

# Desarrollo de un inmuno-ensayo enzimático (ELISA) para el diagnóstico de paratuberculosis en bovinos

## Development of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the diagnosis of bovine paratuberculosis

Adriana Guadalupe Martínez Covarrubias<sup>a</sup>, Marco Antonio Santillán Flores<sup>b</sup>, Claudia Celic Guzmán Ruiz<sup>c</sup>, Lucía del Carmen Favila Humara<sup>b</sup>, Dionicio Córdova López<sup>b</sup>, Efrén Díaz Aparicio<sup>b</sup>, Laura Hernández Andrade<sup>b</sup>, Miguel Ángel Blanco Ochoa<sup>a</sup>

### RESUMEN

Los objetivos del trabajo fueron estandarizar y desarrollar un ELISA con antígeno protoplasmático obtenido de una cepa de *Mycobacterium avium paratuberculosis* (Map) 3065 de origen ovino, para el diagnóstico de paratuberculosis en bovinos. El antígeno se fijó en las placas a concentraciones de 10, 5, 2.5 y 1.25  $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$  y se probaron diluciones de los sueros control positivo y negativo de 1:20, 1:40, 1:80 y 1:160. El punto de corte se estableció con un intervalo de confianza del 95 % y dos desviaciones estándar. Para determinar la sensibilidad y especificidad del ELISA se trabajó con 491 sueros de bovinos, así como también, se colectaron muestras de heces para efectuar el aislamiento bacteriológico, y la prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) anidada para la detección de Map. Los resultados de las tres pruebas fueron analizadas para determinar la asociación o concordancia por medio de una prueba de Kappa La concentración de antígeno y suero que dieron mejor diferencia entre los controles fue de 1.25  $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$  antígeno y la dilución del suero 1:160, el punto de corte se estableció a una densidad óptica de 0.196; la sensibilidad que se obtuvo fue 79.31 %, la especificidad 82.25 % y el índice de concordancia de 0.2763 del ELISA con respecto al cultivo. Los resultados obtenidos permiten recomendar el ELISA con antígeno protoplasmático de la cepa de Map 3065, como una alternativa para el diagnóstico de la paratuberculosis en bovinos.

**PALABRAS CLAVE:** Paratuberculosis bovina, ELISA, Antígeno protoplasmático, *Mycobacterium avium paratuberculosis*.

### ABSTRACT

The objective of this study was to standardize and develop an ELISA with protoplasmatic antigen from a *Mycobacterium avium paratuberculosis* (Map) 3065 strain obtained from sheep, to be used for the diagnosis of bovine paratuberculosis. The antigen was set on plates at 10, 5, 2.5 and 1.25  $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$  concentrations and 1:20, 1:40, 1:80 and 1:160 dilutions of positive and negative control sera were tested. The cutoff point was established with a confidence interval of 95% and two standard deviations. Four-hundred and ninety-one bovine sera were used to establish sensitivity and specificity of the ELISA; likewise feces samples were collected for bacteriological isolation and the nested polymerase chain reaction test (PCR) was applied for Map detection. Results of the three tests were analyzed by kappa test to determine association or concordance. Antigen and sera concentration that gave the best difference between controls was 1.25  $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$  antigen and 1:160 serum dilution, cutoff point was established at an optic density of 0.196; obtained sensitivity was 79.31 %, while specificity was 82.25 % and concordance index of the ELISA was 0.2763 as compared to the culture. Results obtained by ELISA with protoplasmatic antigen of the Map 3065 strain make the recommendation of this assay appropriate as an alternative for the diagnosis of bovine paratuberculosis.

**KEY WORDS:** Bovine paratuberculosis, ELISA, Protoplasmatic antigen, *Mycobacterium avium paratuberculosis*.

Recibido el 16 de diciembre de 2010. Aceptado el 8 de abril de 2011.

<sup>a</sup> Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México.

<sup>b</sup> CENID-Microbiología. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), carretera México Toluca km. 15.5, Colonia Palo alto. Delegación Cuajimalpa 05110. Tel. 55 36 18 08 00 ext. 49 santillan.marco@inifap.gob.mx, mayco1768@yahoo.com.mx. Correspondencia al segundo autor.

<sup>c</sup> Campo Experimental Bajío, INIFAP.

## INTRODUCCIÓN

La paratuberculosis (ptb) o enfermedad de Johne, es una enteritis granulomatosa de curso crónico que afecta a rumiantes domésticos (bovinos, ovinos, caprinos), así como también a antílopes, camellos, llamas y otras especies animales. Su distribución es mundial y su prevalencia varía de 5 a 25 %<sup>(1)</sup>.

El agente causal es *Mycobacterium avium paratuberculosis* (Map). Es un bacilo ácido-alcohol resistente cuya característica la confiere su compleja pared celular, la cual es relativamente resistente al agua y rica en ácidos micólicos, peptidoglicano y arabinogalactano. El bacilo está clasificado dentro del complejo *Mycobacterium avium-intracelullare* (*M. avium* subsp. *avium*, *M. avium paratuberculosis*, *M. avium silvaticum* y *M. intracelullare*) y se diferencia de las otras subespecies del complejo por su dependencia a micobactina para su crecimiento *in vitro*, y la estimulación de su crecimiento con piruvato<sup>(2,3,4)</sup>.

Los animales clínicamente enfermos excretan en forma masiva al bacilo en el excremento, la concentración bacteriana en materia fecal puede sobrepasar valores de  $10^8$  unidades formadoras de colonia (UFC)/g<sup>(5)</sup>, siendo ésta la principal fuente de infección para los animales; otra forma en la que los animales se llegan a infectar es durante la lactancia, por la eliminación directa del microorganismo a través de la leche y calostro, además de la contaminación de la ubre con heces<sup>(2,6)</sup>.

La infección por Map, usualmente ocurre en los primeros meses de vida de los animales, pero los signos clínicos se observarán después de un largo periodo de incubación y generalmente aparecen entre los dos y cinco años de edad. A este largo periodo de incubación se le atribuye el difícil control de la enfermedad, ya que los animales con infección subclínica comienzan a excretar la micobacteria en las heces antes de progresar al estado terminal de la enfermedad<sup>(6)</sup>.

Los signos que se observan son diarrea (al principio intermitente, más tarde permanente), pérdida de la condición corporal aunque el apetito se mantiene,

## INTRODUCTION

Paratuberculosis (ptb) or Johne's disease is a chronic granulomatous enteritis that affects domestic ruminants (cattle, sheep and goats), as well as antelopes, camels, llamas and other animal species. Its worldwide distribution and prevalence varies from 5 to 25 %<sup>(1)</sup>.

*Mycobacterium avium paratuberculosis* (Map) is the causative agent. It is a resistant acid-alcohol bacillus, whose characteristic is conferred by its complex cell wall, which is relatively resistant to water and rich in mycolic acids, peptidoglycan and arabinogalactan. This bacillus is classified within the *Mycobacterium avium-intracelullare* complex (*M. avium* subsp. *avium*, *M. avium paratuberculosis*, *M. avium silvaticum* and *M. intracelullare*) and differentiates from other subspecies of the complex because of its mycobactin- dependency for *in vitro* growth and growth stimulation by pyruvate<sup>(2,3,4)</sup>.

Clinically sick animals excrete massive quantities of bacillus in feces, bacterial concentration in feces may surpass  $10^8$  values of colony forming units (CFU)/g<sup>(5)</sup>, being this the main source of infection in animals; other ways in which animals may become infected is during lactancy, by direct elimination of the microorganism through milk and colostrum, besides udder contamination with feces<sup>(2,6)</sup>.

Map infection usually occurs in the first months of the animals' life, but clinical signs are observed after a long period of incubation and generally appear between two and five years of age. The difficult control of this disease may be attributed to this long period of incubation, since animals with subclinical infection start to excrete the mycobacteria in feces before progressing to the terminal stage of the disease<sup>(6)</sup>.

The signs observed are: diarrhea (intermittent at the beginning, then permanent), loss of body condition with stable appetite; milk production decrease and submaxilar and ventral edema caused by hypoproteinemia. It is estimated that by each clinical case there are 25 subclinical cases; hence the importance of counting with diagnostic tests that can detect infected animals<sup>(7)</sup>.

disminución de la producción láctea y edema submandibular y ventral causado por hipoproteinemia. Se estima que por cada caso clínico hay 25 casos subclínicos; de ahí la importancia de contar con pruebas de diagnóstico que puedan detectar a los animales infectados<sup>(7)</sup>.

No se puede afirmar en forma definitiva si Map puede ser considerado un agente zoonótico, ya que su participación en la etiología y patogénesis de la enfermedad de Crohn es un tema de intenso debate<sup>(8)</sup>.

El perfil inmunológico a la infección por Map consiste en una respuesta mediada por células durante la etapa subclínica y una respuesta de tipo humoral durante la etapa clínica de la enfermedad<sup>(1,2,6,8)</sup>. Las pruebas basadas en la detección de la respuesta inmune humoral no resultan factibles durante etapas tempranas de la infección (fase subclínica) porque no se producen anticuerpos contra Map<sup>(9)</sup>, pero en animales clínicamente afectados su sensibilidad y especificidad son relativamente altas<sup>(10)</sup>.

El diagnóstico de la ptb por medio del ensayo inmuno-enzimático o ELISA (por sus siglas en inglés) se ha utilizado para la detección de ptb, principalmente en bovinos, ovinos y caprinos; generalmente el antígeno que se ha empleado para realizar el ensayo se obtiene de una cepa de Map, la cual ha sido evaluada como antígeno sonicado y filtrado cepa 19698 TTCC<sup>(8)</sup>, células completas inactivadas con formaldehído, antígenos de superficie, cepa Linda<sup>(9,11)</sup>, antígeno protoplasmático cepa 18<sup>(3,12)</sup>, y proteínas de secreción temprana cepa JTC 303<sup>(13)</sup>; la sensibilidad obtenida con los diferentes antígenos varía de 8.9 a 32.1 % en animales que eliminan bajas cantidades de bacilos en el excremento, y del 30 al 95 % animales que eliminan una mayor cantidad<sup>(8,11,12)</sup>. Actualmente existen paquetes comerciales para realizar el diagnóstico de ptb, pero se tiene el inconveniente que son de importación y su precio es elevado, razón por lo cual no se lleva a cabo el diagnóstico de forma rutinaria en los laboratorios de salud animal en México.

La ptb ocasiona importantes pérdidas económicas a la industria pecuaria, por lo que es indispensable el

It can not be definitively affirmed if Map can be considered as a zoonotic agent, since its participation in the etiology and pathogenesis of Crohn's disease is a theme of intense debate<sup>(8)</sup>.

The immunological profile of Map infection consists of a cell-mediated response during subclinical stage and a humoral response during the clinical stage of the disease<sup>(1,2,6,8)</sup>. Tests based on the detection of humoral immune response are not feasible during early stages of infection (subclinical stage) because there are no antibodies against Map<sup>(9)</sup>, but in clinically affected animals their sensitivity and specificity are relatively high<sup>(10)</sup>.

The diagnosis of ptb by means of enzyme-linked immunosorbent assay or ELISA has been used for detection of ptb, mainly in cattle, sheep and goats; generally, the antigen that has been used to carry out the assay is obtained from a Map strain, which has been evaluated as filtered sonicated antigen strain ATCC 19698<sup>(8)</sup>, complete cells inactivated with formaldehyde, surface antigens, Linda strain<sup>(9,11)</sup>, protoplasmatic antigen strain 18<sup>(3,12)</sup>, early secreted proteins based on the JTC303 strain<sup>(13)</sup>; the sensitivity obtained with the different antigens varies from 8.9 to 32.1% in animals that excrete low quantities of bacillus in feces and from 30 to 95 % in animals that excrete greater quantity<sup>(8,11,12)</sup>. Currently, there are commercial kits for diagnosing ptb, but they have the disadvantage of being imported and expensive, reason why the diagnosis is not routinely conducted in animal health laboratories in Mexico.

Paratuberculosis causes great economic losses to agricultural industry, for which it is indispensable to count with diagnostic tests to detect infected animals and be able to establish necessary control measurements. The aim of the study was to develop and standardized an ELISA for ptb diagnosis in cattle, using a protoplasmatic antigen of national origin Map strain 3065.

## MATERIAL AND METHODS

### *Antigen elaboration*

The protoplasmatic antigen was obtained from a *Mycobacterium avium paratuberculosis* strain 3065,

contar con pruebas diagnósticas para detectar a los animales infectados y poder establecer las medidas de control necesarias; el objetivo del trabajo fue desarrollar y estandarizar un ELISA para el diagnóstico de ptb en bovinos, empleando un antígeno protoplasmático de Map cepa 3065 de origen nacional.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### *Elaboración del antígeno*

El antígeno protoplasmático se obtuvo de un aislamiento de *Mycobacterium avium paratuberculosis* cepa 3065, proveniente de excremento de un caso clínico de ovino. La cepa se inoculó en medio líquido de Proskawer y Beck adicionado con micobactina (2 mg/L) y se incubó a 37 °C por ocho semanas. Las bacterias se concentraron por centrifugación a 900 xg durante 10 min, se lavaron tres veces con solución amortiguadora de fosfatos pH 7.2, 1M (PBS), y fueron sonicadas (Ultra Soni Procesor) durante 20 ciclos de 59 seg cada uno; el material obtenido fue centrifugado a 900 xg durante 90 min y el sobrenadante se dializó a 4 °C en una membrana de celulosa (21 a 33 mm de diámetro promedio) (Sigma-Aldrich) durante 18 h, el dializado fue congelado a -170 °C durante 2 h, para posteriormente liofilizarlo. La concentración de proteína se determinó utilizando el paquete comercial *Micro BCA Protein Assay Reagent Kit*<sup>®</sup> y se comparó con la concentración de proteína del antígeno PPA-3 (Paratuberculosis Protoplasmic Antigen, Allied Monitor Inc<sup>®</sup>) de Map<sup>(14)</sup>.

### *Estandarización del ELISA*

El antígeno se fijó en las microplacas de ELISA a concentraciones de 10, 5, 2.5 y 1.25 µg/100 µl, diluidos en solución amortiguadora de carbonatos pH 9.6, 0.06 M. Se colocaron 100 µl de antígeno por pozo, se mantuvieron en incubación a 37 °C, durante 24 h, se lavaron cuatro veces con 300 µl de solución de lavado PBS-tween 20 (PBST)(0.05%) pH 7.4 y por pozo se depositaron 100 µl de solución de bloqueo albúmina 1%, (Fluka Biochemika), las placas se incubaron a 37 °C durante 1 h, se realizaron cuatro lavados con PBST, y se almacenaron a 4 °C envueltas en plástico y papel

present in a sheep fecal sample. The strain was inoculated in Proskawer and Beck liquid medium with mycobactin (2 mg/L) and incubated at 37 °C for 8 wk. Bacteria were concentrated by centrifugation at 900 xg for 10 min, washed three times with phosphate buffered saline (PBS) pH 7.2, 1M, and sonicated (Ultrasonic Processor) for 20 cycles of 59 sec each; the obtained material was centrifuged at 900 xg for 90 min and the supernatant was dialyzed at 4 °C in a cellulose membrane (21 to 33 mm average diameter) (Sigma-Aldrich) for 18 h, the dialysate was frozen at -170 °C for 2 h, to be lyophilized later. Protein concentration was determined using the commercial Micro BCA Protein Assay Reagent Kit<sup>®</sup> and compared to the protein concentration of PPA-3 Map antigen (Paratuberculosis Protoplasmic Antigen, Allied Monitor Inc<sup>®</sup>)(14).

### *ELISA standardization*

The antigen was fixed in ELISA microplates at 10, 5, 2.5 and 1.25 µg/100µl concentrations, diluted in carbonate buffered solution pH 9.6, 0.06 M. A hundred microliters of antigen per well, kept incubated at 37 °C, for 24 h, washed four times with 300 µl of washing buffer PBS-Tween 20 (PBST)(0.05%) pH 7.4 and 100 µl of albumin block solution 1% per well (Fluka Biochemika), plates were incubated at 37 °C for 1 h, four washes were done with PBST, and were stored at 4 °C wrapped in plastic and aluminum paper until further use. A positive and negative control serum (Allied Monitor Inc<sup>®</sup>), diluted in a solution at 0.02% of *M. phlei* in a phosphate buffered solution with 0.1% of gelatin and 0.05% Tween 80 (Sigma), at concentrations of 1:20, 1:40, 1:80 and 1:160. Anti-bovine IgG conjugate marked with horseradish peroxidase (HRP) (Sigma) at 1:750, 1:1500 and 1:2000 dilutions was used.

In each plate, 100 µl of negative and positive control sera were placed in their corresponding wells; all sera were tested in pairs, incubated at room temperature for 30 min, washed four times with 300 µl of PBST, 100 µl of anti-bovine IgG-HRP conjugate were added to each well, incubated at

aluminio, hasta su uso. Se trabajó con un suero testigo positivo (Allied Monitor, Inc<sup>®</sup>) y con un suero testigo negativo, diluidos en una solución al 0.02% de *M. phlei* en una solución amortiguadora de fosfatos con 0.1% de gelatina y 0.05% de tween 80 (Sigma), a concentraciones de 1:20, 1:40, 1:80 y 1:160. Se utilizó un conjugado anti IgG bovino marcado con peroxidasa de rábano (HRP) (Sigma) a diluciones de 1:750, 1:1500 y 1:2000.

En cada placa se colocaron en sus pozos correspondientes 100  $\mu$ l de los sueros testigo negativos o positivos; todos los sueros fueron probados de manera pareada, se incubaron a temperatura ambiente por 30 min, se lavaron con 300  $\mu$ l de PBST cuatro veces, se agregaron 100  $\mu$ l de conjugado anti IgG bovino-HRP en cada pozo, se incubó a temperatura ambiente por 30 min, se eliminó el contenido de la placa y se lavó con PBST cuatro veces; a cada pozo se agregaron 100  $\mu$ l de solución de sustrato 2-2' azino-di-(3-etil-benzotiazol-sulfona-6)-(diamonio) (ABTS) (AMRESCO), se mantuvieron en obscuridad a temperatura ambiente y agitación por 30 min. La lectura se realizó a 650 nm en un espectrofotómetro de ocho canales (ELx800, BioTek)<sup>(15)</sup>.

#### *Determinación del punto de corte, sensibilidad y especificidad*

Se trabajó con 50 sueros de bovino positivos a aislamiento de Maptb y con 50 sueros negativos provenientes de hatos libres a ptb y tuberculosis. El punto de corte se estableció por Intervalos de Confianza al 95% y dos desviaciones estándar utilizando la siguiente fórmula<sup>(15)</sup>:

$$M = \bar{x} \pm Z (0.5 - 0.05/2)(\delta/\sqrt{n}), \text{ donde: } n \text{ (población), } M \text{ (media), } \delta \text{ (desviación estándar)}$$

Con el software Stata 7.0<sup>®</sup> (15), se calcularon los valores de la prueba de Kappa, Sensibilidad (Se) y Especificidad (E).

#### *Evaluación con muestras de campo*

Se determinó la Se y E del ELISA evaluando 491 sueros de bovinos de la raza Holstein mayores a

room temperature for 30 min, and the content of the plate was eliminated and washed four times with PBST; to each well, 100  $\mu$ l of 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic)-(diammonium) substrate solution was added (ABTS) (AMRESCO), they were stored in darkness at room temperature and agitation for 30 min. The reading was done at 650 nm with an eight channel spectrophotometer (ELx800, BioTek)<sup>(15)</sup>.

#### *Determination of cut-off point, sensitivity and specificity*

Fifty bovine sera-positive for Map and 50 negative sera from ptb and tuberculosis free herds were used. The cut-off point was established by confidence intervals at 95% and two standard deviations using the following formula<sup>(15)</sup>:

$$M = \bar{x} \pm Z (0.5 - 0.05/2)(\delta/\sqrt{n}), \text{ where: } n \text{ (population), } M \text{ (medium), } \delta \text{ (standard deviation).}$$

The kappa test, sensitivity (Se) and specificity (S), were calculated with Stata 7.0<sup>®</sup>(15) software.

#### *Evaluation of field samples*

Se and S of ELISA were determined evaluating 491 Holstein breed bovine sera, older than 2 yr of age, coming from dairy herds from the States of Hidalgo, Mexico and Aguascalientes.

The determination of positive vs negative values was obtained with OD mean values as described by Martinez<sup>(15)</sup>; it was considered that the Pearson's chi-square test for two independent samples as statistical evaluation of the groups, whose null hypothesis (Ho) tested was that diagnostic tests of bovine paratuberculosis are the same. In regard to Se, S, positive predictive value and negative predictive were calculated by 2 x 2 contingency tables; Cohen's kappa values were used to evaluate the concordance between each diagnosis (ELISA, PCR and culture).

$$K = \frac{P_o - P_e}{1 - P_e} \text{ Where: } P_o = \text{Proportion of observed agreement; } P_e = \text{Proportion of expected agreement}$$

dos años de edad, procedentes de hatos lecheros de los estados de Hidalgo, México y Aguascalientes.

La determinación de los valores positivos vs negativos, se obtuvo con los valores promedio de las OD de acuerdo a lo descrito por Martínez<sup>(15)</sup>; se consideró que la prueba de comparación de poblaciones de  $Ji^2$  de Pearson para dos muestras independientes como evaluación estadística de los grupos, cuya hipótesis nula ( $H_0$ ) planteada fue que las pruebas diagnósticas en paratuberculosis bovina son iguales. Respecto a Se, E, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo, se calcularon mediante tablas de contingencia de 2X2; para evaluar la concordancia entre cada diagnóstico (ELISA, PCR y cultivo) se calculó mediante los valores de la prueba de Kappa de Cohen:

$K = \frac{Po - Pe}{1 - Pe}$  Donde: Po= proporción de acuerdos observados; Pe= proporción de acuerdos esperados.

#### *Aislamiento bacteriológico*

Se depositaron 2 g de materia fecal en 50 ml de cloruro de hexadecilpiridinio (HCP) al 7.6 %, se mantuvieron en agitación durante 60 min, para posteriormente dejarlos en reposo por 18 h.

Se colectaron 5 ml del sobrenadante y de la fase intermedia, se centrifugaron a 180 xg durante 10 min, se decantó el sobrenadante y a la pastilla obtenida se le adicionaron 3 ml de cloruro de benzalconio (Zephiran) al 3%, dejándolo en reposo por 30 min, posteriormente se centrifugó a 180 xg por 10 min. Se decantó el sobrenadante conservando aproximadamente 1 ml, en el cual se homogenizó la pastilla y se realizó la siembra por duplicado en medio de Herrold adicionado con yema de huevo con y sin micobactina, dejando incubar las muestras a 37 °C durante 8 a 16 semanas<sup>(14,15,16)</sup>.

#### *Extracción de ADN a partir de excremento*

Se colocaron 2 g de materia fecal en 50 ml de HCP al 7.6 %, se mantuvieron en agitación durante 60 min y 18 h en reposo. Del sobrenadante se tomaron 20 ml que se centrifugaron a 180 xg por 10 min. Se decantó el sobrenadante y se realizaron tres lavados con 5 ml de PBS a la pastilla.

#### *Bacteriological isolation*

Two grams of feces were placed in 50 ml of hexadecylpyridine chloride (HCP) at 7.6%, they were kept in agitation for 60 min; afterwards, they were left to stand for 18 h.

Five ml of supernatant and intermediate phase were collected and centrifuged at 180 xg for 10 min, the supernatant was decanted and 3 ml of benzalkonium chloride (Zephiran) at 3% were added to the obtained pellet and allowed to stand for 30 min, then centrifuged at 180 xg for 10 min. The supernatant was decanted conserving approximately 1 ml, in which the pellet was homogenized and seeding was carried out by duplicate in Herrold's egg yolk medium with and without mycobactin, incubating the samples at 37 °C for 8 to 16 wk<sup>(14,15,16)</sup>.

#### *DNA extraction from feces*

Two grams of feces were placed in 50 ml of HCP at 7.6%, agitated for 60 min and allowed to stand for 18 h. Twenty milliliters were obtained from the supernatant and centrifuged at 180 xg for 10 min. The supernatant was decanted and the pellet was washed three times with 5 ml of PBS. Finally, the pellet was resuspended in 1.5 ml of PBS and was transferred to 2 ml tubes and centrifuged at 1,260 xg for 5 min, the supernatant was discarded and the pellet was resuspended in 500  $\mu$ l of Triton X-100 and transferred to 1.5 ml CryoTubes. The samples were placed three times in liquid nitrogen (-170 °C) at 5 min intervals and dry heat at 100 °C, for cellular lyses. Four hundred and fifty microliters of guanidine isothiocyanate 5M and 250  $\mu$ l of ammonium acetate 7.5 M (pH 6.3) were added to each sample and kept in ice for 15 min. Samples were transferred to Eppendorf tubes where, in two occasions, 500  $\mu$ l of chloroform-isoamyl alcohol (1:24) were added, then centrifuged at 1,260 xg for 15 min. The aqueous phase was transferred to a 2 ml Eppendorf tube and 450  $\mu$ l of isopropanol, to precipitate the nucleic acids. The tubes were placed at -20 °C all night. Samples were centrifuged at 1,260 xg for 15 min and the supernatant was eliminated. Two washes were performed with 1 ml of ethanol at 70%. Supernatant was eliminated and the pellet was left to dry at room temperature to

Finalmente, la pastilla se resuspendió en 1.5 ml de PBS y se transfirió a tubos de 2 ml, para centrifugarlo a 1,260 xg durante 5 min, se eliminó el sobrenadante y la pastilla fue resuspendida en 500  $\mu$ l de Te-Triton X100 y transferida a criotubos de 1.5 ml. Las muestras se colocaron tres veces en nitrógeno líquido (-170 °C) a intervalos de 5 min y en calor seco a 100 °C, para la lisis celular. A cada muestra se le agregaron 450  $\mu$ l de isotiocianato de guanidina 5M y 250  $\mu$ l de acetato de amonio 7.5 M (pH 6.3) y se mantuvieron en hielo por 15 min. Las muestras se transfirieron a tubos eppendorf donde se les agregó en dos ocasiones 500  $\mu$ l de cloroformo-alcohol isoamílico (1:24), se centrifugó a 1,260 xg 15 min. La fase acuosa se transfirió a un tubo eppendorf de 2 ml y se le agregaron 450  $\mu$ l de isopropanol, para precipitar los ácidos nucleicos. Los tubos se colocaron a -20 °C toda la noche. Las muestras se centrifugaron a 1,260 xg por 15 min y se eliminó el sobrenadante. Se realizaron dos lavados con 1 ml de etanol al 70%. Se eliminó el sobrenadante y la pastilla se dejó secar a temperatura ambiente, para posteriormente resuspenderla en 100  $\mu$ l de agua bidestilada. Las muestras de ADN se mantuvieron a -20 °C hasta su uso en la PCR anidada<sup>(17,18,19)</sup>.

#### *PCR anidada*

A las muestras de ADN obtenidas a partir de excremento, se les realizó la PCR anidada. Se utilizaron iniciadores para el elemento de inserción IS900 que es específico para Map, descritos por Erume *et al.*<sup>(17)</sup> Paratb1 (5' TGA TCT GGA CAA TGA CGG TTA CGG A 3') y Paratb 4 (5' CGC GGC ACG GCT CTT GTT 3') para la primer reacción de PCR, obteniendo un producto de 563 pares de bases y para la segunda reacción Paratb 2 (5' GCC GCG CTG CTG GAG TTG A 3') y Paratb 3 (5' AGC GTC TTT GGC GTC GGT CTT G 3') obteniendo un producto final de 210 pares de bases. Para la primer reacción se utilizaron 2  $\mu$ l de ADN obtenidos a partir de excremento de bovino; las condiciones para 48  $\mu$ l de premezcla fueron 5  $\mu$ l de amortiguador de reacción 10X (67 mM/ $\mu$ l) (Biogénica), 4  $\mu$ l de MgCl<sub>2</sub> 30 mM 20 X (Biogenica), 1  $\mu$ l DNTP (200 mM), 1  $\mu$ l Paratb 1 (25 pMol) (Invitrogen), 1  $\mu$ l Paratb 4 (25 pMol)

later be resuspended in 100  $\mu$ l of bi-distilled water. DNA samples were kept at -20 °C until use in nested PCR<sup>(17,18,19)</sup>.

#### *Nested PCR*

Nested PCR was carried out on DNA fecal samples. Primers were used for the Map specific IS900 insertion sequence described by Erume *et al.*<sup>(17)</sup>: ptb 1 (5' TGA TCT GGA CAA TGA CGG TTA CGG A 3') and ptb 4 (5' CGC GGC ACG GCT CTT GTT 3') for the first reaction of PCR, obtaining a product of 563 base-pairs, and for the second reaction: ptb 2 (5' GCC GCG CTG CTG GAG TTG A 3') and ptb 3 (5' AGC GTC TTT GGC GTC GGT CTT G 3') obtaining a final product of 210 base-pairs. For the first reaction, 2  $\mu$ l of DNA from bovine feces were used; conditions for 48  $\mu$ l of pre-mixture were 5  $\mu$ l of 10X reaction buffer (67 mM/ $\mu$ l) (Biogenica), 4  $\mu$ l of MgCl<sub>2</sub> 30mM 20X (Biogenica), 1  $\mu$ l DNTP (200 mM), 1  $\mu$ l ptb 1 (25 pMol) (Invitrogen), 1  $\mu$ l ptb 4 (25 pMol) (Invitrogen), 0.25  $\mu$ l of polymerase (5U) (Amplificasa, Biogenica) and 35.75  $\mu$ l of bi-distilled water. The amplification was carried out in a thermocycler (Thermo Electron Corporation) using the following program: one cycle at 95 °C for 5 min, 35 cycles at 95 °C for 1 min, 65 °C for 1 min, 72 °C for 1 min, one more cycle for 1 min at 72 °C and one cycle a 4 °C for 5 min. For the second reaction, 3  $\mu$ l were obtained from the first reaction and transferred to PCR micro tubes, which contained the same quantity and concentration of the already described reactive; except for ptb 1 and ptb 4 that were substituted for ptb 2 and ptb 3 primers. The same thermocycler program was used. DNA from Map strain (ATCC 19698) was included as positive control, samples were run in an electrophoresis chamber (GIBCO BRL Horizontal Gel Electrophoresis Apparatus) at 100 volts for 1 h and amplification products were visualized in agarose gel at 2%, stained with ethidium bromide<sup>(18,19)</sup>.

## RESULTS

#### *Protein concentration determination*

Once the protoplasmatic antigen was resuspended, its protein concentration was determined using the commercial Micro BCA Protein Assay Reagent Kit,

(Invitrogen), 0.25  $\mu\text{l}$  de polimerasa (5 U) (Amplificasa, Biogénica) y 35.75  $\mu\text{l}$  de agua bidestilada. La amplificación se realizó en un termociclador (Thermo Electron Corporation) utilizando el programa: un ciclo a 95 °C por 5 min, 35 ciclos a 95 °C por 1 min, 65 °C por 1 min, 72 °C por 1 min, un ciclo más por 1 min a 72 °C y un ciclo a 4 °C por 5 min. Para la segunda reacción, se tomaron 3  $\mu\text{l}$  de la primera reacción y se transfirieron a microtubos de PCR, que contenían la misma cantidad y concentración de reactivos ya descritos, excepto que los iniciadores Paratb 1 y Paratb 4, fueron sustituidos por los iniciadores Paratb 2 y Paratb 3. Se utilizó el mismo programa del termociclador. Se incluyó como testigo positivo ADN de la cepa de Map (ATCC 19698), las muestras se corrieron en una cámara de electroforesis (GIBCO BRL Horizontal Gel Electrophoresis Apparatus) a 100 volts por 1 h y los productos de la amplificación fueron visualizados en geles de agarosa al 2%, teñido con bromuro de etidio<sup>(18,19)</sup>.

## RESULTADOS

### *Determinación de la concentración de proteínas*

Una vez resuspendido el antígeno protoplasmático se determinó su concentración de proteínas utilizando el paquete comercial *Micro BCA Protein Assay Reagent Kit*, se hizo la lectura a una absorbancia de 563 nm, obteniendo un promedio de 178  $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ , mientras que el antígeno PPA-3 de Map tuvo un promedio de concentración de proteínas de 174  $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ .

### *Estandarización del ELISA*

Para la estandarización del ELISA, se evaluaron diferentes concentraciones de antígeno protoplasmático de Map cepa 3065 (10, 5, 2.5 y 1.25  $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ ), los testigos positivos y negativos se diluyeron a 1:20, 1:40, 1:80 y 1:160, así como también el conjugado anti IgG bovino-HRP el cual fue probado a 1:750, 1:1500 y 1:2000. La mayor diferenciación entre testigos positivos y negativos, se obtuvo empleando el antígeno a 1.25  $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$  y 1:2000 de conjugado anti IgG bovino-HRP. Las diluciones de suero 1:80 y 1:160, permitieron

a reading of 563 nm absorbance was done, obtaining an average of 178  $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ , while Map PPA-3 antigen had a protein concentration average of 174  $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ .

### *ELISA standardization*

For ELISA standardization, different protoplasmic antigen concentrations of Map strain 3065 (10, 5, 2.5, and 1.25  $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ ) were evaluated, and positive and negative controls were diluted at 1:20, 1:40, 1:80 and 1:160, as well as anti-bovine IgG-HRP conjugate, which was tested at 1:750, 1:1500 and 1:2000. The greater differentiation between positive and negative controls was obtained using the antigen at 1.25  $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$  and 1:2000 of anti-bovine IgG-HRP conjugate. Sera dilutions at 1:80 and 1:160 allowed to detect a difference, three times greater, between positive and negative controls; nevertheless, with the last dilution, negative control sera showed an OD average of 0.143 and positive controls kept high with an average of 0.532 OD; for this reason, it was considered that the best sera dilution was 1:160 to carry out ELISA evaluation (Table 1).

### *Determination of cut-off point, sensitivity and specificity*

The obtained average values were 0.01 (OD) for the lowest and 1.43 (OD) for the highest; the

Cuadro 1. Valores de los sueros testigo positivos y negativos a paratuberculosis, expresados en densidades ópticas a 650 nm, utilizando diferentes diluciones para la estandarización del ELISA

Table 1. Positive and negative serum control values for paratuberculosis, expressed in optical densities at 650 nm, using different dilutions of ELISA standardization

Sera dilution	Positive control value	Negative control value
1:20	0.955	0.470
1:40	0.688	0.324
1:80	0.602	0.212
1:160	0.532	0.143

In all cases, antigen and conjugated concentrations were 1.25  $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$  and 1:2000, respectively.



detectar una diferencia tres veces mayor entre los testigos positivos y negativos; sin embargo, con la última dilución los sueros testigo negativos mostraron una OD promedio de 0.143 y los testigo positivos se mantuvieron elevados con un promedio de 0.532 OD; por esta razón se consideró que la mejor dilución del suero era 1:160 para llevar a cabo la evaluación del ELISA (Cuadro 1).

*Determinación del punto de corte, sensibilidad y especificidad*

Los valores promedio obtenidos fueron de 0.01 (OD) el valor más bajo, y 1.43 (OD) el valor más alto; los resultados obtenidos con las 100 muestras, permitieron establecer un punto de corte de 0.196 (OD), por lo que los valores iguales o mayores a este valor fueron considerados como positivos (Figura 1).

Además que se logró clasificar de una manera semi-cuantitativa los 50 sueros positivos en escalas de fuerte, positivo y débilmente positivos en base a la intensidad de respuesta de los sueros y los valores promedio de las densidades ópticas (Figura 2).

obtained results of the 100 samples allowed to establish a cut-off point of 0.196 (OD), for which greater or equal values were considered as positive (Figure 1). Besides, it allowed classifying in a semi-quantitative way the 50 sera in scales of strong and weak positive, based on sera response intensity and average values of the optical densities (Figure 2).

While working for the standardization with a sera bank either positive or negative for culture and PCR, the Se and S obtained was 100 % and kappa value 0.98; with positive predictive value of 100 % and a negative predictive value of 100 %.

*Evaluation of field samples*

The assay was positive for 68/491 (13.84 %) and 423 negative samples. The sensitivity and specificity of the test was calculated using the results of culture and PCR as "golden tests". The obtained results indicate that the ELISA showed a Se= 79.31 %, S= 82.25 %, with a positive predictive value of 22 % and a negative predictive value of 98 %, with concordance between tests of 0.2763 with regard to culture. While comparing with PCR, it

Figura 1. Punto de corte a 0.196 OD con dos desviaciones estándar y el intervalo de confianza del 95%, que divide los valores obtenidos en el ELISA, de los 50 sueros de bovinos positivos (◆) y de los 50 sueros negativos a paratuberculosis (▲)

Figure 1. Cut-off point at 0.196 OD, with two standard deviations and confidence interval of 95%, which divides the values of the 50 positive bovine sera (◆) and the 50 negative sera for paratuberculosis (▲) obtained by ELISA

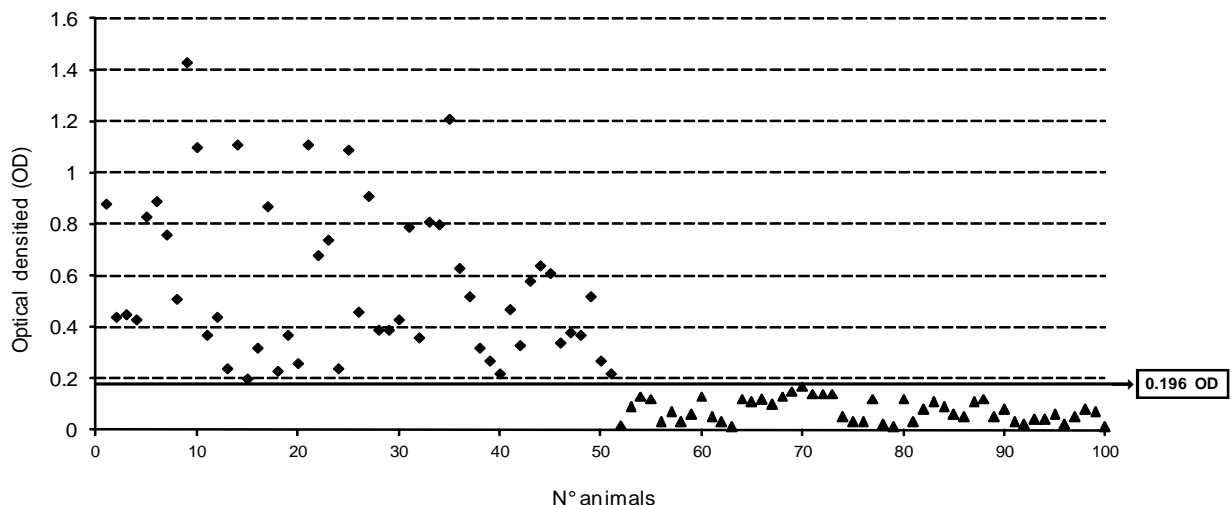
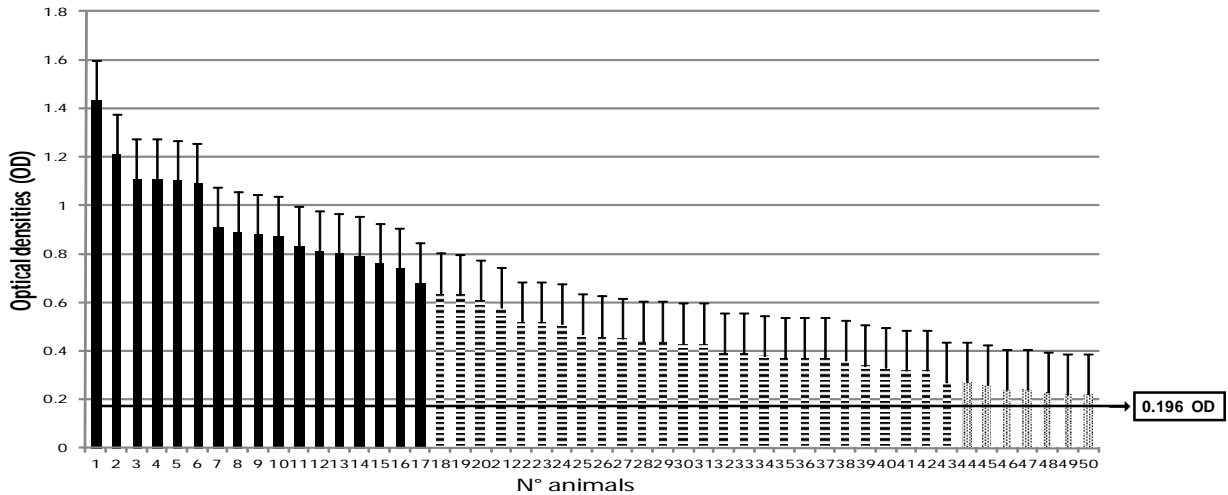


Figura 2. Valores expresados en densidades ópticas (OD) a 650 nm en el ELISA, de los 50 sueros positivos a paratuberculosis, divididos en fuertemente positivos que corresponden a categorías de 1.43 a 0.70 OD (1 a 17); positivos con valores de 0.69 a 0.30 OD (18 a 43) y débilmente positivos de 0.29 a 0.19 OD (44 a 50)

Figure 2. Values expressed in optical densities (OD), at 650 nm in ELISA, of the 50 positive sera for paratuberculosis, divided in strongly positives that correspond to categories 1.43 to 0.70 OD (1 to 17); positives with values of 0.69 OD to 0.30 OD (18 to 43) and weakly positive of 0.29 OD to 0.19 OD (44 to 50)



Al trabajar para la estandarización con un banco de sueros tanto positivos con cultivo y PCR y sueros negativos, la Se y E que se obtuvo fue de 100 % y un valor de Kappa de 0.98. Con un valor predictivo positivo de 100 % y un valor predictivo negativo de 100 %.

#### Evaluación con muestras de campo

Se obtuvieron 68/491 (13.84 %) muestras positivas y 423 negativos al ensayo. Se calculó la sensibilidad y especificidad para la prueba, empleando los resultados de cultivo y PCR como "pruebas de oro". Los resultados obtenidos indican que el ELISA tuvo una Se=79.31 %, E=82.25 %, con un valor predictivo positivo de 22 % y un valor predictivo negativo de 98 %, con una concordancia entre las pruebas de 0.2763 con respecto al cultivo. Al compararla con la PCR se tuvo una Se= 67.8 %, E= 84 % con un valor predictivo positivo de 38 % y un valor predictivo negativo de 95 %, con una concordancia entre las pruebas de 0.394 Al determinar la Se y E de la PCR con respecto al cultivo bacteriológico fue de 62.7 % y 91.13 % con un valor predictivo positivo de 30.5 % y un valor predictivo negativo de 97.45 %,

showed a Se= 67.8 %, S= 84 %, with a positive predictive value of 38 % and negative predictive value of 95 %, with concordance between tests of 0.394. The determination of Se and S of PCR with regard to the bacteriological culture was 62.7 % and 91.13 %, with a positive predictive value of 30.5 % and negative predictive value of 97.45 %, with a concordance between tests of 0.66. The observations of each diagnostic technique correspond to independent groups, since with the chi-square test used, a highly significant result  $P < 0.01$  was obtained. The results indicate that either PCR or culture, are very similar diagnostic techniques; however, comparing with ELISA, there are differences between them.

#### Bacteriological isolation

The bacteriological culture of the 491 fecal samples was performed, obtaining 29 positive isolations (5.9 %). Growth of bacterial colonies from the eighth week of incubation was observed; only in the mediums that included mycobactin and stained with Ziehl-Neelsen, bacillus acid-alcohol resistant (BAAR) were observed. The definitive identification

con una concordancia entre las pruebas de 0.66. Las observaciones de cada técnica diagnóstica, corresponden a grupos independientes, ya que con la prueba de  $Ji^2$  empleada, se obtuvo un resultado altamente significativo  $P < 0.01$ . Los resultados indican que tanto PCR como el cultivo son técnicas diagnósticas muy parecidas, sin embargo comparado con ELISA existe diferencia entre ellas.

#### *Aislamiento bacteriológico*

Se realizó el cultivo bacteriológico de las 491 muestras de excremento, obteniendo 29 aislamientos positivos (5.9 %). Se observó crecimiento de colonias bacterianas a partir de la octava semana de incubación; únicamente en los medios que fueron adicionados con micobactina y con la tinción de Ziehl-Neelsen se observaron bacilos ácido-alcohol resistentes (BAAR). La identificación definitiva de los aislamientos compatibles con Map se realizó por medio de la prueba de PCR anidada ya descrita.

#### *Reacción en cadena de la polimerasa*

Se probaron las 491 muestras de excremento, y en total amplificaron 59 muestras (12.01 %), obteniendo un producto final de 210 pares de bases que corresponde a la región IS900 que es específica de Map (Figura 3).

## DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en el presente trabajo muestran que el ELISA con antígeno de Map cepa 3065, presentó una Se y E relativas de 79.31 % y 82.25 %, respectivamente, al compararla con el aislamiento bacteriológico, el cual es considerado como la prueba de oro. Dichos resultados coinciden con los obtenidos en diversos estudios, donde se han realizado evaluaciones con diferentes antígenos de Map, en ELISAs para el diagnóstico de ptb, en los cuales la Se del ensayo va de un 30 al 95 %<sup>(20,21,22)</sup>.

La capacidad del resultado positivo o negativo de una prueba para predecir de forma precisa el estado de un animal o población con respecto a una infección, es la consideración más importante para la validación de un ensayo, por lo que se deben

of Map compatible isolations was carried out by means of nested PCR test already described.

#### *Polymerase chain reaction*

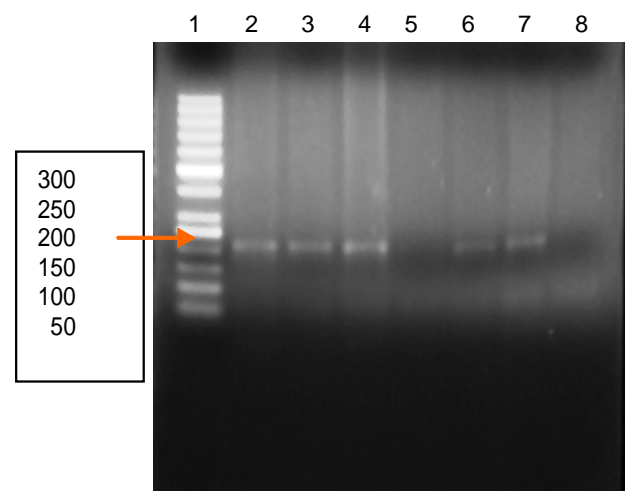
The 491 fecal samples were tested and 59 (12.01 %) samples were amplified, obtaining a final product of 210 base pairs which corresponds to region IS900, which is Map specific (Figure 3).

## DISCUSSION

The obtained results of the present work showed that ELISA with antigen of Map strain 3065, showed relative Se and S of 79.31 % and 82.25 %, respectively, while comparing with the bacteriological isolation, which is considered as golden test. These results coincide with the obtained in several studies, where evaluations have been done on different Map antigens, in ptb ELISA's diagnosis, where assay Se goes from 30 to 95 %<sup>(20,21,22)</sup>.

Figura 3. PCR-anidado realizado a partir del ADN genómico obtenido de heces de bovinos. Amplificación de fragmento de 210 pb de la IS900 de Map

Figure 3. Nested-PCR carried out from genomic DNA obtained from bovine feces. Fragment amplification of 210 bp of Map IS900



Lane: 1) Molecular size marker 50 bp, 2) Map (ATCC 19698), 3) 47, 4) 11221, 5) 138, 6) 14854, 7) 24583, 8) water

considerar factores que pueden influir en el resultado, en este caso al desarrollar el ELISA para determinar la presencia de anticuerpos contra Map, se sabe que en ocasiones los animales negativos a ELISA pueden resultar positivos a PCR o al aislamiento bacteriológico, debido a que en etapas tempranas de la infección la respuesta inmune predominante es de tipo celular, y la eliminación del bacilo en excremento comienza a darse de manera intermitente. Otra razón por la cual la producción de anticuerpos se puede ver afectada es a causa de la pérdida de respuesta inmune ante la infección; esta actividad supresora es denominada anergia, y se presenta cuando los animales son viejos o la infección está en su etapa final, de manera que estos animales pueden estar excretando el bacilo y no ser detectados con las pruebas serológicas<sup>(20-23)</sup>.

De las 491 muestras trabajadas, 59 fueron positivas a PCR anidada y se obtuvieron 29 aislamientos de Map, lo que equivale al 12.01 y 5.9 %, respectivamente. Estos resultados coinciden con lo descrito por Erume *et al*<sup>(17)</sup>, quienes detectaron una mayor cantidad de animales positivos a paratuberculosis a partir de excremento, utilizando la PCR anidada y una menor cantidad mediante el aislamiento bacteriológico, el cual es considerado como la prueba de oro para el diagnóstico de ptb en bovinos, pero que presenta algunas limitantes, pues el procedimiento requiere de 8 a 16 semanas de incubación como mínimo para el aislamiento de Map. Otra desventaja que presenta el cultivo es la contaminación de las muestras con otros microorganismos, principalmente hongos. La PCR anidada es capaz de detectar bacterias viables y no viables, además tiene la ventaja de que los resultados a partir de esta prueba se pueden obtener en tres días, lo que representa una ventaja de tiempo en comparación con el aislamiento bacteriológico<sup>(17,18,19)</sup>.

La concordancia entre las distintas pruebas ELISA, PCR anidada y cultivo bacteriológico utilizadas en el presente trabajo, fue considerada de baja a discreta; sin embargo cabe señalar que cada método, detecta a los animales en diferente etapa de la infección, pero su uso de manera complementaria, contribuyó a que se incrementara la sensibilidad de la prueba serológica<sup>(23)</sup>.

The capacity of a positive or negative result of a test to predict in a precise form the condition of an animal or population with regard to an infection, is the most important consideration for the validity of an assay, for which factors that may influence in the result, in this case by developing ELISA for determining the presence of antibodies against Map, it is known that, in occasions, negative animals for ELISA can result positive for PCR or bacteriological isolation, because in early infection stages the predominant immune response is cell type, and the elimination of bacillus in feces begins in an intermediate way. Other reason for which the antibody production may be affected, is the cause of loss of immune response after infection; this suppressor activity is known as anergia, and it is observed when animals are old or the infection is in its terminal stage, hence this animals may be excreting the bacillus and be undetected by serological tests<sup>(20-23)</sup>.

Out of the 491 samples, 59 were positive for nested PCR and 29 Map isolations were obtained, which is equivalent to 12.01 and 5.9 %, respectively. These results coincide with the described by Erume *et al*<sup>(17)</sup>, who detected greater quantity of paratuberculosis positive animals from feces, using nested PCR and smaller quantity by means of bacteriological isolation, which is considered as the golden test for ptb diagnosis in bovines, but it presents some limitations, since the procedure requires at least 8 to 16 wk of incubation for Map isolation. Another disadvantage that the culture presents is contamination of the samples with other microorganisms, mainly molds. The nested PCR is capable of detecting viable and non-viable bacteria, also it has the advantage that the results of this test can be obtained in three days, which represents an advantage of time in contrast with bacteriological isolation<sup>(17,18,19)</sup>.

The concordance between ELISA, nested PCR and bacteriological culture used in this study, was considered from low to discrete; however, it must be noted that each method detects the animals at different stage of infection, but its complementary use contributed to increase the sensitivity of the serological test<sup>(23)</sup>.

Estudios de tipo epidemiológicos transversales realizados en ganado bovino de los Estados de Guanajuato y San Luis Potosí; indican que existe una seroprevalencia de ptb del 10.71 y 31.3 % respectivamente; en el presente trabajo se incluyeron muestras de animales que procedían de los Estados de Hidalgo, Aguascalientes y Estado de México, de las cuales se obtuvieron 68 animales positivos de los 491 animales evaluados con el ELISA con antígeno protoplasmático de Map 3065, esto corresponde a una frecuencia de 13.84 %, si bien este dato no proviene de un estudio con diseño epidemiológico, pone de manifiesto que la enfermedad, se encuentra ampliamente distribuida en hatos de distintos Estados del País y que se requiere el realizar estudios con los que se pueda determinar la situación real de la enfermedad, y el impacto económico que representa para la ganadería nacional<sup>(24,25,26)</sup>.

Los antígenos protoplasmáticos de Map, que se utilizan en las pruebas serológicas, son mezclas complejas de lípidos, carbohidratos, proteínas y ácidos nucleicos que contienen determinantes antigénicos en común para la mayoría de las cepas de Map sin importar que sean de origen ovino o bovino<sup>(21,22)</sup>. Existe un alto grado de conservación genética entre las cepas de Map de origen ovino y bovino, por lo que comparten determinantes antigénicos, los cuales son reconocidos por los anticuerpos presentes en los sueros que resultan positivos a las pruebas serológicas. Se considera que una de las limitantes por las cuales no se lleva a cabo el diagnóstico de la ptb en el ganado en México, es por la falta de antígenos o paquetes comerciales de ELISA, ya que los que existen en el mercado, tienen un precio alto y el tiempo de entrega del material tarda demasiado tiempo, al ser productos de importación; razón por la cual es importante el realizar estudios con cepas de Map de origen nacional, para la obtención de antígenos que sean evaluados como candidatos para poder llevar a cabo el diagnóstico de la enfermedad.

La cepa de Map 3065 que se empleó para obtener el antígeno, se obtuvo de un caso clínico de ptb en ovino, procedente de un rebaño de Toluca, Edo. de México; la evaluación del antígeno fue realizada

The transversal epidemiological studies carried out in cattle of the states of Guanajuato and San Luis Potosi, show that there is ptb seroprevalence of 10.71 and 31.3 %, respectively. In the present work, samples of animals coming from the states of Hidalgo, Aguascalientes and Estado de Mexico were included, of which 68 animals were positive out of 491 animals evaluated by ELISA development with Map protoplasmic antigen 3065, this corresponds to a frequency of 13.84 %, in spite this datum does not come from an epidemiological design study, it manifests that the disease is widely distributed in herds of different states of the country, and that studies that can determine the real situation of the disease and the economic impact that represents to the national livestock are required<sup>(24,25,26)</sup>.

The Map protoplasmic antigens, used in serological tests, are complex mixtures of fats, carbohydrates, proteins and nucleic acids that contain common antigenic determinants for the majority of Map strains, no matter if they are sheep or cattle origin<sup>(21,22)</sup>. There is a high grade of genetic conservation between the Map strains of sheep and cattle origin, for which they share antigenic determinants, which are recognized by the antibodies present in sera that result positive for serological tests. It is considered that one of the limitations for which bovine ptb diagnosis in Mexico is not carried out, is due to lack of antigens or ELISA commercial kits, since the ones available in the market are expensive and the material delivery takes too long, since they are imported products; reason why, it is important to carry out studies with Map strains national origin for the obtainment of antigens that are evaluated as candidates to be able to diagnose the disease.

The Map strain 3065 that was used to obtain the antigen, came from an ovine ptb clinical case, coming from a herd in Toluca, Estado de Mexico; the antigen evaluation was carried out by Hernandez<sup>(14)</sup>, who describes the eight band proteic profile that has a weight of 20 to 160 kD and protein concentration of 104 µg/100 µl. The ELISA results obtained using protoplasmic antigen of ovine strain, are better compared with the ones of Singh

por Hernández<sup>(14)</sup>, quien describe el perfil proteínico de ocho bandas que tienen un peso que va de 20 a 160 kD, y una concentración de proteínas de 104  $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ . Los resultados obtenidos en el ELISA empleando antígeno protoplasmático de la cepa de origen ovino, son mejores comparados con los de Singh *et al.*<sup>(22)</sup>, quienes estandarizaron un ELISA con antígeno protoplasmático de una cepa de Map "tipo bisonte" de origen caprino, con la que han evaluado sueros de búfalos, bovinos y caprinos, teniendo una Se 50 y E 90 %. Se coincide con este trabajo en que el ensayo se puede utilizar con muestras de suero de distintas especies animales, independientemente del origen (ovino, bovino, caprino) de la cepa de Map con la que se elabore el antígeno para el ELISA.

Estudios realizados por Park *et al.*<sup>(8)</sup> y por Speer *et al.*<sup>(9)</sup>, con un ELISA usando antígeno sonicado elaborado con una cepa de referencia de Map de origen bovino, con una concentración de proteína de 400 ng/100  $\mu\text{l}$ , y 3200 ng de proteína por pozo (100  $\mu\text{l}$ ) respectivamente, la Se y E para ambos casos fue de 95.2 y 96.7 % respectivamente; sin embargo se considera que la prueba tiene la desventaja de que es costosa y que requiere de entrenamiento para alcanzar resultados confiables y constantes. Los resultados del presente trabajo, se obtuvieron utilizando una concentración de proteína de 178 ng por cada 100  $\mu\text{l}$  de buffer de carbonatos; y se comprobó que a menor cantidad de antígeno, la divergencia entre los valores de los sueros positivos y negativos aumentaba, permitiendo una mejor diferencia entre estos.

Pinedo *et al.*<sup>(3)</sup> analizaron 328 muestras de suero, sangre y excremento y determinaron la asociación entre ELISA, cultivo, PCR de sangre y excremento para el diagnóstico de Map ( $P < 0.05$ ).

La prueba Chi<sup>2</sup> (ji cuadrada de Pearson), se emplea cuando las observaciones de una investigación corresponden a muestras independientes y las mediciones se tienen en escala nominal, y el análisis corresponde a dos o más grupos, de dos o más variables. Los resultados obtenidos con esta prueba fueron significativos ( $P < 0.01$ ), por lo que existen diferencias entre las pruebas evaluadas. El análisis

*et al.*<sup>(22)</sup>, who standardized ELISA with a Map strain protoplasmic antigen (Bison type) genotype of goat origin, of which buffalo, cattle and goat sera have been evaluated, obtaining a Se= 50 and S= 90 %. This work coincides with the fact that in the assay, serum samples of different animal species can be used, independently of the Map strain origin (sheep, cattle and goat), of which the antigen for an ELISA is elaborated.

Studies carried out by Park *et al.*<sup>(8)</sup> and by Speer *et al.*<sup>(9)</sup>, with an ELISA using sonicated antigen elaborated with a Map reference strain of cattle origin, with a protein concentration of 400 ng/100  $\mu\text{l}$  and 3,200 ng of protein per well (100  $\mu\text{l}$ ), respectively, Se and S for both cases was 95.2 and 96.7 %, respectively; however, it is considered that the test has the disadvantage of being expensive and that it requires training to be able to reach reliable and constant results. The results of the present study were obtained using a protein concentration of 178 ng per each 100  $\mu\text{l}$  of carbonate buffer; and it was proven that at smaller quantity of antigen the greater the divergence between the values of positive and negative sera, allowing a better difference between these.

Pinedo *et al.*<sup>(3)</sup> analyzed 328 serum, blood and fecal samples and determined the association between ELISA, culture, blood and feces PCR for Map diagnosis ( $P < 0.05$ ).

The chi-square test is used when the observations of an investigation correspond to independent samples and measurements are in a nominal scale, and the analysis corresponds to two or more groups, of two or more variables. The results obtained by this test were significant ( $P < 0.01$ ), for which there are differences between the evaluated tests. The statistical analysis carried out in both studies determines that at least one of the groups is different and that depending on the number of observations obtained, the statistical analysis to be applied will be chosen<sup>(3)</sup>.

In order to determine or classify positive from negative samples of an ELISA, it is considered important to recommend adding two or three

estadístico realizado en ambos estudios determina que al menos uno de los grupos es diferente y que dependiendo del número de observaciones obtenidas, se elegirá el análisis estadístico a aplicar<sup>(3)</sup>.

Se considera importante que para determinar o clasificar las muestras positivas de las negativas de un ELISA, se recomienda agregar al valor promedio que se emplea como punto de corte dos o tres desviaciones estándar, para incluir en teoría al 95 ó 99 % de la población seronegativa, teniendo como inconveniente que al utilizar dos desviaciones estándar se pueden dar resultados falso positivos, pero al trabajar con tres desviaciones estándar existe la probabilidad de dar resultados falsos negativos, es decir se subestima o sobre estima la población susceptible<sup>(27)</sup>. Al trabajar con los 50 sueros positivos a PCR y cultivo, que fueron empleados para estandarizar el ensayo, siete fueron clasificados como débilmente positivos (0.19 a 0.29 OD), si el punto de corte se hubiera establecido con tres desviaciones, estos hubieran sido clasificados como falsos negativos.

Diversos trabajos sobre la evaluación de los ELISA, para el diagnóstico de ptb, establecen el punto de corte entre 0.23 a 0.25 OD<sup>(11,21,28)</sup>. El punto de corte que se determinó en este trabajo fue de 0.196 OD y se obtuvo mediante dos desviaciones estándar y un intervalo de confianza del 95 %, lo cual permitió detectar una mayor cantidad de animales infectados y que fueron también positivos al cultivo bacteriológico y PCR anidado, con esto la sensibilidad de la prueba fue mayor en animales que comenzaban a presentar los signos clínicos de la enfermedad<sup>(13,23)</sup>; al utilizar un punto de corte mayor a 0.23 OD, se tiene la posibilidad de dar un resultado falso negativo, y dejar animales dentro del hato que posteriormente desarrollarán la enfermedad<sup>(23)</sup>.

En las pruebas de tamiz y diagnóstico, la probabilidad de que un individuo con una prueba positiva, sea realmente positivo (es decir que este cursando con la enfermedad), se le denomina valor predictivo positivo, mientras que el valor predictivo negativo, se refiere a la proporción de individuos con un resultado negativo a la prueba que no tienen la enfermedad. Es importante remarcar que el valor

standard deviations to the average value that is used as cut-off point, to theoretically include 95 or 99 % of the seronegative population, having as inconvenient that while using two standard deviations, false-positive results may be obtained, but working with three standard deviations there is the probability to obtain false-negative results; that is, the susceptible population is sub-esteemed or over-esteemed<sup>(27)</sup>. Working with the 50 positive sera for PCR and culture, that were used to standardized the assay, seven were classified as weakly positive (0.19 to 0.29 OD); if the cut-off point had been established with three standard deviations, these would had been classified as false-negatives.

Several studies on ELISA evaluation, for the diagnosis of ptb, establish the cut-off point between 0.23 and 0.25 OD<sup>(11,21,28)</sup>. The cut-off point determined in this work was 0.196 OD and was obtained by means of two standard deviations and a confidence interval of 95 %, which allowed detecting greater quantity of infected animals that were also positive for bacteriological culture and nested PCR; with this, the sensitivity of the test was greater in animals that were beginning to show clinical signs of the disease<sup>(13,23)</sup>; by using a cut-off point greater than 0.23 OD, there is the possibility to obtain a false-negative result, keeping infected animals in the herd that will eventually develop the disease<sup>(23)</sup>.

In screening and diagnostic tests, the probability that an individual with a positive test result, be really positive (that it is going through the disease), is called positive predictive value, while the negative predictive value refers to the ratio of healthy individuals with a negative test result. It is important to point out that the predictive value is associated with the sensitivity and specificity of the test, as well as being highly dependent on the disease prevalence in the population where the test is applied<sup>(29)</sup>. While evaluating an ELISA elaborated with sonicated antigen extracts of Map strain ATCC 19698, and pre-absorb sera with a solution of *M. phlei*, Bench-Nielsen *et al*<sup>(30)</sup> obtained a positive predictive value of 100 %, but they only included in the trial, sera from animals with positive culture

predictivo, está asociado a la sensibilidad y especificidad de la prueba, así como también que es altamente dependiente de la prevalencia de la enfermedad en la población donde se aplica la prueba<sup>(29)</sup>. Bench-Nielsen *et al.*<sup>(30)</sup>, al evaluar un ELISA elaborado con extractos de antígeno sonicado de la cepa de Map ATCC 19698, y preabsorber los sueros con una solución de *M. phlei*, obtuvieron un valor predictivo positivo del 100 %, pero solamente incluyeron en el experimento sueros provenientes de animales con cultivo positivo a Map y sueros negativos de hatos libres. En la primera parte del trabajo al estandarizar el ELISA se obtuvo un valor predictivo positivo y negativo del 100 %, por haber utilizado sueros con las mismas características descritas anteriormente, pero al evaluar el ensayo con muestras de campo el valor predictivo positivo bajó considerablemente a 22 % con respecto a cultivo y 38 % a PCR, esto se debe a que las muestras trabajadas procedían de diferentes Estados del País, y de distintos hatos donde se han presentado casos de ptb, pero que se desconoce su prevalencia; además la ptb es una enfermedad de tipo crónico y generalmente la detección de anticuerpos contra Map, es posible realizarla hasta que el animal tiene entre 18 a 24 meses de edad. Cabe hacer mención que el valor predictivo negativo fue de 98 % con respecto a cultivo y 95 % a PCR, por lo que las muestras de animales de campo con resultado negativo al ELISA, fueron correctamente clasificadas, ya que correspondieron a los verdaderos negativos.

Otra situación que hay que tomar en cuenta, son las posibles reacciones cruzadas. Yokomizo *et al.*<sup>(12)</sup>, demostraron que al dar un tratamiento a sueros, con una solución de *M. phlei* para absorber los anticuerpos no específicos, se reducían los resultados falso positivos ocasionados por infecciones con *Nocardia*, *Corynebacterium*, *Mycobacterium bovis* y otras micobacterias; este método no afecta los niveles de anticuerpos producidos contra Map, e incrementa la sensibilidad y especificidad de las pruebas serológicas<sup>(12,21,30)</sup>. En la evaluación realizada se trabajaron con varias diluciones de los sueros en la solución de *M. phlei*, la dilución de 1:160 fue con la que se obtuvieron los mejores resultados. Los sueros clasificados como positivos, fueron

for Map and negative sera from free herds. In the first part of the work, while ELISA was standardized, a positive and negative predictive value of 100 % was obtained, because of using sera with the same aforementioned characteristics, but evaluating the assay with field samples, the positive predictive value considerably decreased to 22 % with regard to culture and 38 % to PCR; this is because the samples used came from different states of the country and from different herds where there have been ptb cases, but its prevalence is unknown. Besides, ptb is a chronic disease and, generally, antibody detection against Map is possible to carry out until the animal is 18 to 24 mo old. It is important to point out that the negative predictive value was 98 % with regard to culture and 95 % to PCR; therefore, the samples from field animals having a negative result for ELISA, were correctly classified, since they corresponded to the real negatives.

Another situation that must be considered, are the possible cross-reactions. Yokomizo *et al.*<sup>(12)</sup> demonstrated that after treating sera with *M. phlei* solution to absorb nonspecific antibodies, the false-positive results caused by infections with *Nocardia*, *Corynebacterium*, *Mycobacterium bovis* and other mycobacteria were reduced; this method does not affect antibody levels against Map, and increases sensitivity and specificity of serological tests<sup>(12,21,30)</sup>. Several dilutions of sera in *M. phlei* solution were carried out; the best results were obtained with dilution at 1:160. Sera classified as positive were confirmed by culture and PCR; also, considering that a great negative predictive value was obtained, it could be thought that there were no problems with possible cross-reactions.

At the moment, 20 bovine sera that were test-positive for bovine PPD have been working on, and the result has been negative. Working with 20 bovine sera that were positive for *M. avium* PPD in the comparative cervical tuberculin test, seven were detected as ptb positive by ELISA and confirmed by PCR, which implies that it can be used for the differential diagnosis of tuberculosis. Likewise, there are few samples that have been worked with, this allows to have a wider criterion



confirmados por cultivo y PCR, además considerando que se tuvo un valor predictivo negativo elevado, se podría pensar que no se tuvieron problemas con posibles reacciones cruzadas.

Al momento se han trabajado con 20 sueros de bovinos que fueron positivos al PPD bovino, y el resultado fue negativo. Al trabajar con 20 sueros de bovinos que fueron positivos al PPD aviar en la prueba cervical comparativa, siete fueron detectados como positivos a ptb por el ELISA y confirmados por PCR, lo que implica que se puede utilizar para realizar el diagnóstico diferencial con tuberculosis. Si bien son pocas muestras las que se han trabajado, esto permite tener un criterio más amplio de lo que está pasando en los hatos donde existen las dos enfermedades (datos no publicados).

## CONCLUSIONES E IMPLICACIONES

La ptb es una enfermedad que causa grandes pérdidas económicas en la ganadería, por lo que, se requieren de pruebas diagnósticas sensibles y específicas para lograr la detección y posterior eliminación de los casos clínicos y subclínicos de los hatos, para que, de esta manera se reduzca la exposición de los animales jóvenes que son los más susceptibles a infectarse con Map. Además de que se hace indispensable el contar con técnicas diagnósticas que sean de fácil implementación en los laboratorios, y que puedan ser utilizadas para desarrollar estudios de tipo epidemiológico sobre la enfermedad en diversas especies de animales domésticos y silvestres, para poder determinar las medidas necesarias para su control. Los resultados obtenidos en el presente estudio, permiten recomendar el uso del ELISA con el antígeno protoplasmático de Map cepa 3065 (cepa nacional) como una alternativa para el diagnóstico de la ptb bovina, considerando que el diagnóstico de la enfermedad se debe llevar a cabo con una prueba serológica y una prueba confirmatoria como lo es el PCR o el cultivo.

## AGRADECIMIENTOS

Proyecto financiado parcialmente por Fondos Mixtos CONACYT-SAGARPA 48176.

of which is going through in the herds where both diseases are present (unpublished data).

## CONCLUSIONS AND IMPLICATIONS

Paratuberculosis is a disease that causes great economic losses in livestock, for which specific and sensitive tests are required to achieve detection and further elimination of the clinical and subclinical cases of the herds, so that exposure of young animals, which are the most susceptible to Map infection, be reduced. Besides, it is indispensable to count with diagnostic techniques easy to be implemented in laboratories, that they can be used to develop epidemiological studies on disease in diverse species of domestic and wildlife animals, and be able to determine the necessary control measures. The results obtained in the present study allow to recommend the use of ELISA with protoplasmic antigen of Map strain 3065 (national strain) as an alternative for bovine ptb diagnosis, considering that the diagnosis of the disease should be carried out with a serological test and a confirmatory one such as PCR or culture.

## ACKNOWLEDGEMENTS

Project partially financed by Fondos Mixtos CONACYT-SAGARPA 48176.

*End of english version*

---

## LITERATURA CITADA

1. Pino RV, Villarroel NR. Paratuberculosis: una amenaza emergente para la ganadería tropical. Manual de ganadería doble propósito Maracaibo-Venezuela. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad de Zulia. 2005.
2. Cocito C, Gilot P, Coene M, De Kesel M, Poupart P, Vannuffel P. Paratuberculosis. Clin Microbiol Rev 1994;7:328-345.
3. Pinedo PJ, Rae DO, Williams JE, Donovan GA, Melendez P, Buergelt CD. Association among results of serum ELISA, faecal culture and nested PCR on milk, blood and faeces for the detection of paratuberculosis in dairy cows. Transbound Emerg Dis 2008;50:125-133.
4. Abalos P. Actualidad en Paratuberculosis. TECNOVET 2001 Diciembre;7(3). [en línea] <http://www.tecnovet.uchile.cl/>

- index.php/RT/article/viewArticle/5291/5171. Consultado Oct 5, 2010.
5. Kreeger JM. Ruminant paratuberculosis a century of progress and frustration. *J Vet Diagn Invest* 1991;3:373-382.
  6. Craven JA, Morgan IR. Epidemiology and Pathogenesis of Paratuberculosis in cattle. A literature survey prepared for animal health Australia. 2000. [on line] <http://www.animalhealthaustralia.com.au/wp-content/uploads/2011/04/Epidemology-and-Pathogenesis-of-Johne%E2%80%99s-Disease-in-Cattle.pdf>. Accessed Oct 5, 2010.
  7. Harris BT, Barletta GR. *Mycobacterium avium subsp paratuberculosis* in Veterinary Medicine. *Clin Microbiol Rev* 2001;14(3):489-512.
  8. Park KT, Ahn J, Davis WC, Koo HC, Kwon NH, Jung WK, Kim JM, Hong SK, Park YH. Analysis of the seroprevalence of bovine paratuberculosis and the application of modified absorbed ELISA to field sample testing in Korea. *J Vet Sci* 2006;7(4):349-354.
  9. Speer CA, Scott MC, Bannantine JP, Waters WR, Mori Y, Whitlock RH, Eda S. A novel enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infections (Johne's Disease) in cattle. *Clin Vaccine Immunol* 2006;13(5):535-540.
  10. Klausen J, Huda A, Ekeröth L, Ahrens P. Evaluation of serum and milk ELISAs for paratuberculosis in Danish dairy cattle. *Prev Vet Med* 2003;58(3-4):171-178.
  11. Eda S, Bannantine JP, Waters WR, Mori Y, Whitlock RH, Scott MC, Speer CA. A Highly Sensitive and subspecies-specific surface antigen enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of Johne's disease. *Clin Vaccine Immunol* 2006;13(8):837-844.
  12. Yokomizo Y, Yugi H, Merkal RS. A method for avoiding false-positive reactions in an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the diagnosis of bovine paratuberculosis. *Jap S Vet Sci* 1985;47(1):111-119.
  13. Sung JS, Donghee Ch, Collins TM. Diagnosis of bovine paratuberculosis by a novel enzyme-linked immunosorbent assay based on early secreted antigens of *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis*. *Clin Vaccine Immunol* 2008;15(8):1227-1281.
  14. Hernández COA. Obtención de un antígeno protoplasmático de *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* para el diagnóstico de la enfermedad de Johne en ovinos [tesis Licenciatura]. México: FESC-UNAM; 2006.
  15. Martínez CAG. Desarrollo de un ELISA, para el diagnóstico de paratuberculosis en bovinos [tesis Licenciatura]. México: FMVZ-UNAM; 2009.
  16. Payeur JB, Jarnagin JL, Marquardt JG, Schaper LA, Martin BM. Laboratory Methods in Veterinary Mycobacteriology for the Isolation and Identification of Mycobacteria. Iowa, USA: USDA, Animal and plant health inspection service. Natl Vet Serv Lab. 1993:39-40.
  17. Erume J, Spargser J, Rosengarten R. Rapid detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* from cattle and zoo animals by Nested PCR. *Afr Health Sci* 2001;1(2):83-89.
  18. Jaimes MNG. Aplicación de la PCR anidada para el diagnóstico de Paratuberculosis a partir de heces de ovinos [tesis Licenciatura]. México: FESC -UNAM; 2006.
  19. Jaimes NG, Santillán FMA, Hernández COA, Córdova LD, Guzmán RCC, Arellano RB, Díaz AE, Tenorio GVR, Cuellar OA. Detección de *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis*, por medio de PCR-anidada a partir de muestras de heces de ovino. *Vet Mex* 2008;39(4):377-386.
  20. Bernardelli A, Cicuta ME, Nicola A, Roibón WR, Boehringer SI, Benítez MC, Barceló MC, *et al.* Paratuberculosis ovina en Corrientes, Argentina. *Rev Sci Tech Off Int Epiz* 2000;19(3):800-809.
  21. Gonzales SRA, Ramírez CIC. Método de adsorción de anticuerpos no específicos y obtención de un antígeno protoplasmático, para el diagnóstico de la paratuberculosis. *Tec Pecu Mex* 1986;52:99-104.
  22. Singh SV, Singh AV, Singh R, Sharma S, Shukla N, Misra S, Singh PK, *et al.* Sero-prevalence of bovine Johne's disease in buffaloes and cattle population of North India using indigenous ELISA kit based on native *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* "Bison type" genotype of goat origin. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2008;31(5):419-433.
  23. Clark DL, Koziczkowski RP, Radcliff RA, Ellingson JLE. Detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*: Comparing fecal culture versus serum enzyme-linked immunosorbent assay and direct fecal polymerase chain reaction. *J Dairy Sci* 2008;91(7):2620-2627.
  24. Santillán FMA, Córdova LD, Guzmán RCC, López MJ, Rosado RMI, Mojarro JFJ, Zermeño PA, Patiño ZP. Seroprevalencia de paratuberculosis en ganado bovino del estado de Guanajuato. Congreso Nacional de Buiatría. Morelia, Michoacán, México. 2004:127-130.
  25. Santillán FMA, Córdova LD, Guzmán RCC, López IJ. Paratuberculosis en el ganado bovino del Edo. de Guanajuato. Reunión anual CONASA, Pachuca Hidalgo. 2004:125-130.
  26. Córdova LD, Guzmán RCC, Santillán FMA, Favila HLC, Urrutia MJ, Gámez V. La paratuberculosis en la ganadería bovina de San Luis Potosí, México. Congreso Nacional de Buiatría. Monterrey N.L. México. 2010.
  27. Fajardo-Gutiérrez A, Yamamoto-Kimura L, Yañez-Velasco L, Garduño EJ, Martínez GMC. Utilidad de las curvas de sensibilidad y especificidad conjunta en la aplicación de una prueba de diagnóstico. *Salud Pública Mex* 1994;36(3):311-317.
  28. Soto JP, Kruze J, Leiva S. Comparación de tres métodos de diagnóstico de Paratuberculosis bovina en rebaños lecheros infectados. Instituto de Microbiología, Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile. *Arch Med Vet XXIV* 2002;2:265-273.
  29. Kokuina E, Chico A, Estévez M, Pérez D, Gutiérrez A, Cruz C. Utilización y valor predictivo de la determinación de anticuerpos antinucleares en un Hospital de Referencia Nacional de Salud. *Rev Cubana Med* 2006;45(3):520-530.
  30. Bench-Nielsen S, Jorgensen JB, Ahrens P, Feld NC. Diagnostic accuracy of *Mycobacterium phlei*-absorbed serum enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of bovine paratuberculosis in dairy cows. *J Clin Microbiol* 1992;30(3):613-618.

