EFICACIA DE UNA TECNICA DE PCR PARA DETECTAR MYCOBACTERIUM AVIUM SUBSP. SILVATICUM Y MYCOBACTERIUM PARATUBERCULOSIS EN MUESTRAS DE TEJIDO OVINO.

Bolea, R.M.; Pérez, V*; Chávez, G.; García Marín, J.F.*; Badiola, J.J.
Dpto. de Patología Animal (Histología y Anatomía Patológica)
Facultad de Veterinaria.Universidad de Zaragoza.Miguel Servet, 177. 50013. ZARAGOZA
* Dpto. de Patología Animal-Medicina Animal (Anatomía Patológica)
Facultad de Veterinaria. 24071.León.

INTRODUCCION

El diagnóstico de la paratuberculosis ovina es problemático debido a que las técnicas empleadas no logran unos resultados lo suficientemente sensibles y específicos. Este hecho es especialmente evidente cuando se trata del aislamiento e identificación de *Mycobacterium paratuberculosis (M. ptb)* en medios de cultivo, necesitando en ocasiones períodos muy largos, de varios meses, para conseguir resultados positivos (**3**). Asimismo, animales infectados, pero que presentan lesiones latentes, microscópicas y focales, suelen presentar resultados negativos o necesitar periodos de cultivo superiores al año (**5**).

La técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), basada en la amplificación y reconocimiento de fragmentos de ADN micobacteriano, específicos para cada especie, se han propuesto como una alternativa para el cultivo, debido a que acortaría el tiempo de identificación del bacilo. En el caso del *M. ptb,* la secuencia específica de ADN elegida para amplificar es la IS900 (**2**). Asimismo, la posibilidad de infección con *Mycobacterium avium silvaticum*, que produce una enteritis granulomatosa difusa en el ciervo (**Nyange,1991**), debe ser tenida en cuenta como diagnóstico diferencial. De esta bacteria se ha identificado la secuencia de ADN IS901 como específica de la misma(**4**).

En este trabajo se pretende dar a conocer la sensibilidad y especificidad de una técnica de PCR en la detección de ovinos infectados por M. ptbc., tanto experimentalmente como en su forma natural, relacionando dicha sensibilidad con los tipos lesionales presentes en los mismos.

MATERIAL Y METODOS

Animales

-Animales infectados experimentalmente: Se realizó el estudio en grupos de catorce corderos de un mes (A,Z,C). Los del grupo A fueron infectados oralmente con una dosis de $1,9x10^{12}$ UFC de una cepa de *Mas*. En el grupo Z, cada cordero fue infectado con una dosis total de $2,3 \times 10^{12}$ UFC procedente de una cepa de campo de *M.ptb*. El grupo C se mantuvo como control.

-Animales infectados de forma natural: Se estudiaron 74 ovejas procedentes de rebaños con paratuberculosis clínica.

Estudios anatomopatologicos. Se realizó la necropsia de todos los animales, tomando varias muestras de ileon, yeyuno, válvula ileocecal y ganglios mesentéricos, que fueron fijadas en formol 10% y procesadas por métodos histológicos (tinciones de H&E y ZN). El sacrificio se realizó de forma seriada en los corderos infectados experimentalmente a los 60, 120, 220 y 500 días post inoculación.

Técnica de PCR

En el procedimiento utilizado podemos considerar los siguientes puntos como importantes:

*Para la extracción y purificación de mycobacterias de las muestras de tejidos se empleó el protocolo señalado por Challans J, et all.(**1**). La extracción del ADN micobacteriano la llevamos a cabo con GE, cloroformo/octanol e isopropanol. Los cebadores empleados fueron 90/91, específicos para la determinación de la secuencia de inserción IS900 de *Map*, y los primers 102/103, en el caso de *Mas*. Se utilizaron controles positivos y negativos, y realizamos la lectura del producto amplificado mediante electroforesis en gel de poliacrylamida al 7,5% teñido con nitrato de plata.

RESULTADOS

Estudios anatomopatológicos.

Los animales infectados experimentalmente con *Mas* mostraron claras lesiones de distribución multifocal en ileon y ganglios linfáticos. Los inoculados con *M.ptb.* mostraban diferentes lesiones: nueve de ellos presentaban una lesión muy focal, localizada principalmente en el área interfolicular de la placa de Peyer y la mucosa adyacente, siendo la presencia de micobacterias inexistente o en número muy bajo. Los cinco corderos restantes mostraban lesiones difusas en áreas extensas del intestino delgado, con moderada a gran cantidad de bacilos ácido resistentes en los mismos. Los animales infectados de forma natural mostraban: catorce sin evidencia lesional y el resto con lesiones focales (39) o difusas(21).

Resultados de la técnica de la PCR.

Infección experimental:

Grupo A: Los resultados de la PCR fueron en ocho animales positivos a IS901, y todos ellos negativos a IS900.

Grupo Z: La PCR identificó 11 animales positivos a IS900, y todos negativos a IS901. De los positivos, 6 lo eran de los 9 que presentaban lesiones focales (66,6%), y los 5 con lesiones difusas (100%).

Infección natural:

Los animales que no mostraron lesiones fueron negativos a la técnica de la PCR. En el grupo de animales con lesiones focales (39), eran PCR positivo 13 (33,3%), mientras que los que presentaban lesiones difusas (21 ovejas), todas ellas dieron positividad a la PCR (100%).

DISCUSION Y CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos podemos observar que la técnica de la PCR realizada a partir de muestras de la mucosa ileal y ganglio linfático mesentérico ofrece una alta especificidad, ya que diferencia a las dos especies de Mycobacterium, muy relacionadas entre si, *M.a. paratuberculosis y M.a.silvaticum*. Esta especificidad de las secuencias de inserción, ha sido demostrada también por otros autores (**6**), a partir de cultivos.

El método de extracción de ADN descrito por Challans et al.(1994), que hemos seguido en nuestro trabajo, parece realmente eficaz, aunque si bien en los animales que presentaron lesiones difusas la sensibilidad de la PCR es alta, disminuye en los que presentaban lesiones focales con ligera evidencia de micobacterias.

En estudios bacteriológicos realizados mediante cultivo por otros autores (**5**) en ovinos con lesiones difusas, obtienen un 100% de positividad, semejantes a nuestros resultados con la PCR en este tipo lesional; mientras que cuando hacen referencia a las lesiones focales, sus resultados son del 50% de detección, superiores a los nuestros, pero teniendo en cuenta que se requieren hasta 15 meses para obtenerlos.

En conclusión, la técnica de la PCR confirma su valor como método diagnóstico para muestras de tejidos y aunque requiere una mejoría en su sensibilidad, sería el método ideal para confirmar etiológicamente casos clínicos y portadores o excretores de M.ptb.

BIBLIOGRAFIA

(1) Challans J, Stevenson K, Reid HW, Sharp JM.(1991):"A rapid method for the extraction and amplification of *M. paratuberculosis* DNA from clinical specimens".Proc III Int. Coll. PTBC.Orlando.USA:pp:549

(2) Green, E.P.; Tizard, M.L.V.; Moss, M.T.; Thompson, J; Winterbourne, D.J.; McFadden, J.J. & Hermon Taylor, J.(1989): "Sequence and characteristics of IS900, and insertion element identified in a human Crohn's disease isolate of M. paratuberculosis". Nucleic Acids Res. 17: 9063-9072

(3) Juste, R.A.; Marco,J.C.;Saez de Ocariz,C.& Aduriz,J.J.(1991):"Comparision of different media for the isolation of small ruminant strains of *Mycobacterium paratuberculosis*".Vet.Microbiol.,**28:** 385-390.

(4) Kunze, Z.M.; Wall, S.; Appleberg, R.; Silva, M.T.; Portaels, F.& McFadden, J.J. (1991). "IS901, a new member of a widespread class of atypical insertion sequences, is associated with pathogenecy in Mycobacterium avium". Mol. Microbiol. 5:2265-2272

(5).Pérez,V.:"Estudio de la paratuberculosis ovina".Tesis doctoral, 1993.Universidad de Zaragoza.

(6) P.H. Vary, P.R.Andersen, E. Green, J. Hermon-Taylor,and J.J. McFadden.(May 1990)."Use of Highly Specific DNA Probes and the Polymerase Chain Reaction To Detect *Mycobacterium paratuberculosis* in Johne's Disease".J. Clin. Microbiol.:pp 933-937.

Este trabajo ha sido realizado con la ayuda de los Proyectos CEC-CAMAR nº 8001-CT90-0014 y CICYT nº GAN 353/90.