

PREVALENCIA DE LA INFECCIÓN POR *Mycobacterium avium* SUBESPECIE *paratuberculosis* EN REBAÑOS DE OVINOS DE DOS MUNICIPIOS DE SAN LUIS POTOSÍ, MÉXICO

Prevalence of Infection by *Mycobacterium avium* Subspecie *paratuberculosis* in Flocks of Sheep of Two Regions of San Luis Potosi, Mexico

Felipe de Jesús Morón-Cedillo¹, César Cortez-Romero^{1*}, Jaime Gallegos-Sánchez², Benjamín Figueroa-Sandoval¹, Gildardo Aquino-Pérez¹ y Alejandro Amante-Orozco¹

¹ Colegio de Postgraduados. Campus San Luis Potosí, Agustín de Iturbide No. 73, Salinas de Hidalgo, S.L.P. 78622, MEXICO. Tel. y Fax: + (496) 96 302 40. ² Colegio de Postgraduados. Campus Montecillo. Km. 36.5 Carr. México-Texcoco Montecillo CP 56230, Texcoco, Estado de México. México. Tels.: + (55) 5804 5901, 5804 5902 Fax 58 04 59 03. *ccortez@colpos.mx

RESUMEN

La paratuberculosis (Ptb), también conocida como enfermedad de Johne es causada por el *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* (Map). La enfermedad es contagiosa en bovinos, ovinos, cabras y otros rumiantes; en humanos está relacionada con la enfermedad de Crohn. En ovinos se manifiesta con pérdida progresiva de peso, y en estados avanzados, con heces aglutinadas y diarrea. Para el diagnóstico de la enfermedad existen diferentes pruebas: una en heces, de donde se obtiene una secuencia de inserción 900 (IS900) del genoma de Map, pudiendo identificar el organismo por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y otra en suero sanguíneo, por medio de la prueba de inmunodifusión en gel de agar (IDGA). Se seleccionaron estas dos técnicas para estimar la prevalencia de Map. Se analizaron muestras sanguíneas y fecales de 211 ovinos asintomáticos en 32 rebaños de 10 comunidades de Salinas y Villa de Ramos, San Luis Potosí. La prevalencia de Map por rebaño entre comunidades con la prueba de IDAG fluctuó desde 4,35 hasta 33,33%, con promedio de 9,48%. La prevalencia con la prueba de PCR-anidada se presentó de 4,26 a 33,33% y un promedio entre comunidades de 7,58%. La prueba de IDGA detectó 20 ovinos positivos con anticuerpos de Map. La técnica de PCR-anidada detectó 16 ovinos que excretaban Map. Al utilizar la prueba de PCR como prueba de oro, la prueba de IDGA tuvo una sensibilidad de 81% y una especificidad de 96%, con una concordancia kappa de 0,96. Con la presencia de Map en los municipios de Salinas y Villa de Ramos de San Luis Potosí es

necesario tomar las medidas pertinentes en su control y erradicación, para evitar la diseminación y pérdidas económicas en las explotaciones pecuarias.

Palabras clave: Paratuberculosis, prevalencia, IS900, IDGA, PCR.

ABSTRACT

Paratuberculosis (Ptb), also known as Johne's disease, is caused by *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* (Map). The disease is contagious in cattle, sheep, goats and other ruminants; in humans it is associated with Crohn's disease. Progressive weight loss is observed in sheep, and in advanced stages, clumped stools and diarrhea. To diagnose this disease there are different tests: one is using the feces, from which an insertion sequence 900 (IS900) Map genome is obtained, making possible the organism identification through a Polymerase Chain Reaction (PCR), and a second one in blood serum through the Agar Gel Immunodiffusion test (AGID). These two techniques were selected to estimate the prevalence of Map. Fecal and blood samples of 211 asymptomatic sheep were analyzed in 32 flocks from 10 communities in Salinas and Villa of Ramos, San Luis Potosi. The Map prevalence per flock between communities with the AGID test ranged from 4.35 to 33.33%, with a mean of 9.48%. The prevalence with the nested PCR test came out with a value varying from 4.26 to 33.33% and a mean of 7.58% between communities. The AGID test detected 20 positive sheep to Map antibodies. The nested PCR detected 16 sheep excreting Map. By using the PCR test as the gold standard, the AGID test had a sensitivity

of 81% and a specificity of 96%, with a kappa agreement value of 0.96. Being Map present in the Municipalities of Salinas and Villa de Ramos, San Luis Potosí, it is necessary to take the relevant measures to control and eradicate it, preventing its spread and economic losses in all livestock farms.

Key words: Paratuberculosis, prevalence, IS900, AGID, PCR.

INTRODUCCIÓN

La paratuberculosis (Ptb), también conocida como enfermedad de Johne es causada por el *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* (Map). Esta enfermedad causa desordenes infecciosos del tracto intestinal, principalmente en rumiantes domésticos, pero también en rumiantes salvajes e incluso primates [15]. También se ha asociado con la enfermedad de Crohn, una enfermedad crónica multifactorial inflamatoria del intestino humano [8]. La manifestación clínica de Ptb en ovinos (*Ovis aries*) se manifiesta a edades más tempranas que en bovinos (*Bos taurus*), siendo la pérdida progresiva de peso la primera manifestación [19]. Se ha observado que en 10 a 20% de los casos clínicos de Ptb en ovinos se presentan heces aglutinadas o diarrea [29]. La Ptb es una enfermedad común en muchos países [28], incluyendo México. Desafortunadamente en México, aún se desconoce la magnitud del problema [18]. La base del control de esta enfermedad es la identificación y eliminación de los animales infectados. Sin embargo, el carácter subclínico de la enfermedad y la baja sensibilidad de los métodos de identificación dificultan el diagnóstico [4]. La Ptb se puede encontrar en hatos bovinos y ovinos siendo difícil identificar un ovino con infección subclínica, de esta manera, animales asintomáticos infectados pueden estar diseminando el microorganismo mediante heces por varios años [21]. Para detectar la enfermedad de manera subclínica se pueden hacer pruebas como: las serológicas y el aislamiento del agente [20]. En ovinos, la detección mediante los cultivos fecales son efectivos para detectar al menos 12% de los casos subclínicos, la desventaja es que requieren de dos a cuatro meses (mes) para incubar la bacteria [23]. Una alternativa a las limitaciones del procedimiento anterior son las pruebas serológicas como son: la prueba de fijación de complemento (FC), la técnica de ensayo inmunoenzimático (ELISA) y la inmunodifusión en gel de agar (IDGA) [1]. En Nueva Zelanda y Australia, la técnica de IDGA en pequeños rumiantes ha demostrado una mayor sensibilidad y especificidad que la prueba de ELISA [24]. Por otra parte, la prueba serológica de IDGA es sencilla y rápida, lo que permite analizar rebaños completos en pocos días (d), con buena sensibilidad entre 70 a 80% y especificidad de hasta 100% [30]. Actualmente, los avances en biología molecular, como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), ofrecen una alternativa por ser más sensible y específica para la detección de enfermedades infecciosas [7]. La secuencia nucleotídica de inserción 900 (IS900) contiene múltiples copias (14-18) del genoma de Map, lo que facilita la identificación de este microorganismo [9]. Aprovechando esta ventaja, Erume y col. [6]

implementaron a partir de la secuencia IS900, la técnica de PCR-anidada, que se caracteriza por utilizar dos pares de iniciadores. El primer iniciador es diseñado de una secuencia de la región IS900, con él se obtiene un producto de amplificación mayor a 500 pares de bases (pb). El segundo iniciador fue diseñado de la secuencia de la región interna del producto amplificado (500pb) del que se obtiene un producto de amplificación más pequeño que el producto original lo que aumenta la sensibilidad y especificidad de la prueba. Las ventajas que tiene este método sobre el cultivo bacteriano es que, los resultados se pueden obtener en tres o cuatro d, eliminando los periodos de incubación. También la secuencia de inserción IS900 es específica para Map, lo que elimina los problemas de contaminación de la muestra; además, con la misma técnica se puede diferenciar las bacterias viables y las no viables [5, 31]. La base del control de esta enfermedad es la identificación y eliminación de los animales infectados; sin embargo, el carácter subclínico de la infección y escasos diagnósticos hacen que la enfermedad esté subestimada en México, causando un impacto negativo en la economía de las explotaciones ovinas. Por lo anterior, el objetivo de este estudio fue estimar la prevalencia de la infección por *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (Map) con la técnicas IDGA y PCR-anidada, en ovinos de los municipios de Salinas y Villa de Ramos, San Luis Potosí, México.

MATERIALES Y MÉTODOS

Localización del área de estudio. Esta investigación se realizó con rebaños ovinos de las comunidades: Lagunillas, La Herradura, El Calvario, Villa de Ramos, Pinillos, El Zacatón y San Pedro del Saltito del municipio Villa de Ramos, localizado geográficamente a los 22°37'N y 101°42'O, a una altitud de 2070 m [13]. Asimismo, las comunidades: Zaragoza, Diego Martín y Salinas de Hidalgo del municipio Salinas, localizado geográficamente a los 22° 50' N y 101° 55' O, a una altitud de 2,200 m [13]; ambos Municipios del estado de San Luis Potosí. Por la cercanía geográfica, sus características son muy parecidas, el clima predominante es seco templado, su temperatura media anual es de 18,7°C y su precipitación pluvial media anual es de 391 mm. Predomina una vegetación de matorral micrófilo desértico, espinoso, izotal, pastizal, nopalera y cardonal de cuyas asociaciones se tienen especies como: *Larrea tridentata*, *Prosopis laevigata*, *Acacia berlandieri*, *Flourensia cernua*, *Opuntia* spp. *Yucca filiferay* una variedad de pastos como: *Bouteloua gracilis*, *Bouteloua curtipendula*, *Erioneuron pulchellum* y *Distichlis spicata* [22].

Población de estudio. Se muestrearon 211 ovinos mayores de dos años de edad, provenientes de 32 rebaños, localizados en ambos Municipios. Se seleccionaron ocho comunidades para ser incluidas en este estudio de acuerdo a la disposición y cooperación de los productores, dado que algunos productores se mostraron poco cooperantes para proporcionar datos y permitir tomar las muestras necesarias. La raza ovina

predominante en el área de estudio fue Rambouillet y sus cruces. Se tomaron muestras sanguíneas del 10% de animales del rebaño ovino en cada predio de cada comunidad, con una edad mayor a dos años, confirmada por fórmula dentaria. Se identificaron los ovinos por medio de aretes plásticos con número, para poder dar seguimiento a los animales que pudieran resultar positivos. En estos rebaños no se tenían antecedentes de incidencia de la enfermedad y los ovinos no presentaban signos clínicos de infección por Map.

Preparación de las muestras. En cada rebaño se recolectaron muestras de heces y sangre, de un número representativo de animales asintomáticos, hasta reunir un total de 211 muestras de cada tipo. Se muestrearon cinco mL de sangre por animal de la vena yugular y se colocaron en tubos de plástico para suero de 13 x 100 mm x 5,0 mL (BD Vacutainer®, tapón rojo Hemogard™, EUA) adicionados con activador de coagulación y cubierta interior de silicón, que fueron procesados para separar el suero, el cual se almacenó en un ultra congelador (Thermo Scientific, Forma 7000 modelo 7320A, EUA) a -20°C hasta procesarlos mediante la prueba de inmunodifusión en gel de agar (IDGA) [24]. Las muestras fecales se obtuvieron del recto del animal con la ayuda de un guante de plástico, las muestras se conservaron en congelación a -20°C hasta su uso para la extracción de ADN, la cual se llevó a cabo con la técnica descrita por Garrido y col. [7] que brevemente consistió en: tomar dos g de heces, las que se disolvieron durante 15 min en 40 mL de una solución de cloruro de N-cetilpiridinio (HCP) (Sigma Chemical Co., EUA) a 0,76%, después se dejaron en reposo durante 18 h; de esta solución se tomaron 20 mL, los cuales se centrifugaron durante 10 min a 300 x g. El sedimento se lavó tres veces con cinco mL de solución amortiguadora de fosfatos (PBS), después se transfirió a microtubos de un mL y se centrifugó por cinco min a 14 000 x g [14]. La lisis celular se realizó mediante enfriamiento-calentamiento [7]. Para llevar a cabo este proceso, el producto de lisis se centrifugó, el sedimento fue transferido a criotubos y se resuspendió con 500 µL de TE-Tritón100X (Tris 50 mM, EDTA 10 mM, pH 8; tritón 50mM). Los criotubos se colocaron tres veces en un termo criogénico (Taylor-Wharton 3K, EUA) a -80°C durante cinco min para luego retirarlos y colocarlos en un horno (Felisa HR, México) a 100°C por cinco min [14] de acuerdo con el protocolo, este proceso se llevó a cabo tres veces. La extracción de ADN se realizó usando la técnica descrita por Jaimes y col. [14]; que brevemente consistió en lo siguiente, a una muestra fecal de ovino se agregó 450 µL de isotiocianato de guanidina (Sigma Chemical Co., EUA) 5M y 250 µL de acetato de amonio (Sigma Chemical Co., EUA) 7,5 M pH 6,3 y se colocó en hielo durante 15 min. Las muestras se transfirieron a microtubos y se les adicionó en dos ocasiones 500 µL de cloroformo (Sigma Chemical Co., EUA), alcohol isoamílico (24:1), se centrifugó durante cinco min a 14 000 x g. Se recuperó la fase acuosa a la que se le agregó 450 µL de isopropanol (Sigma Chemical Co., EUA) y se incubó en un ultracongelador (Thermo Scientific Forma 7000 modelo 7320A, EUA) a -20°C duran-

te toda la noche. Después, las muestras se centrifugaron durante 15 min a 14 000 x g, se realizaron dos lavados con un mL de etanol a 70% y se centrifugó durante cinco min a 14 000 x g. El ADN se secó a temperatura ambiente y se resuspendió en 100 µL de agua miliQ.

Prueba de inmunodifusión en gel de agar (IDGA).

Para la preparación del gel se pesaron 3,75 g de agar noble (Difcolaboratories), los cuales se disolvieron por calentamiento en 50 mL de buffer salino de fosfatos (PBS 1X) para obtener una concentración final de 0,75% de agar; luego se añadió un mL de azida de sodio al 0,2% y posteriormente se adicionaron 15 mL de la solución de agar en una placa de petri para formar el gel. Una vez polimerizado, se realizaron las perforaciones en forma de rosetas. En el pozo del centro se colocó el antígeno 3065 de Map [17]. En los pozos periféricos se colocaron 30 µL de sueros problemas. La placa con las muestras se colocó en una cámara húmeda y se incubaron a 37°C por un periodo entre 24 y 48 h. Las placas se inspeccionaron para detectar una banda de precipitación definida. Si la banda se presentaba dentro del periodo de 48 h, la muestra se consideraba como positiva; de lo contrario se consideraba negativa [26].

Procedimiento de la PCR anidada. Para la PCR anidada se utilizaron los iniciadores (Accesolab, S.A. de C.V., México) diseñados por Erume y col. [6]; ptb1 (5' TGA TCT GGA CAA TGA CGG TTACGG A 3') y ptb4 (5'CGC GGC ACG GCT CTT GTT3'), con los que se obtiene un producto de amplificación de 563 pb. Para la segunda reacción de PCR se usaron los iniciadores ptb2 (5' GCC GCG CTG CTGGAG TTA A 3') y ptb3 (5' AGC GTC TTT GGC GTCGGT CTT G 3'), con los que se obtuvo un producto de amplificación de 210 pb. Los procedimientos de amplificación y visualización se llevaron a cabo de acuerdo a procedimiento descrito por Jaimes y col. [14]. Para la primera reacción se utilizaron 3 µL (10 ng µL⁻¹) de ADN proveniente de heces de ovinos, 5 µL de amortiguador de PCR (67 mM µL⁻¹), 3 µL MgCl₂ (Sigma Chemical Co., EUA) 2mM (30 mM µL⁻¹), 1 µL dNTP's (Gibco BRL Co., EUA) 200 mM c/u, 1 µL(25 p Mol) de los iniciadores Ptb 1 y Ptb 4 y 0,2 µL (1 U) de ADN polimerasa (Sigma Chemical Co., EUA) termoestable (5 U µL⁻¹) y 35,8 µL de agua miliQ en un volumen final de 50 µL. Las muestras se amplificaron en un termociclador (PCR Sprint1, Termo Electron, Co., EUA) con el siguiente programa: desnaturalización inicial a 95°C por 5 min, seguido de 35 ciclos a 95°C por 1 min, 65°C por 1 min y 72°C por 1 min, y una extensión final a 72°C por 5 min. Para la segunda amplificación se usaron tres µL de la primera amplificación en microtubos de PCR que contenían la misma cantidad y concentración de reactivos descritos anteriormente, excepto que los iniciadores Ptb1 y Ptb4 fueron sustituidos por los iniciadores Ptb2 y Ptb3. Se utilizó el mismo programa del termociclador. Se incluyó como testigo positivo el ADN de una cepa Map (K10 19698). Los productos de amplificación fueron visualizados en gel de agarosa al 2%, teñidos con bromuro de etidio (Sigma Chemical Co., EUA).

Análisis estadístico. Para determinar el tamaño de la muestra se consideró una prevalencia estimada de paratuberculosis ovina de 4,4% [18], para poder utilizarla en un muestreo aleatorio simple, ya que no existen datos en la región, empleando un nivel de confianza de 95,0% y un porcentaje de error de 5,0%, en donde según la metodología de Lwanga y Lemeshow [16], se obtuvo un tamaño de muestra de 73, pero se tuvo la oportunidad de muestrear un mayor número de ovinos (211) para dar más validez al estudio. Para calcular las diferencias de prevalencia entre comunidades, obtenida de cada una de las pruebas diagnósticas, se utilizó una prueba de t-student [27]. Al utilizar dos métodos diferentes para el diagnóstico de una enfermedad, es necesario conocer el grado de concordancia entre ellos. El grado de concordancia entre ambas pruebas de diagnóstico se expresa con el valor de kappa (κ). Este valor expresa el grado de concordancia más allá del azar [3].

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los ovinos no presentaban signos clínicos de infección con Map, asimismo las comunidades no tenían antecedentes de diagnóstico de la enfermedad. Se encontraron 20 muestras de suero sanguíneo ovino con anticuerpos a Map por la prueba IDGA. De acuerdo con los iniciadores diseñados por Erume y col. [6], para reconocer secuencias contenidas en las amplificaciones de un producto con 210 pares de bases en la prueba de PCR-anidada, se presentaron bandas amplificadas en 16 de las 211 muestras de heces, lo que corresponde a la IS900 de Map (FIG. 1) y 13 de las 211 muestras resultaron positivas en ambas pruebas (TABLA II). Con la prueba IDGA se obtuvo una prevalencia global de Ptb ovina de 9,48%, oscilando entre 4,35 y 33,33% entre las comunidades estudiadas; y con la prueba de

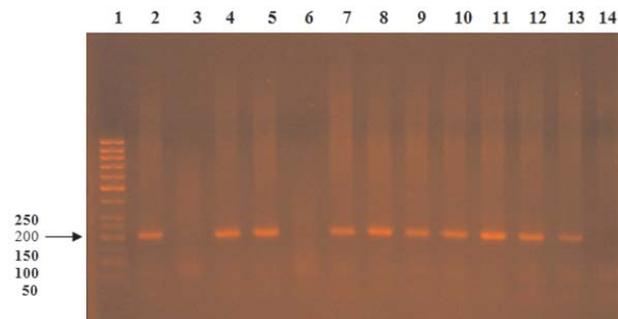


FIGURA 1. AMPLIFICACIÓN DEL ADN GENÓMICO DE HECES DE OVINOS POR PCR ANIDADA. AMPLIFICACIÓN DE UN PRODUCTO DE 210 PB DE LA IS900 DE *Mycobacterium avium* SUBS. *paratuberculosis* (MAP). CARRIL 1: MARCADOR DE TAMAÑO MOLECULAR DE 50 PB; CARRIL 2: CONTROL POSITIVO K10 MAP; CARRILES 3 Y 6 MUESTRAS QUE NO AMPLIFICARON; CARRILES 4, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12 Y 13 MUESTRAS AMPLIFICADAS; CARRIL 14: CONTROL NEGATIVO.

PCR-anidada, la prevalencia fue 7,58%, teniendo una fluctuación entre comunidades de 4,26 y 33,33%. No se encontró diferencia significativa ($P=0,262$) para el diagnóstico de Map con las pruebas utilizadas.

En un estudio realizado en los estados de Querétaro y Guanajuato, México, por Chávez y col. [2] reportaron prevalencias en caprinos (*Capra hircus*) de 8,8% y en ovinos de 4,4%. Por otra parte, Vélez-Hernández y col. [32] determinaron seroprevalencias en el Valle de México de 6,39 y 4,89% en dos rebaños caprinos.

En este estudio, IDGA y PCR, se utilizaron comparativamente con el fin de lograr una evaluación descriptiva del nivel de

TABLA I

PREVALENCIA DE LA INFECCIÓN POR *Mycobacterium avium* SUBS. *paratuberculosis* (MAP) POR INMUNODIFUSIÓN EN GEL DE AGAR (IDGA) Y REACCIÓN EN CADENA DE POLIMERASA – ANIDADA (PCR-ANIDADA) EN OVINOS DE COMUNIDADES DE SALINAS Y VILLA DE RAMOS, SAN LUIS POTOSÍ, MEX.

Comunidad	Total de ovinos	Positivos con IDGA	Prev. %	Positivos con PCR	Prev. %
Cerro Pinillos	10	0	0,00	0	0,00
Salinas	3	1	33,33	0	0,00
Diego Martin	7	1	14,29	1	14,29
El Calvario	3	1	33,33	1	33,33
El Zacatón	54	8	14,81	6	11,11
La Herradura	47	3	6,38	2	4,26
Lagunillas	23	1	4,35	0	0,00
Sn Pedro del Saltito	29	0	0,00	0	0,00
Villa de Ramos	28	3	10,71	4	14,29
Zaragoza	7	2	28,57	2	28,57
TOTAL	211	20	9,48	16	7,58

positividad de Ptb en la población objetivo. De los 20 sueros positivos a Ptb detectados por IDGA, siete muestras fecales fueron negativas a la prueba de PCR, representando el 35% (7/20) de los animales (TABLA II). Como se observa en los resultados, por la prueba de IDGA se obtuvo un número mayor de animales positivos comparada con la prueba de PCR; 20 vs. 16, respectivamente. Este número menor de muestras positivas obtenidas por PCR, se explica porque los bacilos son desechados de manera intermitente en las heces [25], lo que permite sugerir que si solo se utiliza la prueba de PCR para diagnosticar Ptb, se realicen diferentes muestreos para dar un resultado más certero. Los autores apoyan la hipótesis de que estos ovinos están infectados, a pesar de que el grupo criterio tenía una condición corporal clínicamente sana, pero es probable que en el momento de la toma de muestra los individuos no estuvieran excretando un número de organismos adecuados para ser detectados por la prueba de PCR. Aún y cuando el grupo criterio eran animales mayores de dos años edad, ya que la literatura reporta que en este periodo de edad es en donde existe mayor probabilidad de encontrar anticuerpos circulantes y excreción de microorganismos en heces [5].

TABLA II
ANÁLISIS DE SENSIBILIDAD, ESPECIFICIDAD
Y CONCORDANCIA DE LA COMPARACIÓN
INMUNODIFUSIÓN EN GEL DE AGAR (IDGA) EMPLEANDO
PCR-ANIDADACOMO PRUEBA DEFINITIVA

IDGA	PCR (IS900)		Total
	+	-	
+	13 _a	7 _b	20 _(a+b)
-	3 _c	188 _d	191 _(c+d)
Total	16 _(a+c)	195 _(b+d)	211 _n

Sensibilidad: $a / (a + c) \times 100 = 81\%$

Especificidad: $d / (b + d) \times 100 = 96\%$

Concordancia: $Kappa = 0,96$

Con base en los resultados obtenidos, se puede decir que IDGA presentó mayor sensibilidad al compararla con PCR, 81 vs 65%, respectivamente (TABLA II); de igual forma es mayor a las sensibilidades reportadas por Gumber y col. [10] de 8,3% y por Hope y col. [12] de 56, 0%. La sensibilidad de la prueba IDGA está relacionada con el tipo de antígeno utilizado. En este estudio el antígeno utilizado fue el 3065 [17], por lo que pueden diferir los resultados de otros reportes de IDGA. La prueba de IDGA tiene capacidad de detectar un número mayor de animales infectados, lo cual ofrece ventaja al utilizarla como prueba de diagnóstico para esta enfermedad.

Las pruebas de IDGA y PCR coincidieron en 56,5% (13/23) del total de animales positivos, y la amplificación del elemento de inserción IS900 específico para Map en heces está asociada con la titulación de los sueros reactivos detectados por IDGA en 6,2% (13/211) del total de ovinos muestreados. Esto indica que los ovinos, además de presentar anticuer-

pos detectables por IDGA, también eliminaban el bacilo por heces, como lo reporta Gwozdz y col. [11]. Los resultados del análisis revelaron que la prueba tuvo una sensibilidad de 81% y una especificidad de 96% (TABLA II).

Con respecto al 18,75% (3/16) de los ovinos que resultaron negativos a IDGA, pero positivos a PCR, se considera que pudo deberse a la falta de anticuerpos detectables, pues esta prueba necesita gran cantidad de anticuerpos para expresar la precipitación en el gel. Esto sucede en las etapas tempranas de la infección y pueden pasar varios meses o años, antes de que el nivel de anticuerpos circulantes sea suficiente para desencadenar una reacción positiva, permaneciendo la respuesta humoral bajo el límite de detección de las pruebas serológicas actualmente disponibles [31]. Por lo tanto, los factores que afectan la capacidad de detección de la infección como: niveles bajos o nulos de anticuerpos en sangre y excreción intermitente de la bacteria en heces [28], así como la posibilidad de una transmisión vertical de madre a feto vía intrauterina y a través del calostro en los corderos [31], es probable que los niveles de infección encontrada en los rebaños examinados sea mayor a la reportada en esta investigación.

Si bien los resultados expuestos en este estudio muestran que no existe diferencia entre los métodos de diagnóstico usados, se sugiere el método de inmunodifusión en gel de agar (IDGA) por ser una técnica que no requiere equipos costosos de laboratorio para su uso. Cualquier método de diagnóstico elegido será válido para iniciar el diagnóstico de la Ptb y tomar las medidas para su control, como separar y eliminar animales positivos, con el fin de disminuir la diseminación de la enfermedad en el rebaño, aun y cuando existe poca información epidemiológica que implica la enfermedad; sin embargo, se conoce que un animal que conviva con el menor número de patógenos va a tener mayor producción.

CONCLUSIONES

Este estudio es el primer reporte epidemiológico de la infección por Map en el estado de San Luis Potosí, México. Con base en los resultados obtenidos en el estudio se reporta una prevalencia de la infección por Map en los municipios de Villa de Ramos y Salinas del estado de San Luis Potosí de 9,48% y de 7,58% con las técnicas IDGA y PCR, respectivamente. Por medio de la prueba IDGA, se obtuvo una mayor sensibilidad al compararla con la prueba de PCR. Aunque los resultados muestran que no existe una diferencia significativa entre los métodos de diagnóstico utilizados.

AGRADECIMIENTO

Esta investigación fue financiada con el proyecto LEADER. Los autores agradecen al laboratorio del Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Microbiología Animal (CENID-INIFAP), Palo Alto, Estado de México, por el apoyo en la realización de los análisis de las muestras.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] CLARKE, C.J.; PATTERSON, I.A.; ARMSTRONG, K.E.; LOW, C. Comparison of the absorbed ELISA and agar gel immunodiffusion test with clinic pathological findings in ovine clinical paratuberculosis. **Vet. Rec.** 139:618-621. 1996.
- [2] CHÁVEZ, G.G.; TRIGO, F.J.; SVASTOVA, T.P.; PAVLIK, I. Identificación del polimorfismo genético de aislamientos de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* de caprinos del Centro de México. **Vet. Méx.** 35 (1):75-82. 2004.
- [3] COHEN, J. A coefficient of agreement for nominal scales. **Educ. Psychol. Meas.** XX (1): 37-46. 1960.
- [4] COLLINS, M.T. Diagnosis of paratuberculosis. **Vet. Clin. N. Am-Small** (Veterinary Clinics of North America-Small Animal Practice) 12: 357-371. 1996.
- [5] COLLINS, M.T. Update on paratuberculosis: 2. Pathology and diagnosis. **Irish Vet. J.** 56 (12): 619-623. 2003.
- [6] ERUME, J.; SPERGSEER, J.; ROSENGARTEN, R. Rapid detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* from cattle and zoo animals by nested PCR. **Afr. Health Sci.** 1:83-89.2001.
- [7] GARRIDO, J.M.; CORTABARRIA, N.; OGUIZA, J.A.; ADURIZ, G.; JUSTE, R.A. Use of PCR method on fecal samples for diagnosis of sheep paratuberculosis. **Vet. Microbiol.** 77:379-386. 2000.
- [8] GHADIALI, A.H.; STROTHER, M.; NASER, A.S.; MANNING, E.J.; SREEVATSAN, S. *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* strains isolated from Crohn's disease patients and animal species exhibit similar polymorphic locus patterns. **J. Clin. Microbiol.** 42: 5345-5348. 2004.
- [9] GREEN, E.P.; TIZARD, M.L.; MOSS, M.T.; THOMPSON, J.; WINTERBOURNE, D.J.; McFADDEN, J.J.; HERMON-TAYLOR, J. Sequence and characteristics of IS900, an insertion element identified in a human Crohn's disease isolate of *Mycobacterium paratuberculosis*. **Nucleic Acids Res.** 17:9063-9073. 1989.
- [10] GUMBER, S.; EAMENS, G.; WHITTINGTON, R.J. 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(1-3):91-101. 2006.
- [11] GWOZDZ, J.M.; REICHEL, M.P.; MURRAY, A.; MANKETELOW, W.; WEST, D.M.; THOMPSON, K.G. Detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in ovine tissues and blood by polymerase chain reaction. **Vet. Microbiol.** 51: 233-244. 1997.
- [12] HOPE, A.F.; KLUVER, P.F.; JONES, S.L.; CONDRON, R.J. Sensitivity and specificity of two serological tests for the detection of ovine paratuberculosis. **Aust.Vet. J.** 78(12):850-856. 2000.
- [13] INSTITUTO NACIONAL DE ESTADÍSTICA, GEOGRAFÍA E INFORMÁTICA (INEGI). Coordenadas geográficas. **Anuario Estadístico del Estado de San Luis Potosí.** Ed. INEGI, México. 106 pp. 1994.
- [14] JAIMES, G.N.; SANTILLÁN, M.A.; HERNÁNDEZ, O.A.; CÓRDOVA, D.; GUZMÁN, C.C.; ARELLANO, B.; DÍAZ, E.; TENORIO, V.R.; CUÉLLAR, A. Detección de *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* por medio de PCR-anidada a partir de muestras de heces de ovinos. **Vet. Méx.** 39 (4): 377-386. 2008.
- [15] KENNEDY, D.J.; BENEDICTUS, G. Control of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in agricultural species. **Rev. Sci. Tech. OIE.** 20: 151-179. 2001.
- [16] LWANGA, S.K.; LEMESHOW, S. Estimating a population proportion with specified absolute precision. In: **Sample Size Determination in Health Studies. A Practical Manual.** WHO Geneva, Switzerland. 80 pp. 1991.
- [17] MARTÍNEZ, A.G.; SANTILLÁN, M.A.; GUZMÁN, C.C.; FAVILA, L.C.; CÓRDOVA, D.L.; DÍAZ, E.A.; HERNÁNDEZ, L.A.; BLANCO, M.Á. Desarrollo de un inmunoensayo enzimático (ELISA) para el diagnóstico de paratuberculosis en bovinos. **Rev. Mex. Cien. Pec.** 3(1):1-18. 2012.
- [18] MÉNDEZ, G.M.; PEREA, A.R.; ENRÍQUEZ, V.A.; GARCÍA, C.L. Análisis descriptivo de casos recibidos para diagnóstico de paratuberculosis ovina y caprina en el laboratorio de patología animal de Calamanda, México. **VI Congreso Latinoamericano de la Asociación de Especialistas en Pequeños Rumiantes y Camélidos Sudamericanos (ALEPR y CS). Sanidad.** Ciudad de Querétaro 7 al 11 de Septiembre, México. 24 pp. 2009.
- [19] NAVNEET, K.D; JEFF, E.; WHITTINGTON, R.J.; JENNY-ANN, L.M. Risk factors for ovine Johnes's disease in infected sheep flocks in Australia. **Prev. Vet. Med.** 82:51-71. 2007.
- [20] OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES (OIE), ORGANIZACION MUNDIAL DE SALUD ANIMAL. Paratuberculosis (Enfermedad de Johnes) In: **Manual de la OIE Sobre Animales Terrestres.** Cap. 2.2.6. Pp 377-390. 2004.
- [21] REDDACLIFF, L.A.; McCLURE, S.J.; WHITTINGTON, R.J. Immunoperoxidase studies of cell mediated immune effectors cell populations in early *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in sheep. **Vet. Immunol. Immunop.** 97:149-162. 2004.
- [22] RZEDOWSKI, J. Tipos de vegetación. En: **La Vegetación de México.** Ed. Limusa, México, Pp 151-158. 1978.

- [23] SATOKO, K.; DEBORAH, L.T.; YASUYUKI, M.; WHITTINGTON, R.J. 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. 2007.
- [24] SERGEANT, E.S.G.; MARSHALL, D.J.; EAMENSC, G.J.; KEARNS, C.; WHITTINGTON, R.J. Evaluation of an absorbed ELISA and anagar-gel immuno-diffusion test for ovine paratuberculosis in sheep in Australia. **Prev. Vet. Med.** 61: 235-248. 2003.
- [25] SERGEANT, E.S.; WHITTINGTON, R.J.; MORE, S.J. Sensitivity and specificity of pooled faecal culture and serology as flock-screening tests for detection of ovine paratuberculosis in Australia. **Prev. Vet. Med.** 52: 199-211. 2003.
- [26] SHERMAN, D.M.; MARKHAM, R.J.F.; BATES, F. Agar gel immunodiffusion test for diagnosis of clinical paratuberculosis in cattle. **J. Am. Vet. Med. Assoc.** 185: 179-182. 1984.
- [27] SNEDECOR, G.; COCHRAN, W. Student's *t* distribution. In: **Statistical Methods**. 8thEd. Iowa State University Press, Pp 53-58. 1989.
- [28] STABEL, J.R. Johne's disease: A hidden threat. **J. Dairy Sci.** 81: 283-288. 1998.
- [29] STEHMAN, S.M. Paratuberculosis in small ruminants, deer, and South American Camelides. **Vet. Clin. N. Am-Food A.** 12:441-455. 1996.
- [30] SWEENEY, R.W. Transmission of paratuberculosis. **Vet. Clin. N. Am-Food A.** 12: 305-312. 1996.
- [31] TOMAN, M.; FALDYNA, M.; PAVLIK, I. Immunological characteristics of cattle with *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis infection. **Vet. Med-Czech.** 48 (6): 147-154. 2003.
- [32] VÉLEZ-HERNÁNDEZ, M.; DOMÍNGUEZ-PUNARO, M.; CHÁVEZ-GRIS, G.; SUÁREZ-GÜEMES, F. Control of paratuberculosis in two goat flocks. 1999. Proceedings of the 6th International Colloquium on Paratuberculosis. Melbourne, Australia. On line: <http://www.paratuberculosis.org /pubs/proc6/section2.htm>.18.02.99