

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS VETERINARIAS



**PRODUCCIÓN DE UNA VACUNA CONTRA PARATUBERCULOSIS Y SU  
APLICACIÓN EN UN REBAÑO DE TECATE, BAJA CALIFORNIA**

TESIS

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

PRESENTA

EDGA ALAN SANDOVAL AGUILAR

DIRECTORA

DRA. SAWAKO OSHIMA

Mexicali, Baja California, México

Febrero 2014

## COMITÉ ASESOR

Esta tesis se realizó bajo la dirección del Comité de Tesis indicado, ha sido revisada y aceptada por el mismo, como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias Veterinarias.

---

Dra. Sawako Oshima

DIRECTORA

---

Dra. Bertha Landeros Sánchez

ASESORA

---

Dr. Gerardo Enrique Medina Basulto

ASESOR

---

Dr. Gilberto López Valencia

ASESOR

---

Dra. Alama Tamayo Rossana Sosa

ASESORA

## **AGRADECIMIENTOS**

Estoy plenamente agradecido con todas las personas que colaboraron en la realización de esta tesis de maestría, sin su ayuda no hubiese sido factible haberla concluido. A mi Directora de tesis Dra. Sawako Oshima quien por su orientación, tenacidad, conocimiento, paciencia y apoyo incondicional dirigió este trabajo en cuestión. Al Sr. Julián Castellanos quien nos brindó toda la confianza para trabajar dentro de su explotación ovina. A mis asesores de tesis Dra. Landeros Sánchez, Dr. Medina Basulto, Dr. López Valencia y Dra. Rossana Sosa quienes por sus críticas y sugerencias acertadas enriquecieron esta documento. Y para finalizar de manera especial agradezco el apoyo por parte del Dr. Eiichi Momotani y al Dr. José Luis Stephano quienes contribuyeron de manera directa e indirecta en mi formación y la realización de mi tesis de maestría

## RESUMEN

El empleo de la vacunación contra la paratuberculosis (PTB) ovina es considerado un recurso útil para la disminución de la mortalidad en rebaños ovinos. Actualmente en México no se cuenta con biológicos comerciales para explotaciones pecuarias. En este trabajo se utilizó una cepa de referencia de *Mycobacterium avium* subesp. *paratuberculosis* (Map) para la producción de una bacterina. Se aplicó un esquema de vacunación en una explotación de ovinos en Tecate, Baja California, con historial del problema severo de paratuberculosis. Durante dos años se dio seguimiento para obtener la información sobre la respuesta inmune inducida por la vacunación. En la primera aplicación 73% (8/11) animales vacunados mostraron las lesiones inflamatorias duraderas (más de 4 meses) típicas de la respuesta de bacterina contra la paratuberculosis. Para observar el nivel de la respuesta humoral se desarrolló un método casero de la prueba de EVELISA (Etanol-Vortex ELISA) con antígeno lipídico de la Map. Se realizó la EVELISA en muestras de sueros de 8 animales en total, los cuales incluyen sueros seriadas de pre- y post-vacunación. Los resultados de EVELISA fueron no concordantes por animales; se observaron un aumento ligero del título de anticuerpos en 3 animales, un decremento ligero en 1 animal, mientras el resto de 4 animales no se observó cambios significativos. La técnica de EVELISA muestra la potencial en la detección de respuesta humoral en animales post-vacunación sin embargo se identificó la necesidad de la optimización de la prueba así como la experimentación con animales controlados para obtener resultados concretos sobre respuestas inmunes en animales vacunados. Según los efectos de la bacterina reportados en numerosas literaturas, el uso de bacterina en rebaños de pequeños rumiantes en Baja California es recomendable solamente para reducir la mortalidad debida a PTB, no para prevenir la enfermedad, por lo que se requiere el uso controlado de la vacuna supervisado por médicos veterinarios.

# ÍNDICE

RESUMEN .....	iii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	i
ÍNDICE DE CUADROS .....	i
I. INTRODUCCIÓN .....	1
II. ANTECEDENTES.....	2
2.1. Paratuberculosis .....	2
2.1.1. Etiología.....	2
2.1.2. Patogenia .....	4
2.1.3. Diagnóstico.....	7
2.1.4. Control y prevención .....	14
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	17
3.1. Área de estudio .....	17
3.2. Diseño del estudio .....	17
3.3. Animales.....	17
3.3.1. Criterios de inclusión .....	17
3.3.2. Criterios de exclusión .....	17
3.4. Aislamiento de Map .....	18
3.5. Mycobacterium avium subespecie paratuberculosis (Map) .....	18
3.6. Preparación de la bacterina .....	18
3.7. Etanol-Vortex ELISA (EVELISA).....	19
IV. RESULTADOS .....	20
V. DISCUSIÓN.....	24
VI. CONCLUSIONES.....	25
VII. LITERATURA CITADA .....	26

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Título</b>	<b>Página</b>
1	Preparación e inoculación de bacterina .....	21
2	Lesiones en el sitio de inoculación.....	22
3	EVELISA de ovinos pre y post vacunación.....	23

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro</b>	<b>Título</b>	<b>Página</b>
1	Vacuna actual vs. Vacuna ideal.....	16

## LISTA DE ABREVIACIONES

- ADN=** Ácido desoxirribonucleico
- AGID=** Inmunodifusión en gel agar
- ARNr =** Ácido ribonucleico ribosomal
- BAAR=** Bacilo ácido alcohol resistente
- CONASA=** Consejo nacional de salud
- EDTA=** Ácido etilendiamino-tetra-acético
- ELISA=** Ensayo por Inmunoabsorción ligado a enzima
- EVELISA=** Etanol-Vortex ELISA
- HCl=** Ácido clorhídrico Tris
- INFg=** Interferón gamma
- IP=** Intra-peritoneal
- JD=** Enfermedad de Johne
- Map=** *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis*
- MJ=** Mycobactin J
- µg=** Miligramo
- µl=** Microlitro
- NaCl=** Cloruro de Sodio
- NaOH=** Hidróxido de sodio
- OADC=** Complejo de ácido oleico albúmina dextrosa
- PBST=** Tampón fosfato salino de Tween
- PCR=** Reacción en cadena de la polimerasa
- PTB=** Paratuberculosis
- P/S=** Relación de muestras y control positivo. (S, muestra; P, control) positivo)
- SDS=** Dodecil sulfato de sodio
- Se=** Sensibilidad
- Sp=** Especificidad

**TB=** Tuberculosis bovina

**Th1=** Linfocito T ayudador tipo 1

**Th2=** Linfocito T ayudador tipo 2

**TMB=** 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina

**TNF- $\alpha$ =** Factor de necrosis tumoral

**UFC=** Unidades formadoras de colonias

**LJ=** Medio de cultivo Lowen-Stein Jenzen

**PPD=** Derivado proteico purificado (prueba cutánea)

## I. INTRODUCCIÓN

La paratuberculosis (PTB) o enfermedad de Johne (JD) es una enfermedad infecto contagiosa, producida por *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* (Map). Afecta el intestino delgado produciendo una enteritis y linfadenitis granulomatosas, principalmente a rumiantes tanto domésticos como silvestres (Greig *et al.*, 1999, Pavlik, 2000), provocando disminución en la producción de leche, baja fertilidad y eliminación precoz de los animales del rebaño. Para el diagnóstico de la PTB no es posible utilizar un solo método, debido principalmente a su curso fundamentalmente subclínico. (Berdadelli, 2000). La vacunación representa un recurso de gran valor para el control de esta enfermedad resulta muy recomendable a la hora de tomar decisiones en rebaños severamente afectados (Tamayo *et al.*, 2010). Los programas de vacunación varían de unas regiones a otras dependiendo de varios factores entre ellos se encuentra la prevalencia de la paratuberculosis, de la práctica de manejo del rebaño, tamaño y estructura de los mismos. La vacunación controla la paratuberculosis en cualquier estadio de la enfermedad. Con la vacunación, los animales expuestos desarrollan una respuesta inmune a Map evitando que la bacteria se instale en el intestino delgado. En animales infectados la vacunación retrasa la aparición de signos clínicos reduciendo por tanto la tasa de mortalidad.

Por lo anterior, en el presente trabajo se pretende producir una vacuna bacterina contra la paratuberculosis, aplicar un esquema de vacunación en un rebaño de ovinos y analizar las respuestas inmunes en animales vacunado

s.

## II. ANTECEDENTES

### 2.1. Paratuberculosis

La paratuberculosis (PTB) o enfermedad de Johne fue descrita por primera vez en 1895 cuando H. A. Johne y L. Frothingham hallaron la presencia de microorganismos ácido-alcohol resistente a partir de frotis de material intestinal, durante un brote de diarrea bovina en Alemania, sin poder identificar taxonómicamente al agente. En 1923 Bergey *et al.*, otorgaron el nombre de *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* (Map) al microorganismo causante de la enfermedad, como en la actualidad se le identifica. La PTB afecta principalmente a ovinos, bovinos, caprinos y otras especies de rumiantes, provocando signos como emaciación progresiva del animal y diarrea cada vez más grave (Abalos, 2010).

La PTB es endémica a nivel mundial, con altos niveles de prevalencia, fuerte impacto económico e importancia en salud pública por la asociación entre Map y la enfermedad de Crohn. Las pérdidas económicas acarreadas por la infección afectan hatos de bovinos de carne, lecheros y mixtos, por el descenso en la producción láctea, alteraciones reproductivas, mayor incidencia de mastitis, eliminación prematura de animales, pérdida de valor del animal al sacrificio, pérdida de potencial genético, etc. (Kennedy y Bennedictus, 2001; Kudahl y Nielsen, 2009). La PTB es considerada por SAGARPA como una de las dos prioridades de salud animal junto con la leptospirosis y se ha propuesto implementar un programa nacional para el control de la PTB, debido que en México las pérdidas económicas por PTB en el ganado lechero, han sido calculadas en 800 dólares por vaca al año (CONASA, 2010).

#### 2.1.1. Etiología

El agente etiológico de la paratuberculosis, *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis*, es un bacilo gram positivo, aerobio, de un tamaño entre 1,0-2,0 µm de longitud por 0,5 µm de ancho. Su temperatura óptima de crecimiento es de 37°C (Chiodini, 1986), es una bacteria de

crecimiento lento, difícil de cultivar y que requiere un aporte externo de micobactina (Cocito *et al.*, 1994; Taylor, 1949). En medio de cultivo sólido forma colonias pequeñas (1-5 mm), rugosas y generalmente no pigmentadas visibles a las 4-8 semanas (Chiodini *et al.*, 1984) aunque puede alargarse incluso hasta los 6 meses.

La estructura de la pared celular es común en todas las micobacterias y está formada por cuatro capas. La más interna es el glicopéptido o peptidoglicano con moléculas de N-acetilglucosamina y ácido-N-glucolilmurámico (en lugar del habitual N-acetilmurámico) con cadenas cortas de alanina. Esta capa es el esqueleto de la bacteria que le da forma y rigidez. A continuación hay una capa compuesta por polímeros de arabinosa y galactosa que es la responsable de mantener en contacto los peptidoglicanos con la siguiente capa formada por ácidos micólicos. Éstos son ácidos grasos derivados de 60 a 90 átomos de carbono en cadenas ramificadas y con un punto de fusión muy alto (Goodfellow *et al.*, 1982), son de gran importancia taxonómica en micobacterias y otros géneros relacionados como *Nocardia*, siendo además los principales responsables del ácido-alcohol resistencia de este grupo bacteriano. La capa más superficial está formada por glicolípidos y lipopolisacáridos. El LAM (lipoarabinomanano) juega un papel importante en la patogénesis de la tuberculosis (Barnes *et al.*, 1992a), lepra (Barnes *et al.*, 1992b) y paratuberculosis (Sugden *et al.*, 1989; McNab *et al.*, 1991). Se han descrito microorganismos con una pared celular deficiente (*Cell Wall Deficient*, CWD), denominado esferoplastos, aislados a partir de tejidos de pacientes con la enfermedad de Crohn (Chiodini, 1989) y en animales con la enfermedad de Johne (El Zaatari *et al.*, 2003).

Esta composición tan especial de la pared confiere a Map dos características muy importantes: 1) Ácido-alcohol resistencia gracias a la elevada composición lipídica de su pared que varía entre el 20-40% del peso celular seco (Smith, 1969). En las tinciones específicas como la tinción de Ziehl-Neelsen se observa la disposición específica de estos bacilos en agrupaciones formando grumos (o *clumps*). 2) Elevada capacidad de supervivencia en ambientes desfavorables durante períodos de tiempo

elevados, siendo uno de los factores que dificultan el control de la enfermedad. Varios informes describen la supervivencia de Map in vitro bajo diferentes condiciones físicas y ambientales, incluyendo la supervivencia en el agua, la orina y el estiércol a temperaturas extremas (Lombard *et al.*, 2006; Larsen *et al.*, 1956; Vishnevskii *et al.*, 1940). El organismo puede sobrevivir en el agua del estanque hasta 270 días en condiciones in vitro y hasta 246 días en heces bovinas en condiciones naturales donde la temperatura ambiente varió entre -3°C y 23°C (Lovel *et al.*, 1944). En donde se aislaron bacterias viables después de almacenar las mismas muestras de cinco meses a -14°C, después a 4°C durante cinco meses y finalmente a 38 °C durante ocho meses. Las bacterias almacenadas durante 12 meses a -14 °C y luego a 4°C durante cinco meses fueron también viable (Larsen *et al.*, 1956).

La pared celular de Map está implicada en los mecanismos de restricción de adsorción de nutrientes, ocasionando baja actividad metabólica que conlleva a una velocidad de crecimiento en condiciones óptimas 24 veces inferior que la de bacterias como *Escherichia coli* (Juste *et al.*, 1993).

### **2.1.2. Patogenia**

La fuente primaria de infección son los animales adultos infectados y los hatos que los albergan. La principal vía de transmisión es oro-fecal a través de pasturas y agua contaminada con materia fecal y de calostro o leche de animales infectados, así como en menor porcentaje, a través de placenta y semen. Los animales más susceptibles son los terneros menores de 30 días posiblemente debido a la extensa superficie que abarcan las placas de Peyer intestinales en los animales jóvenes, la cual va reduciéndose gradualmente, si bien los animales de más edad pueden infectarse dependiendo de su condición sanitaria y de la carga bacteriana (Gilardoni y Mundo, 2008). El sitio de infección primaria de esta bacteria son las mucosas intestinales, aunque algunos estudios hayan indicado que son las amígdalas y los ganglios retrofaríngeo (Payne y Rankin, 1961, Lugton, 1999).

El blanco de Map son los tejidos linfoides del hospedador asociados a las mucosas del tracto gastrointestinal superior del intestino, donde es

endocitado por las células M epiteliales, mediado por receptores de integrinas y fibronectinas (Sigurdardottir *et al.*, 2005, Secott *et al.*, 2004), que recubren las cúpulas de las placas de Peyer del íleon y yeyuno y posteriormente es fagocitado por los macrófagos subepiteliales e intraepiteliales (Momotami *et al.*, 1988, Lugton 1999).

Sin embargo, parece ser que las células M no son el único sitio de entrada de Map, al menos en cabras, se ha encontrado que en esta especie, la entrada de Map a la mucosa intestinal esta restringida a los enterocitos yeyunales no asociados a las placas de Peyer (Sigurdardottir *et al.*, 2005).

Map se localiza y reside preferentemente en los fagosomas o endosomas inmaduros de los macrófagos del hospedador, con predominio de aquellos asociados a las placas de Peyer ileales y yeyunales (Momotami *et al.*, 1988, Corpa *et al.*, 2000). Los bacilos de Map, son capaces de sobrevivir intracelularmente inhibiendo la acidificación del fagosoma e impidiendo su maduración a fagolisosoma (Cheville *et al.*, 2001). Map es resistente a la degradación por las enzimas lisosómicas, el óxido nítrico y además mecanismos bactericidas que producen los macrófagos, debido entre otros mecanismos a su envoltura celular lipídica (Zhao *et al.*, 1997, Harris y Barleta, 2001, Tessema *et al.*, 2001). Los macrófagos epiteliales activados, estimulan a las dos subpoblaciones celulares (Th1 y Th2) de las células T ayudadoras que a su vez estimulan diferentes tipos de respuestas inmunes en el huésped. La infección por Map parece seguir los patrones observados en *M. tuberculosis*, *M bovis* y *M. leprae*; estos patrones implican una respuesta inmune inicial de tipo celular (Th1) o tuberculoide, en donde la producción de citocinas causan la formación de un granuloma intestinal para contener la infección (Coicito *et al.*, 1994, Lugton, 1999). La respuesta Th1 también se caracteriza por la producción de gamma interferón (INF $\gamma$ ) una de las primeras citocinas detectables en la infección por Map, así como la Interleucina 2 (IL-2) y el Factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ). Estas citocinas dirigen las funciones inmunitarias mediadas por células que son necesarias para contener la infección intracelular.

Durante la etapa subclínica temprana de la infección por Map, la actividad de la respuesta celular Th1 parece predominar. Esta etapa puede durar meses o años durante la cual los bacilos permanecen microscópicos dentro de los macrófagos y granulomas; las células T de memoria y su respuesta es requerida para controlar la diseminación y el daño del tejido ocasionado por la infección; debido a esto se cree que este tipo de respuesta es protectora. A medida que la enfermedad avanza, la respuesta inmune celular disminuye, reflejando un cambio de respuesta de Th1 a Th2 (Chiodini, 1996). Cuando los animales entran a la etapa de infección lepromatosa o Th2, comienza a manifestar signos clínicos inespecíficos de la infección, tales como pérdida de peso, en algunos casos diarrea y excreción intermitente de la bacteria (Koets, *et al.*, 1990). El cambio de respuesta inmune Th1 a Th2, se ha asociado con la progresión de la PTB del estado subclínico al clínico (Stabel, 2010). Th2 estimula la producción de las citocinas reguladoras IL-4, IL-5 e IL-10 las cuales activan la respuesta inmune humoral caracterizándose por la expansión de los linfocitos B, la secreción de inmunoglobulinas, y el control de la respuesta mediada por Th1. A diferencia de la respuesta celular, el tipo de respuesta humoral no es protectora y no tiene la progresión ni la patología de la infección. En la etapa avanzada de la enfermedad, la afluencia de células inflamatorias hace que la pared intestinal del animal se engrose hasta hacerlo no funcional, ocasionando deficiencia en la absorción de nutrientes que desencadena una enteropatía (Patterson *et al.*, 1967). A medida que la infección progresa, los fagocitos infectados diseminan las micobacterias por otros órganos del cuerpo, los cuales son transportados por los vasos sanguíneos y linfáticos (Merkal 1984, Van der Giessen *et al.*, 1995, Lugton, 1999).

De acuerdo a la relación huésped agente que se presente los animales afectados pueden dividirse en tres fases:

**Fase I: *Infección silenciosa.*** Esta fase se caracteriza por la ausencia de signos clínicos de la enfermedad, desarrollan rápidamente resistencia a la bacteria, controlan la infección y no se vuelven portadores contaminantes.

**Fase II. *Fase subclínica.*** La infección no está completamente controlada, algunos animales la controlan parcialmente pero excretan la bacteria de

forma intermitente, mientras que otros incuban la enfermedad y excretan grandes cantidades de bacterias. La mayoría de los animales infectados en una explotación se encuentran en esta fase. En la cual no muestran signos clínicos evidentes de la enfermedad, aunque si lesiones microscópicas (Pérez *et al.*, 2000), también pueden presentar anticuerpos circundantes o respuestas inmunes celulares alteradas. En esta fase los animales comienzan a perder productividad, en el caso de los bovinos se disminuye la producción láctea entre el 4-14% (Wilson *et al.*, 1997), adicionalmente en esta etapa se observa la aparición de síntomas inespecíficos como la disminución de la fertilidad y la mastitis (Valentin-Weigand *et al.*, 1998).

**Fase III. Fase clínica.** Esta fase sólo se desarrolla tras varios años de infección por Map, en bovinos puede comenzar entre los 3-4 años y en pequeños rumiantes el inicio de la enfermedad puede empezar antes de los 2 años; en ambos casos esto coincide con los partos y el inicio de la lactancia (Manning y Collins., 2001, García *et al.*, 1994). Los signos clínicos característicos que se presentan son diarrea intermitente, que afecta principalmente a los bovinos, la cual no responde a tratamiento debido a que el agente persiste en la mucosa intestinal, las bacterias son fagocitadas por los macrófagos, los cuales proliferan e infiltran la submucosa del intestino, provocando una menor absorción, se reduce la absorción de nutrientes; lo que provoca en la vaca hipoproteinemias, disminución de la masa muscular y edema. En ovinos y caprinos no es común la presencia de diarrea, aunque esta puede aparecer en algunos casos en la fase final de la enfermedad, cuando las lesiones afectan ampliamente el intestino.

**Fase IV. Fase final.** A esta fase pertenecen los animales en estado clínico avanzado, cuyas características principales son, debilidad, emaciación, diarrea acuosa o profusa, caquexia extrema, edema intramandibular y deshidratación que conduce a la muerte del animal.

### 2.1.3. Diagnóstico

El diagnóstico de la paratuberculosis es difícil debido a su naturaleza fundamentalmente subclínica, el diagnóstico se puede llevar a cabo mediante el uso de pruebas serológicas como ELISA, las cuales son

utilizadas como pruebas tamices, posteriormente se confirman demostrando la presencia de Map en las heces mediante microscopía, cultivo o empleando sondas de ADN y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (OIE, 2008).

### **2.1.3.1. Serología**

Los animales clínicamente infectados son grandes excretores y tienen una respuesta inmune humoral detectable por las técnicas inmunoenzimática (ELISA), inmunodifusión en gel de agar (AGID) y fijación de complemento (CFT) (Gilardoni y Mundo, 2008). La sensibilidad de estas pruebas es más alta para los animales con lesiones lepromatosas, con signología clínica o aquellos que excretan un gran número de bacterias. Esto es debido a que en los estadios tempranos de la enfermedad, la excreción del bacilo es baja y las inmunoglobulinas específicas son producidas en cantidades no detectables. Durante la infección por Map, los animales desarrollan dos tipos de respuestas inmune, una de tipo celular que evoluciona a otra de tipo humoral. Sin embargo, identificar con precisión a animales en las primeras etapas de la infección es una limitante debido a que la respuesta humoral fuerte se produce hasta la última etapa de la enfermedad. Por el contrario, todas estas pruebas son altamente específicas, y los resultados falsos positivos ocurren con baja frecuencia.

ELISA como método de diagnóstico de la PTB, es utilizado en la estimación de prevalencia y certificación de explotaciones de ganado, así como en el monitoreo y vigilancia de regiones en donde la PTB ha sido erradicada y este estatus debe ser mantenido. Sin embargo el solo resultado obtenido por esta prueba puede tener un valor limitado, por lo que se recomienda la confirmación de los resultados de ELISAS positivos, por otras pruebas como el cultivo fecal (Nielsen *et al.*, 2010)

#### **2.1.3.1.1. EVELISA (Etanol-Vortex ELISA)**

Esta técnica se basó en resultados obtenidos mediante citometría de flujo, en donde se observó anticuerpos presente en el suero de bovinos infectados con Map se unían específicamente a la superficie de este organismo y no a la de otras especies de micobacterias.

Esta observación hizo inferir que Map podría presentar antígenos únicos en el exterior de su superficie celular.

EVELISA es una prueba diagnóstica con mayor especificidad para la enfermedad de Johne's en el ganado la cual utiliza antígenos extraídos de la superficie de Map, esta prueba fue probada en el 2006 por el Dr. Eda *et al.* con el objetivo de mejorar la técnica de ELISA, y para identificar tanto animales de baja excreción como medios excretores, ya que una de las deficiencias de las ELISAs comerciales es tener baja sensibilidad en muestras de animales que cursan una etapa temprana de la enfermedad. En este estudio EVELISA fue capaz de identificar el 96.6% de los excretores fecales de bajo nivel y el 100% de los excretores de nivel medio y alto, mientras que ELISA comercial detectó el 13.7% de los animales de bajo nivel excretor y el 25% en excretores de nivel medio y 96.2% en los excretores de alto nivel. Así EVELISA fue sustancialmente superior a ELISA comercial, especialmente en la detección de excretores de bajo y medio nivel. EVELISA podría ser la base para un ensayo específico y muy sensible para el diagnóstico de paratuberculosis.

#### **2.1.3.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

Esta técnica permitió grandes avances en el diagnóstico molecular de la PTB, debido a la rapidez en la detección de la bacteria, comparado con el tiempo requerido por el cultivo fecal (Whittington *et al.*, 1988, 2009). Map ha podido ser identificado por PCR aun antes de su aislamiento por cultivo, a partir de muestras fecales, (Kawaji *et al.*, 2007, Irenge *et al.*, 2009), leche (Djonne *et al.*, 2003, Kaur *et al.*, 2010), sangre y tejidos. Siendo una gran ventaja sobre todo para aquellas cepas difíciles de aislar como las del tipo I/III. A pesar de estas ventajas que representa, tiene como gran limitante la baja sensibilidad para identificar pequeñas cantidades de bacterias en comparación con el cultivo fecal (Collins *et al.*, 1993) y la presencia de inhibidores contenidos en los especímenes que se van a amplificar, particularmente cuando el ADN es preparado a partir de extractos fecales (Englund *et al.*, 1999).

La secuencia genética mas comúnmente utilizada es IS900, el cual fue el primer elemento móvil identificado en micobacterias y específicamente en aislados de Map (Green *et al.*, 1989, Collins *et al.*, 1989). IS900 es parte de la familia IS110, cuyos miembros están estrechamente relacionados entre si. Es una secuencia de 1451 pb, que se insertan en una sola dirección dentro de una secuencia diana. Se ha encontrado que en cada bacilo de Map presenta entre 14 a 18 copias de IS900 por genoma bacteriano (Green *et al.*, 1989, Collins *et al.*, 1989, Bull *et al.*, 2000).

#### **2.1.3.2.1. Secuencias específicas de Map**

**F57.** Es una secuencia de 620 pb que se encuentra presente un una sola copia en el genoma de Map Este fragmento no ha hibridado con AND de ninguna otra micobacterias y tampoco esta relacionada con ninguna secuencia conocida de Map incluida IS900 (Poupart *et al.*, 1993) y hspX (Ellingson *et al.*, 1998). F57 se ha empleado como diana en aplicaciones por PCR para identificar Map en diferentes estudios (Coetsier *et al.*, 2000, Vansnick *et al.*, 2004, Möbius *et al.*, 2008, Castellanos *et al.*, 2009). Sin embargo, la presencia de solamente una copia por bacteria hace que su sensibilidad sea reducida en comparación con IS900.

**hspX.** Este gen al igual que F57, se encuentra presente en el genoma de Map en una sola copia, lo cual hace que la sensibilidad de su utilización en distintas técnicas de identificación de Map sea reducida (Elligson *et al.*, 1998, 2005).

**Genes 251 y 255.** Estos dos genes fueron confirmados como específicos de Map mediante análisis de hibridación de ADN (Bannantine *et al.*, 2002) han sido utilizados para la identificación de Map en distintos trabajos (Motiwala *et al.*, 2004; Rajeev *et al.*, 2005; Möbius *et al.*, 2008).

**ISMAP02.** Se encuentra presente en el genoma de Map en un total de 6 copias, debido a esto se ha propuesto como un posible diana alternativa al empleo de IS900 (Pausian *et al.*, 2004, Stabel y Bannantine, 2005; Ireng *et al.*, 2009; Sohal *et al.*, 2009)

En la actualidad se siguen buscando nuevas dianas que sean específicas de Map y que puedan suplir a IS900 o al menos complementarla. La secuencia del genoma de Map ha revelado contener diversos genes que no han sido encontrados en otros organismos, los cuales son el blanco de diversos estudios científicos.

### **2.1.3.3. Bacteriología**

La prueba de cultivo fecal aún es reconocido como el estándar de oro para el diagnóstico de la PTB, pero se requiere de 5 a 16 semanas para el crecimiento de colonias, tiene una sensibilidad del 38%, y al igual que la prueba de PCR no puede distinguir entre el paso a través de los bacilos y la colonización del tracto intestinal (Whitlock *et al.*, 2000). La histopatología puede identificar bacilos ácido-alcohol resistentes (BAAR) al utilizar las tinciones de Ziehl-Neelsen, la presencia de BAAR no asegura que sea Map, las inmunohistoquímicas llevadas a cabo en cortes de tejido que contienen BAAR no son específicas para Map y tampoco lo son las pruebas serológicas como ELISA. Map se define como un parásito obligado, por lo que su identificación precisa por el cultivo, es el punto de referencia para el diagnóstico de la paratuberculosis a nivel del rebaño/manada y animal individual.

#### **2.1.3.3.1. Medios de cultivo**

Existen dos Técnicas para cultivar muestras de Map, la técnica convencional que utiliza medios sólidos y la técnica radiométrica (BACTEC). Los medios de cultivos sólidos más frecuentemente empleados para el aislamiento de Map son aquellos a base de huevo como el HEYM (*Herrold's eggs yolk medium*) (Kim *et al.*, 1989) o el Löwestein Jensen (LJ) (Jorgenson, 1982), aunque también se utilizan medios sintéticos como los medios Middlebrook 7H9, 7H10, 7H11 o medios dudosos adicionados con OADC y micobactina J (Aduriz, 1995, OIE, 2008)

##### **2.1.3.3.1.1. Cultivo convencional.**

Permite la detección directa de Map y es el método más empleado en la gran mayoría de los países ya que se le considera como la prueba de

referencia. La principal desventaja que tiene este método es la lentitud en el crecimiento de Map (sobre todo en las cepas del tipo I/III) y la no obtención en aislamientos en aquellas cepas que están formadas de esferoblastos (Whittington *et al.*, 2000a).

#### **2.1.3.3.1.2. Cultivo radiométrico**

Este método utiliza el medio BACTEC™ 12B, suplementado con yema de huevo y micobactina J. El cultivo radiométrico representa una alternativa a los medios de cultivos tradicionales y se basa en la detección de crecimiento de las micobacterias mediante la cuantificación del  $^{14}\text{CO}_2$  liberado tras la metabolización del  $^{14}\text{C}$  presente en el medio del cultivo

#### **2.1.3.4. Histopatología**

El análisis macroscópico de los tejidos procedentes de animales sospechosos es un diagnóstico presuntivo debido a que existen casos en los que no se observa ninguna alteración aparente en la mucosa intestinal a pesar de que los animales presenten semiología (Burgelt *et al.*, 1978). A pesar de esto, en estos casos el diagnóstico se puede complementar con un estudio histopatológico del tejido intestinal, sobre todo de la válvula ileocecal (Carrigan y Seaman, 1990). Esta metodología tiene la ventaja de identificar no sólo animales con lesiones graves sino que también con lesiones focales asociadas a fases subclínicas de la enfermedad (Corpa *et al.*, 2000; Pérez *et al.*, 1996). Para poder identificar correctamente las lesiones es muy importante la realización de una correcta obtención de muestras incluyendo siempre tejido linfoide intestinal que es donde se localizan las lesiones iniciales y latentes de la paratuberculosis (Juste *et al.*, 1994; Nisbet *et al.*, 1962). Para la observación de las lesiones histológicas se ha empleado de forma rutinaria la técnica convencional de la Hematoxilina-Eosina siempre en combinación con la tinción de Ziehl-Neelsen para la observación de bacilos ácido-alcohol resistentes. Sin embargo, en algunos casos con lesiones visibles en las muestras el número de bacilos es escaso o incluso nulo (Burgelt *et al.*, 1978; Stamp y Watt, 1954). La sensibilidad de la técnica histopatológica varía según los distintos autores, hay algunos que la

consideran inferior al cultivo microbiológico (Se 55%) sobre todo en ganado bovino (De Lisle *et al.*, 1980), y otros por el contrario han identificado un mayor número de animales con lesiones características de paratuberculosis en ganado ovino y caprino comparándolo con el diagnóstico microbiológico (Dimareli-Malli y Sarris, 2001; Pérez *et al.*, 1996). Esta disparidad de resultados se debe principalmente a las características de los aislados de Map ya que en concreto los procedentes de pequeños rumiantes son muy difíciles de cultivar y requieren condiciones especiales para su aislamiento en laboratorio. El principal inconveniente de esta metodología es el requerimiento del animal muerto, aunque en algunos casos se ha propuesto la aplicación en animales vivos mediante el análisis de biopsias pero es muy costoso, y además requiere un manejo especializado de los animales.

La histología puede complementarse con técnicas como la inmunohistoquímica. La técnica emplea anticuerpos específicos frente a Map y posteriormente con una reacción enzimática se pone de manifiesto la presencia de antígenos en secciones histológicas. Esta técnica tiene mayor capacidad de detección de micobacterias que otras tinciones y en este caso también se identifican los bacilos con la integridad de su pared afectada (Coetsier *et al.*, 1998; Massone *et al.*, 1990; Navarro *et al.*, 1991).

Las muestras se fijan en formol al 10% y se realiza la inclusión en parafina, se hacen cortes en micrótopo, con un espesor de 4 micras y se tiñen con Hematoxilina-Eosina y Ziehl-Neelsen.

A la observación microscópica se puede ver un infiltrado de células epitelioides en el corion de la mucosa y de la submucosa, deformación de las vellosidades con engrosamiento de la mucosa, comprimiendo las criptas de Lieberkühn.

En los cortes teñidos con Ziehl-Neelsen se visualizan gran cantidad de células epitelioides que contienen dentro de cada una de ellas, bacilos ácido-alcohol resistentes, principalmente en el corion de la mucosa y en los ganglios mesentéricos.

#### 2.1.4. Control y prevención

Las medidas de control comprenden buenas prácticas sanitarias, identificación oportuna de animales infectados en el rebaño, eliminación de animales infectados y una vigilancia constante de animales adultos (Meyer, 1994). La vacunación se considera una muy buena alternativa para disminuir la mortalidad de esta enfermedad en los ovinos y caprinos de nuestro país (CONASA, 2010).

Australia, por ser un país líder en la producción ovina mundial lleva varios años vacunando contra la PTB ovina. En ese contexto, emprendió una experiencia de campo de 5 años de duración para determinar la eficacia de una vacuna inactivada por calor, en emulsión oleosa múltiple de la cepa 316F de *Mycobacterium avium paratuberculosis* (Gudair) contra la paratuberculosis ovina en ovejas merinas australianas. En su diseño y puesta en práctica estuvieron involucradas las autoridades australianas, organizaciones de productores de ovino y, en particular, el Programa Nacional de Control de la Paratuberculosis Ovina (*National Ovine Johne's Disease Program*, NOJDP).

La mencionada vacuna estimuló la respuesta inmunitaria celular y humoral, redujo en un 90% la mortalidad ocasionada por la paratuberculosis y retrasó la excreción fecal del agente patógeno hasta el año siguiente a la vacunación. Un año después, la prevalencia de animales que excretaban el agente patógeno entre los ejemplares vacunados disminuyó en un 90%. En la mayoría de los muestreos, el número de Map eliminado a través de las heces también se redujo como mínimo un 90% en los grupos vacunados.

No obstante, en algunas ocasiones se detectaron niveles elevados de excreción en las ovejas vacunadas, y aunque sólo 7 de los 600 ejemplares vacunados murieron a consecuencia de la PTB, estos siete animales presentaban la forma multibacilar de la enfermedad. Durante el año siguiente a la vacunación, se observó una ligera reducción de la ganancia de peso en los corderos vacunados, aunque la repercusión de esta disminución sobre la puntuación del estado corporal de los animales o la producción de lana fue mínima. Casi el 50% de las ovejas presentaban nódulos fibrosos en el punto de inyección de la vacuna dos meses después de la administración,

y en el 20-25% de los ejemplares vacunados estas lesiones persistieron como mínimo durante 4 años.

Los datos de este estudio, avalan el papel fundamental de la vacunación en el tratamiento actual de la paratuberculosis ovina y permitieron que se registrase en Australia en el año 2002, la vacuna Gudair (Marcos y García, 2002).

La implementación de un conjunto de medidas rigurosas también son necesarias para tener éxito en el control de la paratuberculosis. 1) Realizar un manejo separado de los terneros y animales jóvenes. Los animales adultos pueden compartir pasturas e instalaciones con los animales jóvenes a partir del año de edad nunca antes. 2) Evitar la entrada de animales infectados a la explotación. 3) Identificar animales infectados mediante la prueba de ELISA tomando una muestra estratificada por edad. De cada estrato se toma un número de animales de acuerdo con la prevalencia esperada y el tamaño del hato. 4) Confirmar el diagnóstico clínico o serológico por cultivo fecal. La implementación de estas medidas sanitarias y de manejo no solamente contribuyen a controlar la paratuberculosis, sino que evitan la transmisión de otras enfermedades causadas por micobacterias principalmente la tuberculosis (Whan, *et al.*, 2001).

La vacuna para la paratuberculosis ha sido comercialmente disponible por muchos años, pero por desgracia no es completamente eficaz en la prevención de la enfermedad. Los animales vacunados contra la paratuberculosis desarrollan tanto hipersensibilidad de tipo retardada como anticuerpos séricos, ayuda a prevenir la enfermedad clínica pero no evita necesariamente la infección. También interfiere con los programas de diagnóstico y de control de la tuberculosis bovina. Así, si se necesita diagnosticar la infección en animales vacunados, sólo se pueden utilizar pruebas de detección para Map en heces (Jorgense, 1984), por lo que las características de la vacuna ideal para PTB se observan en el cuadro 1.

**Cuadro 1.** Vacuna actual vs. vacuna ideal

<b>Características</b>	<b>Map total- aceite</b>	<b>Vacuna ideal</b>
Disminuir signos clínicos	Si	Si
Prevenir el establecimiento e infección	No	Si
Respuesta protectora a largo plazo	?	Si
Lesiones en el sitio de la inoculación	Si	No
Lesiones por auto inoculación	Si	No
Falsos positivos en pruebas inmunológicas de TB	Si	No
Falsos positivos en pruebas inmunológicas de la PTB	Si	No

Lisle GW (2010)

## **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **3.1. Área de estudio**

*Trabajo de laboratorio.* Se desarrollo en las instalaciones del Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias de la Universidad Autónoma de Baja California; granja de ovinos, corral de experimentación, Laboratorio de Tuberculosis y Brucelosis y Laboratorio de Biología Molecular.

*Inoculación.* Se llevo a cabo en una explotación ovina con historial de paratuberculosis en Tecate, Baja California, México.

### **3.2. Diseño del estudio**

Estudio longitudinal de la respuesta inmune en ovinos vacunados durante un periodo de 2 años (diciembre 2009 a diciembre 2011).

### **3.3. Animales**

Se vacunaron 244 hembras reproductoras mayores a 8 meses de edad.

Se dio el seguimiento de la respuesta inmune de 8 animales en total, los cuales fueron seleccionados por conveniencia del muestreo, según la disponibilidad de animal en visitas al rancho posterior a la primera vacunación.

#### **3.3.1. Criterios de inclusión**

Hembras reproductoras mayores a 8 meses de edad.

#### **3.3.2. Criterios de exclusión**

Hembras reproductoras con previa inoculación con Map ya sea por la aplicación de la prueba de johnina (PPD aviar) o por vacuna comercial contra paratuberculosis.

### 3.3.3. Inoculación

La aplicación de la vacuna fue de una sola dosis de bacterina de Map equivalente a 10mg (peso mojado) de la bacteria.

### 3.4. Aislamiento de Map

Las muestras de heces fueron procesadas para la realización de cultivos bacteriológicos, en medio sólido Middlebrook 7H10 (Becton Dickinson) suplementado con yema de huevo, Lowen-Stein Jensen (LJ) con yema de huevos, y Middlebrook 7H11, según la metodología descrita por Harris *et al.*, (2009), modificando la concentración del coctel de antibióticos (Anexo 3) y 7H9 con 2 µg/ml de MJ. Se incubaron a 37°C y su crecimiento fue verificado hasta la observación de las colonias o turbidez del líquido.

### 3.5. *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* (Map)

La cepa de Map utilizada para la preparación de la vacuna y preparación de antígeno, fue la cepa de referencia; ATCC 19698, la cual se cultivó en medio líquido Middlebrook 7H9 con 10% de Complejo de ácido oleico albúmina dextrosa (OADC) y 2 µg/ml de MJ a 37°C hasta la observación del crecimiento exponencial de la bacteria, durante 3 meses.

### 3.6. Preparación de la bacterina

Se cosecho Map en fase estacionaria y se procedió a lavar tres veces con Tampón fosfato salino estéril (PBS), se cuantificó el peso mojado y se incubó a 75 °C durante 45 minutos con agitación continua. La preparación de las dosis vacúnales fueron manualmente mezcladas, 10 mg de Map inactivada en 0.5 ml de PBS, y 0.5 ml de aceite mineral estéril con 0.5% de Tween 20 en dos jeringas ligadas a la aguja emulsificadora, y se preparó

emulsión mezclando aproximadamente 5 minutos por cada dosis. La emulsificación fue realizado también utilizando el sonificador el modelo Branson.

### **3.7. Etanol-Vortex ELISA (EVELISA)**

Para analizar la respuesta inmune en animales vacunados, se analizaron muestras de sueros pre- y post-vacunación mediante una técnica nueva de ELISA donde utilizó un antígeno lipídico de Map (EVELISA) según el método publicado por Eda et al. (2006). Cada pocillo de una placa recubierta con antígenos lipídicos de Map se incubo con 300 µl de buffer B (100 ml Superblok [Blocking Buffer in PBS, Thermo Scientific®], 10ml 10X PBS 800 ml de agua destilada y 500 µl de Tween 20) a temperatura ambiente durante 1 hora. Se descartó la solución, se lavaron dos veces con 100 µl de PBS 0.05% Tween 20 (Fosfato salino, que contiene 0,05% de Tween 20), los sueros fueron diluidos 1:100 en buffer B, en cada pozo se colocaron 50 µl de cada muestra, incluyendo los sueros controles, y se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora. Después se procedió a lavar los pocillos cuatro veces con 100 µl de PBS 0.05% Tween 20, posterior al lavado se añadió 50 µl/pozo del anticuerpo secundario cabra anti-bovina de inmunoglobulina G (IgG) diluida 1:500 en buffer B, se incubo durante 45 min. transcurrido el tiempos se procedio a lavar los pocillos cuatro veces con 100 µl de PBS 0.05% Tween 20, y se añadieron 50µl/pozo de TMB se incubó de 15-30 min, se añadió 100 µl/pozo de solución STOP (2M, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), se pocedio a realizar la lectura en un lector de ELISA a 450 nm (Eda, *et al.*, 2006).

## IV. RESULTADOS

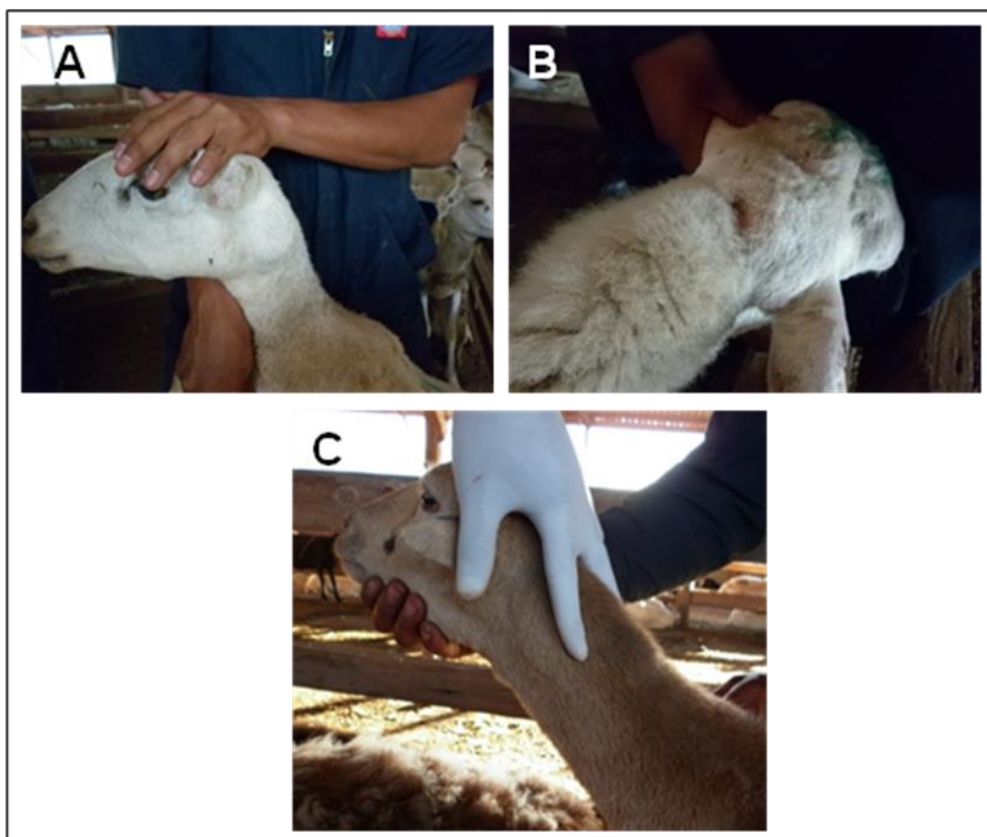
Se implementó la técnica de producción de vacuna bacterina utilizando una cepa referencia de Map ATCC 19698 con el protocolo modificado del manual de OIE. (Figura 1,A, B). La obtención de la emulsión mediante el aparato sonificador fue más exitoso porque en 30 segundos se prepara alrededor de 100 dosis en un tubo Falcon de 50mL, comparado con el tiempo que tarda (5-10min) para obtener un dosis de emulsión mediante agujas emulsificadoras (Figura 1.A.). Se aplicaron 244 dosis de vacuna en total en animales reproductoras de un rebaño en Tecate, Baja California (Figura 1.C), con previo muestreo de sangre pre-vacunación. No hubo ninguna reacción alérgica en animales vacunados ni efectos adversos notificados por el propietario del rebaño.

En la primera aplicación de vacuna en 11 animales reproductoras resultaron 72% (8/11) de animales con lesiones aparentes por más de 4 meses en el sitio de inoculación (Figura 2, A.B.C). La mayoría de estas lesiones no han desaparecidas durante el presente estudio (datos no mostrados) al igual que lesiones causadas en algunos animales del mismo rebaño previamente vacunados con vacuna comercial contra paratuberculosis (marca Fortdoge) (Datos no mostrados).

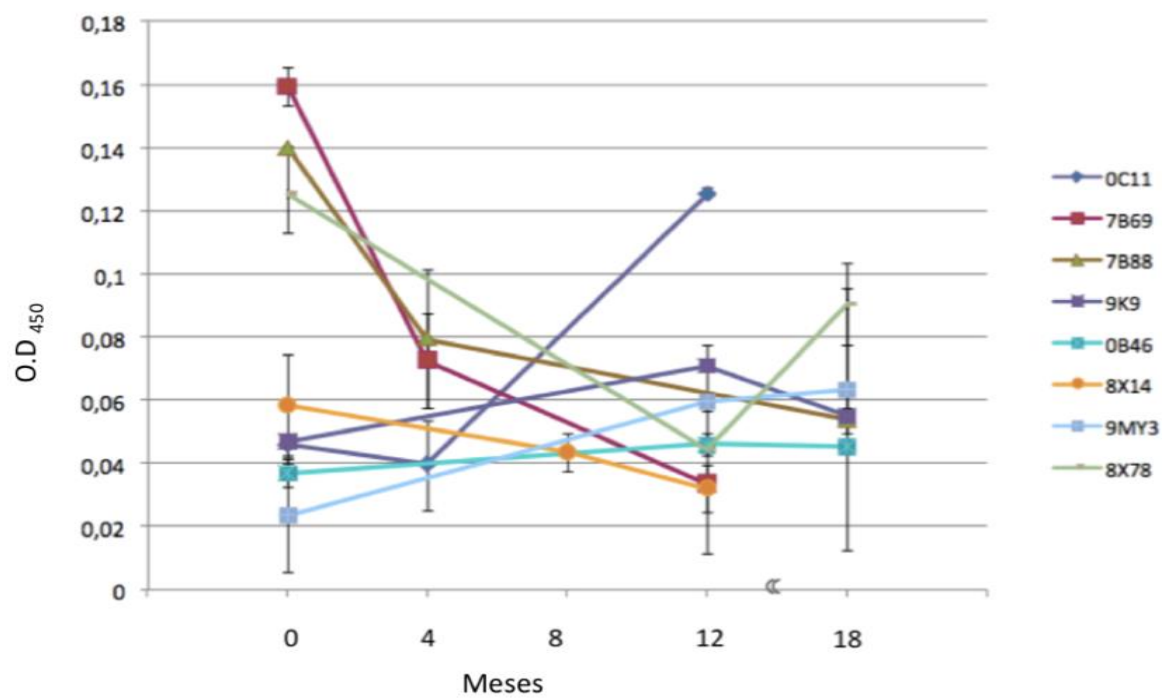
Figura 3. Muestra los resultados de EVELISA aplicadas a muestras seriadas de pre- y post vacunación de 8 animales en el rebaño. El nivel de los títulos fueron bajos, probablemente por la falta de optimización, sin embargo, se pudo observar un decremento ligero en 3 animales (7B69, 7B88, y 8X68) así como un incremento ligero en 1 animal (0C11) analizado. El resto de 4 animales permanecieron con el nivel de anticuerpos bajo en el rango de los controles (“blank”) de la placa.



**Figura 1. Preparación e inoculación de bacterina**



**Figura 2. Lesiones en el sitio de inoculación**



**Figura 3. EVELISA de ovinos pre y post vacunación**

## V. DISCUSIÓN

La vacunación es una herramienta clave para el control de la paratuberculosis, y junto con un adecuado manejo e higiene del rebaño, ayuda a controlar la propagación de la enfermedad y a reducir el riesgo de infección.

En el presente trabajo se estandarizó el protocolo de producción de vacuna y se produjeron 244 dosis de vacunas contra paratuberculosis utilizando una cepa de referencia de MAP (ATCC 19698). No hubo ninguna reacción alérgica en animales vacunados ni efectos adversos, excepto una inflamación que se observó con 72% de frecuencia en el sitio de inyección, la cual fue muy similar al caso de vacunas comerciales. La aplicación de vacuna fue de una sola dosis en animales reproductoras mayores a 8 meses en una explotación de ovinos en Tecate. Se tomaron muestras de sangre pre- y post vacunación para determinar las respuestas inmune humoral contra vacuna. Para dar seguimiento de animales vacunados, se intentó desarrollar un nuevo sistema de ELISA con antígeno lipídico (EVELISA).

Se analizó la reactividad (respuesta humoral) de la prueba EVELISA en 8 animales vacunados, los cuales contaron con muestras de sueros seriadas a los 0, 4, 8, 12 y 18 meses post inoculación (Figura 3). La discrepancia en el título de anticuerpos observados podría ser debido a factores genéticos de cada individuo así también por factores ambientales como la edad de la inoculación, exposición previa a Map y estado nutricional del animal. Por lo que se requiere estudios extensos con mayor número de animales controlados para analizar las respuestas inmunes inducidas por la vacunación contra la paratuberculosis. Además el reciente trabajo del nuestro grupo indica que la técnica de EVELISA se requiere más optimización para aplicarse en pequeños rumiantes (datos no mostrados).

## **VI. CONCLUSIONES**

Se estandarizó el método de preparación de la bacterina de la cepa referencia de Map, la cual pudo inducir la respuesta celular al ser inoculado, resultando con las lesiones inflamatorias semejantes a la literatura en el sitio de inoculación.

El uso de EVELISA en el análisis de la inducción de la respuesta humoral en animales vacunados no tuvo resultados concretos debido al principalmente falta de optimización de la prueba, sin embargo se logró detectar cambios en el nivel de respuesta humoral en algunos animales durante el periodo estudiado.

La vacunación es una buena herramienta para reducir la mortalidad de animales en rebaños de pequeños rumiantes severamente afectados con la PTB, sin embargo el uso de la bacterina debe ser controlado tomando en consideración ventajas y limitaciones de la misma así como los otros factores de prácticas de manejo e historial de la enfermedad.

## VII. LITERATURA CITADA

- Abalos, P. 2010. Actualidades en Paratuberculosis. Departamento de Medicina Preventiva Animal. Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias Universidad de Chile. Disponible en:  
<http://www.ovinos-caprinos.com.ar/SANIDAD/Actualidad%20en%20Paratuberculosis.pdf>
- Aduriz, J., Juste, R. and Cortabaría, N. 1995. Lack of mycobactin dependence of mycobacteria isolated on Middlebrok 7H11 from clinical case of ovine paratuberculosis. *Vet Microbiol.* 45:211-7.
- Bannantine, J., Baechler, E., Zhang, Q., Li, L. y Kapur, V. 2002. Genome scale comparison of *Mycobacterium* with *Mycobacterium avium* subsp. *avium* reveals potential diagnostic sequences. *J Clin Microbiol.* 40 (4):1303-10.
- Barnes, P.F., Chatterjee, D., Abrams, J.S., Lu, S., Wang, E., Yamamura, M., Brennan, P.J., Modlin, R.L. 1992a. Cytokine production induced by *Mycobacterium tuberculosis* lipoarabinomannan. Relationship to chemical structure. *J. Immunol.* 149, 541-547.
- Barnes, P.F., Chatterjee, D., Brennan, P.J., Rea, T.H., Modlin, R.L. 1992b. Tumor necrosis factor production in patients with leprosy. *Infect. Immun.* 60, 1441-1446.
- Buergelt, C.D., Hall, C., McEntee, K., Duncan, J.R. 1978. Pathological evaluation of paratuberculosis in naturally infected cattle. *Vet. Pathol.* 15, 196-207.
- Bull, T., McMinn, E., Sidi´Boumedine, K., Skull, A., Durkin, D., y Neild, P. 2003. Detection and verification of *mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* in fresh ileocolonic mucosal biopsy specimens from individuals with and without Crohn’s disease. *J Clin Microbiol.* 41 (7):2915-23.

- Carrigan, M.J., Seaman, J.T. 1990. The pathology of Johne's disease in sheep. *Aust. Vet. J.* 67, 47-50. Cajeme, Sonora.
- Castellanos, E. Aranaz, A., Gould, K., Linedale, R., Stevenson, K., Álvarez, J. 2009. Discovery of stable and variable differences in the *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* type I,II and III genomes by pangenome microarray analysis. *Appl Environ Microbiol* 75:676-686.
- Chevillat, N., Hostelles, J., Thomsen, B., Simutis, T., Vanloubbeeck y Steadham, E. 2001. Intracellular trafficking of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in macrophages. *Dtsch. Tierarztl. Wochenschr.* 108(6):236-43.
- Chiodini, R.J. 1986. Biochemical characteristics of various strains
- Chiodini, R.J. 1989. Crohn's disease and the mycobacterioses: a review and comparison of two disease entities. *Clin. Microbiol. Rev.* 2, 90-117.
- Chiodini, R.J., Van Kruiningen, H.J., Merkal, R.S. 1984. Ruminant paratuberculosis (Johne's disease): the current status and future prospects. *Cornell Vet.* 74, 218-262.
- Cocito C, Gilot P, Coene M, De Kesel M, Poupart P, Vannuffel P. Paratuberculosis. *Clinical Microbiology Reviews* 1994; 7 (3): 328-345.
- Coetsier, C., Havaux, X., Mattelard, F., Sadatte, S., Cormont, F., Buergelt, K., Limbourg, B., Latinne, D., Bazin, H., Denef, J.F., Cocito, C. 1998. Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in infected tissues by new species-specific immunohistological procedures. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 5, 446-451.
- Collins, D., Gabric, D. y De Lisle, G. 1989 Identification of a repetitive DNA sequence specific to *Mycobacterium paratuberculosis*. *FEMS Microbiol Lett.* 60 (2): 175-8.
- Collins, D., Hilbink, F., West, D., Hosi, B., Cooke, M. y De Lisle. 1993. Investigation of *Mycobacterium paratuberculosis* in sheep by fecal culture, DNA characterization and the polymerase chain reaction. *Vet. Rec* 133:599-600.
- Consejo Técnico Constitutivo Nacional de Salud Animal (CONASA). 2010.

Plan estratégico del programa para la atención de la paratuberculosis en Ganado bovino, ovino y caprino en México. Disponible en: <http://www.conasamexico.org.mx/conasa/pdf/>.

- Corpa, J.M., Garrido, J., García Marín, J.F., Pérez, V. 2000. Classification of lesions observed in natural cases of paratuberculosis in goats. *J. Comp. Comp.*
- De Lisle, G.W., Samagh, B.S., Duncan, J.R. 1980. Bovine paratuberculosis II. A comparison of fecal culture and the antibody response. *Can. J. Comp. Med.* 44, 183-191.
- Dimareli-Malli, Z., Sarris, K. 2001. Comparison of DNA probe test and cultivation methods for detection of *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* in caprine and ovine faeces. *Aust. Vet. J.* 79, 47-50.
- Djonne, B., Jensen, M. R., Grant, I.R. y Hostad, G. 2003. Detection by immunomagnetic PCR of *Mycobacterium avium* subespecies *paratuberculosis* in milk from dairy goats in Norway. *Vet. Microbiol.* 92:135-143.
- Eda, S., Bannantine, J., Waters, W. Mori Y., Whitlock, R., Scott, M., and Speer. 2006. A highly sensitive and subspecies-specific surface antigen enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of Johne's disease. *Clin and Vaccine Immunol.* 13, 837-844.
- El Zaatari, F.A., Hulten, K., El-Zimaity, H.M., Collins, M.T., Graham, D.Y. 2003. Pathogenesis of Johne's disease; a possible role of cell-wall deficient forms of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. En: *Proceedings of the Seventh International Colloquium on Paratuberculosis*. Juste, R.A, Geijo, M.V., Garrido, J.M. Eds. Bilbao, España. 45-48.
- Elligson, J., Bolin, C. y Stabel, J. 1998. Identification of gene unique to *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* and application to diagnosis of paratuberculosis. *Mol. Cell. Probes*, 12(3):133-42.
- Elligson, J., Stabel, J., Radicloff, R., Whitlock, R. y Miller, J. 2005. Detection of *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* in free-ranging bison (*Bison bison*) by PCR. *Mol. Cell Probes* 19:219-225.

- Englund, S., Ballagi-Pordany A, Bolske, G., y Johansson, K. E. 1999. Single PCR with a mimic molecule for detection of *Mycobacterium avium subespecies paratuberculosis*. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 33:163-171.
- García Marín, J., Pérez, V. García de Jalón, J. DE las Heras, M. Barberá, M. Fernández de Luco, D. y Badiola, J. 1994. Diagnóstico de casos clínicos de paratuberculosis ovina y caprina. *Pathol.* 122, 255-265.
- Gilardoni, M. V. y Mundo, S. L. 2008. Paratuberculosis Bovina. Infovet. Sitio Argentino de Producción Animal.
- Goodfellow, M., Weaver, C.R., Minnikin, D.E. 1982. Numerical classification of some Rhodococci, Corynebacteria and related organisms. *J. Gen. Microbiol.* 128, 731-745.
- Green, E., Tizard, M., Moss, M., Thompson, J. Winterbourne, D., McFadden, J. y Hermon-Taylor, J. 1989. Sequence and characteristics of IS900, an insertion element identified in human Crohn's disease isolate of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Nucleic Acids Res* 17:9063-9073.
- Greig, A., Stevenson, K., Henderson, D. Perez, V., Hughes, V., Pavlink, I. 1999. Epidemiological study of paratuberculosis in wild rabbits in Scotland. *J Clin Microbiol.* 37(6): 1746-51.
- Harris, N. y Barletta, R. 2001. *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* in veterinary medicine. *Clin Microbiol Rev.* 14(3):489-512.
- Irengue, L. M., Walravens, K. Govaerts, M. Godfroid, J., Rosseels, V., Huygen, K., y Gala, J.L. 2009. Development and validation of a triplex real-time PCR for rapid detection and specific identification of *M. avium subespecie paratuberculosis* in fecal sample. *Vet. Microbiol.* 136: 166-172.
- Irengue, L., Walravens, K., Govaerts, M., Godfroid, J., Rosseels, V., Huygen, K. y Gala, J. 2009. Development and validation of a triplex real-time PCR for rapid detection and specific identification of *M. avium subsp. Paratuberculosis* in fecal samples. *Vet Microbiol.* 136:166-172.
- Juste, R. A., García Marín, J.F., Peris, B., Sáez de Ocariz, C.S., Badiola, J.J. 1994. Experimental infection of vaccinated and non-vaccinated lambs with *Mycobacterium paratuberculosis*. *J. Comp. Pathol.* 110,

- Juste, R., Aduríz, J., BAscones, M., Foley, E., Bargar, T., Barletta, R. 1993. Effect oron on mycobactin production and dependence in mycobacteria. Proc. 74<sup>th</sup> Annu. Meet. CRWAD, p.64. Chicago, IL, USA.
- Kaur, P., Fila, G.,Singh, S. V., Patil., y Sandhu, K.S. 2010. Moleculas detection and typing of *Mycobacterium avium subespecies paratuberculosis* from milk sample of dary animals. Trop Anim. Heakth Prod. 42(5):1031-5.
- Kawaji S., Taylor, D., Mori y Whittington, R. 2007. Detection of *Mycobacterium avium subespecies paratuberculosis* in ovine feces by direct quantitative PCR has similar or greater sensitivity compared to radiometric culture. Vet. Microbiol. 125: 36-48.
- Kennedy, D., Benedictus, D. 2001. Control of *Mycibacterium avium subsp. paratuberculosis* infection in agriculture species. Rev Sci Tech 20: 151-179.
- Kim, Y., Beach-Nielsen. S., Slemmons, R. and Spangler, E. 1989. Comparison of two methods for isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from bovine fecal samples. Am J of Vet Res 50, 1110-1113.
- Koets, A., Rutten, V. Hoek, A.,Bakker, D.,Van Zijderveld, F., Müller, K. y Van Eden, W. 1990. The T(h) 1 to T(h) 2 shift in bovines paratuberculosis and the role of apoptotic cell death. In Proc. 6<sup>th</sup> International Colloquium on paratuberculosis (E.JB. Manning & M.T. Collins, eds) 14-18 February, Melbourne. International Association for Paratuberculosis, Madison, Wisconsin, 585-592.
- Kudah, A., Nielsen, S., y OStergaard, S. 2008. Economy efficacy, and feasibility of a risck-based control program against paratuberculosis. J of Dairy Sci. 91, 4599-4609.
- Larsen, A.B., Merkal, R.S., Vardaman, T.H. 1956. Survival time of *Mycobacterium paratuberculosis*. Am J Vet Res. 17(64):549-51.
- Lombard, J.E., Byrem, T.M., Wagner, B.A., McCluskey, B.J. 2006. Comparison of milk and serum enzyme-linked immunosorbent assays for diagnosis of *Mycobacterium avium subespecies paratuberculosis* infection in dairy cattle. J Vet Diagn Invest. 18(5):448-58

- Lugton, I. 1999. Mucosa-associated lymphoid tissues as sites for uptake, carriage and excretion of tubercle bacilli and other pathogenic mycobacteria. *Immunol. Cell Biol.* 77(4): 364-72.
- Manning, E. J. y Collins, M. T. 2001. *Mycobacterium avium subespecies paratuberculosis* Pathogen, Pathogenesis and diagnosis: *Rev. Sci. Tech* 20: 133-150.
- Massone, A.R., Martin, A.A., Ibargoyen, G.S., Gimeno, E.J. 1990. Immunohistochemical methods for the visualization of *Mycobacterium paratuberculosis* in bovine tissues. *Zentralbl. Veterinarmed. [B]* 37,
- McNab, W.B., Meek, A.H., Martin, S.W., Duncan, J.R. 1991. Associations between dairy production indices and lipoarabinomannan enzyme-immunoassay results for paratuberculosis. *Can. J. Vet. Res.* 55, 356-361.
- Merkal, R. 1984. Paratuberculosis. *Advances in cultural. Serologic and vaccination methods. J Am Vet Med Assoc.* 184(8):939-43.
- Meyer, L. A. & Hall, H.H. 1994. *Economic Analysis of the Impact of Paratuberculosis on the Kentucky Cattle Industry.* University of Kentucky. Department of Agricultural Economics. 7 pp.
- Möbius, P., Luyven, G., Hotzel, H. y Kohler, H. 2008. High genetic diversity among *Mycobacterium avium subespecie paratuberculosis* strains from German cattle herds shown by combination of IS900 restriction fragment length polymorphism analysis and mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem-repeat typing. *J Clin Microbiol* 46:972-981.
- Momotani, E., Whipple, D., Thiermann, A., y Cheville, N. 1988. Role of M cells and macrophages in the entrance of *Mycobacterium paratuberculosis* into domes of ileal Peyer's patches in calves. *Vet Pathol.* 25:131-7.
- Motiwala, A.S., Strother, M., Amonsin, A., Byrum, B., Naser, S.A., Stabel, J.R., Shulaw, W.P., Bannantine, J.P., Kapur, V., Sreevatsan, S., 2004. Molecular epidemiology of *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis*: evidence for limited strain diversity, strain sharing

- and identification of unique targets for diagnosis. *J. Clin. Microbiol.* 41, 2015–2026.
- Navarro, J.A., Bernabe, A., Gomez, M.A., Sanchez, J., Gomez, S. 1991. Mycobacterial antigen detection by immunohistochemistry in goat paratuberculosis. *Zentralbl. Veterinarmed. [B]* 38, 231-237.
- Nielsen, S. 2010. Immune-based diagnosis of paratuberculosis. Book. Paratuberculosis, organism, disease, control/edited by Marcel A. Behr and Desmond M. Collins. CAB International.
- Nisbet, D.I., Gilmour, N.J.I., Brotherston, J.G. 1962. Quantitative studies of *Mycobacterium johnei* in tissues of sheep. *J. Comp. Pathol.* 72, 80-91.
- OIE. 2008. Manual de Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres. Paratuberculosis Enfermedad de Johne.
- Patterson, D. y Berrett, S. 1969. Malabsorption in Johne's disease in cattle: and in vitro study of L-histidine uptake by isolated intestinal tissue preparations. *J. Med Microbiol.* 2:327-334.
- Paustian, M., Amonsin, A., Kapur, V. y Bannantine, J. 2004. Characterization of novel coding sequences specific to *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis: implications for diagnosis of Johne's disease. *J. Clin Microbiol.* 42(6):2675-81.
- Pavlik, I., Bartl, J., Dvorska, L., Svastova, P., Du, MR., Machackova, M. 2000. Epidemiology of paratuberculosis in wild ruminants studied by restriction fragment length polymorphism in the Czech Republic during the period 1995-1998. *Vet Microbiol.* 77 (3-4)231-51.
- Payne, J. y Rankin, J. 1961. The pathogenesis of experimental Johne's disease in calves. *Res Vet Sci.* 2:167-74.
- Peréz, V., Corpa, J. y García- Marín, J. 2000. El cuadro clínico y lesional de la paratuberculosis bovina. En: Juste editor. Paratuberculosis, Bovis, Aula Veterinaria, Vol. nº93, pp. 39-47. Luzan 5, Madrid, España.
- Pérez, V., García Marín, J.F., Badiola, J.J. 1996. Description and classification of different types of lesion associated with natural paratuberculosis infection in sheep. *J. Comp. Pathol.* 114, 107-122.
- Poupart, P., Coene, M, Van Heuverswyn, H., Cocito, C. 1993. Preparation of specific RNA probe for detection of *Mycobacterium paratuberculosis*

- and diagnosis of Johne's disease. *J Clin Microbiol.* 31(6):1601-5.
- Radiometric culture. *Vet Microbiol* 125:36-48.
- Rajeev, S., Zhang, Y., Sreevatsan, S., Motiwala, A., Byrum, B. 2005. Evaluation of multiple genomic targets for identification and confirmation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolates using real-time PCR. *Vet. Microbiol.* 105:215-221.
- Secott, T., Lin, T., y Wu. C. 2004. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* fibronectin attachment protein facilitates M-cell targeting and invasion though a fibronectin bridge with host integrins. *Infect. Immun.* 72(7):3724-32.
- Sigurdardottir, O., Cakke-McKellp, A. Djonne, B., y Evensen, O. 2005. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* enters the small intestinal mucosa of goat kids in areas with ad without Peyer'spathes as demonstrated with the everd sleeve method. *Comp Immunol Microbiol Infec Dis.* 28 (3):223-30.
- Smith, K. 1969. Electron microscopical observations on *Mycobacterium johnei*. *Res. Vet. Sci.* 10, 1-3.
- Sohal, J., Sheoran, N., Narayanasamy, K., Brahmachari, V., Singh, S. and Subodh, S. 2009. Genomic analysis of local isolate of *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis*. *Vet. Microbiol* 134:375-382.
- Stabel, J. 2010. *Immunology of Paratuberculosis, Infection and Disease.* Book. *Paratuberculosis, Organism, Disease, Control/edited by Marcel A. Behr and Desmond M. Collins.* CAB International.
- Stabel, J. y Bannantine, J. 2005. Development of a nested PCR method targeting a unique multicopy element, ISMap02, for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in fecal samples. *J. Clin Microbiol.* 43(9):4744-50.
- Stamp, J.T. y Watt, J.A. 1954. Johne's disease in sheep. *J. Comp. Pathol.* 64, 26-40.
- Sugden, E.A., Corner, A.H., Samagh, B.S., Brooks, B.W., Turcotte, C., Nielsen, K.H., Stewart, R.B., Duncan, J.R. 1989. Serodiagnosis of ovine *paratuberculosis*, using lipoarabinomannan in an enzyme-linked immunosorbent assay. *Am. J. Vet. Res.* 50, 850-854.

- Tamayo, J., Marcos, F., Esnal, A., Sánchez, J., y Marco, J. 2010. Vacunación frente a paratuberculosis: influencia sobre la producción lechera ovina. XXX Congreso de la SEOC Valladolid.
- Taylor, A.W. 1949. Observations on the incidence of infection with *M. johnei* in cattle. *Vet. Rec.* 61, 539-540.
- Tessema. M., Koets, A., Rutten, V. y Gruys, E. 2001. How does *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* resist intracellular degradation?. *Vet Q.* 23(4)153-62.
- Van der Giessen, J. Van Dijk, L., Bleumink-Pluym, N., Eger, T., Haagsma, J., Van der Zeijls, B. 1995. The spatial distribution of *Mycobacterium paratuberculosis* in infected cattle. Implications for pathogenesis and diagnosis en: Chiodini, Collins y Cassey editores. *Proc 4<sup>th</sup> Int Coll Paratub.* Pp 61-6 IPA, Rehoboth, MA, USA.
- Vansnick, E., De Rijk, P., Vercammen, F., Geysen, D., Rigouts, L. y Portaels, F. 2004. Newly developed primers for the detection of *Mycobacterium avium* subespecie paratuberculosis. *Vet Microbiol* 100:197-204.
- Whan, L.B., Grant, I.R., Ball, H.J., Scott, R. & Rowe, M.T. 2001. Bactericidal effect of chlorine on *Mycobacterium paratuberculosis* in drinking water. *Letters in Applied Microbiology.*
- Whitlock, R., Wells, S., Sweeney, R., and Van Tiem, J. 2000. ELISA and fecal culture for paratuberculosis (Johne's disease): sensitivity and specificity of each method. *Vet Microbiol* 77:387-398.
- Whittington, R. J. 2009 Factors Affecting isolation and identification of *Mycobacterium avium subespecies paratuberculosis* from fecal and tissue samples in a liquid culture system. *J. Clin. Microbiol.* 47 (3): 614-622.
- Whittington, R., Fell, S., Walker, D., McAllister, S., Marsh, I., Sergeant, E. 2000. Use of pooled fecal culture for sensitive and economic detection of *Mycobacterium avium* subespecie paratuberculosis. *J. Clin Microbiol* 38(7):2550-6.

- Wilson, D., Rossiter, C., Han, H. y Sears, P. 1997. Financial Effects of *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* on mastitis, Culling and milk production in clinically normal dairy cattle. En: Chiodini, Hines y Collins Editores. Proc
- Zhao, B., Collins , M. y Czuprynsky. C. 1997. Effects of gamma interferon and nitric oxid on the interaction of *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* whit bovine monocytes. Infect. Immune. 65(5):1761-6.