

Detección de *Mycobacterium avium* subespecie paratuberculosis, por medio de PCR-anidada a partir de muestras de heces de ovinos

Detection of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis by nested-PCR of ovine fecal samples

Norma G. Jaimes* Marco Antonio Santillán Flores** Oscar A. Hernández Cruz* Dionisio Córdova López**
 Claudia Celic Guzmán Ruiz*** Beatriz Arellano Reynoso** Efrén Díaz Aparicio**
 Víctor R. Tenorio Gutiérrez** Alfredo Cuéllar Ordaz*

Abstract

Paratuberculosis is a chronic granulomatous enteritis caused by *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis (Map), which affects wild and domestic ruminants. Map is shed in feces from infected animals. Transmission of the infection takes place by oral ingestion of the bacterium from contaminated food and water with feces. With the objective to establish a paratuberculosis diagnosis in ovine by nested-PCR from fecal samples, 204 fecal and serum ovine samples were studied. Feces were evaluated by nested-PCR and bacterial culture, serum samples were analyzed by agar gel immunodiffusion (AGID). Nested-PCR yielded a 210 bp amplification product that corresponds to Map-IS900, in 61 out of 204 samples. From these, 43 were from AGID positive animals and 18 from negative animals. Seventeen Map strains were isolated by bacterial culture and AGID detected 91 positive animals. Nested-PCR allowed to detect, sooner, greater number of animals shedding bacillus, even when they had resulted negative to the serological test. This result is considered important because generally these animals, while remaining in the farm, constitute the main source of infection for the herd. Nested-PCR should be considered as an alternative, when a prompt result is required to know the health status of the herd with respect to paratuberculosis.

Key words: BACTERIAL CULTURE, SEROLOGICAL STUDY, *MYCOBACTERIUM AVIUM* SUBSPECIES *PARATUBERCULOSIS*, OVINE, NESTED-PCR.

Resumen

La paratuberculosis es una enteritis granulomatosa de curso crónico ocasionada por *Mycobacterium avium* subespecie paratuberculosis (Map), afecta a rumiantes domésticos y silvestres. Map es excretada en las heces de animales que desarrollan la enfermedad, y la transmisión de la infección se da mediante la ingestión de alimentos y agua contaminados por heces de animales infectados. Con el objetivo de establecer el diagnóstico de paratuberculosis en ovinos por medio de la PCR-anidada a partir de muestras de heces, se trabajaron 204 muestras de heces y sueros de ovinos; las heces se evaluaron por PCR-anidada y cultivo bacteriológico, las muestras de sueros fueron analizadas por medio de inmunodifusión en agar gel (IDGA). Con la PCR-anidada se obtuvo un producto de amplificación 210 pb que corresponde a la IS900 de Map, en 61 de las 204 muestras. De éstas, 43 eran de animales positivos a IDGA y 18 negativos. Mediante cultivo bacteriológico se aislaron 17 cepas de Map; en este contexto, la IDGA detectó a 91 animales como positivos. La PCR-anidada permitió detectar en menor tiempo a mayor cantidad de animales que estaban eliminando al bacilo, aun cuando habían resultado negativos a la prueba serológica; este resultado se considera importante, ya que generalmente estos animales, al permanecer dentro de la granja, constituyen la principal fuente de infección para el rebaño. Se debe considerar a la PCR-anidada como alternativa, cuando se requiera el diagnóstico en breve tiempo, para conocer el estado sanitario del rebaño con respecto a paratuberculosis.

Palabras clave: CULTIVO BACTERIOLÓGICO, ESTUDIO SEROLÓGICO, *MYCOBACTERIUM AVIUM* SUBESPECIE *PARATUBERCULOSIS*, OVINOS, PCR-ANIDADA.

Recibido el 28 de marzo de 2007 y aceptado el 20 de mayo de 2008.

*Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Facultad de Estudios Superiores-Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México, Km 2.5, Carretera Cuautitlán-Teoloyucan, San Sebastián Xhala, 54714, Cuautitlán Izcalli, Estado de México, México.

**Centro Nacional de Investigaciones Disciplinarias-Microbiología, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, carretera México-Toluca, Km 15.5, CP 05110, Col. Palo Alto, México, D. F.

***Instituto de Ciencias Agrícolas de Irapuato, Universidad de Guanajuato, Km 9, Carretera Irapuato-Silao, Ex Hacienda El Copal, 36500, Irapuato, Guanajuato, México.

Correspondencia: Marco Antonio Santillán Flores, correo electrónico: santillan.marco@inifap.gob.mx y mayco1768@yahoo.com.mx Tel.: (01) 36180005, extensión 49, Fax: 36180008.

Introduction

Paratuberculosis (ptb) or Johne's disease is a granulomatous enteritis that affects domestic and wild ruminants.^{1,2} *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis is the etiological agent, at present, it is classified in the *Mycobacterium avium-intracellulare* (Mai) *M. avium* subspecies avium, *M. avium* subspecies silvaticum, *M. avium* subspecies paratuberculosis (Map), *M. intracellulare* complex.³⁻⁵ This disease has a chronic course and mainly affects adult animals of two to three years of age. It is characterized by progressive loss of body condition due to the lesions produced in the ileum, ileocecal, cecum and proximal colon mucosa and mesenteric lymph nodes; diffuse hypertrophy of the jejunum and ileum mucosa is developed, which acquire a rough appearance, causing low nutrient absorption.⁴ The bacillus is excreted by feces of sick animals. Under field conditions the disease is transmitted by ingestion of food and water contaminated with feces from infected animals, which are the main source of herd infection.⁴⁻⁸

Disease control in domestic ruminants depends on opportune detection and elimination of infected animals, which is limited by a lack of proper diagnosis.^{7,8} Bacterial culture from feces is considered as the definitive test for clinical and subclinical detection of ptb in herds. However, it has the problem that isolation requires a period from eight to 16 weeks. Besides, Map is a microorganism that needs enriched culture mediums (meat extract, peptones, mycobactin) for growth. Its disadvantage is that culture specificity is 100%, but sensitivity is lower than 50%.^{1,2}

Another alternative for ptb diagnosis is the use of serological tests, such as immunoenzymatic assay (ELISA) and agar gel immunodiffusion (AGID); a restriction of these tests is that detection can only be done when animals have the clinical presentation of the disease.⁵⁻⁷ A new sensitive and specific alternative for diagnosis of infectious diseases is now offered due to the advances in molecular biology, especially those regarding development of the polymerase chain reaction (PCR) assay.^{2,5-7}

Regarding ptb diagnosis by PCR, the most studied primers are those designed from the nucleotide sequence called insertion sequence 900 (IS900), Map specific.^{1,2,5,9-13} Erume *et al.*¹ designed a nested-PCR from the IS900 sequence, characterized by using two primer pairs: the design of the first one was based on a region of the IS900, an amplification product larger than 500 base pairs (bp) is obtained with it; the second one was designed from an internal region of the amplified product, the amplified product obtained with it is smaller than the original product, this increases test sensitivity and specificity. The objective of this work

Introducción

La paratuberculosis (ptb) o enfermedad de Johne es una enteritis granulomatosa que afecta a los rumiantes domésticos y silvestres.^{1,2} *Mycobacterium avium* subespecie paratuberculosis es el agente etiológico, actualmente se encuentra clasificado dentro del complejo *Mycobacterium avium-intracellulare* (Mai) *M. avium* subespecie avium, *M. avium* subespecie silvaticum, *M. avium* subespecie paratuberculosis (Map), *M. intracellulare*.³⁻⁵ La enfermedad es de curso crónico y se manifiesta principalmente en animales adultos de dos a tres años de edad; se caracteriza por pérdida progresiva de la condición corporal debido a que las lesiones que produce, localizadas en la mucosa del íleon, válvula ileocecal, ciego, colon proximal y linfonodos mesentéricos, desarrollan hipertrofia difusa de la mucosa del yeyuno e íleon, que adquieren una apariencia rugosa, lo que ocasiona mala absorción de los nutrientes.⁴ El bacilo se excreta en las heces de animales enfermos. En condiciones de campo, la enfermedad se transmite por la ingestión de alimentos y agua contaminados por las heces de animales infectados, éstos son la principal fuente de infección para el rebaño.⁴⁻⁸

El control de la enfermedad en los rumiantes domésticos depende de la detección oportuna y de la eliminación de los animales afectados. Esto último se ve limitado por falta de un diagnóstico adecuado.^{7,8} El cultivo bacteriológico a partir de heces se considera como prueba definitiva para la detección clínica y subclínica de ptb en los rebaños y hatos, pero tiene la limitante de que para su aislamiento se requiere de un periodo de ocho a 16 semanas; además de que Map es un microorganismo que necesita medios de cultivo enriquecidos (extracto de carne, peptonas, micobactina) para su crecimiento. La desventaja que presenta consiste en que si bien la especificidad del cultivo es de 100%, la sensibilidad es menor a 50%.^{1,2}

Otra alternativa en el diagnóstico de la ptb es el uso de pruebas serológicas, como el ensayo inmunoenzimático (ELISA), y la inmunodifusión en Agar Gel (IDGA); una de las limitantes de estas pruebas es que detecta a los animales hasta que presentan la fase clínica de la enfermedad.⁵⁻⁷ Con los avances en biología molecular, particularmente en el desarrollo de pruebas como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se ofrece una alternativa sensible y específica para el diagnóstico de enfermedades infecciosas.^{2,5-7}

Respecto del diagnóstico de ptb por PCR, los iniciadores que más se han estudiado son los diseñados a partir de la secuencia nucleotídica llamada secuencia de inserción 900 (IS900), específica de Map.^{1,2,5,9-13} Erume *et al.*¹ diseñaron una PCR-anidada a partir de la secuencia IS900, ésta se caracteriza por utilizar dos

was to establish paratuberculosis diagnosis in ovine by nested-PCR from fecal samples.

Material and methods

Samples

A total of 204 fecal samples were used for bacterial culture and nested-PCR, and 204 sera from the same ovine, that were older than 2 years of age, from farms located in Guanajuato, Jalisco and State of Mexico. Fecal samples were directly taken from the animal rectums. Sera were collected from the jugular vein with Vacutainer* tubes without anticoagulant.

Serological diagnosis

Sera were evaluated by duplicate throughout the agar gel immunodiffusion test with Map protoplasmic antigen (PPA-M3**). Test lectures were done at 24 and 48 hours.

Bacterial culture

Bacterial culture was done by the technique described by Payeur *et al.*¹³ Samples were inoculated by duplicate into Herrold culture medium with egg yolk enriched with or without mycobactin J*** (2 mg/L) and amphotericin (50 µg/mL) B† and incubated at 37°C for 20 weeks. Positive Map isolation was considered by growth time and development of bacterial colonies in culture media with mycobactin and Ziehl-Neelsen positive stain.¹³

Fecal DNA obtaining

Cell obtaining

Fecal DNA obtaining was achieved by the technique described by Garrido *et al.*,² where 2 g of feces were taken and dissolved during 15 minutes in 40 mL of 76% N-cetylpyridinium chloride* (HCP), left to rest for 18 hours. Then 20 mL of the solution were taken, centrifuged for 10 min at 300 g. The pellet was washed three times with 5 mL of phosphate buffer solution (PBS) and transferred to microtubes and centrifuged for 5 min at 14 000 g.

Cell lysis and DNA extraction

Cell lysis was done by the cooling/warming method.² The obtained pellet was transferred into cryotubes and resuspended in 500 µL of TE-Triton 100X (50 mM Tris, 10 mM EDTA, pH 8, 50 mM triton). Samples were located three times at -80°C in nitrogen for 5 min and

pares de iniciadores: el primero es diseñado con base en una región de la IS900, con él se obtiene un producto de amplificación mayor a 500 pares de bases (pb); el segundo fue diseñado de una región interna al producto amplificado, con él se obtiene un producto de amplificación más pequeño que el producto original, ello aumenta la sensibilidad y especificidad de la prueba. El objetivo del trabajo fue establecer el diagnóstico de paratuberculosis en ovinos mediante la PCR-anidada a partir de muestras de heces.

Material y métodos

Muestras

Se trabajaron 204 muestras de heces para el cultivo bacteriano y la PCR-anidada, y 204 sueros de los mismos ovinos, que fueron mayores de dos años, provenientes de explotaciones ubicadas en Guanajuato, Jalisco y Estado de México; las muestras de heces se tomaron directamente del recto de los animales. Los sueros fueron recolectados de la vena yugular con tubos Vacutainer* sin anticoagulante.

Diagnóstico serológico

Los sueros se evaluaron por duplicado mediante la prueba de inmunodifusión en agar gel con antígeno protoplasmático de Map (por sus siglas en inglés, PPA-M3**), las lecturas de la prueba se realizaron a las 24 y 48 horas.

Cultivo bacteriano

El cultivo bacteriológico se realizó mediante la técnica descrita por Payeur *et al.*,¹³ las muestras se inocularon por duplicado en el medio de cultivo Herrold con yema de huevo adicionado con y sin micobactina J*** (2 mg/L) y anfotericina B† (50 µg/mL), y se incubaron a 37°C durante 20 semanas. Se consideró aislamiento positivo a Map por tiempo de crecimiento y desarrollo de colonias bacterianas en medio de cultivo con micobactina y tinción Ziehl-Neelsen positiva.¹³

Obtención de ADN de heces

Obtención de células

La obtención del ADN de heces se llevó a cabo con la técnica descrita por Garrido *et al.*² Se tomaron 2 g de heces y se disolvieron durante 15 min en 40 mL de

*Becton Dickinson, Estados Unidos de América.

**Allied Monitor Inc., Estados Unidos de América.

***Allied Monitor Inc., Estados Unidos de América.

†Sigma Chemical Co., Estados Unidos de América.

in oven** at 100°C for 5 min. For DNA extraction 450 µL of guanidine isothiocyanate*** (5M) and 250 µL of ammonia acetate† (7.5 M pH 6.3) were added and located in ice for 15 min. Samples were transferred into microtubes and 500 µL of chloroform‡-isoamyl alcohol (24:1), were added twice, centrifuged for 5 min at 14 000 g and the 450 µL of isopropanol° were added to the aqueous phase and located at -20°C overnight. Then samples were centrifuged for 15 min at 14 000 g, washed two times with 1 mL of 70% ethanol and centrifuged for 5 min at 14 000 g. DNA was dried at room temperature and resuspended in 100 µL of miliQ water.

Nested PCR

The primers°° used were those described by Erume *et al.*,¹ ptb1 (5' TGA TCT GGA CAA TGA CGG TTA CGG A 3') and ptb4 (5'CGC GGC ACG GCT CTT GTT 3') from which a 563 bp amplification product is obtained. The ptb2 (5' GCC GCG CTG CTG GAG TTAA 3') and ptb3 (5' AGC GTC TTT GGC GTC GGT CTT G 3') primers were used for the second reaction that yielded a 210 bp amplification product.

For the first reaction, 3 µL (10 ng/µL) of DNA from the ovine feces were used, along with 5 µL of PCR buffer (67 mM/µL), 3 µL of 2 mM MgCl₂°°° (30 mM/µL), 1 µL 200 mM dNTP's^ each, 1 µL (25 pMol) of the ptb 1 and ptb 4 primers and 0.2 µL (1 U) of DNA thermostable polymerase^^ (5 U/µL) and 35.8 µL of miliQ water, at a final volume of 50 µL. Samples were processed in a thermocycler* with the following program: initial denaturalization at 95°C for 5 min, followed by 35 cycles at 95° C for 1 min, 65°C for 1 min and 72°C for 1 min, as well as the final extension at 72°C for 5 min.

For the second amplification, 3 µL of the first amplification were transferred to PCR microtubes that contained the same amount and concentration of the reactive solutions previously described, except for the ptb1 and ptb4 primers that were replaced by ptb 2 and ptb 3 primers. The same program was used in the thermocycler.** DNA from a Map strain (ATCC 19698) was include as positive control. Amplification products were visualized in 2% agarose gels stained with ethidium bromide.***

Results

The analyzed samples were collected from the herds without previous ptb diagnosis. These farms had records of cases of ovine older than two years of age with chronic wasting without response to antibiotic treatment, females that after lambing lost weight that did not recovered. It was also observed the appear-

cloruro de N-cetylpiridinio* (HCP) a 0.76%, se dejaron en reposo durante 18 horas, se tomaron 20 mL de la solución, se centrifugó durante 10 min a 300 g. A la pastilla obtenida se le realizaron tres lavados con 5 mL de solución amortiguadora de fosfatos (PBS). La pastilla fue transferida a microtubos y se centrifugó por 5 min a 14 000 g.

Lisis celular y extracción de ADN

La lisis celular se realizó con el método de enfriamiento-calentamiento.² La pastilla obtenida fue transferida a criotubos y resuspendida en 500 µL de TE- Tritón 100X (Tris 50 mM, EDTA 10 mM, pH 8; tritón 50 mM). Las muestras se colocaron tres veces a -80°C en nitrógeno durante 5 min y en horno** a 100°C por 5 min. Para la extracción de ADN se agregaron 450 µL de isotiocianato de guanidina*** (5M) y 250 µL de acetato de amonio† (7.5 M pH 6.3), y se colocaron en hielo durante 15 min. Las muestras se transfirieron a microtubos y se les adicionó en dos ocasiones 500 µL de cloroformo,‡ -alcohol isoamílico (24:1), se centrifugó durante 5 min a 14 000 g, y a la fase acuosa obtenida se le agregaron 450 µL de isopropanol° y se colocó a -20°C durante toda la noche. Se centrifugó durante 15 min a 14 000 g, se realizaron dos lavados con 1 mL de etanol a 70% y se centrifugó durante 5 min a 14 000 g, el ADN se secó a temperatura ambiente y se resuspendió en 100 µL de agua miliQ.

PCR anidada

Se utilizaron los iniciadores°° descritos por Erume *et al.*,¹ ptb1 (5' TGA TCT GGA CAA TGA CGG TTA CGG A 3') y ptb4 (5'CGC GGC ACG GCT CTT GTT 3') 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 CTG GAG TTA A 3') y ptb3 (5' AGC GTC TTT GGC GTC GGT CTT G 3'), con los que se obtuvo un producto de amplificación de 210 pb.

Para la primera reacción se utilizaron 3 µL (10 ng/µL) de ADN proveniente de heces de ovinos, 5 µL de amortiguador de PCR (67 mM/µL), 3 µL MgCl₂°°° 2mM (30 mM/µL), 1 µL dNTP's^ 200 mM c/u, 1 µL (25 pMol) de los iniciadores Ptb 1 y Ptb 4 y 0.2 µL (1 U) de ADN polimerasa^^ termoestable (5 U/µL)

*Sigma Chemical Co., Estados Unidos de América.

**Felisa HR, México.

***Sigma Chemical Co., Estados Unidos de América.

†Sigma Chemical Co., Estados Unidos de América.

‡Sigma Chemical Co., Estados Unidos de América.

°°Accsesolab, S.A. de C.V., México.

°°°Sigma Chemical Co., Estados Unidos de América.

^Gibco BRL Co., Estados Unidos de América.

^^Sigma Chemical Co., Estados Unidos de América.

ance of submandibular edema, suggesting malnutrition, and doughy feces in some animals. Results from the positive animals are depicted in Tables 1 and 2.

Serology

A well defined precipitation line between the antigen and serum wells was observed in 91 out of the 204 analyzed sera. Furthermore, identity with the positive control serum was present, and so sera were considered as positive to GAID. Since the line formation was not present in 113 sera, these samples were considered as negative to the test.

Bacterial culture

Seventeen Map isolations out of 204 analyzed samples were obtained. Bacterial colony growth was observed since the fifth incubation week. Acid-fast bacilli (AFB) were only seen in the medium enriched with mycobactin and Ziehl-Neelsen stain. These isolations corresponded to 17/91 samples from seropositive animals.

Nested-PCR

A 210 bp amplification product was observed in 61 out of 204 evaluated samples, corresponding to the one of Map IS900 (Figure 1). From these, 43 corresponded to GAID positive animals and 18 seronegative animals (Tables 2 and 3).

Discussion

Several diagnostic techniques have been developed and evaluated in order to achieve a better identification of ptb infected animals. Here ovine fecal samples were analyzed throughout bacterial culture, nested-PCR and GAID. Sixty-one out of the 204 animals used were positive by nested-PCR, and 17 Map strains were isolated by bacterial culture. This result agrees with the described by Erume *et al.*,¹ and Dimareli and Sarris,¹⁴ who detected a higher amount of ptb positive animals from feces, using nested-PCR, and lower quantity by culture. Bacterial culture from feces is considered as a confirmatory test for ptb diagnosis; nonetheless, it shows several limitations since the procedure requires media cultures enriched with mycobactin and eight to 16 weeks of incubation as minimum to achieve Map isolation.

Another problem shown in fecal culture is sample contamination with other microorganisms, as well as the growth difficulty of the ovine strains.^{5-8,15} Therefore, the amount of ovine detected by this method was low (Tables 1 and 2), besides, since at least 103 bacilli per mL of processed sample are required to

y 35.8 µL de agua miliQ, en un volumen final de 50 µL. Las muestras se trabajaron en un termociclador* 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, así como extensión final a 72°C por 5 min.

Para la segunda amplificación, 3 µL de la primera amplificación fueron transferidos a 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 (ATCC 19698). Los productos de amplificación fueron visualizados en geles de agarosa al 2% teñidos con bromuro de etidio.***

Resultados

Las muestras trabajadas procedían de rebaños en los que no se había realizado el diagnóstico de Ptb. En estas explotaciones se tenía como antecedente la presentación de casos de ovinos mayores de dos años con adelgazamiento crónico sin respuesta al tratamiento con antibióticos, hembras que después del parto adelgazaban y no recuperaban peso, además de que se observó aparición de edema submandibular sugerente de desnutrición, y heces pastosas en algunos animales. Los resultados de los animales que fueron positivos a las pruebas se muestran en los Cuadros 1 y 2.

Serología

De los 204 sueros evaluados, en 91 se observó una línea de precipitación bien definida entre el pozo del antígeno y el suero, además de que presentó identidad con el suero testigo positivo, por lo que fueron considerados como positivos a IDAG, y en 113 sueros no se presentó la formación de la línea de precipitación, por lo que fueron considerados como negativos a la prueba.

Cultivo bacteriológico

Se obtuvieron 17 aislamientos de Map de 204 muestras analizadas. Se observó crecimiento de colonias bacterianas a partir de la quinta semana de incubación; únicamente en los medios que fueron adicionados con micobactina y con la tinción Ziehl-Neelsen se observaron bacilos ácido-alcohol resistentes (BAAR).

*PCR Sprint1, Termo Electron, Co., Estados Unidos de América.

**PCR Sprint1, Termo Electron, Co., Estados Unidos de América.

***Sigma Chemical Co., Estados Unidos de América.

Cuadro 1

RESULTADOS DE LAS PRUEBAS DE INMUNODIFUSIÓN EN AGAR GEL (IDAG), CULTIVO BACTERIOLÓGICO Y PCR-ANIDADO DE MUESTRAS DE HECES DE OVINOS
RESULTS OF THE GEL AGAR IMMUNODIFFUSION TESTS (GAID), BACTERIAL CULTURE AND NESTED-PCR OF FECAL OVINE SAMPLES

	<i>Positive</i>	<i>Negative</i>
Map bacteriology	17/204	187/204
GAID	91/204	113/204
Nested-PCR	61/204	143/204

Cuadro 2

RESULTADOS DE LAS PRUEBAS DE CULTIVO BACTERIOLÓGICO Y PCR-ANIDADA DE MUESTRAS DE HECES DE OVINOS DE ANIMALES QUE FUERON POSITIVOS Y NEGATIVOS A INMUNODIFUSIÓN EN AGAR GEL (IDAG)
RESULTS OF THE BACTERIAL CULTURE AND NESTED-PCR TESTS OF FECAL OVINE SAMPLES FROM ANIMALS THAT WERE POSITIVE AND NEGATIVE TO GEL AGAR IMMUNODIFFUSION (GAID)

	<i>GAID positive</i>		<i>GAID negative</i>	
	+	–	+	–
Map bacteriology	17/91	74/91	0/143	143/143
Nested-PCR	43/91	48/91	18/143	125/143

ensure growth,¹⁶⁻¹⁹ its sensitivity can reach 25.4%.¹⁴ Nested-PCR is capable of detecting viable and non-viable bacteria, which was evident in the study because 43/91 (47.25%) seropositive animals and 18/113 (15.9%) negative to GAID were detected, whereas bacterial culture only yielded 17/204 (8.33%) isolations. This result is attributed to the fact that throughout bacteriology only viable bacteria, able to develop in culture media, are detected. It must be added to the previous statement that nested-PCR results can be obtained in three or four days,^{1-3,5,6,11-26} which represents a time advantage when compared to bacterial isolation.

Serological diagnosis for ovine ptb is done by GAID test, with a sensitivity that can vary from 70% to 80% and 100% specificity.^{6,21,22,24} Because GAID has the advantage of being easy and quick to test complete herds, it was used to determine the presence of antibodies against Map in this study, in which 44.6% (91/204) of the evaluated animals were GAID positive. A total of 47.25% (43/91) of the animals were positive for both GAID and nested-PCR, and in only 17/91 (18.68%) Map isolations were achieved (Table 2). These data reflect that ovine, besides presenting detectable anti-

Estos aislamientos correspondieron a 17/91 muestras de animales con serología positiva.

PCR-anidada

Se visualizó un producto de amplificación de 210 pb que corresponde a la IS900 de Map (Figura 1), en 61 de las 204 muestras evaluadas. De éstas, 43 correspondían a animales positivos a IDAG y 18 animales negativos a la serología (Cuadros 2 y 3).

Discusión

Diversas técnicas diagnósticas se han desarrollado y evaluado con el propósito de lograr mejor identificación de los animales infectados con Ptb. Aquí se probaron muestras de heces de ovinos usando el cultivo bacteriológico, la PCR-anidada y la IDAG. De los 204 animales con los que se trabajó, 61 fueron positivos a PCR anidada, y con el cultivo bacteriológico se lograron aislar 17 cepas de Map. Este resultado coincide con lo descrito por Erume *et al.*¹ y Dimareli y Sarris,¹⁴ quienes detectaron mayor cantidad de animales positivos a Ptb a partir de heces, utilizando la PCR-anidada, y

Cuadro 3

PORCENTAJE DE OVINOS POSITIVOS Y NEGATIVOS A *Mycobacterium avium* SUBESPECIE paratuberculosis MEDIANTE LAS PRUEBAS DE INMUNODIFUSIÓN EN AGAR GEL (IDAG) Y REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR-ANIDADA)
 PERCENTAGES OF POSITIVE AND NEGATIVE OVINE TO *Mycobacterium avium* SUBSPECIES paratuberculosis, BY GEL AGAR IMMUNODIFFUSION (GAID) AND POLYMERASE CHAIN REACTION (NESTED-PCR)

AGID	(+)		(-)		Total
	N	%	N	%	
n-PCR (+)	43	47.25	18	15.9	61
(-)	48	52.75	95	84.1	143
Total	91	100	113	100	204

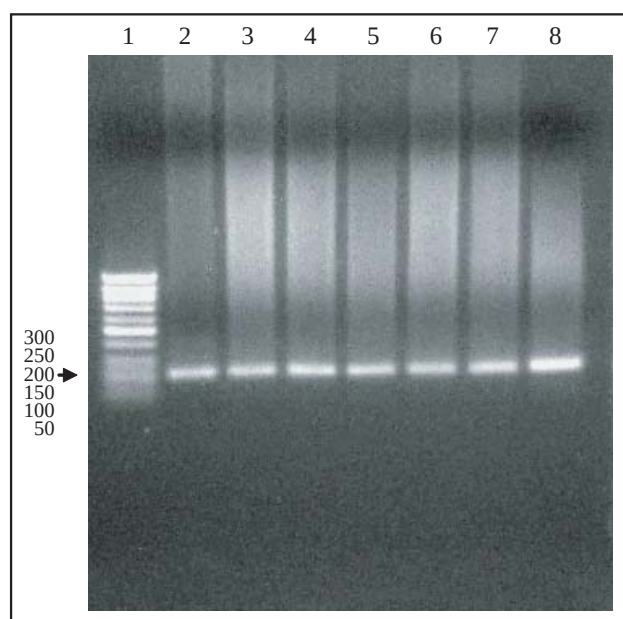


Figura 1: PCR-anidada realizada a partir del ADN genómico obtenido de heces de ovinos. Amplificación de fragmento de 210 pb de la IS900 de Map. Carril: 1) Marcador de tamaño molecular 50 pb; 2) Map (ATCC 19698); 3) 15; 4) 35; 5) 868; 6) 3708; 7) 77; 8) 29.

Figure 1: Nested-PCR done from genomic DNA from ovine feces. Amplification of the 210 bp fragment of the IS900 of Map. Lane: 1) Molecular size marker 50 bp; 2) Map (ATCC 19698); 3) 15; 4) 35; 5) 868; 6) 3708; 7) 77; 8) 29.

bodies by GAID, are shedding the bacilli at the same time in feces, because the presence and quantity of antibodies against Map antigens are directly related to the bacterial load and its elimination.^{1,2,6,10}

Bacillus excretion is also considered as intermittent, whereas there are animals that eliminate huge amounts of bacilli by feces, there are other animals that are sporadic shedders.^{20,27-29} Because of this, 52.75 % (48/91) of the seropositive ovine, that were negative to nested-PCR (Table 2), could be bacterial

menor cantidad mediante el cultivo. El cultivo bacteriológico de heces es considerado como prueba confirmatoria para el diagnóstico de Ptb, pero presenta diversas limitantes, pues el procedimiento requiere de medios de cultivo enriquecidos con micobactina y ocho a 16 semanas de incubación como mínimo para obtener el aislamiento de Map.

Otro problema que se presenta con el cultivo a partir de heces es la contaminación de la muestra con otros microorganismos, así como la dificultad con la que crecen las cepas de origen ovino,^{5-8,15} por ello fueron pocos los ovinos detectados con este método (Cuadros 1 y 2), además de requerir de por lo menos 103 bacilos por mL de muestra procesada para asegurar el crecimiento,¹⁶⁻¹⁹ por lo que su sensibilidad puede llegar a 25.4%.¹⁴ La PCR-anidada es capaz de detectar bacterias viables y no viables, lo cual se hizo evidente en el trabajo, ya que se lograron detectar 43/91 (47.25%) animales con serología positiva y 18/113 (15.9%) fueron negativos a IDAG, mientras que con el cultivo bacteriano sólo se obtuvieron 17/204 (8.33%) aislamientos; este resultado se atribuye a que con la bacteriología solamente se detectaron las bacterias viables capaces de desarrollarse en el medio de cultivo. A lo anterior se debe añadir el hecho de que los resultados con la PCR-anidada se pueden obtener en tres o cuatro días,^{1-3,5,6,11-26} lo que representa ventaja de tiempo en comparación con el aislamiento bacteriológico.

El diagnóstico serológico de ptb en ovinos se realiza con la prueba IDAG, con sensibilidad que puede variar de 70% a 80% y especificidad de 100%.^{6,21,22,24} La IDAG tiene la ventaja de ser sencilla y rápida para probar rebaños completos, por lo que en este trabajo constituyó la prueba utilizada para determinar la presencia de anticuerpos contra Map, en la que 44.6% (91/204) de los animales evaluados resultaron posi-

sporadic shedders; considering this, when sample was taken animals were not shedding the microorganism, or were doing it in low amounts.^{2,7,21,23}

Regarding 15.9% (18/113) of the ovine positive by nested-PCR and not detected by GAID (Table 2), it is considered that it might be caused by a lack of detectable antibodies, since GAID tests need the presence of a large quantity of antibodies to express gel precipitation. Sometimes GAID negative animals might be positive by PCR or culture, due to the fact that in these animals the humoral immune response decreases when the cellular response increases. This occurs in the subclinical phase of the infection. Another reason for affected antibody production is the lost of immune response due to the infection. This suppressing activity, called anergy, presents when animals are old or the infection is in its final stage. However, it is considered that such animals might be shedding the bacillus and are not detected by serological tests.^{21,24,29}

When a PCR test is used on DNA from pure bacterial strains, sensitivity is 100%, but when DNA from biological samples is used, from feces in this case, sensitivity may be reduced by the presence of inhibitors, such as epithelial cells, blood, bile salts, vegetable components and complex carbohydrates, which removal still represents the highest challenge to improve sensitivity.^{1,2,5-7,14,17,20-27}

Since obtaining DNA free from reaction inhibitors is a key point for PCR diagnosis. Several extraction techniques by enzymes and commercial kits have been evaluated.^{5,6,12,26,27} Even though they represent advantages for obtaining good quality DNA, cost per sample is high. The extraction technique used in this work (Garrido *et al.*)² can be considered as a technique of low cost per sample and easy to adapt and apply in the laboratory. The first step is concentrating the cells and breaking them by physical means, then the genetic material is extracted and purified by a chemical method.

The aforementioned technique allowed obtaining good quality DNA to be used in nested-PCR, achieving the identification of 61 animals that were shedding bacilli by feces. Results confirm that ptb diagnosis by nested-PCR should be considered as a useful alternative when quick diagnosis is required, that will allow knowing the heard sanitary state, useful when a control program for the disease is applied inside the herd. It is also adequate before the introduction of new animals to a farm, that represent a sanitary risk. The PCR test used in this study makes possible to detect animals shedding bacilli by feces and that would stay in the farm by being seronegative, becoming the main source of infection to the herd.

Using two diagnostic techniques might be convenient when disease control in herds is the objective: a

tivos a la IDAG. El 47.25% (43/91) de los animales resultaron positivos a IDGA y a PCR-anidada, y sólo en 17/91 (18.68%) se logró aislamiento de Map (Cuadro 2). Estos datos reflejan que los ovinos, además de presentar anticuerpos detectables por IDAG, al mismo tiempo estaban eliminando el bacilo en heces; debido a que la presencia y cantidad de anticuerpos contra los antígenos de Map están directamente relacionados con el número de bacterias presentes y con su eliminación.^{1,2,6,10}

También se considera que la excreción del bacilo es de forma intermitente, así como existen animales que eliminan grandes cantidades de bacilos por heces, otros animales son excretores esporádicos,^{20,27-29} por lo que 52.75% (48/91) de los ovinos positivos a serología, que resultaron negativos a PCR-anidada (Cuadro 2), podrían ser excretores esporádicos de la bacteria, por tal razón, al momento de la toma de la muestra no se encontraban excretando el microorganismo, o lo hacían en baja cantidad.^{2,7,21,23}

Respecto del 15.9% (18/113) de los ovinos que resultaron positivos a la PCR-anidada y que no fueron detectados por la IDAG (Cuadro 2), se considera que pudo deberse a la falta de anticuerpos detectables, ya que las pruebas de inmunodifusión en agar necesitan la presencia de gran cantidad de anticuerpos para expresar la precipitación en el gel. En ocasiones, los animales negativos a inmunodifusión pueden resultar positivos a PCR o al cultivo bacteriológico, debido a que en estos animales la respuesta inmune humoral disminuye cuando la respuesta celular aumenta; esto sucede en la etapa subclínica de la infección. Otra razón por la cual la producción de anticuerpos resulta afectada es la pérdida de respuesta inmune ante la infección; esta actividad supresora, llamada anergia, se presenta cuando los animales son viejos o la infección está en su etapa final. Sin embargo, se considera que tales animales pueden estar eliminando el bacilo y no son detectados con el diagnóstico serológico.^{21,24,29}

Se sabe que cuando se utiliza una prueba de PCR con ADN obtenido de cepas bacterianas puras, la sensibilidad es de 100%, pero al utilizar ADN de muestras biológicas, en este caso heces, la sensibilidad puede verse reducida por la presencia de inhibidores, como las células epiteliales, la sangre, las sales biliares, componentes de vegetales y los carbohidratos complejos, cuya remoción aún representa el mayor reto para mejorar la sensibilidad.^{1,2,5-7,14,17,20-27}

Un punto que se considera importante para el diagnóstico por la PCR a partir de heces, es obtener ADN libre de inhibidores de la reacción, por lo que se han evaluado diversas técnicas de extracción con enzimas y paquetes comerciales,^{5,6,12,26,27} que si bien presentan ventajas para obtener ADN de buena calidad, el costo por muestra es alto. La técnica de extracción utili-

serological test, such as AGID, and another assay that detects *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis in feces, as nested-PCR. In this way animals with paratuberculosis would be identified more efficiently.

Acknowledgements

This work was partially financed by Sectorial Funds of the National Council for Science and Technology in Mexico, as well as by the Agricultural, Animal Production, Food and Fishery Department, with the code 2003-002-140.

Dr. Manuel Delgado Estrella and MVZ Fernando Miranda are thanked, along with the technical personnel of the GGAVATTS-ovine groups of Guanajuato, for their support on sampling in herds.

Referencias

1. Erume J, Spengler J, Rosengarten R. Rapid detection of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis from cattle and zoo animals by Nested PCR. *Afr Health Sci* 2001; 1:83 – 89.
2. Garrido JM, Cortabarria N, Oguiza JA, Aduriz G, Juste RA. Use of PCR method on fecal samples for diagnosis of sheep paratuberculosis. *Vet Microbiol* 2000; 77: 379-386.
3. Collins DM, De Zoete M, Cavaignac M. *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis strains from cattle and sheep can be distinguished by PCR test based on a Novel DNA sequence difference. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 4760-4762.
4. Clark CJ, Little D. The pathology of ovine paratuberculosis: Gross and histological changes in the intestine and others tissues. *J Comp Pathol* 1996; 114: 419-427.
5. Christopher-Hennings J, Dammen MA, Weeks SR, Epperson WB, Singh SN, Steinlicht GL *et al.* Comparison of two DNA extractions and Nested PCR, Real time PCR, a new commercial PCR assay, and bacterial culture for detection of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis in bovine feces. *J Vet Diagn Invest* 2003; 15: 87-93.
6. Gwozdz JM, Reichel MP, Murray A, Manketelov W, West DM, Thompson KG. Detection of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis in ovine tissues and blood by polymerase chain reaction. *Vet Microbiol* 1997; 51: 233-244.
7. Harris B, Barletta RG. *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis in Veterinary Medicine. *Clin Microbiol Rev* 2001; 14: 489-512.
8. Valentin-Weigand P. Johne's disease: pathogenesis and problems related to diagnosis (Recent developments and perspectives in bovine medicine). XXII World Buiatrics Congress; 2002 August 18-23; Hannover (Germany). Hannover (Germany): World Association of Buiatrics, 2002:48-57.
9. Chavez-Gris G, Trigo TF, Svastova P, Pavlik I. Genetic polymorphism identification from *Mycobacterium avium*

subspecies paratuberculosis in goats in central Mexico. *Vet Mex* 2004; 35: 75-82.

Lo anterior permitió obtener ADN de buena calidad para ser empleado en la PCR-anidada, con lo que se logró identificar a 61 animales que estaban eliminando el bacilo por heces. Los resultados confirman que el diagnóstico de ptb por medio de PCR-anidada se debe considerar como alternativa de utilidad cuando se requiere de un diagnóstico rápido, que servirá para conocer el estado sanitario del rebaño, ello es útil cuando se instrumenta un programa de control de la enfermedad dentro del hato; también es adecuado antes de introducir nuevos animales a una explotación en la que representan un riesgo sanitario. La prueba de PCR utilizada en este estudio permite detectar animales que excretan el bacilo por heces y que, al resultar negativos a la prueba serológica, permanecerían dentro de la granja, convirtiéndose en la principal fuente de infección para el rebaño.

Para fines de control de la enfermedad en los rebaños, será conveniente realizar el diagnóstico por lo menos con dos técnicas, una prueba serológica como la IDGA y otra prueba que detecte a *Mycobacterium avium* subespecie paratuberculosis en las heces, como la PCR-anidada, de esta forma se identificará más eficientemente a los animales con paratuberculosis.

Agradecimientos

Este trabajo fue financiado parcialmente por Fondos Sectoriales del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, de México, así como por la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Alimentación y Pesca, con clave 2003-002-140.

Se agradece al Dr. Manuel Delgado Estrella, al MVZ Fernando Miranda y a los técnicos de los grupos GGAVATTS-ovinos de Guanajuato, las facilidades que proporcionaron para la toma de muestras en los rebaños.

-
- subspecies paratuberculosis in goats in central Mexico. *Vet Mex* 2004; 35: 75-82.
 10. Cocito C, Gilot P, Coene M, De Kesel M, Poupart P, Vannuffel P. Paratuberculosis. *Clin Microbiol Rev* 1994; 7: 328-345.
 11. Vary TH, Andersen PR, Green E, Hermon-Taylor J, Mc Fadden. Use of highly specific DNA probes and the Polymerase Chain Reaction to detect *Mycobacterium paratuberculosis* in Johne's disease. *J Clin Microbiol* 1990; 28: 933-937.
 12. Pavlik I, Matlova L, Bartl J. Parallel faecal and organ

- Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis culture of different productivity types of cattle. Vet Microbiol 2000; 77: 309-324.
13. Payeur B, Jarnagin L, Marquardt G, Schaper A, Martín M. Manual of laboratory methods in veterinary mycobacteriology for the isolation and identification of *Mycobacterium*. Ames, Iowa: United States Department of Agriculture, Animal and Plant Health Inspection Service. Veterinary Services. NSLV, 1993.
 14. Dimareli M, Sarris K. Comparison of DNA probe test and cultivation methods for detection of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis in caprine and ovine faeces. Aust Vet 2001; 79: 47-50.
 15. Valentin-Weigand P, Goethe R. Pathogenesis of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis infection in ruminants: still more question than answers. Microbes Infect 1999; 1: 1121-1127.
 16. Ikonomopoulos J, Gazouili M, Pavlik I, Bartos M. Comparative evaluation of PCR assays for the robust molecular detection of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis. J Microbiol Method 2004; 56:315-321.
 17. Cortabarria N, Oguiza JA, Aduriz G, Juste RA. Use of a PCR method on fecal samples for diagnosis of sheep paratuberculosis. Vet Microbiol 2000; 77: 379-386.
 18. Romero TA. Asociación de la excreción de *Mycobacterium bovis* con la respuesta inmune específica en un hato de alta prevalencia (tesis de maestría). México D F: UNAM 2003.
 19. Buergelt CD, Williams JE. Nested PCR on blood and milk, for detection of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis DNA in clinical and subclinical bovine paratuberculosis. Aust Vet J 2004; 82 (8): 497-503.
 20. Collins DM, Stephens DM, de Lisle. Comparasion of polymerase reactions tests and feacal culture for detecting *Mycobacterium paratuberculosis* in bovine faeces. Vet Microbiol 1993; 36: 289-299.
 21. Sweeney R. Paratuberculosis (Johne's Disease). Vet Clin North Am Food Anim Pract 1996; 12 (2): 305-452.
 22. Blood DC, Radostits OM, Gay CC, Hincholiff KW. Medicina Veterinaria. Tratado de las enfermedades del Ganado bovino, ovino, porcino, caprino y equino. En: Henderson JA, Arundel JH, editores. Enfermedades ocasionadas por especies del género *Mycobacterium*. 9ª ed. Barcelona España: McGraw-Hill Interamericana, 2002; 1088-1103.
 23. Taddei S, Robbi C, Cesena C, Rossi I, Schiano E. Detection of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis in bovine fecal samples: comparison of three polymerase chain reaction-based diagnostic test with a conventional culture method. J Vet Diagn Invest 2004; 16: 503-508.
 24. Toman M, Faldyna M, Pavlik I. Immunological characteristics of cattle with *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis infection. Vet Med. 2003. 48 (6): 147-154.
 25. Ramirez CIC, Santillan FMA, Arellano RB, Morales AF, Tenorio GVR. Detection of *Mycobacterium bovis* nucleotide sequences from nasal mucus of experimentally inoculated goats. Vet Mex 2006; 37: 191-196.
 26. Stabel JR, Bosworth TL, Kirkbride TA, Forde RL, Whitlock RH. A simple, rapid, and effective method for the extraction of *Mycobacterium paratuberculosis* DNA from fecal samples for Polymerase Chain Reaction. J Vet Diagn Invest 2004; 16: 22-30.
 27. Stabel JR, Bannantine JP. Develoment of Nested PCR Method targeting a unique multicopy element, ISMap02, for detection of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis in fecal samples. J Clin Microbiol 2005; 43: 4744-4750.
 28. Soto JP, Kruze J, Leiva S. Aislamiento de *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis de heces en rebaños lecheros infectados mediante el método de Cornell modificado. Arch Med Vet 2002; 34(2):1-5.
 29. Whittington RJ, Fell S, Walter D, Mcallister M, Marsh I, Sergeant E *et al.* Use of pooled fecal culture for sensitive and economic detection of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis infection in flocks of sheep. J Clin Microbiol 2000; 38: 2550-2556.