosorbent assays for the diagnosis of bovine paratuberculosis in Chilean dairy herds. *J Vet Diagn Invest* 20, 329-332.
- Gardner, I.A., Stryhn, H., Lind, P., Collins, M.T., 2000, Conditional dependence between tests affects the diagnosis and surveillance of animal diseases. *Prev Vet Med* 45, 107-122.

- Green, E.P., Moss, M.T., Hermon-Taylor, J., McFadden, J.J., 1989, Insertion elements in mycobacteria. *Acta Leprol* 7 Suppl 1, 239-242.
- 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. *Vet Microbiol* 115, 91-101.
- Greiner, M., Gardner, I.A., 2000, Application of diagnostic tests in veterinary epidemiologic studies. *Prev Vet Med* 45, 43-59.
- Gunnarsson, E., Fodstad, F.H., 1979, Cultural and biochemical characteristics of *Mycobacterium paratuberculosis* isolated from goats in Norway. *Acta Vet Scand* 20, 122-134.
- Harris, N.B., Barletta, R.G., 2001, *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Veterinary Medicine. *Clin Microbiol Rev* 14, 489-512.
- Hilbink F., West D.M., deLisle G.W., Kittelberger R., Hosie B.D., Hutton J., Cooke M. M., Penrose M. (1994) Comparison of a complement fixation test, a gel diffusion test and two absorbed and unabsorbed ELISAs for the diagnosis of paratuberculosis in sheep. *Vet. Microbiol.* 41:107–116.
- Hope, A.F., Kluver, P.F., Jones, S.L., Condon, R.J., 2000, Sensitivity and specificity of two serological tests for the detection of ovine paratuberculosis. *Aust Vet J* 78, 850-856.
- Jorgensen JB: 1984, The diagnosis of clinical paratuberculosis in bovines. *In: Paratuberculosis, diagnostic methods, their practical application and*

experience with vaccination, ed. Jørgensen JB, Aalund O, pp. 1–7.
Commission of the European Communities, Copenhagen, Denmark

Jorge, M.C., Schettino, D.M., Torres, P., Bernardelli, A., 2000, [First description of concomitant infection with tuberculosis and paratuberculosis in dairy sheep in Argentina]. *Rev Sci Tech* 19, 800-809.

Juste, R.A., Garrido, J.M., Geijo, M., Elguezabal, N., Aduriz, G., Atxaerandio, R., Sevilla, I., 2005, Comparison of blood polymerase chain reaction and enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in cattle and sheep. *J Vet Diagn Invest* 17, 354-359.

Kalis CHJ, Hesselink JW, Russchen EW, et al.: 1999, Factors influencing the isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from bovine fecal samples. *J Vet Diagn Invest* 11: 345–351.

Kalis, C.H., Barkema, H.W., Hesselink, J.W., van Maanen, C., Collins, M.T., 2002, Evaluation of two absorbed enzyme-linked immunosorbent assays and a complement fixation test as replacements for fecal culture in the detection of cows shedding *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *J Vet Diagn Invest* 14, 219-224.

Kawaji, S., Taylor, D.L., Mori, Y., Whittington, R.J., 2007, Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in ovine faeces by direct quantitative PCR has similar or greater sensitivity compared to radiometric culture. *Vet Microbiol* 125, 36-48

.

Leroy, B., Viart, S., Trincherio, N., Roupie, V., Govaerts, M., Letesson, J.J., Huygen, K., Wattiez, R., 2009, Use of *Mycobacterium avium* subsp.

paratuberculosis specific coding sequences for serodiagnosis of bovine paratuberculosis. *Vet Microbiol* 135, 313-319.

Lilenbaum, W., de Souza, G.N., Ristow, P., Moreira, M.C., Fraguas, S., Cardoso Vda, S., Oelemann, W.M., 2007, A serological study on *Brucella abortus*, caprine arthritis-encephalitis virus and *Leptospira* in dairy goats in Rio de Janeiro, Brazil. *Vet J* 173, 408-412.

Manning, E.J., Collins, M.T., 2001, *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis: pathogen, pathogenesis and diagnosis. *Rev Sci Tech* 20, 133-150.

Manual para aislamiento e identificación de *M. paratuberculosis* USDA-APHIS-VS-NVSL v3.0 2009. https://www.aphis.usda.gov/animal_health/lab_info_services/

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.

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.

Mikkelsen, H., Aagaard, C., Nielsen, S.S., Jungersen, G., 2011. Review of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis antigen candidates with diagnostic potential. *Vet. Microbiol.* 152 (1–2), 1–20.

Motiwalla, A. S., M. Strother, N. E. Theus, R. W. Stich, B. Byrum, W. P. Shulaw, V. Kapur, and S. Sreevatsan. 2005. Rapid detection and typing of strains

of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from broth cultures. J. Clin. Microbiol. 43:2111–2117.

National Research Council. 2003. Diagnosis and control of Johne's disease, p. 129. National Academies Press, Washington, DC.

Nielsen, S.S., Houe, H., Thamsborg, S.M., Bitsch, V., 2001, Comparison of two enzyme-linked immunosorbent assays for serologic diagnosis of paratuberculosis (Johne's disease) in cattle using different subspecies strains of *Mycobacterium avium*. J Vet Diagn Invest 13, 164-166.

Nielsen, S.S., Toft, N., 2008, Ante mortem diagnosis of paratuberculosis: a review of accuracies of ELISA, interferon-gamma assay and faecal culture techniques. Vet Microbiol 129, 217-235.

OIE. 2008b. Paratuberculosis (Enfermedad de Johne). Manual Sobre Animales Terrestres. Capítulo 2.1.11.

OIE. (2008) Manual de test diagnósticos y vacunas para animales terrestres, 6^a Edición. *Organización Internacional de Epizootias* (OIE). 1-2.

O'Mahony, J., Hill, C., 2004, Rapid real-time PCR assay for detection and quantitation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* DNA in artificially contaminated milk. Appl Environ Microbiol 70, 4561-4568.

Paolicchii, F.A., Zumarraga, M.J., Gioffre, A., Zamorano, P., Morsella, C., Verna, A., Cataldi, A., Alito, A., Romano, M., 2003, Application of different methods for the diagnosis of paratuberculosis in a dairy cattle herd in Argentina. J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health 50, 20-26.

Pavlik, I., A. Horvathova, L. Dvorska, J. Bartl, P. Svastova, R. du Maine, and I. Rychlik. 1999. Standardisation of restriction fragment length polymorphism

analysis for *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. J. Microbiol. Methods 38:155–167.

Perez, V., Garcia Marin, 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.

Perez V., Tellechea J., Badiola J. J., Gutierrez M., Garcia Marin J.F.(1997) Relationbetween serologic response and pathologic findings in sheep with naturally acquired paratuberculosis. Am. J. Vet. Res. 58:799–803.

Perez, V., Tellechea, J., Corpa, J.M., Gutierrez, M., Garcia Marin, J.F., 1999, Relation between pathologic findings and cellular immune responses in sheep with naturally acquired paratuberculosis. Am J Vet Res 60, 123-127.

Rankin JD: 1961, The non-specificity of a complement-fixation test used in the diagnosis of Johne's disease in cattle. Res Vet Sci 2:89–95.

Robbe-Austerman, S., Gardner, I.A., Thomsen, B.V., Morrical, D.G., Martin, B.M., Palmer, M.V., Thoen, C.O., Ewing, C., 2006, Sensitivity and specificity of the agar-gel-immunodiffusion test, ELISA and the skin test for detection of paratuberculosis in United States Midwest sheep populations. Vet Res 37, 553-564.

Sechi, L.A., Mura, M., Tanda, F., Lissia, A., Solinas, A., Fadda, G., Zanetti, S., 2001, Identification of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in biopsy specimens from patients with Crohn's disease identified by in situ hybridization. J Clin Microbiol 39, 4514-4517.

Sergeant, E.S., 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. *Prev Vet Med* 61, 235-248.

Shulaw W. P., Bech-Nielsen S., Rings D. M., Getzy D. M., Woodruff T. S. (1993) Serodiagnosis of paratuberculosis in sheep by use of agar gel immunodiffusion. *Am. J. Vet. Res.* 54:13–19.

Sockett, D.C., Conrad, T.A., Thomas, C.B., Collins, M.T., 1992, Evaluation of four serological tests for bovine paratuberculosis. *J Clin Microbiol* 30, 1134-1139.

Sockett DC: 1994, Update on control and management of Johne's disease. *Bovine Pract* 28:136–138.

Sonawane, G.G., Tripathi, B.N., 2013, Comparison of a quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR) with conventional PCR, bacterial culture and ELISA for detection of subsp. infection in sheep showing pathology of Johne's disease. *Springerplus* 2, 45.

Speer, C. A., M. C. Scott, J. P. Bannantine, W. R. Waters, Y. Mori, R. H. Whitlock, and S. Eda. 2006. A novel enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infections (Johne's disease) in cattle. *Clin. Vaccine Immunol.* 13:535–540.

Stabel, J.R., Bosworth, T.L., Kirkbride, T.A., Forde, R.L., Whitlock, R.H., 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, 22-30.

Stehman, S.M., 1996, Paratuberculosis in small ruminants, deer, and South American camelids. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 12, 441-455.

- Stevenson, K., V. M. Hughes, L. de Juan, N. F. Inglis, F. Wright, and J. M. Sharp. 2002. Molecular characterization of pigmented and nonpigmented isolates of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. J. Clin. Microbiol. 40:1798–1804.
- Sugden E. A., Stilwell K., Michaelides A.(1997) A comparison of lipoarabinomannan with other antigens used in absorbed enzyme immunoassays for the serological detection of cattle infected with mycobacterium paratuberculosis. J. Vet. Diagn. Investig.
- Sweeney R. W., Whitlock R. H., Buckley C. L., Spencer P., Rosenberger A. E., Hutchinson L. J. (1994) Diagnosis of paratuberculosis in dairy cattle, using enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies against *Mycobacterium paratuberculosis* in milk. Am. J. Vet. Res. 55:905–909.
- Sweeney R. W., Whitlock R. H., Buckley C. L., Spencer P. A (1995) Evaluation of a commercial enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of paratuberculosis in dairy cattle. J. Vet. Diagn. Investig. 7:488–493.
- Sweeney, R. W., R. H. Whitlock, S. McAdams, and T. Fyock. 2006. Longitudinal study of ELISA seroreactivity to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in infected cattle and culture-negative herd mates. J. Vet. Diagn. Investig. 18:2–6.
- Tripathi, B.N., Periasamy, S., Paliwal, O.P., Singh, N., 2006, Comparison of IS900 tissue PCR, bacterial culture, johnin and serological tests for diagnosis of naturally occurring paratuberculosis in goats. Vet Microbiol 116, 129-137.

- 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., Buergelt, C., 1996, Preclinical and clinical manifestations of paratuberculosis (including pathology). *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 12, 345-356.
- Whitlock RH, Wells SJ, Sweeney RW, van Tiem J: 1999, ELISA and fecal culture: sensitivity and specificity of each method. *Proc Int Colloq Paratuberculosis* 6:353–362.
- Whitlock, R.H., Wells, S.J., Sweeney, R.W., Van Tiem, J., 2000, ELISA and fecal culture for paratuberculosis (Johne's disease): sensitivity and specificity of each method. *Vet Microbiol* 77, 387-398.
- Whittington, R. J., I. Marsh, S. McAllister, M. J. Turner, D. J. Marshall, and C. A. Fraser. 1999. Evaluation of modified BACTEC 12B radiometric medium and solid media for culture of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from sheep. *J. Clin. Microbiol.* 37:1077–1083.
- Whittington, R.J., Hope, A.F., Marshall, D.J., Taragel, C.A., Marsh, I., 2000, Molecular epidemiology of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: IS900 restriction fragment length polymorphism and IS1311 polymorphism analyses of isolates from animals and a human in Australia. *J Clin Microbiol* 38, 3240-3248.
- Zhang, M.Z., Zhang, S., 2011, An efficient DNA extraction method for polymerase chain reaction-based detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in bovine fecal samples. *J Vet Diagn Invest* 23, 41-48.

ANEXO 1.

Protocolo de extracción de DNA por el método lisis –Guanidina

(modificado de Zhang y Zhang, 2011)

1. Se mezcla 1 a 1.2 gramos de heces con 25 ml de NaOH a 0.02N en un tubo Falcon de 50 ml. Agitar vigorosamente más de 30 segundos.
2. Reposar a temperatura ambiente durante 30 minutos para la sedimentación.
3. Transferir 20 ml de sobrenadante a un tubo nuevo de Falcon 50ml.
4. Centrifugar a 1800 *g* durante 30 minutos a 25° C.
5. Descartar el sobrenadante.
6. Lavar el pellet 2 veces con 25 ml de agua destilada, centrifugando a 1800 *g* durante 30 minutos a 25° C, descartando el sobrenadante.
7. Resuspender el pellet en 800 µl de buffer de lisis (0.01 M Tris- HCl, 5mM EDTA, 4M Tiocinato de guanidina, SDS al 0.25% y 0.5% de citrato de sodio) (opcionalmente detener el paso y guardar a -20°C o -80°C, para futura extracción de DNA)
8. Transferir la suspensión a un microtubo nuevo de 2ml con fondo cónico para bead beater que contiene 400 µl de Fenol saturado con Tris (pH7.5-8.0), 400µl de cloroformo y 0.5g (o 0.2mL) de perlas de zirconio de diámetro 0.1 mm (Biospec Inc.)
9. Agitar el tubo con un bead beater a velocidad máxima (4800 rpm) durante 45 segundos y enfriar en hielo.
10. Centrifugar a 8000 *g* durante 5 minutos.
11. Transferir 500µl de sobrenadante en un micro tubo nuevo con 500µl de Chelex 100 matrix (Bio-Rad, Inc.) al 5% (preparado con 2.5gr de Chelex100 en 50 ml de agua destilada)
12. Incubar a 56°C durante 30 minutos después a 100°C durante 10 minutos.
13. Centrifugar a 13000 *g* durante 10 minutos a 4° C
14. Transferir 800µl de sobrenadante en un micro tubo nuevo con 400 µl de etanol al 100%
15. Aplicar todas en una columna de purificación de DNA con membrana de silicio.
16. Lavar 2 veces con 700 µl de buffer de lavado (2mM Tris-HCl, pH7.5, 150mM NaCl, en Etanol al 80%) centrifugando a 8000 *g* durante 1 minuto.
17. Eluir DNA con 50 µl de agua libre de DNasa y RNasa. Almacenar a -20°C.

ANEXO 2.

Protocolo de preparación de medios de cultivo bacteriológico

2.1. Agar Middlebrook 7H10 Modificado Con Mycobactin J

Agar Middlebrook 7H10	9.5g
Agua destilada	450 ml
Glicerol (70 o100 %)	2.5 ml
Vancomicina	300 µl
Ácido nalidixico	300 µl
Anfotericina B	150 µl
OADC	12.5 g
Yema de huevo	125 ml
Mycobactin J (0.5 mg/ml)	1200 µl

1. Combinar dentro de un matraz el agar Middlebrook 7H10 (BD Inc) con el glicerol y el agua destilada y esterilice en autoclave a 121°C durante 30 minutos.
2. Sumergir en baño María a 58°C para evitar la solidificación.
3. Mezclar los antibióticos VAN (100 µg/ml de vancomicina, 100 µg/ml de anfotericina B y 100 µg/ml de ácido nalidixico) a 1:10 y la micobactina (concentración final en medio a 2 µg/ml) dentro de un tubo falcon bajo la campana de seguridad biológica antes de agregarlos.
4. Dentro de la campana de seguridad biológica agregar la mezcla de antibióticos y micobactina dentro del material que se esterilizo previamente que ha sido colocado en baño María y mezclar vigorosamente con un agitador estéril.
5. Bajo las mismas condiciones asépticas agregar las yemas de huevo (anexo 2.2.) y vuelva a agitar hasta que la mezcla sea homogénea.
6. Dispensar 10 ml de medio dentro de tubos de cultivo con tapa rosca (diámetro 17.5-20.0mm) estériles.

7. Inclinar los medios (a 10 grados aproximadamente), evitando salpicar las paredes del tubo con el medio, asegurándose de agitar durante el llenado de tubos.
8. Permitir que el medio solidifique.
9. Confirmar la esterilidad mediante incubación a 37 °C durante 48 horas.

2.2. Preparación de los huevos

1. Deben ser huevos frescos y libres de antibióticos.
2. Lavar bien cada huevo con agua y jabón.
3. Escurrir.
4. Sumergirlos en isopropanol al 75 % durante 15 minutos mínimo (depende de cuan contaminados estén).
5. Antes de usarlos se deben secar muy bien bajo la campana con papel esterilizado previamente.

ANEXO 3.

Resultados de PCR-IS900 de heces

Resultados de 60 muestras presentados en siguiente, se clasificaron 40 muestras positivos como grupo control positivos en la evaluación de pruebas serológicas.

# Arete	Resultado	#Arete	Resultado
36	Positivo	115	Positivo
45	Positivo	117	Positivo
48	Negativo	118	Positivo
49	Positivo	121	Positivo
51	Positivo	122	Positivo
55	Positivo	123	Negativo
60	Positivo	124	Positivo
61	Negativo	125	Positivo
62	Positivo	126	Sospechoso
63	Positivo	127	Positivo
66	Positivo	128	Sospechoso
68	Positivo	130	Positivo
71	Positivo	133	Positivo
72	Positivo	143	Negativo
73	Positivo	144	Negativo
90	Positivo	146	Negativo
92	Positivo	147	Negativo
94	Positivo	151	Negativo
95	Positivo	152	Negativo
97	Negativo	153	Negativo
99	Positivo	155	Negativo
101	Positivo	158	Sospechoso
102	Positivo	161	Positivo
105	Negativo	164	Sospechoso
106	Positivo	168	Positivo
107	Negativo	170	Positivo
108	Negativo	171	Positivo
111	Positivo	173	Negativo
113	Positivo	177	Positivo
114	Positivo	191	Positivo

ANEXO 4.

Resultados de ELISA comercial (Pourquier/ IDEXX)

	# Arete	OD ₄₅₀	S/P	Interpretación
Experimento 1 Placa 1 24/Oct/2012	Ctrl. neg.	0.171		
	Ctrl. pos.	2.424		
	Ctrl. pos.	2.371		
	36	0.214	1.931	NEGATIVO
	45	0.363	8.623	NEGATIVO
	48	0.213	1.886	NEGATIVO
	49	0.345	7.815	NEGATIVO
	51	0.247	3.413	NEGATIVO
	55	0.278	4.806	NEGATIVO
	60	0.233	2.785	NEGATIVO
	61	0.321	6.737	NEGATIVO
	62	2.356	98.136	POSITIVO
	63	0.382	9.477	NEGATIVO
	66	0.23	2.650	NEGATIVO
	68	0.231	2.695	NEGATIVO
	71	1.167	44.734	NEGATIVO
	72	0.221	2.246	NEGATIVO
	73	0.237	2.964	NEGATIVO
	90	0.23	2.650	NEGATIVO
	92	1.107	42.039	NEGATIVO
Experimento 1 placa2 24/Oct/2012	Ctrl. neg.	0.171		
	Ctrl. pos.	2.521		
	Ctrl. pos.	2.681		
	94	0.547	15.473	NEGATIVO
	95	0.218	1.934	NEGATIVO
	97	0.241	2.881	NEGATIVO
	99	0.704	21.934	NEGATIVO
	101	0.167	-0.165	NEGATIVO
	102	1.741	64.609	DUDOSO
	105	0.248	3.169	NEGATIVO
	106	0.194	0.947	NEGATIVO
	107	0.302	5.391	NEGATIVO
	108	0.175	0.165	NEGATIVO
	111	0.193	0.905	NEGATIVO
	113	0.619	18.436	NEGATIVO
	114	0.219	1.975	NEGATIVO

	115	0.227	2.305	NEGATIVO
	117	0.807	26.173	NEGATIVO
	118	1.664	61.440	DUDOSO
	121	0.302	5.391	NEGATIVO
	122	3	116.420	POSITIVO
	123	1.948	73.128	POSITIVO
	124	0.467	12.181	NEGATIVO
	125	0.712	22.263	NEGATIVO
	126	0.273	4.198	NEGATIVO
	127	1.527	55.802	NEGATIVO
	128	0.209	1.564	NEGATIVO
	130	0.257	3.539	NEGATIVO
	133	0.246	3.086	NEGATIVO
	143	1.63	60.041	DUDOSO
Experimento 2 27 /Mayo/ 2014	Ctrl. pos	0.928	0.000	
	Ctrl. pos	1.047	0.000	
	Ctrl. neg.	0.055	0.000	
	Ctrl. neg.	0.057	0.000	
	144	0.08	0.026	NEGATIVO
	146	0.375	0.342	NEGATIVO
	147	0.084	0.030	NEGATIVO
	151	0.096	0.043	NEGATIVO
	152	0.06	0.004	NEGATIVO
	153	0.085	0.031	NEGATIVO
	155	0.059	0.003	NEGATIVO
	158	0.07	0.015	NEGATIVO
	161	0.091	0.038	NEGATIVO
	164	0.118	0.067	NEGATIVO
	168	0.061	0.005	NEGATIVO
	170	0.063	0.008	NEGATIVO
	171	0.404	0.374	NEGATIVO
	173	0.064	0.009	NEGATIVO
	177	0.096	0.043	NEGATIVO
	191	0.09	0.037	NEGATIVO

ANEXO 5.

Animales grupo control positivo seleccionado por la excreción fecal de Map (cultivo bacteriológico o qPCR-IS900) y resúmenes de resultados.

#Arete	Cultivo	QPCR	ELISA			AGID	Signos clínicos
			PPA	Pourquier/ID EXX	EVELISA		
36	+	+	-	-	ND	-	-
45	ND	+	-	-	ND	-	-
49	ND	+	-	-	ND	-	-
51	+	+	-	-	ND	-	-
55	ND	+	-	-	ND	-	-
60	ND	+	+	-	ND	-	-
62	ND	+	-	+	ND	-	-
63	ND	+	-	-	ND	-	-
66	+	+	-	-	ND	-	-
68	ND	+	-	-	ND	-	-
71	ND	+	+	-	ND	-	-
72	ND	+	-	-	ND	-	-
73	ND	+	-	-	ND	-	-
90	ND	+	-	-	ND	-	-
92	ND	+	-	-	ND	-	-
94	ND	+	-	-	ND	-	-
95	+	+	-	-	ND	-	-
99	ND	+	-	-	ND	-	-
101	ND	+	-	-	ND	-	-
102	ND	+	-	-/+	ND	-	-
106	ND	+	-	-	ND	-	-
111	ND	+	-	-	ND	-	-
113	ND	+	-	-	ND	-	-
114	ND	+	-	-	ND	-	-
115	ND	+	+	-	ND	-	-
117	ND	+	+	-	ND	-	-
118	ND	+	-	-/+	ND	-	-
121	ND	+	+	-	ND	-	-
122	+	+	-	+	ND	-	-
124	ND	+	-	-	ND	-	-
125	ND	+	-	-	ND	-	-
127	ND	+	-	-	ND	-	-
130	ND	+	-	-	ND	-	-
133	+	+	-	-	ND	-	-
161	-	+	-	-	ND	-	-
168	-	+	-	-	ND	-	-
170	-	+	-	-	ND	-	-
171	+	+	+	-	ND	-	-
177	-	+	-	-	ND	-	-
191	-	+	-	-	ND	-	-

ND: No disponible ; (-/+): sospechoso; (+): positivo o se observó crecimiento en cultivo; (-): negativo.

ANEXO 6.

Resultados de ELISA propio con antígeno protoplasmático (PPA)

		# Arete (Positivos)	OD 1/2	OD 2/2	Promedio	Promedio ajustado	S/P
Placa1 OD₆₅₀	Ctrl Positivo		0.622	0.562	0.592	0.523	1.000
	Blank		0.076	0.063	0.070	0.000	0.000
	133		0.288	0.274	0.281	0.212	0.405
	92		0.185	0.162	0.174	0.104	0.199
	113		0.285	0.247	0.266	0.197	0.376
	114		0.313	0.286	0.300	0.230	0.440
	115		0.401	0.365	0.383	0.314	0.600
	49		0.248	0.207	0.228	0.158	0.302
	71		0.404	0.361	0.383	0.313	0.599
	60		0.395	0.350	0.373	0.303	0.580
	68		0.286	0.224	0.255	0.186	0.355
	66		0.294	0.243	0.269	0.199	0.381
	122		0.306	0.267	0.287	0.217	0.415
	130		0.339	0.300	0.320	0.250	0.478
	36		0.295	0.251	0.273	0.204	0.389
	118		0.254	0.207	0.231	0.161	0.308
	90		0.283	0.265	0.274	0.205	0.391
	73		0.294	0.270	0.282	0.213	0.407
	101		0.258	0.219	0.239	0.169	0.323
	55		0.294	0.248	0.271	0.202	0.386
	72		0.300	0.266	0.283	0.214	0.409
	94		0.300	0.281	0.291	0.221	0.423
	124		0.293	0.244	0.269	0.199	0.381
	45		0.196	0.160	0.178	0.109	0.208
	121		0.409	0.388	0.399	0.329	0.630
	95		0.247	0.228	0.238	0.168	0.322
	62		0.253	0.212	0.233	0.163	0.312
	51		0.162	0.156	0.159	0.090	0.171
	63		0.341	0.309	0.325	0.256	0.489
	106		0.241	0.230	0.236	0.166	0.318
	177		0.231	0.185	0.208	0.139	0.265
	170		0.167	0.160	0.164	0.094	0.180
	168		0.177	0.163	0.170	0.101	0.192
	161		0.303	0.306	0.305	0.235	0.450
	171		0.380	0.332	0.356	0.287	0.548
	191		0.176	0.169	0.173	0.103	0.197

	102	0.204	0.162	0.183	0.114	0.217
	99	0.276	0.257	0.267	0.197	0.377
	125	0.240	0.212	0.226	0.157	0.300
	164	0.179	0.157	0.168	0.099	0.189
	158	0.276	0.239	0.258	0.188	0.360
	111	0.288	0.300	0.294	0.225	0.430
	117	0.420	0.375	0.398	0.328	0.628
	127	0.189	0.164	0.177	0.107	0.205
	#Arete (Negativos)	OD 1/2	OD 2/2	Promedio	Promedio ajustado	S/P
Placa2						
OD₆₅₀	Ctrl. Positivo	0.568	0.563	0.566	0.498	1.000
	Blank	0.074	0.062	0.068	0.000	0.000
	#2-234	0.266	0.235	0.251	0.183	0.367
	#2-282	0.208	0.207	0.208	0.140	0.280
	#2-245	0.141	0.162	0.152	0.084	0.168
	#2-223	0.156	0.135	0.146	0.078	0.156
	#2-200	0.190	0.174	0.182	0.114	0.229
	#2-289	0.165	0.160	0.163	0.095	0.190
	#2-259	0.205	0.198	0.202	0.134	0.268
	#2-205	0.246	0.234	0.240	0.172	0.346
	#2-207	0.229	0.233	0.231	0.163	0.328
	#2-215	0.172	0.201	0.187	0.119	0.238
	#2-292	0.126	0.139	0.133	0.065	0.130
	#2-201	0.236	0.164	0.200	0.132	0.265
	#2-261	0.255	0.260	0.258	0.190	0.381
	#2-287	0.112	0.110	0.111	0.043	0.086
	#2-188636	0.194	0.204	0.199	0.131	0.263
	#2-89	0.188	0.183	0.186	0.118	0.236
	#2-208	0.190	0.184	0.187	0.119	0.239
	#2-236	0.176	0.164	0.170	0.102	0.205
	#2-188635	0.221	0.213	0.217	0.149	0.299
	#2-202	0.158	0.217	0.188	0.120	0.240
	#2-232	0.152	0.143	0.148	0.080	0.160
	#2-211	0.170	0.163	0.167	0.099	0.198
	#2-293	0.149	0.126	0.138	0.070	0.140
	#2-128	0.150	0.171	0.161	0.093	0.186
	#2-218	0.187	0.173	0.180	0.112	0.225
	#2-291	0.128	0.130	0.129	0.061	0.123
	#2-283	0.244	0.252	0.248	0.180	0.362
	#3-40	0.287	0.258	0.273	0.205	0.411
	#3-36	0.231	0.231	0.231	0.163	0.328
	#3-27	0.167	0.202	0.185	0.117	0.234

#3-37	0.264	0.155	0.210	0.142	0.284
#3-53	0.222	0.199	0.211	0.143	0.286
#3-42	0.190	0.176	0.183	0.115	0.231
#3-46	0.160	0.150	0.155	0.087	0.175
#3-41	0.215	0.192	0.204	0.136	0.272
#3-39	0.223	0.211	0.217	0.149	0.299
#3-45	0.177	0.173	0.175	0.107	0.215
#3-44	0.170	0.156	0.163	0.095	0.191
#3-9	0.181	0.196	0.189	0.121	0.242
#3-52	0.165	0.154	0.160	0.092	0.184
#3-38	0.242	0.248	0.245	0.177	0.356
#3-50	0.176	0.167	0.172	0.104	0.208
#3-47	0.237	0.240	0.239	0.171	0.343

