

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS VETERINARIAS



**USO DE UN BACTERIOFAGO COMERCIAL PARA LA DETECCIÓN DE DOS
MICOBACTERIAS, *Mycobacterium bovis* Y *Mycobacterium avium* subesp.
*paratuberculosis***

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

PRESENTA
KARLA ALEJANDRA GARCIA BORJAS

DIRECTOR DE TESIS
DRA. SAWAKO OSHIMA

Mexicali, Baja California, México

Enero 2022

Uso de un bacteriófago comercial para la detección de dos micobacterias, *Mycobacterium bovis* y *Mycobacterium avium* subesp. *paratuberculosis*.
Tesis presentada por Karla Alejandra García Borjas como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias Veterinarias, que ha sido aprobada por el siguiente comité:

Dra. Sawako Oshima
Director de Tesis

Dr. Gerardo Enrique Medina Basulto
Asesor

Dr. Miguel Arturo Cabanillas Gámez
Asesor

Dr. José Carloman Herrera Ramírez
Asesor

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACYT por su apoyo para la realización de esta maestría.

A mi asesora de Tesis, Sawako Oshima por adoptarme y darme la oportunidad de concluir este posgrado, por los conocimientos y lecciones de vida brindados.

A cada uno de los doctores que aportaron en mi formación durante mi estancia en el instituto, en especial al doctor Tomas Benjamín Rentería Evangelista, por aceptarme como su alumna, es por el que pude ingresar como alumna de este postgrado.

DEDICATORIA

- **A mi padre:** Que siempre me alentó a estudiar lo que quise, apoyándome durante todo momento , por ser el mejor padre del mundo y por cada buen consejo que me ha dado durante mi vida.
- **A mi hermana:** Por todo el amor que me demuestras, independientemente de todas las situaciones que hemos pasado, ¡te amo!
- **A mi abuelita:** A ti conse, que sé que desde el cielo nos cuidas... te quiero muchísimo y siempre estás en mi corazón.

RESUMEN

La tuberculosis bovina (TB) causada por *Mycobacterium bovis* y la paratuberculosis (PTB) producida por *Mycobacterium avium* subesp. *paratuberculosis* (MAP) son enfermedades comunes de rumiantes que generan un impacto en la salud pública y en la economía la industria ganadera. La prueba de oro en el diagnóstico de la TB y PTB es la bacteriología, sin embargo, se requiere el tiempo prolongado, hasta 2 - 6 meses o más, para obtener resultados. En este trabajo se implementó una técnica alternativa para la detección rápida de estas micobacterias utilizando un bacteriófago lítico comercial (Actiphage®). Se detectó *M.bovis* solo en la muestra control positivo y hasta la fecha ninguna muestra de sangre de bovinos lecheros reactivos (N=59) resultó positivo. No se logró estandarizar el protocolo para la detección del MAP en leche, por posibles pérdidas de la micobacteria indicador (*M. smegmatis*) y/o el fago activo, por lo que se buscó desarrollar la técnica convencional del PCR modificando los métodos anteriormente publicados. La leche del estanque del establo del IICV fue libre del ADN del MAP, mientras una muestra de leche comercial resultó positiva. La técnica del PCR servirá para evaluar el nivel de antígeno del MAP en productos lácteos, y así evitar el riesgo de enfermedades inmunomoduladores como la Enfermedad de Crohn. Aunque el uso del fago lítico pudiera ser una herramienta *ante mortem* para confirmar la septicemia de TB y PTB, se sugiere usar en combinación con otras pruebas para complementar el diagnóstico.

Palabras claves: micobacterias, MAP, bacteriófagos, PCR

ABSTRACT

Bovine tuberculosis (TB) caused by *Mycobacterium bovis* and paratuberculosis (PTB) caused by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) are common ruminant diseases that have an impact on public health and the economy of the livestock industry. The gold standard in the diagnosis of TB and PTB is bacteriology, however, it takes a long time, up to 2 - 6 months or more, to obtain results. In this work, an alternative technique was implemented for the rapid detection of these mycobacteria using a commercial lytic bacteriophage (Actiphage®). *M. bovis* was detected only in the positive control sample and to date no blood sample from reactive dairy cattle (N = 59) was positive. It was not possible to standardize the protocol for the detection of MAP in milk, due to possible losses of the indicator mycobacterium (*M. smegmatis*) and / or the active phage, we developed the conventional PCR technique by modifying the published methods. Milk from the IICV barn pond was free of MAP DNA, while a commercial milk sample was positive. The PCR technique could be used to evaluate the MAP antigen level in dairy products, and thus avoid the risk of immunomodulatory diseases such as Crohn's disease. Although the use of lytic phage could be a *ante-mortem* tool to confirm TB and PTB septicemia, it should be used in combination with other tests to complement the diagnosis.

Keywords: mycobacteria, MAP, bacteriophage, PCR

CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS	iii
DEDICATORIA	iv
RESUMEN	v
ABSTRACT	vi
LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE ABREVIACIONES	x
INTRODUCCIÓN	1
HIPÓTESIS	2
REVISIÓN DE LITERATURA	3
MATERIALES Y MÉTODOS	25
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	31
CONCLUSIONES	38
LITERATURA CITADA	39
ANEXO. Instrucciones de uso del kit Actiphage®	50

LISTA DE FIGURAS

Figura	Pág.
1. Principales grupos de micobacterias agrupadas según el criterio de la producción de pigmento y velocidad de crecimiento (Runyon y col. 1959).....	5
2. Esquema de pared celular resaltando el complejo peptidoglicano-arabinogalactano-ácidos micólicos (PG-AG AM)	12
3. Fundamentos del protocolo Actiphage®.....	24
4. Resultados del <i>Rapid Blood Test</i> del Actiphage®	33
5. Resultados de la detección del ADN del Map en leche.	35

3.

LISTA DE ABREVIACIONES

ADN= Ácido desoxirribonucleico

IICV: Instituto de Investigación en Ciencias Veterinarias

INFg= Interferón gamma

JD= Enfermedad de Johne

Map= *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis*

M.bovis= *Mycobacterium bovis*

MJ= Mycobactin J

µg= Miligramo

ml: Mililitro

µl= Microlitro

OADC= Complejo de ácido oleico albúmina Dextrosa

PCR= Reacción en Cadena de la Polimerasa

TB= Tuberculosis Bovina

INTRODUCCIÓN

El género *Mycobacterium* comprende de un grupo heterogéneo de distintas bacterias: saprofitas, oportunistas y patógenos específicos para humanos y animales (Wayne y Kubica.,1986). Este género suele ser dividido en dos grupos principales en función de su tasa de crecimiento, un grupo incluye especies de crecimiento lento, como las especies patógenas conocidas de *Mycobacterium bovis* causante de la tuberculosis bovina y *Mycobacterium avium* subesp. *paratuberculosis*, responsable de la paratuberculosis bovina. El segundo grupo incluye especies de crecimiento rápido como *Mycobacterium smegmatis* que son bacterias oportunistas no patógenas (Forrellad et al., 2013). En México en el ganado lechero la tuberculosis bovina tiene una prevalencia entre 0.1 y 14.2% (SENASICA,2016), mientras que la paratuberculosis presenta una prevalencia del 16% (SENASICA,2014). La prueba oficial para la detección de tuberculosis ante mortem en bovinos es la La prueba cutánea, que posee una sensibilidad del 80% y una especificidad del 89%.

Estos datos conllevan al sacrificio y decomiso de animales falsos positivos, además de mantener animales positivos que seguirán propagando esta enfermedad dentro del hato, lo que en consecuencia genera altas pérdidas económicas a los productores.

Por lo antes expuesto, el objetivo de este trabajo fue detectar *Mycobacterium bovis* y *Mycobacterium avium* subesp. *paratuberculosis* en muestras de leche y sangre bovina mediante un bacteriófago comercial.

HIPÓTESIS

Tomando en cuenta las características bactericidas del micobacteriofago comercial y su combinación *in vitro* con *M. smegmatis*, se detectara *Mycobacterium bovis* y *Mycobacterium avium* subesp. *paratuberculosis* en muestras de leche y sangre bovina.

REVISIÓN DE LITERATURA

Esta revisión incluye aspectos relacionados con la clasificación, métodos de diagnóstico y enfermedad que producen las distintas micobacterias, así como el uso de micobacteriofago como alternativa de diagnóstico.

Las primeras micobacterias descritas fueron denominadas por Hansen en 1880 y por Koch en 1882 como bacilo de lepra (*Bacillus leprae*) y bacilo tuberculoso (*Bacterium tuberculosis*), sin embargo, fueron clasificadas dentro del género *Mycobacterium* hasta 1896, siendo renombradas como *Mycobacterium tuberculosis* y *Mycobacterium leprae* (Lehman y Neuman, 1896). El género *Mycobacterium* comprende de un grupo heterogéneo de distintas bacterias: saprofitas, oportunistas y patógenos específicos para humanos y animales (Wayne y Kubica.,1986).

Clasificación de las micobacterias

Existen diversas clasificaciones para el género *Mycobacterium* de acuerdo a sus características de crecimiento y pigmentación, patogenicidad, bioquímicas, y moleculares (Runyon., 1959, Shinnick et al., 1994, Wayne et al., 1996, Rastogi et al., 2001). El sistema de clasificación vigente es el denominado Runyon de 1959, (Figura 1), puesto que tiene una concordancia con los modelos genotípicos, que clasifica a las micobacterias en cuatro grupos de acuerdo a su velocidad de crecimiento, morfología de colonias y su pigmentación, conforme a su velocidad de crecimiento las micobacterias se clasifican en 2 sub grupos: crecimiento lento

aquellas que tardan más de 7 días en producir colonias visibles en medio sólido, que incluyen 3 grupos de la clasificación por pigmentación: grupo I. pigmento fotocromógeno (pigmento producido solo en presencia de luz), II. Escoto cromógenas (pigmento en ausencia de luz) y III no cromógenas (sin producción de pigmento), y crecimiento rápido (aquellas que requieren menos de 7 días en producir colonias en un medio solido) y de acuerdo a su pigmentación son clasificadas en el grupo IV (Young., 2008, Adekambi y Drancourt., 2004).

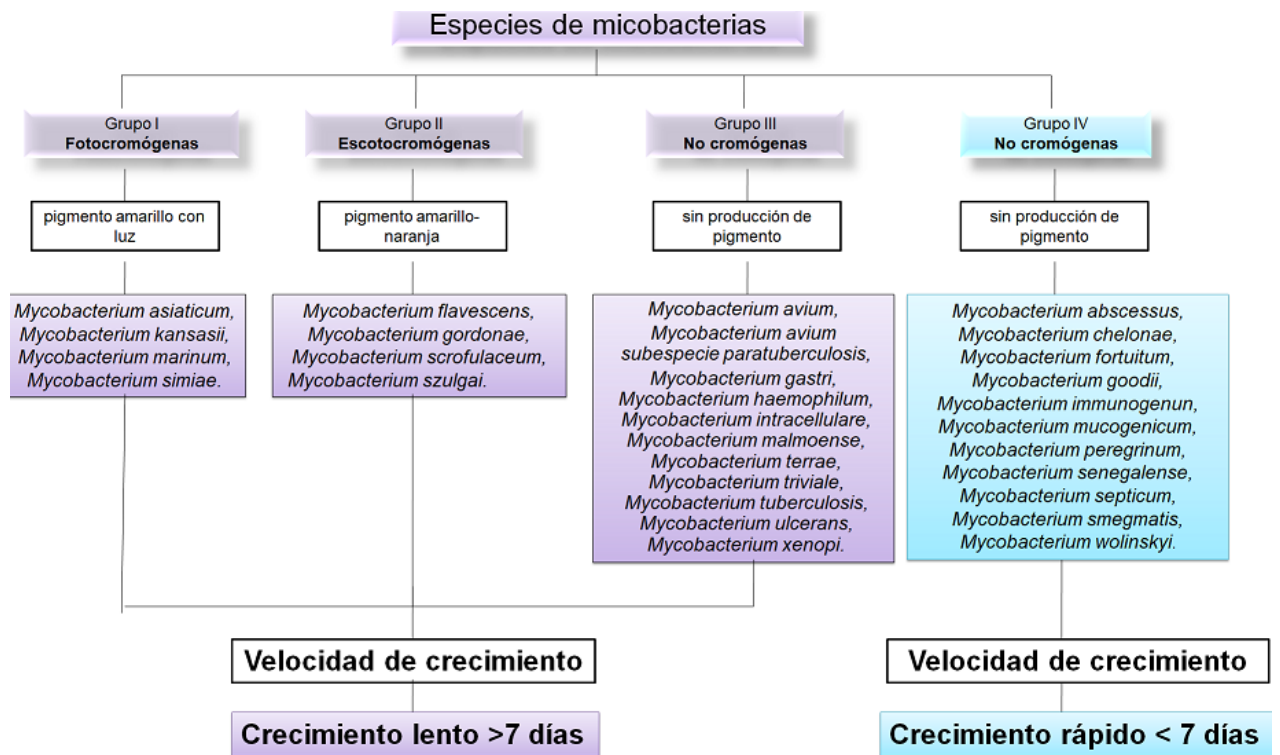


Figura 1. Principales grupos de micobacterias agrupadas según el criterio de la producción de pigmento y velocidad de crecimiento (Runyon y col. 1959).

Además, existe otra clasificación basada en la salud pública y medicina veterinaria, dividida en 2 grandes grupos: el de mayor interés es el complejo de *M. tuberculosis* (MTC) ya que son las causantes de tuberculosis en humanos y animales al cual pertenecen *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis* BCG, *M. africanum*, *M. microti* y *M. caprae*. (Stahl et al., 1990, Shinnick et al., 1994) el segundo grupo son las micobacterias no tuberculosas, atípicas o ambientales (MNT O MOTT) donde *Mycobacterium fortuitum*, *M. chelonae/abscessus* y *M. smegmatis* han adquirido más relevancia, debido a su capacidad de producir infecciones para ambas especies (Freudenberger et al., 2006, Tortoli 2003, Malik et al., 2004) aislándose frecuentemente en pacientes inmunodeprimidos (Falkinham III 1996), en infecciones cutáneas, heridas post traumáticas y post operatorias (Rastogi et al., 2001).

Para la clasificación taxonómica se emplea la secuenciación del gen de ARN ribosómico 16s., El cual posee 1500 nucleótidos aproximadamente (Bercovier et al., 1986). Este gen cuenta con diferentes regiones altamente conservadas y 2 regiones hipervariables (A, B) entre las distintas micobacterias.

Para su identificación se emplea comúnmente la secuenciación de la región hipervariable A, y a manera confirmatoria se puede utilizar la secuencia B. (Bercovier et al., 1986, Boddington et al., 1990, Kirschner et al., 1993).

Tortoli en el 2003 realizó un análisis de todas las secuencias del gen 16s creando un árbol filogenético donde clasifica alrededor de 100 especies en 5 grupos (sqv., secuevar; TTRG, termo tolerantes de crecimiento rápido; RG, de

crecimiento rápido, MSR, relacionados con *M. simiae*, SG, de crecimiento lento). Asimismo, existen otras regiones de interés en cuanto a la clasificación taxonómica, tal es el caso del gen hsP65 (heat shock protein) conservado entre las diversas mycobacterias, el gen superóxido dismutasa entre otras (Tortoli, 2003).

Las principales micobacterias estudiadas son: *M.bovis* y MAP., esto debido a que conllevan grandes pérdidas económicas. Puesto que afectan tanto al ser humano como a los animales. *M.bovis* es una bacteria no formadora de esporas, aerobia con una longitud de 1 a 10 µm y una anchura de 0.2 a 0.6 µm, es un organismo facultativo intracelular con un tiempo de replicación de 15 a 20 horas (Rivera y Giménez, 2010). Al ser esta la micobacteria la causante de la tuberculosis bovina, se considera que *M. bovis* es el agente causal más importante para el ganado bovino (Acha y Szyfres, 1989). Sin embargo tiene una amplia gama de hospedadores (caprinos, porcinos, equinos, aves, animales silvestres y seres humanos). En temperaturas entre 12°C - 24°C puede sobrevivir en el ambiente de 18 a 332 días (Verma et al., 2014).

Mientras que MAP es un bacilo ácido alcohol resistente inmóvil de 1-2 µm de longitud y hasta 0,5 µm de ancho, causante de la enfermedad de Johne, clasificada como micobacteria de crecimiento lento, puesto que cultivadas in vitro requiere de 8-16 semanas para la formación de colonias mismas que tienden a agruparse en grumos y se caracterizan por ser rugosas y no pigmentadas en medios sintéticos y a base de huevo, (Juste et al., 1991; Thoen et al., 1979). Para que una bacteria se multiplique dentro de las células del huésped requiere

condiciones metabólicas específicas, una de ellas es la presencia de hierro, elemento esencial para la síntesis de ADN y el transporte de electrones. Mismo que no es un elemento que esté disponible libremente, para su obtención las bacterias producen hemoforos y receptores en la superficie celular para la captura de hemoproteínas (Krewulak y Vogel., 2008)

Tuberculosis bovina

La tuberculosis bovina (Tb) es una enfermedad crónica debido a que este bacilo es resistente a la fagocitosis, en consecuencia, una vez dentro del organismo permanece por un largo tiempo. *M. bovis* se caracteriza por la formación de granulomas nodulares caseosos, donde los pulmones y ganglios linfáticos son los principales órganos afectados (López et al., 2006). Se encuentra entre las enfermedades más relevantes del mundo, debido a su importancia económica y de salud pública por ser una enfermedad zoonótica (Sánchez et al., 2002). Existen diversas vías de transmisión de esta enfermedad, la más común entre los animales es vía aérea (95 %) al excretar bacilos mediante secreciones respiratorias y ser inhalados por animales sanos, diseminando así la infección. Además existen otras vías de transmisión como la congénita, genital, cutánea y digestiva, donde esta última tiene relevancia en los terneros puesto que el 2 % de las vacas infectadas eliminan este bacilo por medio de la leche; el grado de infección de *M. bovis* depende del número de bacilos excretados y del tiempo de exposición. Los principales medios de cultivo son Lowenstein-Jensen con base de huevo y el medio de Stonebrink a diferencia de las otras micobacterias *M.*

bovis no crece en medios con glicerol, en su lugar estos medios son adicionados con piruvato sódico 4% (Sharma y Gupta, 2011).

***Mycobacterium bovis* en humanos**

El agente causal de tuberculosis humana es *M. tuberculosis*, *M. bovis* es la segunda causa de esta enfermedad (Romero et al., 2005). Debido a que diversos estudios demostraron que el 10% de los casos de tuberculosis son causadas por este patógeno (Gibson et al., 2004, Gibson et al., 2006; Milán et al., 2010). La principal forma de transmisión al humano es al ingerir productos lácteos contaminados y no pasteurizados, sin embargo, también se puede transmitir de manera a erógena al manejar o estar en contacto con animales infectados (Clavijo et al., 2004).

Paratuberculosis o enfermedad de Johne

Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis (MAP) es el agente causal de la enfermedad de Johne o paratuberculosis (Thorel et al., 1990), fue descrita por primera vez por el profesor Johne y el doctor Frothingham en 1885. Enfermedad que afecta el tracto intestinal de los rumiantes y animales silvestres, luego de una larga fase preclínica que va desde los primeros meses de vida hasta los 3 o 5 años de edad. Genera enteritis severa con diarrea profusa, baja producción de leche, pérdida de peso concluyendo con la muerte del animal (Chiodini et al., 1985, Pavlick et al., 2000).

En los animales la principal vía de transmisión de MAP es la oro- fecal (Sweeney, 1996). Al ingerir la micobacteria mediante el agua, pastos, calostro,

leche o cualquier alimento que este contaminado por heces de animales infectados (Kudahl et al., 2008; Lombard, 2011). Uno de los factores más importantes para que un animal adquiera y desarrolle la enfermedad es la edad., diversos científicos probaron que los animales jóvenes son más susceptibles que los adultos, sobre todo en los primeros días de vida, esto relacionado con la madurez del sistema inmune y la alta permeabilidad intestinal (Larsen et al., 1975; Sergeant, 2001; Barkema et al., 2009). Otro factor importante es la cantidad de ingesta de bacilos de MAP, haciendo más susceptibles a los animales que consuman mayor cantidad de MAP a infectarse y entrar a fase clínica (Sweeney 2011). En los humanos el mecanismo de transmisión de MAP no está definido claramente, diversos autores mencionan que la infección es a través de leche contaminada, puesto que la pasteurización no es capaz de destruir las mycobacterias (Taylor et al.,1981, Stabel et al.,1997, Grant et al., 2003).

Métodos de diagnóstico

Las micobacterias se caracterizan por ser bacilos cortos, rectos o ligeramente curvos de 1-10 μm de largo y 0,2-0,6 μm de ancho, no formadoras de esporas, inmóviles, aerobios, con ausencia de capsula y flagelos, emplean glicerol como fuente de energía y asparagina o glutamato como fuente de nitrógeno (Goodfellow y Magee., 1998).

La pared celular de las micobacterias está constituida por una capa interna y una capa externa rodeando la membrana plasmática, los lípidos asociados a la

capa externa son: lipoarabinomanano (LAM), lipomanano, lípidos tiocerol y el tildil-nositolmanósido. La capa interna se compone de arabinogalactano, peptidoglicano que aporta la forma y rigidez a la bacteria y de abundantes ácidos grasos de cadena larga 60-90 átomos de carbono (ácidos micólicos); que constituyen el complejo denominado peptidoglicano(PG) –arabinogalactano(AG)-ácidos micólicos(AM) (PG-AG-AM) (Hett y Rubon.,2008). Se pueden observar mediante la tinción de Ziehl Nielsen, una vez teñidos con fucsina, los ácidos micólicos les proveen resistencia a la decoloración con alcohol ácido, es por ello que se les denomina bacterias ácido-alcohol resistentes (BAAR) (Rastogi et al.,2001). (Figura 2). La PG o mureina representa la rigidez manteniendo la forma de la micobacteria, compuesto por cadenas de péptidos y glicanos de N-acetilglucosamida y N-acetil murámico (Hett y Rubin., 2008) los AM están constituidos por ácidos grasos de cadena larga, determinan la permeabilidad de la pared celular, los PG están compuestos de arabinano y galactano unidos covalentemente mediante la unión fosforil-Nacetilglucosaminosil-ramnosil (Mcneil et al., 1990).

La detección de Tb para *Mycobacterium bovis*, en bovinos se basan en la prueba cutánea oficial, además de las pruebas bacteriológicas confirmatorias.

Prueba cutánea de Tuberculina: Es la prueba oficial, según la norma NOM 031-ZOO-1995 posee una sensibilidad del 80% y una especificidad del 89% (Álvarez et al., 2012). Se basa en la aplicación de 0.1 ml del extracto proteico purificado (PPD) de *M.bovis* el resultado de la misma requiere de 72 horas de espera, si el animal está infectado tendrá una inflamación en la piel ocasionada por la reacción de hipersensibilidad retardada de la inyección. Si la inflamación es igual o mayor a 5 mm se le considera una reacción positiva. Para diferenciar a los animales que tienen *M.bovis* y aquellos que estuvieron expuestos a otras micobacterias; se aplica la prueba de tuberculina doble comparativa. Que consiste en la aplicación intradérmica de 0.1ml de *M.avium* y de *M.bovis* en diferentes sitios del cuello y medir su respuesta 72 horas después (OIE.,2009).

ELISA Indirecta: esta prueba mide la unión de anticuerpos específicos a un antígeno (de la Rua-Domenech et al 2006) puede ser útil en animales anergicos, la mayoría de los antígenos utilizados son MPB70 y MPB83 han alcanzado una sensibilidad y especificidad alrededor del 90% son proteínas derivadas de cepas de cultivo de *M.bovis* que son representativas de la fuerte respuesta inmune mediada por células inducidas por antígenos de las primeras etapas de infección mediada por tuberculosis (McNair et al.,2001, Faye et al .,2011).

Prueba de ensayo de Interferón Gamma: es una prueba complementaria de laboratorio para el diagnóstico de tuberculosis, el ensayo se basa en la liberación de FN- γ de linfocitos sensibilizados durante un periodo de incubación de 16 a 24 horas con un antígeno específico de avium y PPD bovino (Alito et al .,2003) los glóbulos blancos de los bovinos que estuvieron en contacto con *M.bovis* liberan

una proteína (interferón – gamma) al ser estimulados con tuberculina in vitro, si esta cantidad sobre pasa cierto nivel, el animal es clasificado como reactor, esta prueba tiene una sensibilidad del 90% y una especificidad del 96% y es costosa en comparación con la prueba de tuberculina (Wards et al.,1995).

Cultivo microbiológico: Es considerado como prueba de oro para el diagnóstico de las distintas especies de *Mycobacterium*. Ya que permite su aislamiento e identificación morfológica de las colonias bacterianas (De la Rúa-Domenech et al., 2006). Los medios comúnmente utilizados son los medios sólidos como: Lowenstein-Jensen, Stonebrink, Hellold, Coletos todos ellos a base de huevo, además se utilizan aquellos con base sintética Middlebrook 7H10 o 7H11, también se puede realizar el cultivo en medio líquido como Middlebrook 7H9, Sauton, o Proskauer-Beck, Los medios se deben incubar a 37°C de 8 a 12 semanas con ambiente anaeróbico (Smith et al., 2006). Dependiendo de la micobacteria que se desee aislar estos medios se adicionan con piruvato de sodio o con glicerol, así mismo se pueden suplementar con albumina, dextrosa, catalasa, micobactina, entre otras (Goodfellow et al., 1998). Esta última es utilizada como factor de crecimiento en MAP, es una molécula lipídica quelante del hierro, necesaria para el transporte de este metal al interior de la célula (Juste et al.,1991). La micobactina es regulada por el grupo de genes *mbtA-J*, Sin embargo este gen es más corto en MAP comparado con otras mycobacterias, lo que conlleva a no realizar una codificación completa del mismo, esto indica que MAP poseen una producción atenuada o nula de micobactina, por lo que es necesario agregarla en el medio de cultivo (Li et al., 2005). No obstante este

método a pesar de ser la prueba de oro resulta un método de diagnóstico difícil, por el bajo aislamiento, el tiempo de incubación, el personal capacitado y la infraestructura que requiere (Juste et al., 2000).

Diagnostico histopatológico: Macroscópicamente el diagnostico presuntivo de micobacteriosis puede realizarse si el tejido presenta lesiones histológicas características de la enfermedad como nódulos caseosos, células gigantes multinucleadas, tejido con mineralización, es sin embargo al ser multibacilares estas lesiones es posible que no se detecte la presencia de estos organismos (Schiller et al., 2010)

Microscópicamente se realiza el método de tinción bacteriológico utilizado para identificar organismos ácido-alcohol resistentes que contengan grandes cantidades lipídicas en su pared como *Mycobacterium*, las muestras se fijan con formol al 10% y se procesan con parafina estándar, se tiñen con el método de hematoxilina y eosina y al microscopio se observan como células rojas bacilares de 1 micra de longitud (OIE, 2009).

Diagnóstico molecular por reacción en cadena de polimerasa (PCR)

El PCR dentro de los procesos de diagnóstico, se utiliza para detectar la presencia de material genético (ADN) de un organismo de interés. Ha sido ampliamente evaluado para la detección del complejo de *Mycobacterium*, con diferentes tipos de muestras como: sangre, tejidos, heces y leche (Gwozdz et al., 1997; Naser et al., 2004, Verrello et al., 2006, Bosshard et al., 2006, Kawaji et al., 2007, Donaghy et al., 2008). Además permite diferenciar las distintas

micobacterias detectando un blanco específico, como lo es el gen *mtp40* exclusivo de *M. tuberculosis*, la secuencia de inserción (IS) IS6110 para *M. bovis* y la IS900 para *M. avium* subesp. Paratuberculosis (Dvorska et al., 2001, Acosta-Salinas et al., 2009, Solmaz et al., 2009). El PCR se utiliza para proporcionar resultados preliminares rápidos; y es eficiente como método de diagnóstico complementario (Collins, 2011). El principal impedimento de este procedimiento es, la presencia de inhibidores de PCR dentro de las mismas muestras (Eamens et al., 2007). El PCR es una herramienta diagnóstica específica pero no definitiva, debido a que no detecta bacterias viables, esto es importante para la detección de ciertas enfermedades como: paratuberculosis o tuberculosis; mismas que entonces, requerirán de un cultivo bacteriológico para demostrar dicha presencia (Grant et al., 2002).

Alimentos como posible fuente de exposición a MAP

Debido a la preocupación que genera la posible relación entre MAP y la enfermedad de Crohn, se ha investigado diferentes productos alimenticios como posible fuente de transmisión. La leche es el producto más estudiado, ya que Map ha podido ser cultivada a partir de esta, en vacas con paratuberculosis clínica y subclínica (Giese et al., 2000, Pillai et al., 2002). La contaminación de la leche puede surgir, mediante la eliminación directa del patógeno en esta, o por contaminación con heces., infectadas durante su procesamiento. Se ha calculado que la leche de rebaños con enfermedad de Johne puede encontrarse contaminada con 11.67 ± 12.33 UFC / 100 ml (Herman et al., 2006).

Considerando que la mayor parte de la leche dedicada a consumo humano es sometida a pasteurización con el fin de eliminar patógenos zoonóticos como *M. bovis* se han desarrollado diversos estudios con el fin de conocer la capacidad de MAP para mantenerse viable ante este procedimiento. El primer trabajo al respecto fue el de Millar y sus col. en 1996 quienes analizaron 312 muestras de leche pasteurizada en Reino Unido, evaluándolas mediante PCR y cultivo microbiológico. Resultando positivas a PCR el 7% y el 4.8% a cultivo. Años más tarde, en California, Minnesota y Wisconsin se detectó un 2.8% de un total de 702 muestras de MAP viable en leche comercial pasteurizada (Ellingson et al., 2005).

En ese mismo año en República Checa, se analizaron 244 muestras de leche pasteurizada comercializada en todo el país. MAP fue detectado en el 1.6% (4/244). (Ayele et al., 2005). En India, la presencia de MAP fue evaluada en 43 muestras de leche comercializada (16 no pasteurizadas, 27 pasteurizadas) obteniendo como resultado que el 44% (7/16) de las muestras no pasteurizadas fueron cultivos positivos y 6% (1/16) fueron positivos para ADN de MAP IS900. Mientras que 67% (18/27) de las muestras pasteurizadas, fueron cultivos positivos para MAP y 33% (9/27) fueron positivos para IS900 (Shankar et al., 2009). Sin embargo, en Australia se analizaron mediante qPCR 180 muestras de leche pasteurizada en busca de *Mycobacterium avium* complex, donde el 100% de sus muestras fueron negativas, ellos concluyen que los resultados pueden deberse a él buen control de bioseguridad en su país o que las muestras no contenían una concentración detectable de mycobacterias para este método (Shraddha et

al.,2016). Lo que indica *M. avium subsp. Paratuberculosis* puede sobrevivir en ocasiones a tratamientos de pasteurización. Pero Es importante diferenciar entre la detección de ADN, donde solo se puede suponer que la pasteurización inactivo los bacilos., puesto que no se puede diferenciar entre patógenos vivos y muertos. Mientras tanto la detección por cultivo involucra una posible infección.

Alternativas de detección de micobacterias

Bacteriófagos como Alternativa rápida para la detección de micobacterias

Los bacteriófagos son virus que están presentes abundantemente en el planeta y son enemigos naturales de las bacterias (Loc-Carrillo y Abedon, 2011). Su genoma puede componerse de ADN, ARN de cadena doble o sencilla, este material genético es protegido por una cubierta de proteínas denominada cápside (Clark y March, 2006). Han sido administrados por diferentes vías como la oral, intravenosa e intrapleural, y no existen reportes de complicaciones asociadas a su uso (Viertel et al., 2014).

Ciclo biológico de los fagos

Los fagos, como todos los virus, son parásitos absolutos (Kutter y Sulakvelidze, 2004). Los fagos solo pueden infectar a bacterias susceptibles que posean receptores a los que éstos se puedan unir (Azeredo y Sutherland, 2008). Tales receptores pueden ser: proteínas y lipopolisácaridos de la pared celular, ácidos teicoicos, pili y flagelos (Skurnik y Strauch, 2006). Para que un bacteriófago sea considerado virulento tiene que realizar el ciclo lítico es decir

que termina su ciclo lisando a la bacteria (Azeredo y Sutherland, 2008). Este ciclo inicia cuando el virus reconoce a los receptores bacterianos, se fija o absorbe los componentes de la superficie celular bacteriana, esta zona de absorción varía según el tipo de fago, misma que produce un cambio en las proteínas de la placa basal de la bacteria, algunas tienen actividad enzimática y producen un poro en la membrana citoplasmática de la célula bacteriana por donde la vaina del fago se contrae y su material genético viral ingresa a la célula, mientras que su envoltura proteica queda en el exterior.

Las enzimas degradan el DNA bacteriano, evitan la síntesis de RNA y proteínas bacterianas, además proporciona ribosomas para la síntesis de proteínas del fago (Quiroz, 2005). Posteriormente el fago controla a la célula bacteriana, para que se realice únicamente la replicación de su material genético (Ley de Coss et al., 2013). La forma de replicación del genoma viral depende del tipo de material genético (Quiroz, 2005). Este proceso provoca la lisis bacteriana que es causada por diferentes enzimas del fago, Ejemplo de estas, son las lisinas que digieren el peptidoglucano de la pared celular bacteriana (Hermoso et al., 2007; Fischetti, 2008).

Estudios que utilizan fagos para detección de mycobacterias vivas

David et al. (1980), probaron cepas de referencia de *Mycobacterium smegmatis* ATCC607, *Mycobacterium tuberculosis* H37RB, y aislados de *Mycobacterium leprae*, con diferentes bacteriófagos, con el fin de encontrar uno que infectara a todas estas mycobacterias. Dando a conocer el ahora nombrado

bacteriófago D29, fago que puede infectar tanto a patógenos de crecimiento lento (*Mycobacterium tuberculosis* y *Mycobacterium leprae*) y como a la cepa de rápido crecimiento (*Mycobacterium smegmatis*).

Stewart et al. (1998) realizaron la prueba de amplificación de fagos que se basa en la replicación exitosa de los mismos; con el fin de indicar la presencia de bacterias viables dentro de la muestra, finalizando el ensayo con la formación de placas en el agar. Primero la muestra sospechosa se mezcla con fagos y se deja incubar para permitir la infección, posteriormente se agrega un virucida para eliminar todos los fagos que no infectaron células viables, quedando únicamente los fagos que están protegidos dentro de la bacteria; para poder detectar estos fagos vivos se agrega a la muestra *M. smegmatis* y se mezcla con agar para formar un césped y se incuba toda la noche. Una vez lisada la célula blanco libera fagos que posteriormente forman placas que infectan las células de *M. smegmatis*., cada placa representa la presencia de una célula micobacteriana capaz de ser infectada por el fago en la muestra original, Esta prueba denominada FASTPlaqueTB se probó en diferentes patógenos como *Samonella* spp., *Listeria* spp.y *Escherichia coli*. Técnica que actualmente es ampliamente utilizada para *Mycobacterium tuberculosis*.

Stanley et al. (2006) realizaron modificaciones al kit FASTPlaqueTB (FPTB) con el fin de detectar *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis*, a partir de muestras de leche, los resultados se confirmaron con PCR utilizaron la cepa de referencia de *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* (ATCC 19851), y los aislados bovinos de *Mycobacterium tuberculosis*,

Mycobacterium smegmatis. Las muestras de estas bacterias fueron tomadas partir de un medio solido de Lowenstein Jensen y re suspendidas en medio Middlebrook 7H9 medidas a partir de su densidad óptica predijeron aproximadamente 1×10^7 UFC 1 ml, para corroborar que el ensayo detectara únicamente bacterias viables., se realizó el ensayo con *M. avium* muerta por calor subsp. células de paratuberculosis (1×10^7 UFC ml *M. avium* subsp. paratuberculosis ATCC 19851 tratado térmicamente a 100°C para 20 min), y no se formaron placas. Este hallazgo indicó que el formato y los componentes actuales del ensayo FPTB eran adecuados para la detección de *M. avium* subsp. células de paratuberculosis. Resultados confirmados mediante PCR con el gen multicopia IS900 400pb, encontrado en todas las cepas de *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis*, a partir del kit FASTPlaqueTB.

Botsaris et. al en el 2010 detectaron presencia de MAP en tanques de leche a granel, mediante PCR en tiempo real 63/220(28.6%) y el método que combina fagos y PCR punto final 50/220(22.2%). trabajo que concluyo con que este método ayuda a identificar animales positivos en rebaños aparentemente libres de MAP.

Benjamín et al. (2013), utilizaron el kit FASTplaqueTB combinado con PCR anidado amplificando IS900. En 14 muestras de sangre bovina.; 5 de las muestras fueron de un rebaño libre de paratuberculosis, las 9 restantes fueron positivas a prueba de ELISA en leche y en sangre, el 100% (9/9) de las muestras probadas por el kit coinciden con el resultado de Elisa en leche y el 44% (4/9) con el resultado en sangre. Utilizaron 2 cepas de referencia de vK10 y ATCC 196998.

La cepa de *Mycobacterium smegmatis* y el bacteriófago utilizado D29 fueron los suministrados en el kit FASTPlaqueTB™. Todos los cultivos de *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* se prepararon usando FASTPlaqueTB™ benjamín y colaboradores demostraron que la modificación al kit es capaz de detectar MAP viva en sangre con un límite de detección de 101 bacterias por ml de sangre

Benjamín et al 2016 desarrollaron una combinación de PCR y bacteriófagos utilizando el kit FASTplaqueTB para detectar células de *Mycobacterium bovis* en sangre y evaluar la detección de estos en 41 bovinos positivos a la prueba intradérmica de tuberculina. Para los ensayos se utilizó el fago D29 y la cepa *Mycobacterium smegmatis* mc2155, Este ensayo y sus controles se llevaron a cabo según las consideraciones del fabricante. Para el PCR se utilizó *Mycobacterium. Bovis* BCG empleando la IS6110, manejando el protocolo descrito por Eisenach et al (1990) La extracción de ADN la realizaron a partir de 5 placas donde se obtenía sin problema la IS6110, sin embargo, se probó la extracción con diferente número de placas y no se detectó el gen en cuestión. De las 41 muestras probadas 31 produjeron placas, al realizar el PCR 27/ 31 fueron positivas para IS6110 esto indica que el ADN de la mycobacteria estaba presente, la combinación basada en fagos con PCR para la detección de Mycobacterias permite diferencias de bacterias vivas y muertas ya que el fago solo se replica en células vivas el número de placas detectadas es indicativo de la carga microbiana en la muestra de sangre. El gen IS6110 es específico para el complejo de bacterias tuberculosas al que pertenece *Mycobacterium bovis* lo que lo hace útil para la detección, pero inespecífico (Benjamín et al.,2016).

Principio del kit actiphage

El kit actiphage se basa en la amplificación de fagos, utiliza fagos (virus que infectan específicamente a las mycobacterias objetivo). Para reflejar la presencia de mycobacterias viables dentro de una muestra. Las mycobacterias objetivo se infectan rápidamente por el bacteriófago específico objetivo (actiphage) agregado a la muestra .

La mezcla resultante se trata con una solución virucida (virusol) que causa la destrucción de todos los bacteriófagos que no han infectado las células objetivo. Después del tratamiento con la solución virucida, los únicos bacteriófagos que quedan son aquellos que están protegidos dentro de mycobacterias objetivo viables .

Estos bacteriófagos continúan replicándose hasta que se liberan nuevos fagos de progenie a medida que las células se lisan, estos bacteriófagos de la progenie se amplifican mediante la introducción de un huésped de células mycobacterianas de crecimiento rápido no patógeno (*M.smegmatis*), el bacteriófago experimenta ciclos rápidos de infección, replicación y lisis que se ven como áreas blancas (placas) en un césped de crecimiento confluyente de *M.smegmatis* . El número de placas generadas partir de una muestra está relacionado con el número de células mycobacterianas viables que contienen bacteriófagos, si no hay bacteria objetivo (es decir no hay células mycobacterianas viables) dentro de la muestra original , no habrá amplificación de fagos y por lo tanto, no habrá bacteriófagos como placas al final del ensayo (figura 3).

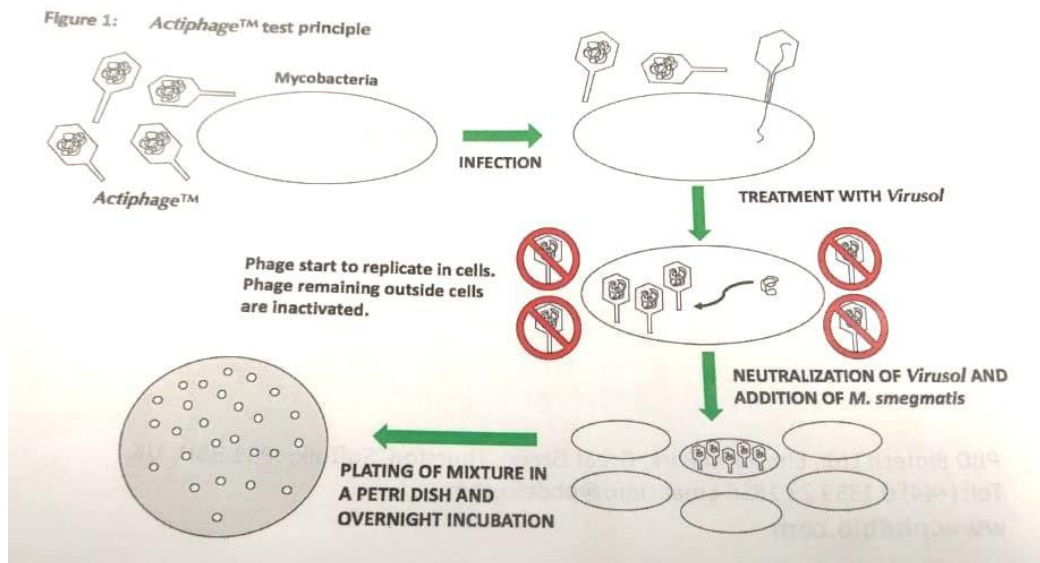


Figura 3. Fundamentos del protocolo Actiphage®.

MATERIALES Y MÉTODOS

Lugar de estudio

El presente estudio fue realizado en el Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinaria (IICV) de la Universidad Autónoma de Baja California (UABC), campus Mexicali.

Animales

Un total de 59 muestras de sangre de bovinos Holstein reactivos de la TB fueron utilizadas (cortesía del Dr. Tomás Benjamín Rentería Evangelista). 10 mL de sangre de cada animal fueron colectadas en tubos con heparina por dos ocasiones en un establo comercial en Chihuahua durante el año 2019 (N = 47) y 2020 (N = 12), inmediatamente enviadas en refrigeración al IICV-UABC. Una vez recibidas las muestras fueron almacenadas a 4 ° C hasta el procesamiento dentro de una semana posterior al muestreo.

Bacterias

Mycobacterium smegmatis (cortesía del Dr. T.B. Rentería Evangelista) utilizada como la bacteria indicador en todos los procedimientos del Kit Actiphage® (PBD Biotech. Ltd). Las características fisiológicas del rápido

crecimiento menos de 24 hr fueron confirmadas en los medios de cultivo en líquido como LB (Luria-Bertani) y Middlebrook 7H9 enriquecido por OADC.

El cultivo puro de *M.bovis* fue utilizada como control positivo en la detección de *M.bovis* en sangre bovino. Para ello la cepa referencia de *M.bovis* (ATCC19210) fue cultivada en el caldo Middlebrook 7H9 (Becton Dickinson) enriquecido por OADC (BD BBL™ Middlebrook OADC Enrichment) al 10%, a 37 °C por dos semanas aproximadamente.

Para la muestra del control positivo en la detección de la *M. avium subesp. paratuberculosis* (Map), se utilizó una cepa referencia del Map (ATCC 19698) cultivada en medio líquido Middlebrook 7H9 enriquecido por OADC (10 %) y micobacina J (Institut Pourquier, Francia) a una concentración de 2 µg/ml. Se incubó sin agitación a 35 °C por 2 meses.

Todas las alícuotas del crecimiento bacteriano en cultivos en líquido fueron analizadas para verificar su identidad molecular mediante técnicas del PCR, salvo el caso de *M.smegmatis* debido a la carencia de cebadores específicos para la amplificación exclusiva de segmentos genómicos de *M.smegmatis*.

PCR punto final

ADN genómico de micobacterias fueron extraídos de las alícuotas del cultivo en líquido utilizando el kit comercial DNeasy Mini Kit (QIAGEN Inc.) o mediante la desnaturalización de bacterias por calentamiento (Liebana et al., 1995). La extracción de ADN genómico del Map de muestras de leche fue desarrollado en el presente estudio, modificando los protocolos reportados

Para confirmar la presencia de ADN genómico de diferentes especies de micobacterias se utilizaron siguientes cebadores: IS41 (5' - CCTGCGAGCGTAGGG - 3') y IS43 (5' - TCAGCCGCGTCCACGCCGCCA - 3) para la amplificación del segmento IS6110 de *M.bovis* (Liebana et al., 1995), MP10-1 (5' - ATGCGCCACGACTTGCAGCCT - 3') y MP11-1 (5'-GGCACGGCTCTTGTGTAGTCG - 3') para la amplificación del segmento IS900 del Map (Kawaji et al., 2007), y RPOB-F (5' - GGCAAGGTCACCCCGAAGGG--3') y RPOB-F (5' - AGCGGCTCTGGGTGATCATC - 3') para la amplificación del gen ARN polimerasa (*rpoB*) del grupo de micobacterias no tuberculosas (Adekambi et al., 2003).

Las reacciones del PCR consistió en 1 × Mezclas maestras para qPCR SYBR™ Green (Thermo Fisher, Inc.), 40 µM de cada cebadores y 5 µL de ADN bacteriano en un volumen final de 25 µl, y se efectuaron en un termociclador Hybaid TR2 con siguientes ciclos termales. Para el IS6110, 95°C por 10 min, seguido por 30 ciclos de 95 °C por 2 min, 68 °C por 2 min y 72 °C por 2 min, con

una extensión extra de 72°C por 10 min (Liebana et al., 1995). Para el IS900, inicialmente por 95 °C por 10 min, seguido con 40 ciclos de 95 °C por 30 seg, 68 °C por 1 min (Kawaji et al., 2007). Para el gen *rpoB*, 95°C por 1 min, seguido por 35 ciclos de 94 °C por 30 seg, 64 °C por 30 seg y 72 °C por 90 seg, con una extensión extra de 72°C por 5 min (Adekambi et al., 2003).

Los productos de PCR fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa al 1.5 – 2 % y se visualizaron con tinción por bromuro de etidio a 0.5 µg/ml bajo el transiluminador de luz ultravioleta (UV) del sistema de fotodocumentación de la marca UVP, modelo BioDoc-It™ Imaging System. Se usó un marcador de peso molecular (100 pb DNA Ladder, GeneRuler) para confirmar el tamaño de los productos amplificados, 317 pb, 198 pb y 723 pb del IS6110, IS900 y *rpoB*, respectivamente.

Detección de micobacterias mediante el uso del kit Actifage®

Preparación de muestras de sangre

Se mezcló 2 mL de sangre con 2 ml de PBS en un tubo de 15 ml de Falcon, posteriormente se colocó toda la muestra (4 mL) en la capa superior de tubos de Leucosep® que contiene 3 mL de ficoll. Se centrifugó a 400 rpm por 30 min a 20 °C, sin el freno de la desaceleración, para recuperar las células mononucleadas de sangre periféricas (PMBCs) o la capa “*buffy coat*” en inglés. Se mezcló 1 mL de PMBCs con 6 ml de PBS, y se centrifugó de nuevo a 100 rpm por 10 min, para

recuperar el sedimento del PBMCs. Posteriormente se añadió 0.1 mL del Medio Actiphage® Plus al pellet para alisar el PBMC y hacer el material acelular.

Controles

Para el control negativo, solo se utilizó 1 mL del Medio Actiphage® Plus sin muestras de sangre. Para los controles positivos se utilizó el alícuota del *M.bovis* lavado por PBS, o diluciones en serie de *M.smegmatis*.

Lísis de micobacterias por Actiphage®

Al añadir 1 mL del Medio Actiphage® Plus en muestras y controles antes mencionado se inició el proceso de la lisis de posible micobacterias en las muestras mediante el Actiphage®. Para asegurar la lisis se incubaron las muestras a 37 °C por 1 hr. Posteriormente se le agregó 0.1 mL de la solución Virusol, invirtiéndose cuidadosamente el tubo para que la solución Virusol entre en contacto con todas las superficies del recipiente. Dejar a reposar el recipiente por 5 min a la temperatura ambiente (20-25°C), se le agregó 5 mL del Medium Actiphage y se invirtió nuevamente.

Prueba en agar blando

Se le agregó 1 mL de la alícuota del cultivo de *M. smegmatis* (10^8 cfu/ml) . Se mezcló las muestras con un agar previamente calentada a 55 °C y se plaqueó la totalidad en placas de Petri estéril, cubriéndose toda la superficie interior. Una vez solidificada el agar en aproximadamente 30 min, se colocaron las placas en una incubadora a 37 °C durante 18-24 horas para observar las presencias de calvas.

Análisis de resultados

Anotaron el número de calvas obtenidas. Debido a que no se observó ninguna calva en las muestras ni controles no se continuó con la parte del análisis posterior de calvas mediante el PCR, para confirmar la especie bacteriana lisada por Actiphage®.

El nuevo protocolo “Test de Sangre Rápido” del kit Actiphage®

Al no poder verificar resultados de muestras de control, se consultó con la fabricante del kit comercial, quienes nos sugirieron probar la prueba con un protocolo nuevo recientemente desarrollado por ellos (anexo el protocolo en inglés). El nuevo protocolo consiste en realizar solo la verificación por PCR de muestras lisadas por el Actiphage®, omitiendo la totalidad del paso de la visualización de las calvas mediante *M. smegmatis*.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Protocolo Actiphage® para muestras de sangre

Los resultados de la prueba actiphage® con el protocolo original se leen en cajas de Petri identificando número de calvas (zonas de limpieza) en una cama de *M.smegmatis*, la cual debe aparecer uniformemente opaco y de color blanco cremoso. Al detectar las muestras infectadas por *M.bovis*, aparecerán calvas en la cama de *M. smegmatis* como zonas transparentes y circulares de aproximadamente 1-4mm de diámetro, separadas o fusionadas dependiendo de la carga bacteriana original, y un máximo aproximada de 300 calvas en caso de la lisis confluyente o completa de la placa.

Con las muestras de sangre de bovinos lechero del año 2019 (N =47) no se logró observar ninguna calva incluyendo muestras de tipo control, básicamente por mal manejo de placas posterior al último paso del procedimiento que fue el plaqueo en caja Petri. Es decir, no se pudo interpretar los resultados. De acuerdo a las instrucciones del kit las cajas del control negativo y positivo, para la interpretación correcta de los resultados, los controles positivos y negativo deben de estar dentro de los siguientes limites especificado:

Control negativo: 0 -10 calvas

Control positivo: > 20 calvas

Es importante destacar que el del control negativo del kit de Actiphage® puede resultar hasta 10 calvas en caja, lo que pudiera dificultar en la detección sangre con baja nivel de presencia de *M.bovis* que pudiera resultar con alrededor de 10 calvas. La razón por el cual el control negativo resulta con calvas visibles es básicamente la eliminación incompleta de *M. smegmatis* durante el procedimiento. La la presencia de *M. smegmatis* residual generan calvas indistintas a calvas provenientes de la lisis de *M. bovis*. Por lo tanto, el fabricante del kit recomienda siempre proceder con la identificación molecular por PCR cuando se visualizan algunas calvas en el resultado. Esto se considera una limitación grande del diagnóstico mediante el Actiphage, particularmente se dificulta el diagnóstico en animales coinfectados por múltiples micobacterias por ejemplo *M. bovis* y otra micobacteria ambiental como el Map.

En el segundo intento del análisis de muestras de sangre (N=12), solo se empleó el nuevo protocolo del kit Actiphage® recientemente desarrollado por el fabricante (Anexo), omitiendo la parte laboriosa de la visualización de calvas, y solo se realizó la lisis y posterior confirmación por PCR. Mismos autores discutieron que el método original del Actiphage® es laborioso pasos de transferencias del PMBCs y muestras lisadas, que podría ocasionar la perdida de muestras (Swift, et al. 2016).



Figura 4. Resultados del *Rapid Blood Test* del Actiphage®

Se empleó el protocolo nuevo “rápido” de la prueba de Actiphage® para muestras de sangre de bovinos lecheros de un establo comercial de Chihuahua. La foto muestra el resultado del PCR al final del Test en un gel de agarosa al 2%. C1; control positivo, C2; control negativo, C3; marcadores de pesos de ADN, C4-13; 10 muestras clínica de total de 12 muestras procesadas. Solo en el carril del control positivo demuestra un producto de 317 pb del segmento IS6110 del *M.bovis*, debidamente lisado por el fago.

En la Figura 4 demuestra el resultado del electroforesis donde visualiza los productos del PCR obtenido del protocolo rápido (Rapid Blood Test) del Actiphage®. Se observa que el control negativo no resultó la amplificación y el control positivo resultó con el producto específico del IS6110 amplificado por *M.bovis* debidamente lisado en la prueba. Las otras muestras de sangre fueron negativas (Figura 4, datos no mostrados). Debido que el establo comercial no nos compartió otros tipos de muestras clínicas, historial clínica, ni información general de estos animales, no es posible interpretar resultados más al fondo. Solo cabe enfatizar que la prueba del fago solo detecta la presencia de la bacteria viva, por lo que animales reactivos de la TB sin estado patológico de septicemia no saldrán positivo a la prueba.

Para emplear una prueba de Actiphage® se prepararon dos tipos de muestras de leche, uno del tambo del establo del IICV y otro comercial y se inocularon con el Map (10^6 CFU). Se desarrolló un protocolo de la extracción de ADN de estas muestras de leche, para poder obtener información complementaria de muestras de leche en futuro estudio sistemático de leche comercial. La Figura 5. demuestra resultados del PCR (PCR directo de muestras, sin Actiphage®). Todas las muestras del tipo control resultaron satisfactoriamente, indicando que el protocolo fue debidamente estandarizada para poder analizar la presencia de ADN del Map en muestras de leche.

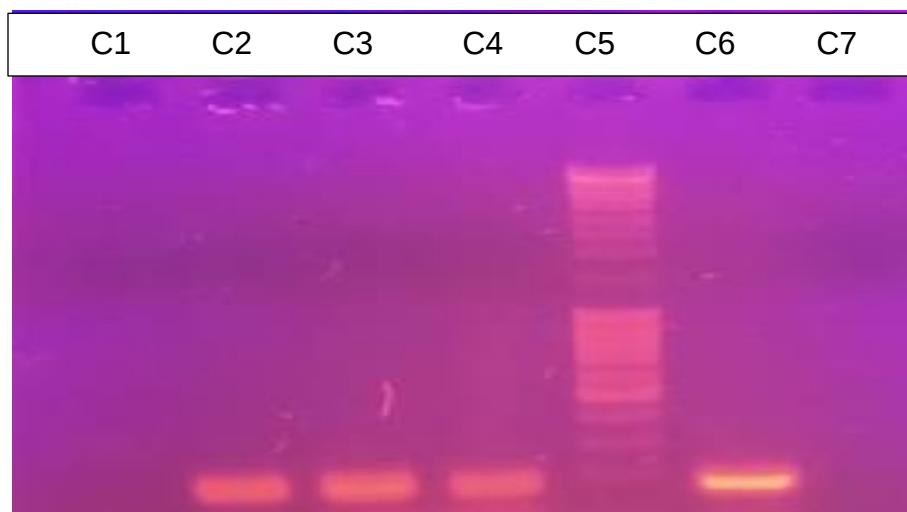


Figura 5. Resultados de la detección del ADN del Map en leche.

Se desarrollo un protocolo de la extracción de ADN para la detección del Map en leche, modificando a protocolos de la literatura. **C1 y C3**; leche en tambo del establo del IICV, **C2 y C4**: leche comercial, **C5**; Marcadores del peso de ADN, **C6**; Map ATCC 19698 (ADN), **C7**; control negativo (sin ADN). **C3 y C4**; control posigito (leche inoculada con Map a 10^6 CFU). Muestras positivas resultaron con una sola banda de 198 pb del IS900.

El establo lechero del IICV actualmente esta libre de la TB y la PTB, por lo que el resultado negativo del Map en el PCR directo de la leche es concordante (Figura 5). Ante la positividad de ADN del Map en una muestra de leche comercial se procedió la prueba del Actiphage® con el protocolo original ya que no existe un protocolo rápido modificado por el fabricante del kit para muestras de leche. El resultado del plaqueo, de nuevo, no fue interpretable, no se pudo determinar que se presentó el Map viva en la lecha comercial en cuestión (datos no demostrados), ya que no hubo ninguna calva en muestra ni en controles. Se realizó una prueba de gota, para verificar la actividad lítica del Antiphage® y no se pudo confirmar la actividad lítica contra *M.smegmatis* (datos no demostrados), por lo que se sospechó de la caducidad del fago y/o posible contaminación en las muestras de *M.smegmatis*. Es lamentable aclarar que no se ha podido tener acceso al laboratorio en la gran mayoría del periodo del presente estudio debido a la contingencia sanitaria por motivo de la prevención del COVID-19.

La realización de la prueba del Actiphage® requiere personales de laboratorio altamente capacitadas y el resultado de la prueba depende de la cantidad y calidad de las muestras recolectadas, su almacenamiento antes del procesamiento y la cantidad de organismos vivos presentes. Por ejemplo, como anteriormente discutido (en la página 32), muestras con la baja carga bacteriana o con micobacterias agrupadas, o incluso limitación por equipamiento de centrifugación o falta de técnicas personales que impide sedimentar células PMBCs viables adecuadamente, pueden afectar en la sensibilidad de la prueba por números de calvas inferior al límite del control negativo. Otra limitación de la

prueba es que no se ha desarrollado el protocolo para muestras de tejidos ni para la secreción nasal. Este momento solo protocolos para sangre y leche son disponibles. Al respecto a la especificidad de la prueba, hay que acordar que el Actiphage® es capaz infectar y lisar a múltiples especies de micobacterias patógenas incluyendo el complejo de tuberculosis cómo *M. tuberculosis*, *M. bovis* *M. africanum* *M. microti*, y micobacterias no tuberculosas incluyendo el complejo de *M. avium* al que pertenece el Map. La identificación molecular de la especie de micobacteria es muy importante en las muestras positivas a Actipahge®, requiriendo el tiempo y costo extra para la compleción del análisis.

La prueba de Actiphage® tampoco debe utilizarse como única prueba confirmatoria de la micobacteriosis, sino que el resultado se debe interpretarse en relación con otra información clínica, diversos métodos de diagnóstico *ante mortem* y *post mortem* de la TB. Sin duda, en un establecimiento donde se busca acelerar el proceso de erradicación de la TB, la prueba basada al uso del Antiphage® será una hcomplementaria ideal a la prueba oficial intradérmica para identificar oportunamente animales con la septicemia y/o anérgico y cortar la cadena de transmisión dentro del hato.

CONCLUSIONES

El protocolo original del kit de Actiphage ® no nos permitió confirmar presencia del *M. bovis* viva en sangre bovino, tampoco se pudo confirmar Map viva en leche. Falta continuar más experimentos para estandarizar la técnica.

El protocolo nuevo de la prueba rápida del sangre con Actiphage® en demostró su efectividad en la detección de *M. bovis* viva en muestras control positivo, lo que indica que este fago comercial proporciona una herramienta a alternativa a la bacteriología para poder complementar diagnóstico de la TB o para estudios patología *ante mortem*.

Se requiere continuar la estandarizar del protocolo de la prueba de Actiphage® especialmente a muestras de leche, debido a preocupaciones recientes sobre la contaminación de antígenos de Map y Map viva en productos lácteos. En el presente estudio se logró estandarizar el procedimiento de la extracción de ADN del Map por lo que se espera iniciar un estudio sistemático de la detección de ADN del Map en leche comercial.

LITERATURA CITADA

- Adekambi, T., Stein, A., Carvajal, J., Raoult, D., y Drancourt, M. (2006) Description of *Mycobacterium conceptionense* sp. nov., a *Mycobacterium fortuitum* group organism isolated from a posttraumatic osteitis inflammation. J Clin Microbiol 44: 1268-1273.
- Ayele WY, Svastova P, Roubal P, Bartos M y Pavlik I. (2005). *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* cultured from locally and commercially pasteurized cow's milk in the Czech Republic. Appl. Environ. Microbiol., 71(3):1210-4.
- Azeredo, J., and I.W. Sutherland. (2008). The Use of Phages for the Removal of Infectious Biofilms. Curr. Pharmaceut. Biotech. 9: 261-266.
- Barkema HW, Green MJ, Bradley AJ, Zadoks RN. (2009). Invited review: The role of contagious disease in udder health. J Dairy Sci. 92:4717–29.
- Bandzar, S., Gupta, S., Platt, M. (2013). Crohn's disease: A review of treatment options and current research. Cellular Immunol.286,45–5.
- Benjamin M. S., E.J. Delton, J.N. Huxley, and E.D. Rees. (2013). Development of a rapid phage-based method for detection of viable *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in blood in 48h, J. Microbiol. Methods.94 (3), 175-179.
- Botsaris, G., Slana, I., Liapi, M., Dodd, C., Economides, C., Rees, C., Pavlik, I. (2010). Rapid detection methods for viable *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk and cheese. Int J Food Microbiol.141,S87–S90.

- Boddinghaus, B., Rogall, T., Flohr, T., Blocker, H., y Bottger, E.C. (1990) Detection and identification of mycobacteria by amplification of rRNA. J Clin Microbiol 28: 1751-1759
- Collins DM, Gabric DM, De Lisle GW. (1989). Identification of a repetitive DNA sequence specific to *Mycobacterium paratuberculosis*. FEMS Microbiol Lett. 51:175–8
- Collins, M. T., G. Lisby, C. Moser, D. Chicks, S. Christensen, M.Reichelderfer, N. Hoiby, B. A. Harms, O. O. Thomsen, U. Skibsted, and V. Binder. (2000). Results of multiple diagnostic tests for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in patients with inflammatory bowel disease and in controls. J. Clin. Microbiol. 38:4373–4381.
- Clarke, C. J. (1997). The pathology and pathogenesis of paratuberculosis in ruminants and in other species. J. Comp. Pathol. 116:217–261.
- Clark, J. R., and J. B. March. (2006). Bacteriophages and biotechnology: vaccines, gene therapy and antibacterials. Trends in Biotechnology. 24(5): 212-218.
- Chacon O, Bermudez LEM y Barletta RG. (2004). Johne's Disease, Inflammatory Bowel Disease, and *Mycobacterium paratuberculosis*. Annu. Rev. Microbiol., 58:329-63.
- Chiodini, R.; van Kruiningen H. (1985). Characterization of *Mycobacterium paratuberculosis* bovine, caprine, and ovine origin by gas-liquid chromatographic analysis of fatty acids in whole-cell extracts. Am. J. Vet. Res. 46:1980-1989.
- Chiodini, R. J. (1989). Crohn's disease and the mycobacterioses: a review and comparison of two disease entities. Clin. Microbiol. Rev. 2:90–117.

David, H. L., S.Clavel , and F. Clement. (1980). Adsorption and growth of the bacteriophage D29 in selected mycobacteria. *Ann Virol* .131: 167–184.

Dundee, L., I. R. Grant, H. J. Ball, and M. T. Rowe. (2001). Comparative evaluation of four decontamination protocols for the isolation of *Mycobacterium avium* subsp.*paratuberculosis* from milk. *Lett. Appl. Microbiol.* 33: 173–177.

Ellingson, J.; Anderson, J.; Koziczowski, J.; Radcliff, R.; Sloan, S.; Allen, S.; Sullivan, N. (2005). Detection of viable *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in retail pasteurized whole milk by two culture methods and PCR. *J. Food Prot.* 68, 966-972.

Freudenberger RS y Simafranca SM. (2006). Cutaneous infection with rapidly-growing mycobacterial infection following heart transplant: a case report and review of the literature. *Transplant. Proc.*, 38(5):1526-9.

G. y. D. R. Secretaría de Agricultura, "Norma Oficial Mexicana NOM-031- ZOO-1995, Campaña Nacional contra la tuberculosis bovina," *Diario Oficial, México*1996.

Giese SB y Ahrens P. (2000). Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk from clinically affected cows by PCR and culture. *Vet. Microbiol.*, 77(3-4):291-7

Goodfellow M y Magee JG. (1998). Taxonomy of mycobacteria. En: Gangadharam, P. R. y Jenkin, P. A. editores. *Mycobacteria I: basic aspects.* pp. 1-71. International Thomson Publishing. New York

- Grant, I.; Kirk, E.; Hitchings, E.; Rowe, M. (2003). Comparative evaluation of MGIT and BACTEC culture systems for the recovery of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from milk. J. Appl. Microbiol. 95, 169-201. 10.
- Grant IR, Williams AG, Rowe MT y Muir DD. (2005a). Efficacy of various pasteurization time-temperature conditions in combination with homogenization on inactivation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk. Appl. Environ. Microbiol., 71(6):2853-61.
- Grant, I. (2006). Occurrence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in foods and the impact of milk processing on its survival. 8th Int. Colloquium on Paratuberculosis, Copenhagen, Denmark. p. 276.
- Harris NB y Barletta RG. (2001). *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in veterinary medicine. Clin. Microbiol. Rev., 14(3):489-512.
- Herman L, De Jonghe V, Dumon I, Grijspeerd K, Naydenski H y D'Haese E. (2006). Clumping of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk and feces and growth activation after milk heating. En: Manning y Nielsen ed. Proc.8th Int. Coll. Paratub., pp. 304-10. IAP, Madison, WI, USA.
- Hermon-Taylor, J. (2002). *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and its relation to Crohn's disease. 7th Int. Colloquium on Paratuberculosis. Bilbao, Spain, p. 96.
- Juste RA, Marco JC, Sáez de Ocáriz C, Adúriz JJ. (1991). Comparison of different media for the isolation of small ruminant strains of *Mycobacterium paratuberculosis*. Vet Microbiol. 28:385-90.

- Juste RA, Aduriz G, Bascones M, Foley E, Bargar TW y Barletta RG. (1993). Effect of iron on mycobactin production and dependence in Mycobacteria. Proc.74th Annu.Meet.CRWAD, p. 64. Chicago, IL, USA.
- 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. Veterinary microbiology, 125(1-2), 36-48.
- Kirschner P, Springer B, Vogel U, Meier A, Wrede A, Kiekenbeck M, Bange FC y Bottger EC. (1993). Genotypic identification of mycobacteria by nucleic acid sequence determination: report of a 2-year experience in a clinical laboratory. J. Clin. Microbiol., 31(11):2882-9.
- Kudahl, A.B., y Nielsen, S.S. (2009). Effect of paratuberculosis on slaughter weight and slaughter value of dairy cows. J Dairy Sci92: 4340-4346.
- Kutter, E., R. Raya, and K. Carlson. (2004). Molecular Mechanisms of Phage Infection, en: bacteriophages: biology and application, Kutter, E., A.Sulakvelidze. CRC Press.New Yok, Washington,D.C. p.3-10.
- Krewulak KD, Vogel HJ. (2008). Structural biology of bacterial iron uptake. Biochimia et Biophysica Acta-Biomembranes, 1778:1781-1804.
- Larsen AB, Merkal RS y Cutlip RC. (1975). Age of cattle as related to resistance to infection with Mycobacterium paratuberculosis. Am.J.Vet.Res., 36(3):255
- Liebana, E., Aranaz, A., Mateos, A., Vilafranca, M., Gomez-Mampaso, E., Tercero, J. C., ... & Dominguez, L. (1995). Simple and rapid detection of

Mycobacterium tuberculosis complex organisms in bovine tissue samples by PCR. Journal of Clinical Microbiology, 33(1), 33-36.

Malik R, Shaw SE, Griffin C, Stanley B, Burrows AK, Bryden SL, Titmarsh J, Stutsel MJ, Carter SA, Warner A, Martin P, Wigney DI y Gilpin C. (2004). Infections of the subcutis and skin of dogs caused by rapidly growing mycobacteria. J.Small Anim.Pract., 45(10):485-94.

N, Kanjilal S y Kapur V. 2005. The complete genome sequence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A., 102(35):12344-9

Loc-Carrillo,C., and S.T. Abedon, 2011. Pros and cons of phage therapy. Landes Bioscience, 1(2):111-114.

Lehmann, K.B., y Neumann, R. (1896) Atlas und Grundriss der Bakteriologie und Lehrbuch der speziellen bakteriologischen Diagnostik. 1st. ed.

LombardJ. (2011). Epidemiology and economics of paratuberculosis. Vet Clin North Am Food Anim Pract. 27, 525-535

Merkal RS y Curran BJ. 1974. Growth and metabolic characteristics of *Mycobacterium paratuberculosis*. Appl. Microbiol., 28:276-9.

Millar D, Sanderson J, Withey S, Tizard M, Doran T y Hermon-Taylor J. (1996). IS900 PCR to detect *Mycobacterium paratuberculosis* in retail supplies of whole pasteurized cows' milk in England and Wales. Appl. Environ. Microbiol., 62(9):3446-52-

Moss MT, Sanderson JD, Tizard MLV, Hermon-Taylor J, El-Zaatari FAK, Markesich DC y Graham DY. (1992)b. Polymerase chain reaction detection of *Mycobacterium paratuberculosis* and *Mycobacterium avium* subsp.

silvaticum in long term cultures from Crohn's disease and control tissues. Gut, 33(9):1209-13.

Motiwala AS, Amonsin A, Strother M, Manning EJ, Kapur V y Sreevatsan S. (2004). Molecular epidemiology of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolates recovered from wild animal species. J.Clin.Microbiol., 42(4):1703-12.

Müller, B., S. Dürr, S. Alonso, J. Hattendorf, C.J.M. Laisse, S. D.C. Parsons, P. D. Van Helden and J. Zinsstag. (2013). Zoonotic *Mycobacterium Bovis* Induced Tuberculosis in Humans. Emerging Infectious Diseases. 19(6):899-908.

Nacy, C., y Buckley, M. (2008). *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: Infrequent human pathogen or public health threat? Report from the American Academy of Microbiology.

Pavlik, I., L. Matlova, J. Bartl, P. Svastova, L. Dvorska, and R. H. Whitlock. (2000). Parallel faecal and organ *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* culture of different productivity types of cattle. Vet. Microbiol. 77:309–324.

Pillai SR y Jayarao BM. (2002). Application of IS900 PCR for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* directly from raw milk. J.Dairy Sci., 85(5):1052-7.

Rastogi N, Legrand E y Sola C. (2001). The mycobacteria: an introduction to nomenclature and pathogenesis. Rev.- Off.Int.Epizoot., 20(1):21-54.

Regassa, A., A. Tassew, K. Amenu, B. Megersa, F. Abuna, B. Mekibib, T. Macrotty and G. Ameni. (2009). A cross-sectional study on bovine

tuberculosis in Hawassa town and its surrounding Southern Ethiopia: Tropical Animal Health Production. 42(4):915-920.

Rosenfeld, G., Bressler, B. (2010). *Mycobacterium avium paratuberculosis* and the etiology of Crohn's disease: a review of the controversy from the clinician's perspective. Can J Gastroenterol. 24, 619-624

Runyon, E.H. (1959) Anonymous mycobacteria in pulmonary disease. Med Clin North Am 43: 273-290.

Seaman, T., A. Trollip, R. Mole, and H. Albert. (2003). The use of a novel phage-based technology as a practical tool for the diagnosis of tuberculosis in Africa. African J Biotechnol. 2 (2): 40–45.

Segundo-Arizmendi, N., E. Hernández-Baltazar, O. Villegas y O. Torres-Ángeles. 2010. Los bacteriófagos como una alternativa en el tratamiento de enfermedades.

Sergeant ES. (2001). Ovine Johne's disease in Australia: the first 20 years. Aust.Vet.J., 79(7):484-91.

Shankar, H.; Singh, S.; Singh, P.; Singh, A.; Sohal, J.; Greenstein, R. (2009). Presence, characterization and genotype profiles of *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* from unpasteurized individual and pooled milk, commercial pasteurized milk and milk production products in india by culture, PCR and PCR REA methods. Int. J. Infect. Dis. 14(2), 121-126.

Shinnick, T.M., y Good, R.C. (1994) Mycobacterial taxonomy. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 13: 884-901

- Shraddha Adhikari, Tanya Caro Tohme and Harriet Whiley. (2016). Investigation of *Mycobacterium avium* complex (MAC) in Australian commercial milk using qPCR. *Journal of Dairy Research*.84, 89-91.
- Skurnik, M. and E. Strauch. (2006). Phage therapy: Facts and fiction. *International Journal of Medical Microbiology* 296:5- 1.
- Stabel, J. R., E. M. Steadham, and C. A. Boli. (1997). Heat inactivation of *Mycobacterium paratuberculosis* in raw milk: are current pasteurization conditions effective? *Appl. Environ. Microbiol.*63:4975–4977.
- Sweeney RW. (1996). Transmission of paratuberculosis. *Vet.Clin.North Am.Food Anim.Pract.*, 12(2):305-12.
- Sweeney RW. (2011). Pathogenesis of paratuberculosis. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*27, 537-46.
- Taylor, T. K., C. R. Wilks, and D. S. McQueen. (1981). Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from the milk of a cow with Johne's disease. *Vet. Rec.*109:532–533.
- Thoen CO y Muscoplat CC. (1979). Recent developments in diagnosis of paratuberculosis. *J.Am.Vet.Med.Assoc.*, 174(8):838-40.
- Thoen CO, Owen WJ, Himes EM y Hall MR. (1983). Experimental exposure of cattle to *Mycobacterium paratuberculosis*. En: Merkai editor. *Proc.1st Int.Coll.Paratub.*, pp. 120-6. NADC, USDA, Ames, IA, USA.
- Thompson, D. E. (1994). The role of *Mycobacterium* in Crohn's disease. *J. Med. Microbiol.*41:74–94.

- Thorel, M. F., Krichevsky, M., & Lévy-Frébault, V. V. (1990). Numerical taxonomy of mycobactin-dependent mycobacteria, emended description of *Mycobacterium avium*, and description of *Mycobacterium avium* subsp. *avium* subsp. nov., *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* subsp. nov., and *Mycobacterium avium* subsp. *silvaticum* subsp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 40(3), 254-260.
- Tortoli, E. (2003). Impact of genotypic studies on mycobacterial taxonomy: the new mycobacteria of the 1990s. *Clin Microbiol Rev* 16: 319-354.
- Viertel, T. M., K. Ritter, and H. P. Horz. (2014). Viruses versus bacteria—novel approaches to phage therapy as a tool against multidrug-resistant pathogens. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 69(9): 2326-2336.
- Wayne, L.G., y Diaz, G.A. (1986) A double staining method for differentiating between two classes of mycobacterial catalase in polyacrylamide electrophoresis gels. *Anal Biochem* 157: 89-92.
- Wayne, L.G., Good, R.C., Tsang, A., Butler, R., Dawson, D., Groothuis, D. y col. (1993) Serovar determination and molecular taxonomic correlation in *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, and *Mycobacterium scrofulaceum*: a cooperative study of the International Working Group on Mycobacterial Taxonomy. *Int J Syst Bacteriol* 43: 482-489.

ANEXO. Instrucciones de uso del kit Actiphage®



Instructions for Use

Actiphage® Rapid Blood Test

A rapid bacteriophage assay for the detection of mycobacteria in blood samples.

For research use only

50 Determinations



Actiphage® Rapid Catalogue No. K100501



PBD Biotech Ltd., Elm Farm Park, Great Green, Thurston, Suffolk, IP31 3SH, UK.
Tel: +44 (0) 1359 231856 Email: info@pbdbio.com
www.pbdbio.com



1 INTENDED USE

PBD Biotech's Actiphage® Rapid test is a rapid bacteriophage assay developed for the determination of mycobacteria in blood.

2 PRINCIPLE OF *Actiphage® Rapid*

Actiphage® Rapid is a rapid bacteriophage assay for the detection of mycobacteria in blood. The sample is prepared, loaded into our optimised sample tube and is then mixed with a viable lysis reagent (Actiphage®). If any target mycobacterial cells are present, they will be rapidly infected by the mycobacteria-specific bacteriophage added to the specimen. The phage replicates inside the mycobacterial cell until new progeny phage are released as the cells break open. Following centrifugation, the genetic material released from the viable mycobacterial cells following this lysis step is collected and purified. Finally, the identity of the mycobacteria is determined by conventional DNA analyses, such as PCR.

3 PRODUCT CONTENTS

Each kit contains sufficient materials for 50 determinations. The shelf life of each component is indicated on the respective label. The kit must be stored at +2 °C - 8 °C.

3.1 ITEMS PROVIDED

2 x Actiphage® Medium sachets
2 x Actiphage® Growth Supplement vials
5 x lyophilised Actiphage® vials
50 x Rapid Tubes
1 x Instructions for use

3.2 ITEMS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

3.2.1 Reagents

- Purified water (distilled, or reverse osmosis water)
- Sterile phosphate buffered saline (PBS) (for isolation of PBMCs)
- Ficoll-Paque plus (for isolation of PBMCs)

N.B. Ficoll-Paque plus is manufactured by GE Healthcare and is available as a 6 x 100 ml pack (17-1440-02) or as a 6 x 500 ml pack (17-1440-03). Alternative suppliers are Sigma Aldrich (6 x 100 ml pack, product code GE17-1440-02; 6 x 500 ml pack, product code 17-1440-03) and Fisher Scientific (6 x 100 ml pack, product code 11768538; 6 x 500 ml pack, product code 11778538)

3.2.2 Accessories and Equipment

General Equipment

- Microbiology laboratory consistent with local regulations for use with BS level 2 pathogens
- Refrigerator (+2 - 8 °C)
- 37 °C incubator
- 55 °C incubator or waterbath
- Class II Biosafety cabinet (or containment facilities compliant with local regulations for potentially infectious agents)
- Autoclave capable of reaching 121 °C (15 psi)
- Pipettes to accurately dispense 1.1 ml, 1 ml and 0.1 ml
- Centrifuge rotor suitable for 15 ml conical tubes and swing out rotor capable of generating at least 2,000 x g. *NB: samples must only be centrifuged in rotors with biocontainment lids.*
- Microcentrifuge suitable for 2 ml microcentrifuge tubes and capable of generating at least 13,000 x g

General Disposables

- Autoclavable containers for discard of waste (various sizes)
- Disposable gloves
- Sterile disposable 1.5 ml microcentrifuge tubes capable of withstanding at least 13,000 x g
- Sterile pipette tips (filter tips recommended)
- 10 ml graduated pipettes
- Leucosep Tubes (for optimal separation of PBMCs)
- Sterile 15 ml conical polypropylene screw cap centrifuge tubes
- Suitable mycobactericidal disinfectant
- Sterile culture vessels (for preparation of assay control cultures)

3.3 STORAGE, RECONSTITUTION, SHELF-LIFE AND RE-USE OF KIT COMPONENTS

Prior to use, the test kit and components should be stored at +2 °C - 8 °C. The components should not be used beyond the date shown on the respective label. In order to ensure optimal kit performance, it is important that all kit components are reconstituted as directed below and that any unused kit components are stored according to the following instructions.

3.3.1 Actiphage® Medium base

To carry out the assay, two different concentrations (1x and 2x) of Actiphage® Medium base are required. (2x) Actiphage® Medium base, is used during the sample preparation process (see section 3.4, step 12) and to prepare (1x) Actiphage® Medium base.

To prepare (2x) Actiphage® Medium base, in a suitable autoclavable container, mix the contents of one Actiphage® Medium base sachet (2.35 g) with 225 ml purified water. Gently mix to dissolve and autoclave at 121 °C for 10 min.

Once reconstituted and autoclaved the (2x) Actiphage® Medium base can be stored for up to 4 weeks at room temperature (+18 – 25 °C) before use (see 3.3.2). Actiphage® Medium base should not be used if there are any visual signs of contamination (turbidity).

To prepare (1x) Actiphage® Medium base, dilute the 2x stock solution 1:1 using sterile purified water as required.

3.3.2 Addition of Actiphage® Growth Supplement to 1x Actiphage® Medium base to make Actiphage® Medium Plus

Actiphage® Growth Supplement is NOT added directly to (2x) Actiphage® Medium base.

Actiphage® Growth Supplement is added at a 1:10 dilution ratio to (1x) Actiphage® Medium base to produce Actiphage® Medium Plus. Ensure the (1x) Actiphage® Medium base is at room temperature (+18 – 25 °C) before addition of Actiphage® Growth Supplement.

Each 25 ml bottle of Actiphage® Growth Supplement is sufficient to prepare 250 ml Actiphage® Medium Plus.

Actiphage® Medium Plus is used to reconstitute Actiphage® Reagent (see 3.3.3) and to grow and dilute the liquid culture of target *Mycobacterium* used as a positive control (see 3.5.1). Actiphage® Medium Plus can be stored for up to 4 weeks at +2 - 8°C before use (but no longer than the expiry date). Actiphage® Medium Plus should not be used if there are any visual signs of contamination (turbidity).

3.3.3 Actiphage® Reagent

Actiphage® Reagent is prepared by adding 1.1 ml of Actiphage® Medium Plus to the Actiphage® vial and mixing gently to re-hydrate the freeze dried mycobacteriophage. One bottle of Actiphage® is sufficient for 10 tests. Reconstituted Actiphage® Reagent may be stored for up to 7 days if kept at +2 - 8 °C (but no longer than the expiry date of (1x) Actiphage® Medium base). Mix well prior to use.

3.3.4 Rapid Tubes

Rapid Tubes supplied with the kit are for single use only. The kit contains sufficient Rapid Tubes for the number of determinations. Only the tubes supplied with the kit should be used for the assay procedure.

3.4 BLOOD SAMPLE PREPARATION: Isolation of PBMCs

Blood samples to be collected using sodium heparin as the anticoagulant (minimum recommended volume is 10 ml).

We recommend that blood samples from animals suspected to have infection are handled in a class II biosafety cabinet or as compliant with local regulations for handling potentially infectious agents.

If the blood specimens are to be stored prior to testing, they should be kept at room temperature (+18 – 25 °C) for no longer than 2 days. Refrigerated storage is NOT recommended. Longer storage of samples is likely to result in a failure to achieve good recovery of PBMCs (buffy coat).

- 1) Prepare the Leucosep tubes by filling with 3 ml of Ficoll and centrifuging at 1,000 x g for 3 min at room temperature (+18 – 25 °C); add 2.5 ml of PBS to each Leucosep tube and store at room temperature protected from light until ready for use.
- 2) Ensure the blood sample is homogenous by inverting the sample a few times to ensure good mixing.
- 3) Gently mix 2 ml of blood with the 2.5 ml of PBS preloaded into the Leucosep tube.
- 4) Centrifuge in a swing out rotor at 800 x g for 15 min at room temperature (+18 – 25 °C) with no brake in deceleration phase.

N.B. if any leakage is detected after centrifugation, the outside of the Leucosep tube should be decontaminated using a suitable disinfectant before further handling.

- 5) The PBMC layer should be visible above the frit in the Leucosep tube, below the bulk layer of plasma.
- 6) Using a 10 ml pipette or by aspirating, remove plasma layer to a discard container for autoclaving.
- 7) Using a 1 ml pipette, harvest the buffy coat (PBMCs) and transfer to a Falcon tube prefilled with 6 ml of sterile PBS (wash step).

N.B., harvesting of some of the plasma layer under the buffy coat but above the frit at this point will not affect the assay.

8) The PBMCs are recovered by centrifuging each Falcon tube at 200 x g for 10 min, with brake in deceleration phase.

9) Remove the supernatant and transfer to a discard container for autoclaving.

N.B., It is important to drain the pellet well so that the residual volume of PBS in the tube is as small as possible.

10) Resuspend the pellet in 0.6 ml sterile water and incubate for 20 min to lyse PBMCs and release intracellular bacteria.

11) Transfer samples to a sterile disposable 1.5 ml microcentrifuge tube.

12) To each sample add 0.75 ml (2x) Actiphage® Medium base and 0.15 ml Actiphage® Growth Supplement.

*N.B.: at this stage samples can be stored overnight at room temperature (+18 – 25 °C).
If blood samples have experienced any low temperatures during transport, this stage is recommended.*

13) Centrifuge samples at 13,000 x g for 3 min to recover the Mycobacteria.

14) Discard the supernatant into a suitable discard container for autoclaving and resuspend the pellet in 110 µl of Actiphage® Reagent.

NB: If pellets are difficult to resuspend at this stage due to large amounts of eukaryotic cell debris, the samples can be left in the disposable 1.5 ml microcentrifuge tube for incubation (see section 3.5.2).

15) The Actiphage® Rapid assay incubation time starts when these samples are transferred to a 37 °C incubator (see section 3.5.2).

3.5 Actiphage® Rapid PROCEDURE

3.5.1 Preparation of Controls

A Negative and Positive control must be performed on every occasion the Actiphage® Rapid assay is carried out. The controls will be prepared at the point of assay and require no pre-processing steps.

- **Negative Control:** Dispense 110 µl of Actiphage® Reagent into a Rapid Tube labelled "Negative control".
- **Positive Control:** The positive control sample should contain approximately 10^2 cells. If mycobacterial culture density is too high, this can be diluted in Actiphage® Medium Plus prior to dispensing the sample. Dispense 10 µl of an active growing liquid culture of target mycobacteria (approx. 10^4 cfu ml⁻¹ grown aerobically at 37 °C in Actiphage® Medium Plus) into a Rapid Tube labelled "Positive control" prefilled with 100 µl of Actiphage® Reagent.

3.5.2 Assay Procedure:

Prepare Negative and Positive Control samples as described in section 3.5.1. These should then be treated in the same way as the test samples, as described below.

- 1) Add the samples (110 µl) to the top section of the Rapid Tubes.

N.B. If the pellets were difficult to resuspend at the end of blood preparation method, the sample should be left in the disposable 1.5 ml microcentrifuge tube (see section 3.4-12) and proceed to step 2.

- 2) Incubate the samples for 3.5 h at 37 °C. If the samples are in Rapid Tubes, proceed to step 3.

N.B. If the samples are still in a microcentrifuge tube (see section 3.4-12), centrifuge the samples at room temperature at 13,000 x g for 3 min to sediment any material that might block the filters. Transfer the supernatant to Rapid Tubes and then proceed to step 3.

- 3) Centrifuge the samples at 13,000 x g for 3 min.
- 4) After centrifugation, remove the inner filter section of the Rapid Tube and collect the flow through in the bottom of section of the Rapid Tube.
- 5) The flow through contains the mycobacterial genomic DNA. This can either be used directly for the further stages of the assay or can be stored frozen at -20 °C until required.

N.B.: To increase sensitivity of the assay, the flow through liquid should be cleaned and concentrated into a final volume of approx. 10 µl using an appropriate DNA purification system (e.g. Zymo DNA Clean & Concentrator; for recommended protocol please contact PBD Biotech Ltd Tel: +44 1359 231856, Email: Info@pbdbio.com).

3.6 MOLECULAR ANALYSIS

The output from the Actiphage® Rapid assay is nucleic acid which can be used as a substrate for multiple molecular diagnostic analyses. Each DNA sample recovered from section 3.5.2 should be sufficient for two detection events. For recommended PCR kits, please contact PBD Biotech Ltd. Tel: +44 1359 231856, Email: Info@pbdbio.com.

- 1) To confirm phage-based lysis of target cells by the kit, a positive PCR result should be given with the positive control sample and no target DNA should be detected in the negative control sample.
- 2) For detection of MAP genomic DNA, we recommend PCR amplification of IS900-specific sequences. To detect very low number of cells, the PCR should be optimised to achieve a sensitivity of amplification of genomic sequences from 1 fg of genomic DNA.
- 3) For detection of *M. bovis* genomic DNA we recommend PCR amplification of IS6110-specific sequences. To detect very low number of cells, the PCR should be optimised to achieve a sensitivity of amplification of genomic sequences from 1 fg of genomic DNA.

4 LIMITATIONS

- 1) Detection of mycobacteria by the Actiphage® Rapid test is dependent on the quantity and quality of the specimen collected, its storage prior to processing, and the number of live organisms present.
- 2) Positive Actiphage® Rapid test results are dependent on the levels of mycobacteria-infected PBMCs present in the circulating blood and has a reported LOD of less than 10 cells. Therefore, in the very early stages of infection it is possible to get a false-negative result.
- 3) A false-positive result will only occur if there is cross-contamination of the sample with mycobacterial DNA from the target organism.

5 PRECAUTIONS

5.1 SAFETY PRECAUTIONS

Suitable safety precautions must be used at all times when handling clinical specimens, including working in an appropriate bio-safety cabinet and using personal protective equipment. Local guidelines must be followed when working with pathogenic material and for disposal of pathogenic biological waste and in the event of laboratory accidents.

Any remaining specimen that gives a positive by Actiphage® Rapid assay test result should be treated as containing viable cells of the organism detected.

5.2 TECHNICAL PRECAUTIONS

- For use only by personnel competent in aseptic technique and experienced in working with pathogenic *Mycobacterium spp.* Use aseptic techniques throughout the reagent preparation and assay procedure.
- The operator should seek assistance directly from PBD Biotech if they do not understand anything in these instructions or have problems running the test.
- If the kits or reagents appear damaged upon arrival, do not use and contact PBD Biotech.
- Components must not be used beyond the expiry date printed on the label. Do not mix different batch or lot numbers of reagents.
- Do not freeze any kit component or reconstituted reagent. All reagents must be brought to room temperature before use.
- The reagents are provided at defined working concentrations. Assay performance may be lost if reagents are modified or not stored under recommended conditions as detailed in Section 3.3.
- All pipettes, pipette tips, glassware and plastic-ware used must be sterile.
- Ensure that all equipment used is correctly maintained, calibrated and monitored as appropriate.
- Reconstitute sufficient reagents required to perform the test. Do not return excess reagents to bottles after use.
- Care needs to be taken to treat all specimens and control reactions in the same manner, according to Sections 3.4 and 3.5 of these instructions for use. Omission of, or deviation from, any step could lead to inaccurate results.
- Disposal of Actiphage® and any equipment that has come into contact with these reagents, should be in accordance with local regulations for the disposal of microbiological waste.



6 MATERIAL SAFETY DATA SHEETS

A material safety data sheet (MSDS) for the kit is available from PBD Biotech, upon request. Tel: +44 1359 231856, Email: Info@pbdbio.com.

7 OTHER INFORMATION

A large text version of these instructions is available from PBD Biotech, upon request. Tel: +44 1359 231856, Email: Info@pbdbio.com.