UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

Instituto de Ciencias Agrícolas

Instituto en Investigaciones en Ciencias Veterinarias

Aislamiento y caracterización molecular de *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* en hatos ovinos y bovinos, en el Municipio de Mexicali-Baja California.

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

PRESENTA

MAGNOLIA MATILDE CORREA MUÑOZ

DIRECTOR

Dr. GILBERTO LOPEZ VALENCIA

MEXICALI, B.C DICIEMBRE 13 2012

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 Doctor en Ciencias Agropecuarias.

_____
Dr. Gilberto López Valencia
DIRECTOR

_____
Dra. Sawako Oshima Katsuragui
ASESOR

_____
Dr. Tomas Rentería Evangelista
ASESOR

_____
Dr. Gerardo Medina Basulto
ASESOR

_____
Dr. Francisco Monge Navarro
ASESOR

AGRADECIMIENTOS

Mi eterna gratitud está dirigida a Dios, por haberme dado la existencia, por haber puesto en mi camino a tantas personas, quienes me han guiado y de quienes he obtenido valiosos conocimientos para llevar a cabo el cumplimiento de mis metas.

Quiero agradecer de manera especial a cada uno de los doctores que integraron mi comité asesor, encabezado por el Dr. Gilberto López Valencia, por todo el apoyo y conocimientos que me brindaron durante la realización de este trabajo. Muchas gracias!

A todas las personas que conocí durante mi paso por el IICV y fuera de el, a los que creyeron en mi, a quienes de una u otra manera me ayudaron, y en los momentos difíciles siempre tuvieron palabras de aliento para que siguiera adelante, a todos ellos muchas gracias por todo.

Quiero expresar también mis agradecimientos a la Dra. Andrea Gioffré, a la Dra. María Isabel Romano y al Dr. Martin Zumárraga del Instituto Nacional de Ciencia y Tecnología Agropecuaria (INTA) de Buenos Aires-Argentina, por su hospitalidad durante mi estancia en dicha institución, así como también por permitirme hacer parte de sus estudios de investigación y darme su opinión crítica acerca de mío. Fue una experiencia muy enriquecedora, nunca lo olvidare.

A los doctores de otras instituciones extranjeras que aun sin conocerme, me guiaron desde la distancia para decidir sobre los experimentos que debía hacer o modificar para aclarar dudas y llegar a ciertas conclusiones. Muchas gracias, ojala Dios me permita conocerlos personalmente para aprender más de su sabiduría.

Finalmente quiero agradecer a la Universidad Autónoma de Baja California, por permitirme realizar mis estudios de doctorado y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por otorgarme la beca de apoyo durante el curso del presente estudio.

DEDICATORIA

A mis padres, esposo e hija, quienes siempre han estado a mi lado apoyándome en los buenos y en malos momentos y que sin su soporte emocional no hubiera sido posible lograr concluir con esta meta. A mi hermano, porque sé que desde el lugar en donde se encuentre estará feliz de ver otro de mis sueños cumplido.

ÍNDICE DEL CONTENIDO

RESUMEN

Resumen…….....2

Abstract……..3

CAPÍTULO 1.

Introducción general……4

CAPÍTULO 2

REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Género *Mycobacterium*…….9

2.1.1 Clasificación de las micobacterias……..……9

2.1.2 Envoltura celular……..…….....10

2.2 Complejo *Mycobacterium avium*……..…11

2.3 *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis*……12

2.3.1 Características generales……..…….....12

2.3.2 Dependencia a la micobactina……..…….....14

2.3.3 El genoma de *Map*……..…….....16

2.3.4 Secuencias de inserción……..…….....17

2.3.5 Diversidad de las cepas de *Map*……..…….....18

2.4 Epidemiología de la paratuberculosis……..21

2.4.1 Transmisión……..…….....22

2.4.2 Prevalencia de la paratuberculosis……...24

2.4.2.1 Prevalencia de la paratuberculosis en México……26

2.4.3 Signos clínicos de la paratuberculosis……27

2.5 Patogénesis de la enfermedad……29

2.6 Diagnóstico microbiológico……....31

2.6.1 Tinción directa……..31

2.6.2 El cultivo de *Map*……..32

2.6.3 Medios de cultivo……..34

2.6.3.1 Cultivo convencional……...34

2.6.3.2 Cultivo radiométrico……..35

2.6.4 Morfología de las colonias de *Map*……....35

2.7 Diagnóstico molecular de *Map*……..38

2.7.1.PCR IS*900*…….....38

2.7.2. IS*900* RFLP……..40

2.7.3. IS*1311* PCR-REA……....41

2.7.4 Repeticiones en tándeme de número variable (VNTR)……..…....42

2.7.5 Secuencias específicas de *Map*……44

2.8 Diagnóstico basado en la respuesta inmune……..…46

2.8.1 ELISA……47

2.8.1.1 EVELISA……..……49

2.9 Estrategias de control de la paratuberculosis……50

Bibliografía citada……...51

CAPÍTULO 3

ARTÍCULOS DERIVADOS DEL ESTUDIO

3.1 “Aislamiento y caracterización molecular de *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* en ganado bovino y ovino en el Municipio de Mexicali Baja California, México”……..…72

3.2. Seroprevalence survey of ovine Johne’s disease in Mexicali, Mexico…….88

CAPÍTULO 4

Conclusiones generales……..104

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de la composición de la pared celular de las micobacterias……...11

Figura 2. Imágenes de los bacilos de *Map*, observados al microscopio……...13

Figura 3. Representación circular de las secuencias de inserción y secuencias repetidas en el genoma de *Map*……..…17

Figura 4. Posibles vías de transmisión de los miembros del complejo *M. avium*……24

Figura 5. Casos de paratuberculosis en México, 2004-2009…….27

Figura 6. Colonias de *Map* de origen bovino, aisladas en medio HEYM…….…….36

Figura 7. Colonias de *Map*, aisladas en diferentes tipos de medio……37

Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa en donde se observan los distintos patrones de restricción dados por las cepas C y S de *Map*…….42

RESUMEN

El presente estudio reporta por primera vez el aislamiento y tipificación molecular de *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* (*Map*) en ganado bovino y ovino, así como la seroprevalencia de la paratuberculosis (ptb) ovina, en el Valle de Mexicali. Para el primer estudio se muestrearon 6 animales, 5 de origen ovino y uno de origen bovino, provenientes de dos ranchos distintos, los cuales tenían antecedentes de animales enfermos con signos compatibles con la ptb. A estos animales se les tomaron muestras de sangre para la obtención de suero y posterior análisis serológico, y de heces para la realización del cultivo bacteriológico. Los resultados de la serología mostraron que 3 ovinos y un bovino, reaccionaron positivos al ELISA comercial utilizado, con una razón S/P superior al 70%. Mediante el cultivo bacteriológico se obtuvieron 3 aislamientos de *Map*, dos de origen ovino y uno de origen bovino que fueron identificados como *Map* según la PCR IS*900* y f*57*, y caracterizados como Tipo C, mediante el ensayo IS*1311* PCR-REA. Para el segundo estudio, se analizaron 690 sueros de origen ovino provenientes de 44 rebaños, mediante la técnica de EVELISA según Eda (2006). Con un punto de corte S/P = 0.4, establecido a partir de 2 SD arriba del promedio de los controles negativos, se encontró una prevalencia total del 13.5% (93/690). Los resultados obtenidos en el presente trabajo, confirman la presencia de *Map* y de la ptb en la región, contribuyendo con valiosa información acerca de su distribución en el país, así como con el suministro de nuevos datos de prevalencia de la enfermedad en ganado ovino. El análisis molecular sugiere la presencia, circulación y transmisión del tipo C de *Map* entre el ganado bovino y ovino; sin embargo no se descarta la presencia de otros tipos de *Map* en la región, por lo tanto se requiere de más estudios que incluyan una mayor cantidad de animales, así como la utilización de técnicas de subtipificación, para lograr un mejor conocimiento acerca de la biodiversidad, las dinámicas de transmisión y fuentes de infección de *Map* en Baja California.

Palabras clave: *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis*, cepas de *Map*, Etanol-vortex ELISA, prevalencias, paratuberculosis ovina, México.

ABSTRACT

The present study reports for the first time the bacteriological isolation and molecular typing of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (Map) in cattle and sheep and the seroprevalence of paratuberculosis (ptb) in sheep in the Mexicali Valley. For the first study, a total o six samples were collected; five from sheep and one bovine. The animals were located in two different farms showing records of sick animals with symptoms of disease consistent with ptb. From all animals, blood samples were obtained for serology and feces for bacteriological culture. The results from serology showed that the bovine sample and three ovine sera reacted positive with an S/P ratio >70% using a commercial ELISA kit. The bacteriological culture produced three Map isolates, two from sheep and one from bovine, which were identified as Map using IS900 and f57 PCR and classified as Type C using theIS1311 PCR-REA assay. For the second study, 690 sera from sheep obtained from 44 farms were analyzed by EVELISA following the protocols from Eda (2006). A cut-off value (S/P = 0.4) was set 2 SD above the mean optical density of the negative control sera to obtain an overall seroprevalence of 13.5% (93/690). The results obtained in this study confirm the presence of Map and ptb in the region and contribute with valuable information of its distribution in the country as well as provide new data for the prevalence of the disease in sheep. The molecular analysis suggests the presence, distribution and transmission of Map Type C in cattle and sheep but does not rule out the presence of other types of Map in the region therefore, it is required to do additional studies that include more animals and the utilization of sub typing molecular techniques to achieve a better knowledge about the biodiversity, the transmission dynamics and the sources of Map infection in Baja California.

Keywords: *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*, Ovine Johne's Disease, strains of *Map*, Ethanol- vortex ELISA, prevalence, Mexico.

CAPÍTULO 1

Introducción

INTRODUCCIÓN GENERAL

La paratuberculosis (ptb) también conocida como enfermedad de Johne, es una infección del tracto intestinal, crónica y progresiva causada por *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* (*Map*). Este microorganismo pertenece al género *Mycobacterium* y es parte del complejo *Mycobacterium avium* (MAC) (Thorel *et al*., 1990, Inderlied *et al*., 1993). Aunque los miembros de MAC estan estrechamente relacionados entre sí, *Map* se distingue por la dependencia a la micobactina, la lentitud en su crecimiento, la resistencia a condiciones adversas, y genotípicamente a la presencia de múltiples copias de la secuencia de inserción *900* (IS*900)* (Green *et al*., 1989, Cocito *et al*., 1994,).

Map infecta principalmente a rumiantes tanto domésticos como silvestres (Greig *et al*., 1999, Pavlik 2000), aunque las especies en donde más se ha estudiado la ptb es en rumiantes domésticos, debido a la importancia económica que estos animales representan. Aunque la ptb tiene una distribución mundial, la realidad sobre la verdadera prevalencia de la enfermedad, esta enmascarada por las dificultadas en el diagnóstico de la infección (Fecteau y Whitlock, 2010). No obstante, se ha reportado que esta enfermedad ocasiona un gran impacto económico a la industria pecuaria, debido a que afecta directamente a las explotaciones ganaderas, disminuyendo la producción de carne y leche, así como también la fertilidad del ganado, el sacrificio prematuro de los animales, el aumento de la susceptibilidad a otras enfermedades infecciosas, la pérdida del potencial genético y la devaluación de los animales sacrificados para su venta (Kennedy y Bennedictus 2001, Kudahl y Nielsen 2009).

El departamento de agricultura de los Estados Unidos (*United States Department of Agriculture*, USDA), ha estimado que aproximadamente el 22% del ganado vacuno lechero y el 8% del ganado de carne está afectado por la ptb, con pérdidas que han sido estimadas en más de $250 millones de dólares anuales, tan solo en la industria láctea (Wells 1998, Whitlock *et al*., 2000). En otros países como México, las pérdidas económicas por la ptb en ganado lechero, han sido calculadas en 800 dólares/vaca al

año (Consejo Técnico Consultivo Nacional de Salud Animal, CONASA 2010). Distintos programas de control han sido diseñados para erradicar la enfermedad o al menos para disminuir su impacto económico, sin embargo estos no han sido lo suficientemente eficaces, debido en gran parte a la naturaleza crónica de la enfermedad, a la gran resistencia de *Map* a las condiciones adversas, al largo periodo de latencia, no es una enfermedad de declaración obligatoria en la mayoría de los países, y principalmente a las dificultades en el diagnóstico de la infección temprana.

Diferentes técnicas son utilizadas para la detección de la ptb las cuales incluyen, técnicas histopatológicas, bacteriológicas (cultivo) y los ensayos moleculares e inmunológicos. La utilización en conjunto de algunas de estas pruebas puede aumentar la posibilidad de detectar animales infectados, como por ejemplo el ELISA y el cultivo fecal, ya que las dos miden diferentes aspectos de la enfermedad (respuesta indirecta de los anticuerpos a la infección y excreción de la bacteria viva, respectivamente) (Rossiter *et al*., 1996).

El cultivo de *Map* es considerado como la técnica confirmatoria de la ptb, esta prueba detecta a la mayoría de los animales en avanzado estado de la enfermedad, en donde alcanza una sensibilidad y una especificidad del 100%, pero solo a unos cuantos animales en las fases iniciales de la infección (Whitlock *et al*., 2000, OIE 2008). A su vez, el ELISA es la técnica más utilizada en el diagnóstico de la ptb por ser una prueba rápida y de bajo costo; sin embargo a pesar de que presenta alta especificidad (>95%), la sensibilidad varía dependiendo del estadio en el que se encuentra el animal (5–30%) dificultando el diagnóstico temprano de la infección, aspecto clave en el control de la enfermedad (Jorgensen *et al*., 1978, Collins 2002, Nilesen y Toft, 2008). Diferentes variaciones al método del ELISA se han evaluado para detectar anticuerpos contra *Map*, en donde la sensibilidad y especificidad estimadas varían ampliamente dentro y entre las pruebas (Nielsen y Toft 2008). Uno de los pasos cruciales en el ELISA son las preparaciones antigénicas ya que dependiendo de esto, la prueba se puede afectar directamente en cuanto a su sensibilidad y especificidad. El EVELISA, es un test de ELISA que utiliza como antígeno un extracto obtenido de la superficie celular de *Map,*

por medio de solventes orgánicos; con el cual se han obtenido resultados prometedores, debido a que ha permitido detectar infecciones tempranas de *Map* mucho tiempo antes que el ELISA comercial o el cultivo fecal, con una sensibilidad del 97.4% y una especificidad del 100% (Eda *et al*., 2006, Scott *et al*., 2010).

La utilización de las pruebas moleculares para la detección y tipificación de *Map*, han sido de gran ayuda epidemiológica ya que permiten obtener un mejor entendimiento sobre el origen de la infección, la identificación de factores de riesgo, la caracterización del patógeno y la evaluación de programas regionales para el control de la ptb. La identificación de la secuencia IS*900* descubierta por Green (1989), posibilitó un gran avance en el conocimiento genético de *Map*; desde entones esta secuencia ha sido utilizada como diana en diferentes técnicas de diagnóstico como la PCR IS*900* y el ensayo de Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (IS*900*-RFLP), con el cual se logró diferenciar por primera vez los dos grandes grupos de cepas de *Map*, las bovinas o Tipo C *(Cattle*) y las ovinas o Tipo S (*Sheep*) (Pavlic *et al*., 1999). Otras técnicas como la IS*1311* PCR-REA, también son empleadas para lograr esta misma diferenciación, con ventajas como la mayor rapidez en los resultados y el menor costo económico (Whittington *et al*., 1998, Marsh *et al*., 1999).

El empleo de pruebas de detección de *Map*, en combinación con estrategias que permitan reducir el impacto de la enfermedad en un hato, son aspectos necesarios para su control. En México existen evidencias histopatológicas, serológicas, bacteriológicas y de biología molecular de infecciones por *Map*, en distintas especies de ganado (Domínguez-Punero 2002, Chávez-Gris *et al*., 2004, Favila-Humara *et al*., 2010), en 16 estados del centro y sur del país (CONASA 2010). Estos antecedentes hacen necesario el desarrollo de estudios que permitan la identificación del ganado afectado por estado y especie animal, ya que a partir de esta información, será posible el establecimiento de diferentes estrategias que contribuyan a incrementar la productividad de los sectores bovino, ovino y caprino. En Baja California, estado situado al noroeste de México, no se conocían reportes sobre aislamiento e identificación molecular de las cepas de *Map* circulantes en la región; por lo tanto los

resultados obtenidos en el presente estudio, contribuyen con el conocimiento sobre su distribución en el país, así como también con la información de nuevos datos de seroprevalencia de la ptb en ganado ovino, en un estado del territorio Mexicano, que no está incluido dentro del mapa de los estados afectados por la enfermedad de Jonhe. Lo anterior permitirá el diseño y la implementación de mejores medidas de prevención y control de la enfermedad.

CAPÍTULO 2

Revisión de literatura

2.1 Género *Micobacterium*

El género *Mycobacterium* fue propuesto por Lehmann y Neumann (1896), el cual se clasifica dentro de la familia *Mycobacteriaceae*, suborden *Corynebacterinae*, orden *Actinomycetales*, subclase *Actinobacteridae*, clase *Actinobacteria*, división *Firmacutes*, y superreino *Bacteria* (Stackebrandt *et al*., 1997). Esta división se basó en dos características presentes en todos los miembros de este género: la morfología (bacilos, inmóviles) y la ácido-alcohol resistencia (Lehmann y Neumann, 1896). Las micobacterias se desarrollan en condiciones aerobias y la temperatura óptima de crecimiento está entre los 30 y 45 ºC (Wayne y Kubica, 1986, Levy-Frebault y Porteals, 1992). Como fuente de carbono utilizan glicerol o piruvato, son protótrofas para todos los aminoácidos y producen exoquelina y micobactina, dos sideróforos necesarios para metabolizar el hierro (elemento indispensable para su crecimiento). Los bacilos son morfológicamente rectos o ligeramente curvados de 1-10 µm de largo y 0.2-0.6 µm de ancho, inmóviles y considerados Gram positivos a pesar de la escasa penetración del colorante cuando son teñidos por medio de la técnica Gram, efecto ocasionado por los ácidos micólicos presentes en la compleja envoltura celular de la que están provistos (Wayne y Kubica, 1986).

2.1.1 Clasificación de las micobacterias

Actualmente, los requisitos mínimos necesarios para la inclusión de una especie dentro del género *Mycobacterium* son la ácido-alcohol resistencia, la presencia de ácidos micólicos con 60-90 átomos de carbono y un 61-71% de GC en su genoma (Levy-Frebault y Portaels, 1992). Adicionalmente, estas especies también se clasifican según el tiempo requerido para la formación de colonias visibles en medio sólido en, micobacterias de “crecimiento rápido” y micobacterias de “crecimiento lento”, en el primer caso la aparición de colonias visibles se produce en un período inferior a siete días y en el segundo caso, este periodo es mayor a siete días (Wayne *et al*., 1986, Shinnick *et al*., 1994). A su vez, las especies de “crecimiento lento” se subdividen en tres grupos diferentes en base a la producción de pigmentación (Timpe y Runyon, 1954): fotocromógenas (Grupo I de Runyon), escotocromógenas (Grupo II de Runyon)

y no fotocromógenas (Grupo III de Runyon). Aunque esta clasificación no es de importancia taxonómica si lo es a nivel clínico, debido a que las micobacterias de crecimiento lento son patógenas para el hombre y los animales.

En la primera década del siglo XX, se comenzaron a desarrollar nuevas técnicas para la clasificación de micobacterias, permitiendo la identificación de nuevas especies dentro del género *Mycobacterium*. Las técnicas de tipado genético basado en la secuencia de regiones hipervariables presentes en el genoma altamente conservado de genes como 16SARNr y *hsp65* (65- KDa *heat shock protein*), son ampliamente utilizadas en la actualidad para tipificar y subtipificar distintas especies de micobacterias. (Telenti *et al*., 1993, Ringuet *et al*., 1999). Otros tipos de análisis utilizados son los estudios de patrones de ácidos micólicos característicos de cada especie, mediante diferentes técnicas de cromatografía (Tortoli 2003).

2.1.2 Envoltura celular

La pared celular de las micobacterias está constituida por una capa interna y una capa externa que rodean a una membrana plasmática, cuya composición es similar en todas las micobacterias. La capa externa está formada por lípidos y proteínas, los lípidos están asociados a la pared celular a través de ácidos grasos de cadena corta y larga que complementan las cadenas largas y cortas de la capa interna. Los lípidos y polisacáridos asociados con la parte externa de la pared celular son: el lipoarabinomanano (LAM), lipomanano, lípidos tioceroles como el dimicocerosato, dimicolil-trealosa y sulfolípidos específicos en el caso de *M. tuberculosis* (Hett y Rubin, 2008). El compartimento interno está constituido por peptidoglicano (PG), arabinogalactano (AG) y ácidos micólicos (AM), los cuales están unidos covalentemente y constituyen el denominado complejo PG-AG-AM. Este complejo es insoluble y se caracteriza por conformar la estructura esencial de la pared celular, además de ser el blanco a donde van dirigidas la mayoría de los agentes antimicrobianos (Hett y Rubin, 2008) (Figura 1).

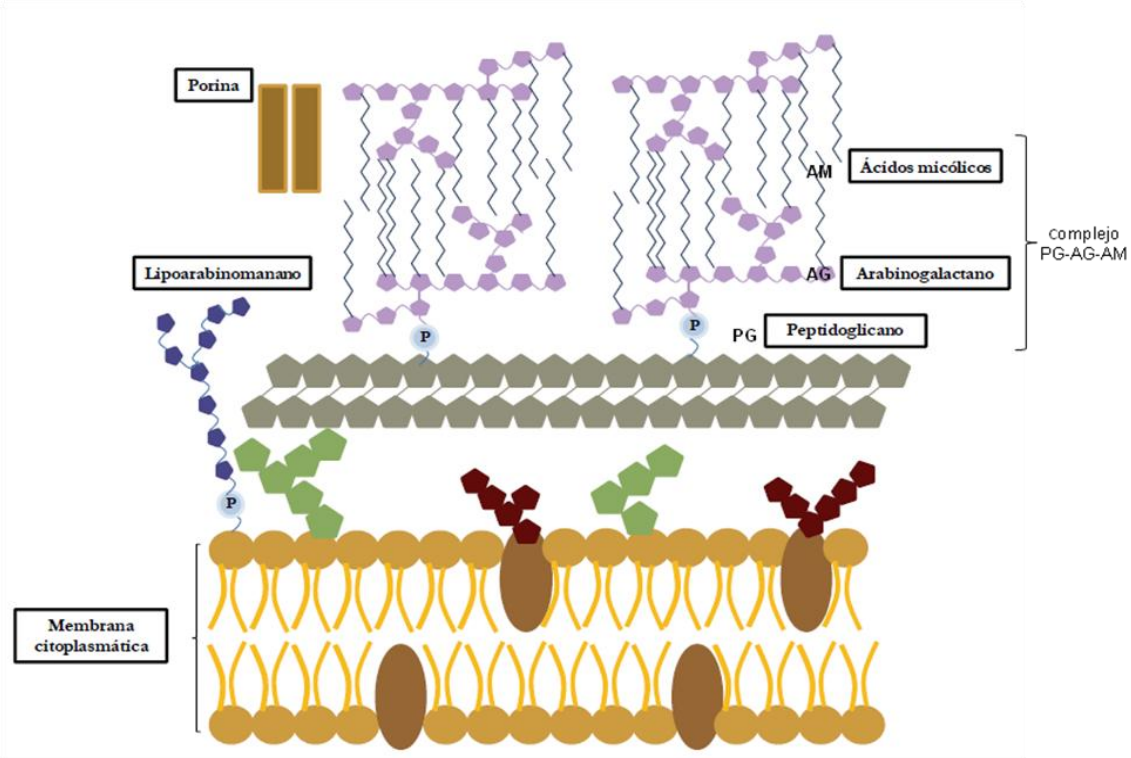


Figura 1. Esquema de la composición de la pared celular de las micobacterias.

2.2 Complejo *Mycobacterium avium*

El Complejo *Mycobacterium avium* o MAC, también denominado como Complejo *M*ycobacterium *avium-intracellulare* o MAIC. Son un grupo de micobacterias de crecimiento lento pertenecientes al grupo de "Micobacterias no tuberculosas" (NMT) o "Micobacterias atípicas" (Inderlied *et al*., 1993). Este grupo de bacterias crecen en rangos de temperatura entre los 20 y 37ºC, son ácido alcohol resistentes y producen un pigmento amarillo en ausencia de luz. El complejo *M. avium* incluye a los siguientes microorganismos:

Mycobacterium avium subespecie *avium* (*M. a. avium*),
Mycobacterium avium subespecie *paratuberculosis* (*Map*),
Mycobacterium avium subespecie *hominissuis* (*M. a. hominissuis*),
Mycobacterium avium subespecie *silvaticum* (*M. a. silvaticum*) y
Mycobacterium intracelullare (*M. intracelullare*) (Inderlied *et al*., 1993).

En la última década se han descrito nuevos miembros de MAC como
Mycobacterium chimaera (Tortoli *et al*., 2004),
Mycobacterium colombiense (Murcia *et al*., 2006),
Mycobacterium arosiense (Bang *et al*., 2008),
Mycobacterium vulneris (van Ingen *et al.*, 2009)
Mycobacterium bouchedurhonense,
Mycobacterium marseillense y
Mycobacterium timonense (Ben Salah *et al*., 2009).

Las especies pertenecientes a MAC se caracterizan por tener una similitud nucleotídica superior al 90%. *Map* está más estrechamente relacionado con *M. avium*, con el cual presenta una identidad >99%, distinguiéndose de *M. avium* por la presencia de 15-18 copias de la secuencia de inserción *900* (IS*900*) (Green 1989). A pesar de la similitud genotípica entre las cepas de MAC, fenotípicamente sus miembros difieren ampliamente en términos de su tropismo por el huésped, fenotipos microbiológicos, enfermedad y patogenicidad (Motiwala *et al*., 2006).

2.3 *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis*

2.3.1 Características generales

Map es el agente causal de la paratuberculosis o enfermedad de Johne, su denominación actual se debe a Thorel (1990). *Map* es un parásito intracelular obligado, hidrófobo, Gram positivo, aeróbico, inmóvil, no forma esporas, su tamaño oscila entre 1-2 µm, normalmente forma colonias rugosas de morfología cocobacilar, carecen de fosfatasa alcalina (Thorel *et al*., 1990) (Figura 2A), la mayoría de las cepas son fotocromógenas y requieren de micobactina para su crecimiento (Snow *et al*., 1970). La gruesa pared celular que recubre a este microorganismo está compuesta por 60% de lípidos; lo que le confiere la ácido-alcohol resistencia. En extensiones de heces y de tejidos los bacilos tienden a agruparse en grumos, supuestamente debido a la

disposición que adoptan al replicarse dentro de los macrófagos que infectan (Thoen *et al*., 1979). (Figura 2B).

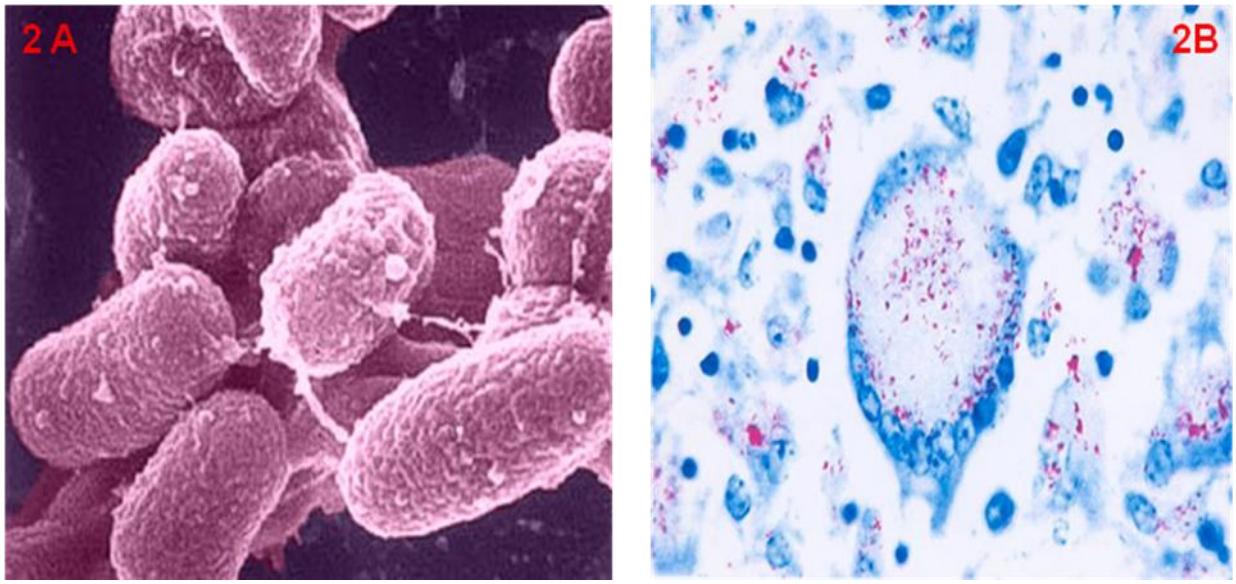


Figura 2. Imágenes de los bacilos de *Map* observados al microscopio **A.** Micrografía electrónica de barrido que muestra la gruesa pared celular de carácter lipídico de *Map*. (Fuente: Centro de Pruebas de Johne, Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad de Wisconsin (Wisconsin, EE.UU.) **2B.** Agrupaciones de bacilos de *Map* en el intestino delgado de un caso típico de paratuberculosis bovina. (Fuente: *Moredun Research Institute of London*).

La pared celular de *Map* está implicada en los mecanismos de restricción de absorción de nutrientes, ocasionando baja actividad metabólica que conlleva a una velocidad de crecimiento en condiciones optimas, 24 veces inferior que la de bacterias como *Escherichia coli* (Juste *et al*., 1993). Esta propiedad en combinación con la gruesa pared celular, son algunos de los factores que le proporciona a *Map*, su gran resistencia a las condiciones adversas (Ratledge 1982).

Según Vaerewijck (2005) otros factores que propician la supervivencia de *Map* en el medio ambiente son: la concentración de materiales biodegradables, la cantidad de nutrientes, las interacciones microbiológicas (*clumbs*), la resistencia a desinfectantes, los factores ambientales como turbidez, suelos con pHs bajos (la solubilidad del hierro aumenta cuando el pH del suelo disminuye y este organismo necesita de este elemento

para su metabolismo) (Johnson *et al*., 1997), la latencia, la aerosolización y la formación de biopelículas (*biofilms*) (Rowe y Grant., 2006, Pavlik *et al*., 2009).

Algunos ejemplos específicos de la supervivencia de *Map* en el medio ambiente son: largos periodos en heces (246 días), 55 semanas en ambientes secos sombríos y en agua de presa no expuesta a luz solar (Whittington *et al*., 2004, 2005); temperaturas de congelación (Juste *et al*., 1990a) y tratamientos de pasteurización y cloración (Whan *et al*., 2001, Grant *et al*., 2002a). No obstante a pesar de la resistencia que *Map* presenta para sobrevivir en condiciones extremas, se ha encontrado que este organismo es susceptible a factores como: la luz solar, la desecación, pH superiores a 7 (Manning y Collins 2001), elevadas concentraciones de calcio y a las temperaturas de ebullición (Schroen *et al*., 2003, Whittington *et al*., 2004, 2005). Así como también a desinfectantes como: amonio (3%), formol (5%), compuestos cresólicos (1:32), fenol (1:40), hipoclorito cálcico (1:50), cloro (2µg/ml) y etanol (Merkal *et al*., 1982b, Chiodini *et al*., 1984a, Böhn *et al*., 1994, Katayama *et al*., 2003).

2.3.2 Dependencia a la micobactina

El hierro es uno de los metales especialmente requeridos para el crecimiento de las micobacterias patógenas; este metal es quelado por los sideróforos (micobactinas y exoquelinas). Las micobactinas son agentes internos secuestradores y las exoquelinas son vectores externos. En el caso de *Map*, la dependencia a la micobactina se ha utilizado ampliamente como una característica taxonómica de este microorganismo debido a que la mayoría de las micobacterias son capaces de sintetizarla. Las micobactinas son lípidos de elevado peso molecular estrechamente relacionados entre sí y asociadas a la célula, son producidas por las micobacterias cuando existen limitadas cantidades de hierro en el medio. Debido a que sus estructuras son altamente hidrofóbicas, las micobactinas están confinadas a la membrana celular en donde su función es facilitar el transporte de este mental a través de la compleja pared celular. Las exoquelinas son imprescindibles en la captación del hierro, estas pequeñas moléculas están presentes en el fluido extracelular y se liberan en altas

concentraciones cuando hay deficiencia de hierro; se han identificado exoquelinas tanto liposolubles como hidrosolubles y su función en las micobacterias es adquirir el hierro presente en el hospedador en forma de ferritina a través de la pared celular bacteriana (Ratledge 2004). Una vez es quelado el hierro, este pasa al interior del citoplasma mediante un transporte transmembranal (Snow *et al*. 1969); en donde tiene lugar el intercambio del metal quelado con la micobactina, la cual será la responsable de la formación de un depósito de hierro en el interior de la célula.

Aunque la dependencia a la micobactina es ampliamente utilizada como un rasgo característico que distingue a *Map*, algunos estudios han demostrado que esta dependencia no es especifica de este microorganismo, ya que también ha sido observada en otras especies como *M. silvaticum* y algunos aislamientos primarios de *M. avium* (Thorel *et al*., 1991, Coicito 1994). De igual manera, otros estudios han demostrado que *Map* también puede crecer sin aporte externo de micobactina, lo cual es posible si el medio contiene suficiente hierro y otros nutrientes disponibles (Merkal *et al*., 1974, Juste *et al*., 1993).

Por otro lado se ha reportado que la incapacidad que tienen algunas micobacterias como *Map* y algunas cepas de *M. avium* de crecer sin el suministro adicional de micobactina no dependería de la imposibilidad real de ser sintetizada, sino de la represión en la capacidad de producir este compuesto, derivada de su condición como parasito en el interior del macrófago de donde obtiene directamente los nutrientes que necesita (Lambrecht y Collins 1993), así como también de la utilización de proteínas quelantes del hospedador (Merkal *et al*., 1974). Sin embargo, estudios posteriores derivados de la secuenciación del genoma completo de *Map*, sugirieron que la imposibilidad de *Map* en producir la micobactina se podría deber al truncamiento del gen mbtA-J, el cual se cree que es el gen responsable de la iniciación de la producción de micobactina en *Map*. Esta diferencia podría ser entonces, el factor limitante en la producción de dicho sideróforo, (Li *et al*., 2005), aunque esto aún no ha sido probado. Por lo anterior, el suplemento de micobactina en los medios de cultivo de *Map*, se sigue considerando como un método eficaz para su aislamiento.

2.3.3 El genoma de *Map*

La secuenciación del genoma completo de *Map*, fue publicada por Li *et al*., (2005) la cual fue realizada a partir de la cepa referencia K-10, un aislado de origen bovino. El conocimiento de la secuencia del genoma de *Map*, ha posibilitado grandes avances en todos los campos de investigación de *Map* como estudios genómicos comparativos con relación a otras micobacterias, blancos de diagnóstico, evolución molecular de *Map* como patógeno, elementos genéticos específicos, etc.

El genoma de *Map* esta insertado en un cromosoma circular de 4.829.781 pb que codifica para 4.350 marcos de lectura abiertos u ORFs, del inglés *open reading frames*, 45 tRNAs, y un operón rRNA. El análisis *in silico* ha identificado más de 3.000 genes con homólogos en *M*. *tuberculosis*, y 161 regiones genómicas únicas que codifican 39 genes de *Map* desconocidos hasta el momento. El genoma esta caracterizado por la relativa alta proporción de guanina y citosina (69%) así como abundantes secuencias de inserción (IS) y miembros de la familia PE/PPE (dominios de prolina-ácido glutámico y prolina-prolina-ácido glutámico respectivamente), estos últimos, estan implicadas como factores de virulencia y patogénesis en las infecciones por *Map* (Li *et al*., 2005).

En el genoma de *Map*, se han identificado 58 secuencias de inserción, incluyendo 17 copias de IS*900,* 7 a 10 copias de IS*1311* y 3 copias de ISMav2 (Li *et al.*, 2005), 3 copias de IS*Mpa*1 (Olsen *et al*., 2004), y 6 copias de IS*Map*02 (Stabel *et al*., 2005). *Map* no contiene la IS*1245*, característica del complejo *avium* (Johansen *et al*., 2005). Otros genes o dianas de interés específicos son el *locus* 251 (Bannantine et al., 2002, Motiwala *et al*., 2003), el *hspX* (Ellingson *et al*., 1998, 2000) y el F57 (Poupart *et al*., 1993) (Figura 3).

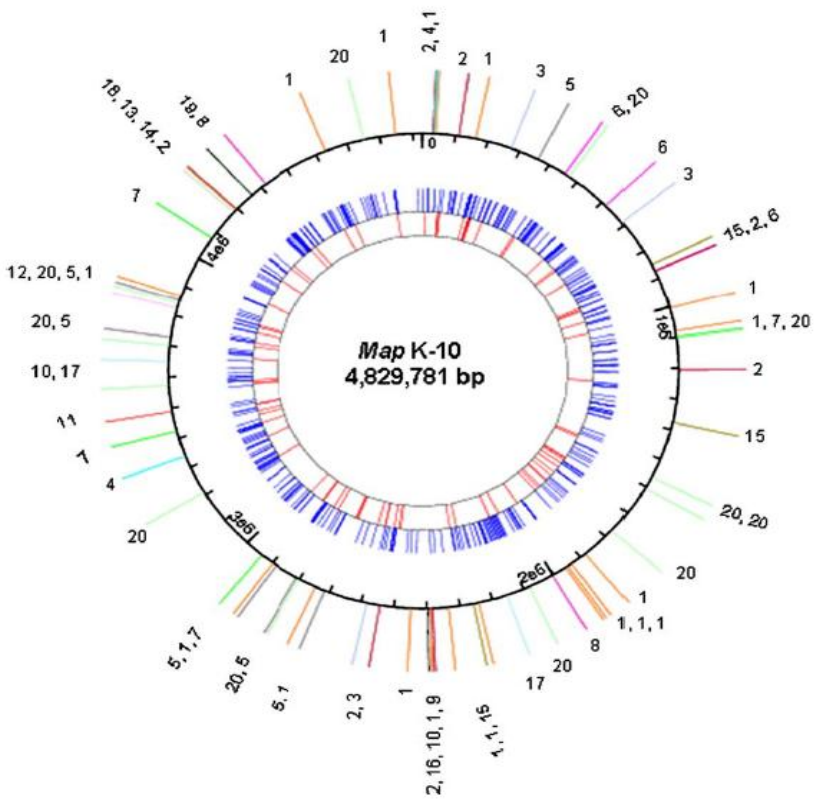


Figura 3. Representación circular de los elementos IS y secuencias repetitivas en el genoma de *Map*. Las líneas de color rojo representan los SSRs (Repeticiones de secuencias cortas), las de color azul representa los VNTRs (Repeticiones en tándem de número variable), las del círculo negro representan las escalas, los líneas de color que estan por fuera del histograma son las secuencias de inserción (1: IS*900*; 2: IS*1311*; 3: IS*mav2*; 4: IS_*MAP01*; 5: *MAP02*; 6: *MAP03*; 7: *MAP04*; 8: *MAP05*; 9: *MAP06*; 10: *MAP07*; 11: *MAP08*; 12: *MAP09*; 13: *MAP10*; 14: *MAP011*; 15: *MAP12*; 16: *MAP13*; 17: *MAP14*; 18: *MAP015*; 19: *MAP16*; 20) (Fuente: Motiwala, 2006).

Adicionalmente, el conocimiento del genoma de *Map* está proporcionando nueva información acerca de regiones genéticas únicas de la bacteria, que además de servir para la identificación y el diagnóstico, permitirán revelar los procesos genéticos de la interacción patógeno-hospedador (Li *et al*., 2005, Marsh *et al*., 2006, Bannantine *et al*., 2006).

2.3.4 Secuencias de inserción (*Insertion sequences*, IS)

Las secuencias de inserción son repeticiones de ADN dispersas, relacionadas con elementos genéticos móviles presentes en múltiples copias (Hatfull y Jacobs, 2000). La

movilidad de estos elementos constituye una fuente de flexibilidad genética, siendo responsables a su vez, de una gran variedad de reestructuraciones cromosómicas además de deleciones (Mahillon y Chandler, 1998). La utilización de las secuencias de inserción en pruebas de diagnóstico, proporciona discriminación entre distintas especies, debido a la tendencia de estos elementos transponibles para insertarse al azar y ocupar varios sitios en el genoma. En algunos casos la localización de estos elementos de inserción, en lugares definidos del genoma son lo suficientemente estables para ser utilizados como marcadores para la tipificación de especies y para fines epidemiológicos (Dombek *et al*., 2000). En el caso particular de *Map* las secuencias de inserción más comúnmente utilizadas para su identificación y tipificación son las secuencias IS*900* e IS*1311*, las cuales estan descritas detalladamente en el apartado de **Diagnóstico molecular de *Map***, página 38.

2.3.5 Diversidad de las cepas de *Map*

Observaciones fenotípicas así como estudios epidemiológicos y moleculares, han evidenciado la heterogeneidad en los distintos aislamientos de *Map.* Los cuales se han clasificado ampliamente en dos grandes grupos o tipos de cepas, las bovinas y las ovinas. Esta diferenciación fue realizada por primera vez mediante el análisis de Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (*restriction fragment length polymorphism analysis,* RFLP) en combinación con la hibridización de IS*900*, (IS900-RFLP) (Collins *et al*., 1990, Pavlic *et al*., 1999). Inicialmente la denominación de los tipos de *Map,* se hizo de acuerdo a las especies en las cuales fueron aisladas en: cepas ovinas o Tipo “S” (Type *sheep*) asiladas de ganado ovino, cepas bovinas o Tipo “C” (*Type cattle*) obtenidas de animales de origen bovino, y Tipo intermedio o “I” aisladas de pequeños rumiantes (Collins *et al*., 1990). Posteriormente se encontró que los tipos de *Map* pueden también ser aislados de diferentes especies y que por lo tanto, las especies de origen no son necesariamente un indicador adecuado del tipo de cepa. Por lo tanto se propuso denominar a estas cepas como: Tipo I (que corresponde al Tipo S), Tipo II (correspondiente al Tipo C) y Tipo III (o Tipo Intermedio) (Stevenson *et al.*, 2002, de Juan *et al*., 2005).

Los avances en las técnicas de tipificación molecular han hecho posible la diferenciación genética entre los distintos aislamientos de *Map,* así como la identificación de otras cepas de este organismo. Mediante la utilización del ensayo IS*1311* PCR-REA, se logro identificar además de las cepas ya descritas, otro tipo de cepa obtenida a partir de muestras de bisontes, denominándosele Tipo B (*Type bison*), (Whittington *et al.*, 2001, Sohal *et al.*, 2009). Un estudio reciente de comparación genómica de *Map*, ratificó la división de *Map* en los dos grandes grupos propuestos inicialmente, los Tipos I y II pero debido a que en este estudio no se encontró diferencias que delimitaran al tercer grupo, es decir al Tipo III o intermedio, se hizo un agrupamiento que incluyó a las cepas del Tipo III con las cepas del tipo I, conformándose el Tipo I/III. Esta agrupación es consistente con la observación de que las cepas del tipo I y las del tipo III comparten rasgos fenotípicos similares así como las preferencias por el huésped (Alexander *et al*., 2009).

A nivel epidemiológico parece existir cierta tendencia de los tipos de *Map* a asociarse con aspectos como la transmisión, preferencia por el huésped y susceptibilidad a la infección; sin embargo las distintas metodologías empleadas en los diferentes estudios publicados sobre aislamiento y tipificación de *Map*, han hecho difícil el entendimiento de estas asociaciones. No obstante, existen evidencias fenotípicas y genotípicas que diferencian a las cepas de *Map*. Fenotípicamente se distinguen por el tiempo en que tardan en crecer, el tipo de medio de cultivo en donde se pueden aislar (estos aspectos se ampliaran en el apartado de **El cultivo de *Map*,** página 32) y otra característica aunque poco común, es la pigmentación que presentan algunas cepas de origen ovino y que no ha sido observada en las cepas bovinas (Stevenson *et al*., 2002).

A nivel genotípico se han encontrado algunas diferencias entre las cepas del Tipo I y II. Un estudio realizado por Dohmann *et al*., (2003), encontró que estos dos tipos de cepas no tienen locus tipo-específicos únicos, y que las cepas del tipo II parecen haber sufrido más deleciones y rearreglos de regiones genómicas que las del tipo I. En las cepas del tipo I se han encontrado 3 regiones específicas denominadas *pig*-RDA10,

pig-RDA20 y *pig*-RDA30, las cuales no tienen ninguna homología con el genoma de Map-K10 (la cual perteneciente al Tipo II), pero si una alta homología con secuencias de *M. avium* (Dohmann *et al*., 2003). En la actualidad se adelanten distintos estudios para conocer si estas diferencias podrían estar implicadas en la capacidad de infección, susceptibilidad, rango de huéspedes, etc.

Con respecto a las preferencias por el huésped, se ha encontrado que las cepas que más amplio rango de huéspedes presentan son las del Tipo II, ya que han sido comúnmente aisladas de diferentes especies de animales, tanto rumiantes como no rumiantes (Greig *et al.*, 1999, Florou *et al*., 2008), así como de muestras humas de pacientes con enfermedad de Crohn (Bull *et al.*, 2003, Paustian *et al.*, 2008). En cambio, las cepas del Tipo I han mostrado tener mayor restricción por los huéspedes a los que infectan ya que se han asilado más comúnmente de ovinos y caprinos (Sevilla *et al*., 2007), sin embargo se han reportado asilamiento de este tipo, en ciervos rojos (de Lise 1993), gamos (Machackova *et al*., 2004) y el ratón domestico (Florou *et al*., 2008. Otros reportes muestran que los ovinos también son susceptibles a las cepas del Tipo II (Stevenson *et al*., 2009) ocasionándoles la enfermedad (ptb). El tipo B (bisonte), no ha mostrado especificidad por su especie ya que ha sido aislado de ovejas y cabras (Sevilla 2005), búfalos (Yadav *et al*., 2008) y antílopes (Kumar *et al*., 2008).

La distribución geográfica de las cepas de *Map*, está probablemente influenciada por factores tales como: el movimiento de animales de una región geográfica a otra, la virulencia de las cepas (las cepas del Tipo I son más virulentas que las cepas del tipo II, Verna, (2007)) y los sistemas de manejo en los ranchos. A pesar del gran avance que se ha tenido con respecto a la epidemiologia molecular de *Map*, es necesario profundizar en el conocimiento de su genoma, lo cual proporcionará información más detallada sobre los rasgos fenotípicos, epidemiológicos y patogénicos observados entre las distintas cepas. El análisis molecular de la secuencia del genoma de *Map* ha permitido la identificación de polimorfismos específicos en las cepas de este microorganismo*,* los cuales podrían estar asociados con las diferencias relacionadas con la virulencia y patogenicidad (Marsh *et al*., 2005, Castellanos *et al*., 2009,

Alexander *et al*., 2009). Futuros estudios son requeridos para determinar el impacto funcional de estos polimorfismos en las cepas de *Map*

2.4 Epidemiología de la paratuberculosis

La epidemiología de la ptb está ligada a las características biológicas de *Map* tales como el lento desarrollo, el parasitismo obligado, la alta resistencia ambiental, la posibilidad de infección congénita y la transmisión a través del medio ambiente contaminado. La implicación de este microorganismo en la ptb, fue descrita por primera vez por Johne y Frothingham (1895).

Aunque la ptb afecta principalmente a rumiantes domésticos, esta enfermedad también ha sido descrita en rumiantes no domésticos como ciervos, búfalos, bisontes, muflones, cimarrones, cabras de montaña etc. (Mackintosh *et al*., 2004, Sivakumar *et al*., 2005, Whitlock *et al*., 1999, Richards *et al*., 1983). Así como también a especies monogástricas como: conejos, caballos, cerdos, mulas, perros, pollos, primates y el hombre (Hermon- Taylor y El-Zaatari, 2004; Committee on Diagnosis and Control of Johne's Disease, 2003).

Mycobacterium paratuberculosis, ha sido señalado como agente etiológico de la enfermedad de Crohn en humanos (Dalzeil *et al*., 1913, Rosenfeld *et al*., 2010), enfermedad que consiste en una inflamación crónica del intestino (íleon y el área ileocecal) (Anderson *et al*., 1980, Chiodini *et al*., 1997). Lo anterior es debido a que *Map* ha sido aislado en muestras de tejidos intestinales y de sangre periférica de estos pacientes (Hulten *et al*., 2001, Naser *et al*., 2004, Bentley *et al*., 2008), así como de leche materna de mujeres que padecen la enfermedad (Nacer *et al*., 2000b), en donde también ha sido identificado por medio de PCR (Bull *et al*., 2000, Autschbach *et al*., 2005). Sin embargo, otros autores son escépticos a esta asociación debido a que han encontrado resultados contradictorios como por ejemplo, la extrema dificultad y en algunos casos la imposibilidad de aislar la bacteria a partir de muestras de estos pacientes (Collins *et al*., 2000), el aislamiento de *Map* en individuos sanos (Bull *et al*.,

2003, Sechi *et al*., 2005), la identificación de genes relacionados con la predisposición a la enfermedad (cuestionando la implicación de micobacterias en la enfermedad de Crohn), entre otros. Lo anterior ha hecho que la etiología de dicha enfermedad sigua siendo desconocida hasta el momento. No obstante, diferentes estudios han mostrado la posibilidad de que la enfermedad de Crohn presente causas multifactoriales en donde factores ambientales, genéticos e inmunológicos, estén contribuyendo con su desarrollo (Rosenfeld *et al*., 2010) y la infección por *Map* sea tan solo un factor, más no la causa suficiente para ocasionarla.

2.4.1 Transmisión

La ruta de transmisión principal es la fecal-oral a través de la ingestión de heces, leche o calostro contaminados por *Map*, siendo los neonatos y los animales menores a un año, los que presentan el más alto riesgo de adquirir la infección (Chiodini *et al*., 1993, Coicito *et al*., 1994, Sweeney 1996). Se ha establecido que la dosis infectiva es aproximadamente de 1 x 10^3 bacilos (Brotherston *et al.,* 1961) y teniendo en cuenta que el número de bacilos viables eliminados en heces de animales infectados es de 10^6-10^8 UFC/g (Jorgensen 1982, Whittington *et al.,* 2000c,) una mínima contaminación fecal del ambiente es suficiente para producir la infección de los animales susceptibles.

El consumo de muestras ambientales contaminadas como agua o pasto también son fuentes de infección (Sweeney 1996, Manning *et al*., 1998). Otras posibles vías de entrada de *Map* al organismo son: la intravenosa (Kluge *et al*., 1968), la intrauterina (Merkal *et al*., 1982a, Lambeth *et al*., 2004), por semen de toros afectados con ptb (Glawischnig *et al*., 2004) y la depredación, la cual también ha sido considerada como fuente de infección en el caso de los animales carnívoros, esto debido a que el porcentaje de aislamiento de *Map* en los depredadores es del 62%, en comparación con el 10% de aislamiento de *Map* en las presas (Greig *et al*., 1997, 1999). La alta prevalencia de *Map* en algunas especies de animales no rumiantes de vida salvaje y su interacción con rumiantes domésticos susceptibles, aumentan la posibilidad de que

estos jueguen un papel en la epidemiologia de la enfermedad (Biet *et al*., 2005). (Figura 4)

Los miembros de MAC se han encontrado en un amplio rango de huéspedes de distintas especies domesticas y silvestres (Thorel *et al*., 1997, Biet *et al*., 2005) así como también en humanos inmunocomprometidos (Mendoza *et al*., 2009). En el caso particular de *Map*, este también ha sido aislado de insectos (Fischer *et al*., 2004b), lombrices (Fischer *et al*., 2003a), nematodos (Whittington *et al*., 2001) y amebas de vida libre (Mura *et al*., 2006). Demostrando que todas estas especies juegan un papel importante en la epidemiologia y en la transmisión de enfermedades entre las distintas especies de animales (Figura 4).

En el ser humano, una posible vía de transmisión puede ser la ingestión de alimentos contaminados con *Map*, principalmente por la leche y sus derivados, en particular si esta proviene de animales que estén eliminando grandes cantidades del bacilo en las heces (Sweeney 1996). Una vaca seropositiva puede eliminar un promedio de 42,33 ± 19,67 UFCs por 100 ml de leche (Herman *et al*., 2006). La mayoría de los estudios realizados enfatizan el rol de la leche como principal vector de transmisión, ya que la pasteurización según las evidencias reportadas, no lograría eliminar totalmente las células viables de *Map* presentes en este alimento. Otros productos lácteos y cárnicos, así como el agua podrían también trasmitir esta micobacteria al humano, aunque la implicación de estos productos todavía no es clara (Grant *et al*., 2005).

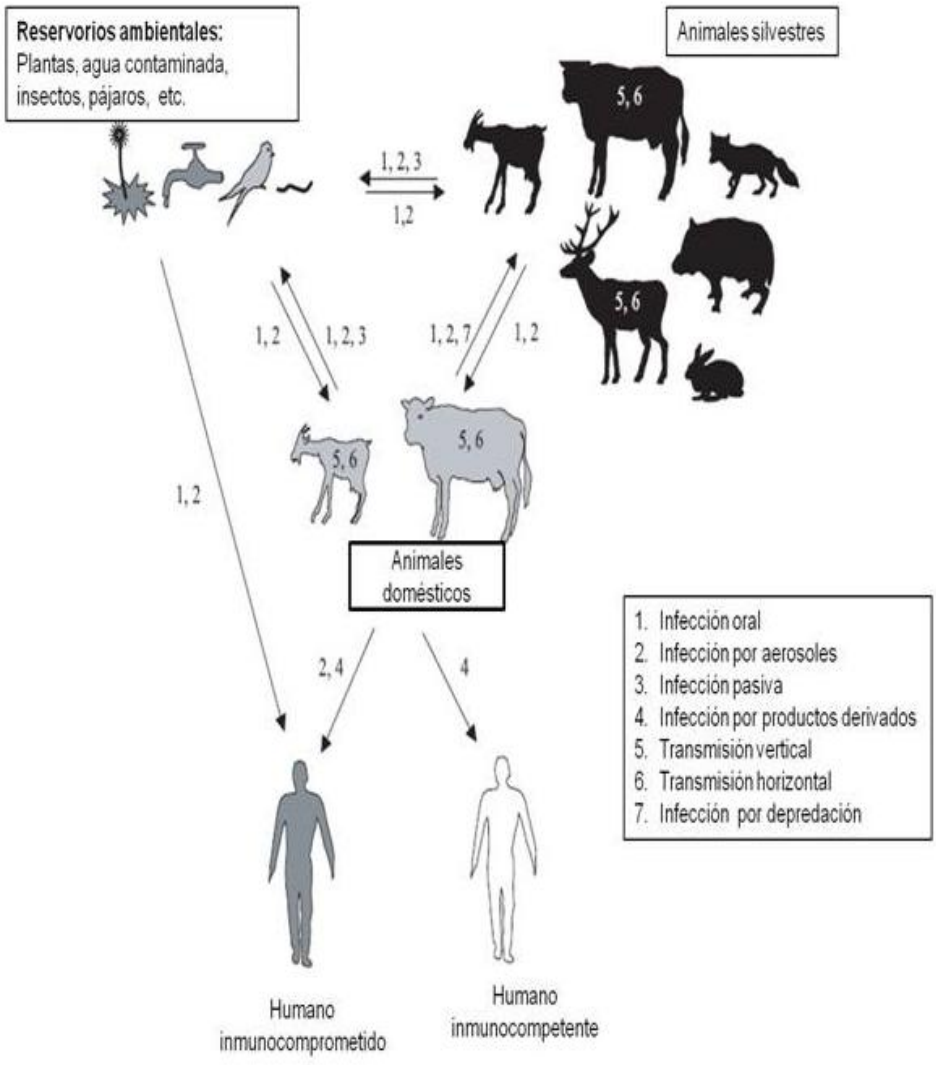


Figura 4. La ilustración muestra las posibles vías de transmisión de los miembros de MAC, entre el medioambiente, los animales salvajes, el ganado y el humano. (Figura adaptada de Biet *et al*., 2005). La transmisión vertical se da por vía intrauterina y la horizontal por contaminantes del medio ambiente (heces, aerosoles, etc.)

2.4.2 Prevalencia de la paratuberculosis

La ptb presenta una distribución mundial y es reconocida como un serio problema de salud animal ya que afecta a distintas especies de rumiantes de importancia agropecuaria como ganado de carne y de leche, ovinos y caprinos (Whittington *et al*., 2000b). Esta enfermedad tiene el mayor impacto económico en el ganado vacuno de leche, donde el sacrificio prematuro reduce considerablemente la producción de este

producto así como el valor de la canal. El departamento de agricultura de los Estados Unidos (*United States Department of Agriculture*, USDA), ha estimado que en este país, aproximadamente el 22% del ganado vacuno lechero y el 8% del ganado de carne está afectado por la ptb, ocasionando grandes pérdidas que han sido estimadas hasta en $ 250 millones de dólares anuales tan solo en la industria láctea (Whitlock *et al*., 2000, Hendrick *et al*., 2005, Tiwari *et al*., 2008). Sin embargo, los verdaderos efectos económicos ocasionados por la ptb así como las prevalencias a nivel mundial, son difíciles de estimar por las siguientes razones:

1. La mayoría de los animales infectados son asintomáticos,
2. Los animales en estadios clínicos y que presentan disminución en la producción, son sacrificados antes de que se les realice el diagnóstico definitivo de la enfermedad, y
3. Las dificultadas en el diagnóstico de la infección temprana (baja sensibilidad de las técnicas de detección) (Fecteau y Whitlock, 2010).

En ganado ovino, la prevalencia de la ptb es desconocida mundialmente, debido a que no es de notificación obligatoria en muchos países, su estudio presenta menor prioridad en comparación con la ptb en ganado bovino, las dificultades en el aislamiento de *Map*, la falta de técnicas de diagnóstico lo suficientemente sensibles y específicas. En resumen el alto costo de la detección de la enfermedad en comparación con el bajo valor comercial que estos animales tienen. La ptb ovina se ha reportado en países de Norte América, Suramérica, Australasia, países del este, Asia, África y Europa, en donde la prevalencia de la enfermedad difiere entre el 2-32% (Bakker *et al.*, 2000; Sergeant 2001; Nielsen y Toft, 2009). Aunque en rebaños ovinos la prevalencia de *Map* no ha sido estudiada detalladamente, algunos estudios reportan una tasa de mortalidad que va del 5-15% por año (Reddacliff *et al.*, 2006).

En ganado caprino la prevalencia de la ptb también ha sido difícil de estimar, por razones similares a las mencionadas en el caso de la especie ovina. El principal problema que ocasiona la ptb en esta especie se relaciona con las pérdidas

económicas debido a la baja producción de leche e infertilidad, así como al aumento en el sacrificio de los animales infectados a temprana edad (Kostoulas *et al.*, 2006).

2.4.2.1 Prevalencia de la paratuberculosis en México

En México, la ptb es una enfermedad de gran impacto económico ya que junto con la tuberculosis bovina, la brucelosis y la infección por garrapatas, contribuye a la disminución en la producción ganadera.

En un estudio realizado en el 2005, sobre el impacto económico de la ptb en bovinos lecheros del centro del país, se calcularon pérdidas de $10,345.00 pesos por vaca al año, con una prevalencia del 8.87% en una población de casi 30,000 bovinos, siendo la disminución en la producción de leche el factor más desfavorable (CONASA, 2010).

Por otro lado, la utilización de pruebas diagnósticas como anatomía patológica, serología, bacteriología y técnicas de biología molecular como PCR y RFLP (Chávez-Gris *et al*., 2004, Estévez-Denaives *et al*., 2007, Favila-Humara *et al*., 2010), han permitido detectar la enfermedad en 16 estados del país y en distintas especies de rumiantes, encontrándose prevalencias del 9% en ganado bovino, 19.72% en caprinos y 36% en ovinos, en pruebas realizadas en más de 7000 muestras (CONASA 2010) (Figura 5). Sin embargo, a pesar de estos datos la prevalencia real de la paratuberculosis en el país sigue siendo desconocida y aun no han llevado a cabo programas de control de la enfermedad (Favila-Humara *et al*., 2010).

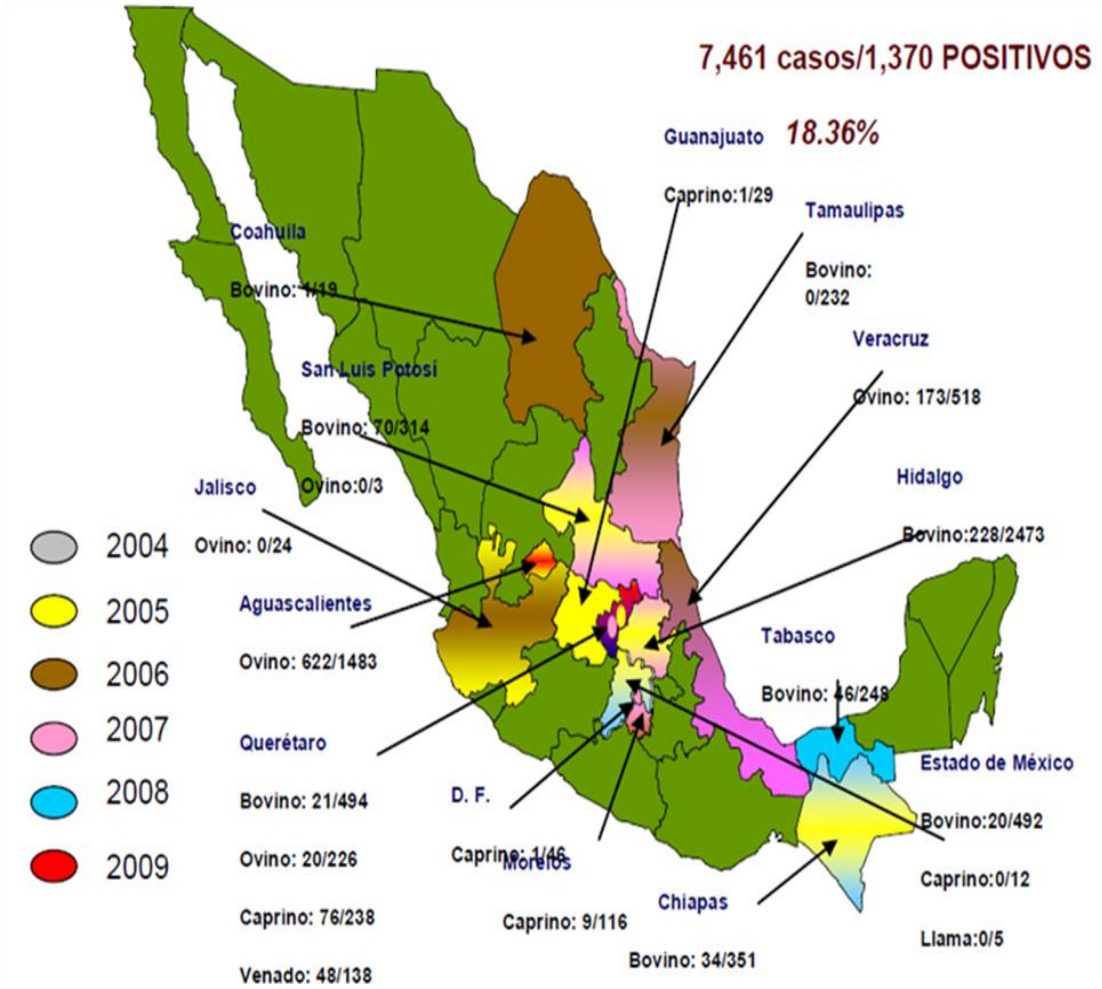


Figura 5. Casos de Paratuberculosis en México 2004—2009 (ELISA). Fuente: Dr. Gilberto Chávez Gris. FMVZ/CEIEPAA, USEDICO, UNAM. 17ª Reunión Anual del CONASA.

2.4.3 Signos clínicos de la paratuberculosis

La ptb se caracteriza por ser una enfermedad que progresa a través de varios estadios, tardando varios años antes de que se manifiesten los signos clínicos característicos (Olsen *et al*., 2001). Las fases en las que se desarrolla la ptb, son similares para las especies bovinas, ovinas y caprinas, aunque la presencia de algunos signos como la diarrea, es menos frecuente en pequeños rumiantes, así como la aparición de la enfermedad, la cual se da en animales más jóvenes (Stehman 1996). Las fases o estadios en las que se ha dividido la ptb son cuatro:

Fase I. Infección silenciosa. Esta fase se caracteriza por la ausencia de signos clínicos de la enfermedad y la no excreción del microorganismo. Esta etapa de infección se encuentra presente fundamentalmente en terneros y novillas, aunque en ocasiones también se ha descrito en ganado adulto.

Fase II. Fase subclínica. La mayoría de los animales infectados en una explotación estan en esta fase. Los cuales no muestran signos evidentes de la enfermedad, aunque sí lesiones microscópicas (Pérez *et al*., 2000), también pueden presentar anticuerpos circulantes o respuestas inmunes celulares alteradas. En esta fase los animales comienzan a perder productividad, en el caso de los bovinos se disminuye la producción de leche que puede variar 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*., 1999). La gran mayoría de los animales son negativos al cultivo de heces, aunque estos pueden comenzar a excretar la bacteria de manera intermitente con una baja carga microbiana.

Fase III. Fase clínica. Esta fase sólo se desarrolla tras varios años de infección por *Map,* en bovinos puede comenzar entre 3-4 años y en pequeños rumiantes el inicio de la enfermedad puede empezar antes de los 2 años; en ambos casos esta fase coincide con los partos y el inicio de la lactancia (Manning y Collins., 2001, García Marín *et al*., 1994). Los signos clínicos característicos que se presentan son: diarrea intermitente que afecta especialmente a los bovinos, la cual no responde a tratamientos, y que se puede relacionar con la baja capacidad de la mucosa intestinal de retener nutrientes. 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. Muchas veces estas heces son de consistencia pastosa o reblandecida (Carrigan *et al*., 1990, García Marín *et al*., 1994). Otros signos característicos son: pérdida de peso, emaciación y caquexia, los cultivos fecales de estos animales son positivos y usualmente presentan incrementados títulos de anticuerpos detectables por pruebas serológicas.

FASE IV

A esta fase pertenecen los animales en estado clínico avanzado, cuyas características principales son, debilidad, emaciación, diarrea acuosa profusa, caquexia extrema, edema intramandibular y deshidratación, que conducen a la muerte del animal (Choidini *et al*., 1984, Pérez *et al*., 2000,).

2.5 Patogénesis de la enfermedad

La principal vía de infección por *Map* es la oral, a través de su ingestión. El sitio de infección primaria de esta bacteria son las mucosas intestinales, aunque algunos estudios hayan indicado que son las amígdalas y los ganglios retrofaríngeos, (Payne y Rankin 1961, Lugton 1999), sin embargo estas parecen ser transitorias y desaparecen sin ocasionar trastornos (García Marín *et al*., 2000). La mayor susceptibilidad a la infección por *Map*, se presenta en animales menores a 1 año, posiblemente debido a la extensa superficie que abarcan las placas de Peyer intestinales en animales jóvenes, la cual va reduciéndose gradualmente con la edad.

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 integrina 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). No obstante, parece ser que las células M no son el único sitio de entrada de *Map*, al menos en cabras, ya que se ha encontrado que en esta especie de animales, la entrada de *Map* a la mucosa intestinal está 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 (Momotani *et al*., 1988, Pérez 1992, Corpa *et al*., 2000). Los macrófagos epiteliales activados, estimulan a las dos subpoblaciones celulares (Th1 y Th2) de las células T ayudadoras (T helper, Th) 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 citoquinas 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 gama interferón (INFg), una de las primeras citoquinas detectables en infecciones por *Map*, así como la interluquina 2 (IL-2) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF-a), estas citoquinas dirigen las funciones inmunitarias mediadas por células que son necesarias para contener la infección intracelular.

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 demás 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). 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 el 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 en el tipo de respuesta de Th1 a Th2 (Chiodini 1996). Cuando los animales entran a la etapa de infección lepromatosa o Th2, comienzan a manifestar signos clínicos inespecíficos de la infección por *Map*, tales como pérdida de peso, en algunos casos diarrea y excreción intermitente de la bacteria (Koets *et al*., 1990).

El cambio de respuesta inmune de 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 citoquinas 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 detiene 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 deficiencias 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). Se han observado lesiones que contienen infiltraciones de macrófagos llenos de bacilos de *Map* en órganos como: riñón, hígado, glándula mamaria, etc (Pavlik *et al*., 1990). Los animales infectados en fase clínica avanzada de la enfermedad, usualmente sucumben a la infección en pocas semanas y mueren.

2.6 Diagnóstico microbiológico de la paratuberculosis

2.6.1 Tinción directa

Se realiza sobre frotis obtenidos a partir de preparaciones de cortes histológicos o de heces, que son teñidos por medio de la técnica de Ziehl-Neelsen. La técnica se basa en la retención del colorante fucsina por bacterias ácido-alcohol resistentes, en las que el decolorante (ácido-alcohol) no penetra debido a la gruesa pared celular que las recubre. A pesar de que esta técnica es rápida y económica, no se considera específica de *Map* (Juste y Aduriz 1990).

2.6.2 El cultivo de *Map*

El aislamiento de *Map* es considerado la técnica de referencia para el diagnóstico de la ptb en animales vivos. El primer aislamiento de *Map* lo realizó Twort (1911), desde entonces se ha tratado de mejorar la técnica del cultivo, con el objetivo de hacerlo más rápido, eficaz y sensible. Las muestras normalmente utilizadas para el cultivo de *Map* son: heces, ganglios mesentéricos o raspados de mucosa intestinal y leche (Garrido *et al*., 2000a).

El cultivo fecal es capaz de detectar a la mayoría de los animales en avanzado estado de la enfermedad donde alcanza una sensibilidad del 100%, pero solo a unos cuantos en las fases iniciales de la infección (Whitlock *et al*., 2000a). Se considera que su especificidad es del 100% (Whitlock *et al*., 1992, OIE 2008) y su límite de detección es de 50 a 100 unidades formadoras de colonias (UFC) por gramo de heces (Whitlock *et al*., 2000). El crecimiento de una o más colonias de *Map* es suficiente para definir una muestra como positiva, así como la detección de un solo animal con ptb dentro de un rebaño, es suficiente para clasificar al hato como infectado (Kalis *et al*., 2000).

Los requerimientos nutricionales para el cultivo de *Map* son similares a los de las micobacterias en general, con la salvedad del suplemento de micobactina como ya se había mencionado. Además, existen algunos componentes que pueden potenciar el crecimiento de *Map* como son la albumina sérica bovina y la yema de huevo, cuyo efecto más que aportar nutrientes radicaría en la eliminación o neutralización de compuestos deletéreos presentes en el medio. El dióxido de carbono y la asparagina (Ratledge 1982), el glicerol y el piruvato como fuentes de carbono, favorecen igualmente su crecimiento. Los antibióticos como la penicilina y antifúngicos como la anfotericina B (Kalis 1999), son necesarios ya que en las muestras fecales y de tejido intestinal, los microorganismos de *Map* pueden estar enmascarados por otras bacterias y hongos. Por consiguiente, el aislamiento efectivo de *Map* a partir de tales muestras dependerá de la eficacia en la inactivación de los microorganismos no deseados. Un método óptimo de descontaminación debe tener el menor efecto inhibidor posible sobre

el crecimiento de *Map.* Se ha encontrado que los protocolos rutinarios de descontaminación pueden disminuir el número de microorganismos de *Map* en cantidades cercanas a 2.7 $\log^{10}$ en heces y 3.1 $\log^{10}$ en tejidos (Reddacliff 2003).

En cuanto a las preferencias por los medios de cultivo de las distintas cepas de *Map*, se ha encontrado que estas estarían determinadas por el genotipo y no por la especie hospedadora (Sevilla 2007). En este sentido, se ha reportado que el medio más propicio para aislar cepas del Tipo II es el Herrold (Juste 1991b, Nielsen 2004). Mientras que para aislar cepas del Tipo I/III el medio más favorable es el Lowenstein Jensen (LJ) sin piruvato (Juste 1991, Aduriz 1995, Whittington 2000a). Sin embargo, debido a que no es posible determinar el tipo de cepa con anticipación, es recomendable la utilización de diferentes medios. Otro factor que está relacionado con el tipo de cepa es el periodo de incubación, el cual para cepas de origen bovino puede tardar entre 4-16 semanas y hasta un año en cepas de origen ovino (Whittington 1999). Así, el periodo de incubación de *Map* también es dependiente del tipo de cepa y no del origen del huésped (de Juan 2006).

En la búsqueda de estrategias para reducir los altos costos que conlleva el cultivo bacteriológico (20 dólares por muestra), se ha encontrado que una buena alternativa es el cultivo a partir de lotes o "*pool*" de heces, el cual ha resultado ser muy útil como método de estimación de la prevalencia de la ptb en un rebaño (Whittington 2000a, Kalis 2004), aunque ineficaz a la hora de identificar animales infectados dentro de un programa de control ya que la dilución del número de microorganismos de *Map* presentes en la muestra individual, reduce la sensibilidad de la técnica. No obstante, se ha encontrado que la reducción observada en el recuento de colonias en un *pool* de heces es mucho menor de lo que se podría esperar y que esto se atribuiría a una concentración de *Map* durante el procesamiento y descontaminación de las muestras; por lo tanto con una eficiente técnica de concentración como la centrifugación, sedimentación o filtración, la dilución de las muestras fecales no influye en el número de colonias totales (Kalis *et al*., 2000).

Otra alternativa recientemente explorada ha evaluado el papel del cultivo de *Map* a partir de muestras ambientales, como método para clasificar el estatus y la prevalencia de la infección por *Map* en hatos de ganado (Raizman *et al*., 2004, Fyock *et al*., 2005, USDA, 2005a). Entre las ventajas potenciales que este método representa estan: los bajos costos comparado con el ELISA o el cultivo fecal, la facilidad en el muestreo, la no manipulación de animales y la especificidad, la cual al igual que el cultivo fecal es cercana al 100% (Berghaus 2006). En un estudio realizado en Minnesota se encontró que el cultivo de muestras ambientales proporcionaba una clasificación de rebaños similar a la obtenida mediante el cultivo de lotes de heces, lográndose las mayores proporciones de resultados positivos en muestras recolectadas de pasillos, zonas de almacenamiento de estiércol, cama y suelo (Raizman *et al.,* 2004). Así mismo se ha reportado que la proporción de cultivos positivos en muestras ambientales esta en relación directa con la proporción de animales seropositivos, sugiriendo que el cultivo de muestras ambientales además de la información sobre el estatus del rebaño, puede proporcionar una estimación cualitativa de la prevalencia de la enfermedad dentro del mismo (Berghaus 2006).

2.6.3 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 cultivo sólido más frecuentemente empleados para el aislamiento de *Map* son aquellos a base de huevo como el HEYM (*Herrold's egg yolk médium*) (Kim *et al*., 1989) o el Löwestein Jensen (LJ) (Jorgenson 1982), aunque también se utilizan medios sintéticos como los medios Middlebrook 7H9, 7H10 y 7H11 o medio Dubos adicionados con OADC y micobactina (Aduriz 1995, OIE, 2008).

2.6.3.1 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 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 de

aislamientos en aquellas cepas que estan en forma de esferoblastos (Whittington *et al*., 2000a).

2.6.3.2 Cultivo radiométrico. Este método utiliza el medio BACTEC™12B, suplementado con yema de huevo y micobactina. El cultivo radiométrico representa una alternativa a los medios de cultivo tradicionales y se basa en la detección del crecimiento de las micobacterias mediante la cuantificación del $^{14}CO_2$ liberado tras la metabolización del 14C presente en el medio del cultivo. La técnica fue adaptada por Whittington (1999) y presenta como principales ventajas, mayor sensibilidad (Damato y Collins 1990) y rapidez en el crecimiento de las micobacterias, facilitando la obtención de aislamientos especialmente difíciles de crecer como son las cepas ovinas y esferoblastos (Whittington *et al*., 1999, 2009). Se han descrito aislamientos positivos en nueve días tras la inoculación en este medio de cultivo (Damato y Collins 1990, Cousins 1995). Sin embargo presenta desventajas como la imposibilidad de observar colonias y la dependencia a la micobactina, adicionalmente los altos costos y el empleo de isótopos radiactivos dificultan su utilización en los laboratorios.

2.6.4 Morfología de las colonias de *Map*

Las colonias primarias de las cepas bovinas de *Map*, aisladas en medio HEYM son pequeñas, convexas (semiesféricas), suaves, brillantes, miscibles con el agua, de color blanquecino a crema o color beige, no cromogénicas (Figura 6). El tamaño inicial de las colonias es puntual con un tamaño de 0,25–1 mm cuando son numerosas en la superficie del cultivo. Los bordes son redondos y uniformes de superficies lisas y brillantes. A medida que el cultivo envejece, las colonias alcanzan un tamaño mayor y se engrosan, tornándose opacas y de color blanco-parduzco. Las colonias de los aislamientos más viejos pueden alcanzar 2 mm y su morfología cambia pasando de lisa a rugosa y de semiesférica a irregular (Thorel 1984).

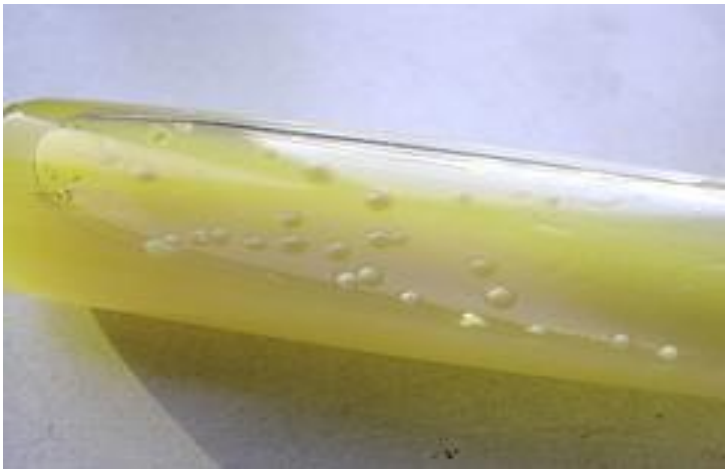


Figura 6. Colonias de *Map* de origen bovino, realizado en medio HEYM suplementado con micobactina. En donde se puede apreciar la morfología de las colonias descritas. (Fuente: Foto publicada en *Bacteriology's photostream*).

En medio Middlebrook 7H10, las colonias de las cepas del Tipo II de *Map* son menos convexas que en medio HEYM especialmente en los cultivos viejos, el diámetro es de aproximadamente de 1 mm, son difíciles de diferenciar debido al poco contraste de color entre la colonia y el medio (Figuras 7 A y B). Las colonias de las cepas del tipo I aisladas en medio Middlebrook 7H10 se observan convexas, suaves, húmedas, brillantes, de color blanco-parduzco similar al color del medio. El tamaño de estas colonias es de 0.5 mm aproximadamente, pero pueden alcanzar 1 mm y raramente 1.5 mm de diámetro si se presentan pocas colonias en el cultivo (Cousins *et al*., 2002). (Figura 7 C).

Un estudio reciente encontró que las morfologías de las colonias de los distintos tipos de *Map*, son dependientes del medio sólido de donde son aisladas. Así, las colonias que crecen en el medio LJ son muy pequeñas, translúcidas, usualmente abundantes, distribuidas en toda la superficie del medio y difíciles de ser observadas macroscópicamente (Figura 7 D), comparadas con las colonias aisladas en otros tipos de medios como Middelbrook y HEYM, en donde se observan rugosas, grandes y más fáciles de observar macroscópicamente (de Juan *et al*., 2006).

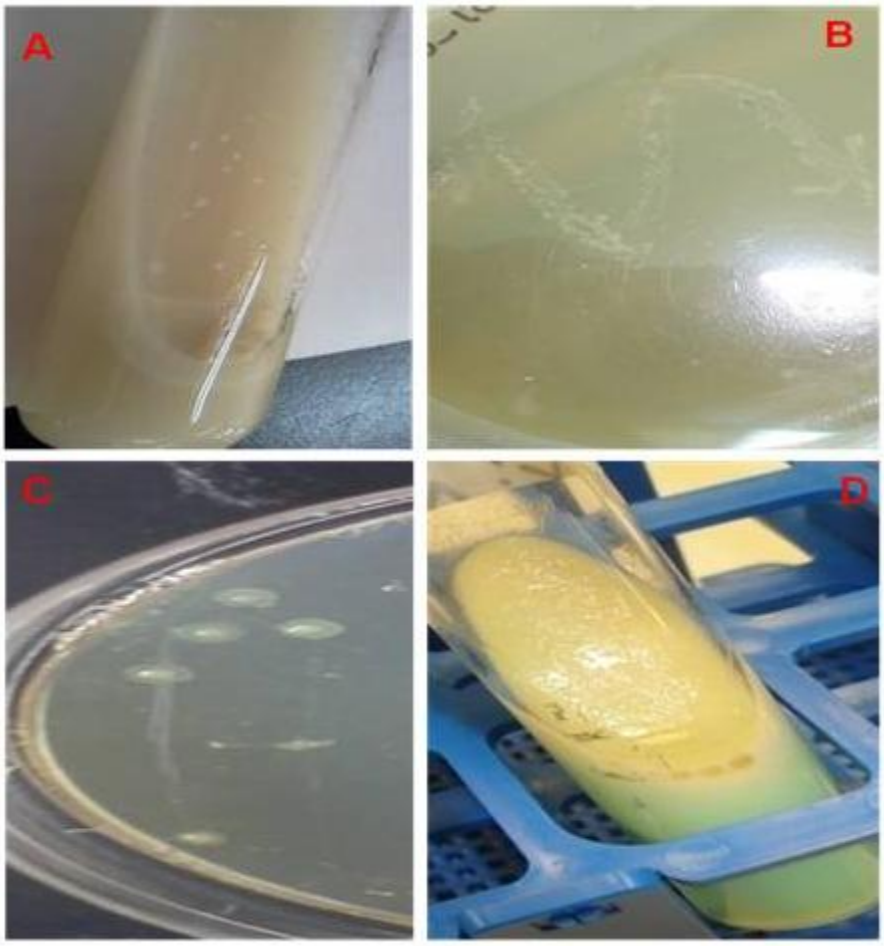


Figura 7. Colonias de *Map* aisladas en diferentes tipos de medio de cultivo suplementados con micobactina, estos cultivos fueron obtenidos en el presente estudio. **A.** Cepa de tipo bovino ATCC19698, cultivada en medio Middlebrook 7H10 adicionado con yema de huevo, **B.** Subcultivo de heces de origen bovino sembrado en medio Middlebrrok 7H10, **C.** Subcultivo de heces de origen ovino en medio Middlebrook 7H10, **D.** Cultivo primario de heces de origen bovino, obtenido en medio Lowenstein Jenesen.

En los distintos cultivos de *Map* es probable también observar el crecimiento de otros organismos además de micobacterias saprófitas, que pueden tener una apariencia muy semejante a las colonias de *Map*; estos microorganismos crecen entre los 5–7 días o hasta meses, después de iniciado el cultivo (Cousins *et al.,* 2002). Por lo tanto es necesario el análisis de las colonias sospechosas de *Map* mediante la tinción de Ziehl-Neelsen, el subcultivo de una de estas colonias en medios con y sin suplemento de

micobactina, y la realización de pruebas moleculares de regiones especificas de *Map*, para confirmar su presencia en el cultivo.

2.7 Diagnóstico molecular de *Map*

En la identificación molecular de *Map*, la secuencia genética más comúnmente utilizada es IS*900*, el cual fue el primer elemento móvil identificado en micobacterias y específicamente en aislamientos de *Map* (Green *et al*., 1989, Collins *et al*., 1989). IS*900* es parte de la familia IS*110*, cuyos miembros estan estrechamente relacionados entre sí e incluyen además de la IS*900*, las secuencias IS*901* en *M. avium* (Kunze 1991), IS*902* en *M. silvaticum* (Moss 1992), e IS*1110* en *M. avium* (Hernández-Pérez, 1994). IS*900* diferencia a *Map* de *M. avium* y *M. silvaticum*, debido a esto se han desarrollado técnicas de diagnóstico e identificación basadas en la reacción en cadena de la polimerasa dirigida a esta secuencia de inserción (IS*900*-PCR).

IS*900* es una secuencia de 1451 pb, que se inserta en una sola dirección dentro de una secuencia diana consenso, en un locus altamente conservado dentro del genoma de *Map* (Bull *et al*., 2000). Se ha encontrado que cada bacilo de *Map* presenta entre 14 a 18 copias de IS*900* por genoma bacteriano (Green *et al*., 1989, Collins *et al*., 1989, Bull *et al*., 2000). Característica que le confiere alta sensibilidad a la técnica de PCR, en comparación con otros genes o secuencias con una única copia por genoma bacteriano (Turenne *et al*., 2008).

2.7.1 PCR IS*900*

La PCR IS*900* fue utilizada por primera vez por Vary *et al.,* (1990) para la identificación de *Map*. Esta técnica permitió grandes avances en el diagnostico 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*., 1998b, 2009). *Map* ha podido ser identificado por PCR aun antes de su aislamiento por cultivo, a partir muestras fecales, (Kawaji *et al*., 2007, Irenge *et al*., 2009), leche (Djonne *et al*., 2003, Kaur *et al*., 2010), sangre y

tejidos (de ovinos y humanos) (Hermon-Taylor *et al*., 2000, Bull *et al*., 2003; Naser *et al*., 2004; Juste *et al*., 2005); siendo una gran ventaja sobre todo para aquellas cepas difíciles de aislar como las del Tipo I/III. A pesar de las ventajas que la PCR IS*900* representa, tiene como gran limitante la baja sensibilidad para identificar pequeñas cantidades de bacterias en comparación con el cultivo fecal (Collins *et al*., 1993a, Zimmer *et al*., 1999) 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). Los inhibidores pueden provenir de ADN inespecífico derivado del hospedador o de otras micobacterias, así como también de sales, detergentes iónicos, alcoholes, etc. Lo anterior conlleva al bloqueo de la reacción de PCR dando lugar a resultados falsos negativos (Collins *et al*., 1993a).

Uno de los pasos claves para mejorar la sensibilidad de la PCR es el tratamiento de las muestras que van a ser amplificadas, para lo cual se han descrito distintos procedimientos tales como: las perlas de zirconio (Collins et al., 1993b, Odumeru *et al*., 2001), el hervido (Whittington *et al*., 1998, Marsh *et al*., 1999), ciclos de hervido-congelación (Miller *et al*., 1997, Garrido *et al*., 2000b), kits comerciales, etc; cuya función principal es el rompimiento de la gruesa pared celular que recubre a la micobacteria. Lo anterior, seguido de pasos de purificación del ADN mediante procedimientos como la extracción mediante partículas magnéticas (Chui *et al*., 2004), columnas de sílica (Whittington *et al*., 1998) entre otros. Aunque estos procedimientos han dado buenos resultados, los reportes sobre la sensibilidad de la PCR son muy variables, siendo atribuido a la heterogeneidad en las técnicas de extracción que se utilizan en los diferentes laboratorios (Garrido *et al*., 2000a).

Otra limitante que la PCR IS*900* presenta, son los falsos positivos que las secuencias estrechamente relacionadas a IS*900* puedan ocasionar. Estas secuencias denominadas IS*900-like* se encuentran en micobacterias distintas a *Map*, como *M. avium* subsp. *avium* (Naser 1999), *M. cookii* (Englund *et al*., 2002), *M. marinum*, *M. scrofulaceum* (Cousins *et al*., 1999), *M. porcinum* (Taddei *et al*., 2008) e incluso en cocos Gram positivos como *Lactobacillus* spp. (Willemsen *et al*., 2000), haciendo que

la PCR IS*900* no sea 100% específica de *Map.* Lo anterior ha hecho necesario la utilización de otras dianas específicas como f57 e IS*Mav2*. Sin embargo, ninguna de estas secuencias presenta la sensibilidad que tiene IS*900*. Por lo tanto este elemento de inserción, sigue siendo la diana empleada como primera opción en la identificación de *Map*, aunque los resultados obtenidos mediante este elemento deben ser complementados con otros métodos de confirmación.

2.7.2 IS*900*-RFLP

El ensayo de polimorfismos de restricción de fragmentos largos, es una técnica mediante la cual los organismos pueden ser diferenciados por medio del análisis de patrones derivados de la digestión del ADN con endonucleasas de restricción, seguido por la electroforesis de los fragmentos generados. La similitud o diferencia de los patrones de las bandas obtenidas pueden ser utilizadas para distinguir entre especies y aislamientos.

El análisis de IS*900*-RFLP, fue la primera prueba basada en RFLP diseñada para la tipificación de los aislamientos de *Map* y con la cual se describieron por primera vez tres grandes grupos de *Map*, Tipo S, C e Intermedio (I) (Collins *et al*., 1990). Posteriormente esta técnica fue estandarizada por Pavlik (1999), permitiendo además de agrupar a los aislamientos de *Map* en los tres grupos descritos por Collins (1990), subtipificarlos mediante la combinación de dos enzimas de restricción (*Pst*I y *Bst*EII). La restricción enzimática con la enzima *Pst*I dio lugar a 13 perfiles que fueron designados desde la A hasta la M, y la digestión enzimática con la enzima *Bst*EII dio lugar a los tres grupos de *Map* C, S e I, subdivididos a su vez en: 20 perfiles para el grupo C (C1-C20), 3 para el grupo S (S1,S2 y S3), y 2 para el grupo I (I1, I2).

Esta técnica ha sido aplicada ampliamente en estudios de *Map* y es utilizada como referencia para evaluar el poder de discriminación de una nueva prueba de tipificación de *Map* (Overduin *et al*., 2004). Sin embargo, su utilización se dificulta, ya que es un

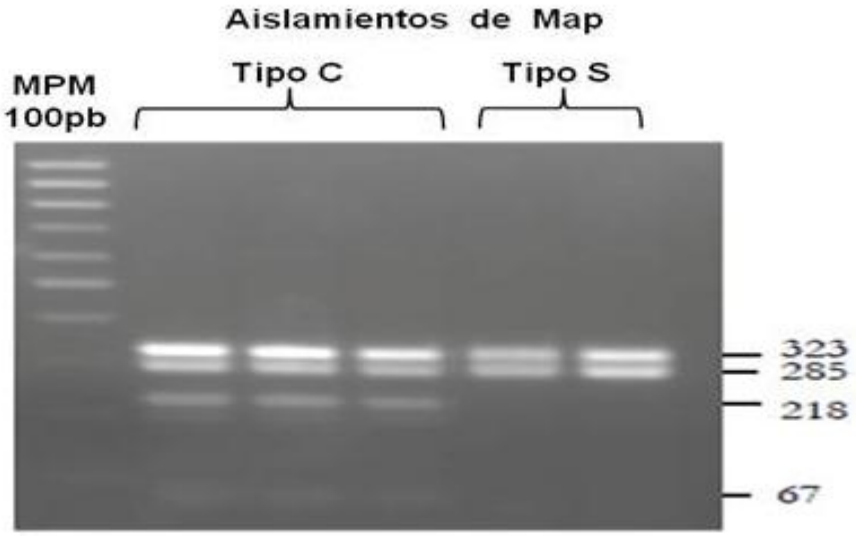
método laborioso, costoso y requiere de grandes cantidades de ADN de alta calidad (Pavlik 1999, Motiwala 2006).

2.7.3 IS*1311* PCR-REA

La secuencia IS*1311* está presente en el genoma de *Map* entre 7 a 10 copias y aunque se caracteriza por tener una homología del 85% con la secuencia IS*1245* presente en *M. avium* (Collins *et al*., 1997, Whittington *et al*., 1998a), IS*1245* no se encuentra en el genoma *Map* (Johansen *et al*., 2005). A pesar de que IS*1311* ha sido identificada tanto en *Map* como en *M. avium*, la identificación de 5 mutaciones puntuales detectadas mediante análisis de secuenciación de este elemento genético, ha permitido la diferenciación entre estas dos especies. Adicionalmente, otro análisis realizado en la secuencia IS*1311* de aislamientos de *Map* de origen ovino y bovino, identificó una mutación puntual localizada en el nucleótido 223 (C/T) la cual se presenta solo en aislamientos de origen bovino más no en aquellos de origen ovino (Whittington *et al*., 1998). Este hallazgo posibilitó el desarrollo de una técnica basada en la digestión con enzimas de restricción de productos PCR IS*1311*, permitiendo flanquear dicha mutación (Marsh *et al*., 1999). El polimorfismo 223 (C/T), ha sido considerado específico para la caracterización de los aislados de *Map* (Whittington *et al*., 1998a, Kumar *et al*., 2008, Yadav *et al*., 2008, Singh *et al*., 2009).

La técnica IS*1311* PCR-REA, consiste en la amplificación por una PCR dirigida al extremo 5’ de la secuencia IS*1311* y posterior digestión con la enzima de restricción *Hinf*I. La mutación 223 C/T da un sitio de restricción *Hinf*I, que permite distinguir entre las cepas del tipo C de las del tipo S. Los fragmentos generados con la digestión enzimática, son visualizados en geles de agarosa e interpretados de acuerdo a Marsh *et al*., (1999), así: las cepas del tipo C exhiben un patrón de digestión correspondiente a las bandas de: 67 bp, 218 bp, 285 bp and 323 bp y las cepas del tipo S a las bandas de 285 y 323 pb, como se observa en la figura 8.

Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa en donde se observan los patrones de restricción enzimática (de las cepas C y S), generados tras la digestión con *Hinf*I, a partir de productos de PCR IS*1311* (Fuente: Centro VISAVET, Madrid-España).



El ensayo IS*1311* PCR-REA tiene ventajas como: la rápida diferenciación entre los aislamientos de *Map*, no requiere de grandes cantidades de ADN y es de bajo costo. Adicionalmente, el agrupamiento de los aislados de *Map* realizados por medio de esta técnica, son concordantes con los resultados obtenidos por el ensayo IS*900*-RFLP (Whittington *et al*., 1998a). Sin embargo, IS*1311* PCR-REA tiene uso limitado en estudios epidemiológicos de *Map* ya que no es especifico de esta especie, está presente en menor número de copias en el genoma de *Map* comparado con IS*900*, y no subtipifica a los aislados de *Map* dentro de subgrupos, como si lo permite el ensayo de IS*900*-RFLP (Whinttington *et al*., 1998a, Motiwala *et al*., 2006).

2.7.4 Repeticiones en tándem de número variable (*Variable number tandem repeats*, VNTR)

Las secuencias de ADN repetidas en tándem se encuentran presentes en los genomas tanto de organismos procariotas como de eucariotas y reciben el nombre de VNTR

(Jeffreys *et al*., 1985; Supply *et al*., 2000). Los VNTR se encuentran dentro del grupo de elementos repetitivos distribuidos en el genoma y se caracterizan por la variación en el número de copias que difiere entre individuos; los cuales pueden ser detectados mediante PCR, en la que los oligonucleótidos están dirigidos a regiones adyacentes (Keim *et al*., 2000). Estas secuencias presentan además, un gran índice de variabilidad genética y por lo tanto presentan un poder discriminativo alto (Keim *et al*., 2000). El poder discriminativo de un método de tipificación, se relaciona con la capacidad que tiene este para distinguir entre cepas no relacionadas, lo cual es determinado por el número de tipos definidos por el método de la prueba y las frecuencias relativas en las que se encuentran estos tipos (Hunter y Gaston., 1988).

Los VNTR se clasifican en microsatélites (SSR) y minisatélites en función de su longitud y la secuencia de repetición (Deka *et al*., 1992), los microsatélites presentan secuencias entre 1-13 pb y los minisatélites entre 10-100 pb. Estas secuencias repetitivas, sirven como herramienta para la subtipificación molecular de diferentes aislados de organismos procariotas que presentan un bajo índice de heterogeneidad genética y un elevado índice de estabilidad genética (Lindstedt *et al*., 2005). En el caso especifico de *Map*, la identificación por VNTR fue basada en el tamizaje de partes del genoma total de *Map*-K10 y probados por ensayos de polimorfismos, en diversos paneles de cepas. Distintos locus VNTR han sido utilizados para la subtipificación molecular de *Map* (Overdin *et al*., 2004); así como también en combinación con unidades intergénicas dispersas de micobacterias (*specific mycobacterial interspersed repetitive units* MIRUs) (MIRU-VNTR). (Schwartz *et al*., 2000, Harris y Barleta., 2001). Thibault (2007), describió un sistema de tipificación en el que incluyó 8 locus diferentes en una colección de 183 aislados de *Map* obtenidos de 10 países. De los ocho locus analizados, seis presentaron estructura de VNTR (3, 7, 10, 25, 32 y 47) y dos estructura de MIRU (X3 y 292). Estos locus han sido utilizados en diferentes estudios con el objetivo de subtipificar a *Map* (Stevenson *et al*., 2009, Radomoski *et al*., 2010, Goffré *et al*., 2012).

Una de las ventajas que ofrece la tipificación por VNTR es el conocimiento sobre el índice de variación de un locus conocido, así como la identificación de múltiples alelos por locus (Maiden *et al*., 1998). Lo anterior no solo permite un incremento en el poder de discriminación de un ensayo, sino que también facilita el entendimiento de los mecanismos genéticos que conducen a la diversificación y evolución dentro de las especies. No obstante, debido a que los aislamientos de *Map* muestran un muy bajo nivel de heterogeneidad genética en comparación con *M. tuberculosis* y otras bacterias, la combinación de dos o más métodos de tipificación (como por ejemplo VNTR-MIRU y el ensayo de IS*900*-RFLP) puede conducir a un incremento en el poder de discriminación en la tipificación de *Map*. Este enfoque ya ha sido empleado en distintos estudios (Thibault *et al*., 2007, Mobius *et al*., 2008, Stevenson *et al*., 2009, Radmoski *et al*., 2010).

Otras técnicas que han sido desarrolladas para la caracterización genética de *Map*, además de las ya mencionadas son: La Electroforesis en gel de campo pulsado (*Pulsed-field gel electrophoresis,* PFGE), el análisis de las diferencias representacionales (*Representational differential analysis*, RDA), el análisis de polimorfismos de fragmentos largos amplificados (*Amplified Fragment Lenght Polymorphism*, AFLP), la electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante (Denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE), los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP), PCR en tiempo real, etc. La utilización de estas técnicas depende del objetivo particular de cada investigación.

2.7.5 Secuencias específicas de *Map.*

F57. Es una secuencia de 620 pb que se encuentra presente en una sola copia en el genoma de *Map* (Poupart *et al*., 1993). Este fragmento no ha hibridado con DNA de ninguna otra especie de micobacterias y tampoco está relacionada con ninguna secuencia conocida de *Map* incluida IS*900* (Poupart *et al*., 1993) y *hspX* (Ellingson *et al*., 1998). F57 se ha empleado como diana en amplificaciones por PCR para la identificación de *Map* en diferentes estudios (Coetsier *et al*., 2000, Vansnick *et al*., 2004, Möbius *et al*., 2008, Castellanos *et al*., 2009, e igualmente en el presente

estudio). Sin embargo, la presencia de solamente una copia por bacteria, hace que su sensibilidad sea reducida en comparación con IS*900.*

***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 (Ellingson *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) y han sido utilizados para la identificación de *Map* en distintos trabajos (Motiwala *et al*., 2004; Rajeev *et al*., 2005; Möbius *et al*., 2008).

IS*MAP02*. Se encuentra presente en el genoma de *Map* en un total de seis copias, debido a esto se ha propuesto como una posible diana alternativa al empleo del IS*900* (Paustian *et al*., 2004, Stabel y Bannantine, 2005; Irenge *et al*., 2009; Sohal *et al*., 2009).

Otros elementos genéticos encontrados en *Map* son IS*Mav2* e IS*Mpa1* y aunque también han sido utilizados como alternativas para su identificación, recientes estudios han revelado la amplificación por PCR de estas secuencias en organismos diferentes a *Map* como, *M. fortuitum*, *M. smegmatis* y en dos especies no pertenecientes al género *Mycobacterium* (Möbius *et al*., 2008). IS*Mpa1* ha sido amplificado por PCR en *M. a. hominissuis* de origen porcino (Olsen *et al*., 2004, Johansen *et al*., 2007).

En la actualidad se siguen buscando nuevas dianas que sean específicas de *Map* y que puedan suplir a IS*900* o al menos complementarla. La secuenciación 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. Lo anterior conducirá entre otros beneficios, al descubrimiento de nuevas secuencias para la identificación de *Map*.

2.8 Diagnóstico basado en la respuesta inmune

El diagnóstico de la ptb es bastante difícil y uno de los factores que lo obstaculizan es la baja sensibilidad que presentan las pruebas de detección empleadas. En la determinación de la respuesta inmune, las técnicas disponibles para evaluar anticuerpos específicos contra *Map* no han sido suficientemente eficaces, debido a su incapacidad para identificar a todos los animales afectados, sobre todo aquellos que estan en el curso temprano de la infección (Coussens 2004). Lo anterior se debe 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 respuesta inmune, una de tipo celular que evoluciona a otra de tipo humoral, las cuales pueden ser correlacionadas con el estadio de la enfermedad (Harris y Barleta 2001). Para la detección de la respuesta inmune celular se utilizan las pruebas de intradermorreacción y el test de interferón gama (IFNg). La detección de este tipo de respuesta, permite determinar si una población ha estado expuesta a *Map*, sin embargo sus resultados no deben ser considerados para decidir sobre el manejo individual de los animales.

En la detección de la respuesta inmune humoral se emplean técnicas como la fijación del complemento (*Complement Fixation Test*, CFT), la inmunodifusión en gel de agar (*Agar-gel immunodiffusion*, AGID) y el ensayo inmunoenzimático **(***Enzyme-linked immunosorbent assay*, ELISA), siendo el ELISA el método que presenta mayor sensibilidad debido a que permite detectar anticuerpos en bajas concentraciones (Collins 1996). Debido a que una fuerte respuesta inmune humoral solo ocurre hasta que el animal esta en estadios tardíos de la enfermedad, la sensibilidad de estas pruebas es más alta para aquellos animales con lesiones lepromatosas, los que padecen los síntomas clínicos, y los excretores de grandes cantidades de bacterias (Sweeney *et al*., 1995, Pérez *et al*., 1997, Nielsen y Toft, 2006). Lo anterior representa una gran limitante para el control de la ptb, ya que la mayoría de los animales infectados en una explotación estan en estadio subclínico de la enfermedad y algunos de ellos, pueden comenzar a excretar la micobacteria de forma intermitente en bajos

niveles. Se ha encontrado que estos animales constituyen aproximadamente el 80% del ganado positivo por cultivo fecal (Whitlock *et al*., 2000). El riesgo que estos animales representan, se relaciona con el hecho de que pequeñas dosis de organismos de *Map*, son suficientes para causar infecciones en terneros recién nacidos (Sweeney 1996).

2.8.1 E*nzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA)

El ELISA fue empleado por primera vez en el diagnóstico de la ptb bovina por Jorgensen y Jensen (1978). Este test es actualmente la técnica serológica más utilizada para el diagnóstico de la ptb debido a que es una prueba sencilla, económica, rápida, reproducible y que permite analizar grandes lotes de muestras a la vez (Collins *et al*., 1993b, OIE 2008). Sin embargo, presenta como grandes limitantes la baja sensibilidad para detectar aquellos animales con bajos y moderados niveles de excreción, y los potenciales resultados falsos positivos ocasionados por reacciones cruzadas con micobacterias relacionadas, y con otros organismos como Nocardia asteroides (Nielsen *et al*., 2001). No obstante, estas reacciones cruzadas pueden ser minimizadas con la inclusión de un paso de preabsorción con antígenos de *M. phlei*, el cual permite remover anticuerpos no específicos contra estos organismos, aumentando así la especificidad del ELISA (Yokomizo *et al* 1983, Bech-Nielsen *et al*., 1993).

El ELISA como método de diagnóstico de la ptb, es utilizado en la estimación de prevalencias 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 este test, puede tener un valor limitado, debido a que los animales con varios perfiles de anticuerpos estan en diferentes estadios de la infección por *Map,* y también la baja prevalencia de la ptb en la mayoría de los rebaños (<5%) ocasiona errores en la clasificación de la infección (Shin *et al*., 2004, Berghaus *et al*., 2006, Nielsen 2010). Por lo tanto se recomienda la confirmación de un resultado ELISA positivo, por otras pruebas como el cultivo fecal.

Diferentes antígenos han sido utilizados en las pruebas del ELISA. Estos antígenos son usualmente extraídos de *Map* o de *M. avium* subespecie *avium* (*Maa*), y su utilización es igual de útil independientemente de su origen (Nielsen *et al*., 2001). Sin embargo sin importar la procedencia de estos antígenos, se deben considerar los resultados falsos positivos que las reacciones cruzadas con otras micobacterias ambientales puedan ocasionar (Nielsen *et al*., 2008); sobre todo en aquellas explotaciones con alta seroprevalencia de micobacterias ambientales (Roussel *et al*., 2007).

Distintos antígenos han sido probados en el ELISA para diagnosticar la ptb, entre los que estan el PPA (Antígeno protoplasmático) y el lipoarabinomano (LAM), los cuales son utilizados en los ELISAs comerciales (Yokomizo *et al*., 1983; Sugden *et al*., 1987). La capacidad de la técnica para detectar animales infectados dependerá de la frecuencia con la que se realiza la prueba y el punto de corte elegido para considerar un resultado como positivo o negativo. Se ha encontrado que la sensibilidad del ELISA, es más baja en comparación con el cultivo fecal, oscilando entre el 5 – 30%, sin embargo este porcentaje se incrementa con la edad del animal hasta un 87%; mientras que la especificidad reportada está por encima del 95% (Nielsen y Toft, 2008).

En pequeños rumiantes, al igual que en bovinos la sensibilidad del ELISA está afectada significativamente por el estadio de la infección del animal (Gumber *et al*., 2006). En un estudio diseñado para evaluar la capacidad de diagnóstico entre el ELISA comercial de POURQUIER y el AGID, se encontró que el ELISA fue significativamente más sensible, presentando valores de sensibilidad (Se) del 34.9% con una especificidad (Sp) del 98.8% para ganado ovino; y del 56.4% y 100% en ganado caprino, mientras que con el AGID se obtuvo una Se del 13.8% en ovinos y 39.5% para cabras, con una Sp del 100% para ambas especies (Gumber *et al*., 2006).

En la búsqueda de estrategias para mejorar la sensibilidad del ELISA en estadios tempranos de la infección por *Map*, han sido evaluados varios tipos de antígenos así como métodos de preparación de los mismos. Se han ensayado extractos no purificados de *Map* y preparaciones fraccionadas. Los extractos crudos contienen

mezclas de proteínas de *Map* y abundantes antígenos de polisacáridos como arabinómano y arabinogalactano y dado que estos componentes antigénicos se han conservado a través del género *Mycobacterium*, los resultados de los ensayos en donde se utilizan este tipo de antígenos, pueden ser afectados negativamente por las reacciones cruzadas (Nielsen y Toft, 2008). En la actualidad, los nuevos métodos desarrollados para la preparación de proteínas antigénicas, han proporcionado importantes avances que han ayudado a mejorar las técnicas de diagnóstico para el control de la ptb. Ensayos como el EVELISA (extracción del antígeno por etanol-vórtex) incorporado a un formato de ELISA (Eda *et al*., 2006) han dado resultados prometedores.

2.8.1.1 EVELISA

Esta técnica se basó en resultados obtenidos mediante citometría de flujo, en donde se observó que anticuerpos presentes 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. Adicionalmente se detectaron anticuerpos anti-*Map* en infecciones naturales bovinas, varios meses antes que la micobacteria fuera aislada por cultivo fecal o detectada por algún ELISA comercial. Basados en estos hallazgos se desarrolló una prueba diagnóstica que evaluó la respuesta inmune humoral temprana en infecciones por *Map*. La técnica consistió en extraer antígenos de superficie por medio de una solución de etanol al 80%, mezclada por medio de vórtex. La preparación antigénica resultante fue evaluada en un formato de ELISA casera, a la que se le denominó EVELISA (Eda *et al*., 2006).

La técnica de EVELISA detectó anticuerpos en animales infectados experimentalmente con *Map*, 6 meses antes que el aislamiento del organismo por cultivo fecal y 17 meses antes que el ELISA comercial, con una sensibilidad del 96.6 % y una especificidad del 100%. Estudios posteriores indicaron que el repertorio completo de antígenos presente en el extracto etanólico es requerido para mantener la alta sensibilidad de la técnica; ya

que al ser fraccionado, la sensibilidad disminuye. Otro estudio subsiguiente encontró que la especificidad del EVELISA puede ser afectada por reacciones cruzadas con micobacterias ambientales, las cuales pudieron ser minimizadas mediante la preadsorción con antígenos de *M. phlei* (Scott *et al*., 2010). Con respecto a la composición del antígeno, datos preliminares han mostrado que está compuesto predominantemente por carbohidratos, lípidos y una pequeña cantidad de componentes proteicos.

2.9 Estrategias para el control de la paratuberculosis

Los programas de control de la ptb se basan en el conocimiento de las vías de infección de *Map,* en la persistencia del microorganismo en el medio ambiente, la identificación de los puntos críticos de transmisión de la enfermedad y en el desarrollo de métodos para la reducción de la exposición a *Map* en una explotación de animales.
Bajo estas condiciones, es necesario aplicar medidas de control fundamentales tales como, los cambios de manejo para disminuir la transmisión de *Map* (la separación de los animales recién nacidos tras el parto, lo cual impediría una importante vía de transmisión de la enfermedad), la implementación de medidas de bioseguridad como: la limpieza de los hatos, el manejo del estiércol, la prevención de la contaminación fecal del agua, comida y el medioambiente, la estricta revisión a la hora de introducir un animal externo a un rebaño, etc. Una de las estrategias mas recomendada es la detección de los animales infectados y su posterior sacrificio, ya que esto contribuye con una reducción considerable de *Map* en el medioambiente. Igualmente se sugiere el reemplazo de los animales sacrificados por otros que estén libres de la enfermedad o vacunados (Kennedy y Benedictus, 2001, McKenna *et al.*, 2006). No obstante, el éxito de esta estrategia dependerá del diagnóstico adecuado de los animales infectados tan pronto como sea posible. Se ha sugerido que la combinación de técnicas como el ELISA y el cultivo fecal pueden aumentar la posibilidad de detectar a una animal infectado, debido a que las dos pruebas miden diferentes aspectos de la enfermedad, como la repuesta indirecta de los anticuerpos frente a la infección por *Map* y la excreción de la bacteria viva (Rossiter y Burhans, 1996).

BIBLIOGRAFÍA CITADA

Alexander DC, Turenne CY, Beher MA. 2009. Insertion and deletion events that define the pathogen Mycobacterium avium subsp. Paratuberculosis. *J of Bacteriol*. 191:1018-1025.

Aduriz JJ, Juste RA y Cortabarría N. 1995. Lack of mycobactin dependence of mycobacteria isolated on Middlebrook 7H11 from clinical cases of ovine paratuberculosis. *Vet Microbiol*. 45:211-7.

Alonso-Hearn M, Molina E, Geijo M, Vázquez P, Sevilla I, Garrido JM y Juste RA. 2009. Isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from muscle tissue of naturally infected cattle. *Foodborne Pathog Dis* 6: 513-518.

Anderson JR. 1980. Alimentary tract. Muir's textbook of pathology. ed. 11. Edward Arnold. London, UK.

Autschbach F, Eisold S, Hinz U, Zinser S, Linnebacher M, Giese T, Loffler T, *et al*. 2005. High prevalence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* IS*900* DNA in gut tissues from individuals with Crohn's disease. Gut, 54(7):944-9.

Bakker D, Willemsen PT and van Zijderveld FG. 2000. Paratuberculosis recognized as a problem at last: a review. *Veterinary Quarterly.* 22, 200–204.

Bang D, Herlin T, Stegger M, Andersen AB, Torkko P, Tortoli E y Thomsen VO. 2008. *Mycobacterium arosiense* sp. nov., a slowly growing, scotochromogenic species causing osteomyelitis in an immunocompromised child. *Int J Syst Evol Microbiol.* 58: 2398-2402.

Bannantine JP, Baechler E, Zhang Q, Li L y Kapur V. 2002. Genome scale comparison of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* with *Mycobacterium avium* subsp. *avium* reveals potential diagnostic sequences. *J Clin Microbiol*. 40(4):1303-10.

Bannantine JP y Paustian ML. 2006. Identification of diagnostic proteins in *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* by a whole genome analysis approach. *Methods Mol Biol*. 345:185-96.

Bech-Nielsen S, Shulaw WP, Frandsen PL, Jorgensen JB, Feld NC y Ahrens P. 1993. Comparison of subjective and objective test evaluations for use of *Mycobacterium phlei*-absorbed serum in a dot-enzyme linked immunosorbent assay for diagnosis of paratuberculosis in cattle. *Am J Vet Res.* 53**:**1386–1391.

Ben Salah I, Adekambi T, Raoult D y Drancourt M. 2008. *rpoB* sequence-based identify cation of *Mycobacterium avium* complex species. *Microbiology* 154, 3715–3723.

Benedictus G, Dijkhuizen AA y Stelwagen J. 1985. Economic losses to farms due to paratuberculosis in cattle. *Tijdschr.Diergeneeskd*. 110(8):310-9.

Bentley RW, Keenan JI, Gearry R B, Kennedy MA, Barclay ML y Roberts RL. 2008. Incidence of Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis in a populationbased cohort of patients with Crohn’s disease and control subjects. *Am J Gastroenterol* 103, 1168–1172.

Berghaus RD, Farver BT, Anderson RJ, Jaravata CC y Gardner IA. 2006. Environmental Sampling for Detection of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* on Large California Dairies. *J Dairy Sci*. 89:963–970.

Biet F, Boschiroli ML, Thorel MF, y Guilloteau LA. 2005. Zoonotic aspects of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium avium-intracellulare* complex (MAC). *Vet Res* 36: 411-436.

Böhn R y Ley T. 1994. Desinfection of *Mycobacterium paratuberculosis* in cattle slurry. En: Diesch editor. Proc.8th Int.Congr.Anim.Hyg., p. DD10-DD15. ISAH, St. Paul, MN, USA.

Brotherston JB, Gilmour NJL, Mc Samuel J. 1961. Quantitative studies of *Mycobacterium johnei* in the tissues of sheep. J. Comp. Pathol. 71, 286-299.

Bull TJ, Hermon-Taylor J, Pavlik I, El-Zaatari IF y Tizard M. 2000. Characterization of IS*900* loci in *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and development of multiplex PCR typing. *Microbiology* 146 (Pt 12**)**: 3285.

Bull TJ, McMinn EJ, Sidi-Boumedine K, Skull A, Durkin D, Neild P, *et al*. 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 MJ y Seaman JT. 1990. The pathology of Johne's disease in sheep. *Aust Vet J*. 67(2):47-50.

Castellanos E, Aranaz A, Gould KA, Linedale R, Stevenson K, Álvarez J, *et al*. 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.

Chávez-Gris GG, Trigo-Tavera FJ, Svastova P, Pavlik I. 2004. Genetic polimorphism identification from *Mycobacterium avium* subspecie *paratuberculosis* in goats in Central Mexico. *Vet Mex.* 35:75–82.

Cheville NF, Hostetter J, Thomsen BV, Simutis F, Vanloubbeeck Y Steadham E. 2001. Intracellular trafficking of *Mycobacterium avium* ss. *paratuberculosis* in macrophages*. Dtsch.Tierarztl.Wochenschr*. 108(6):236-43.

Chiodini RJ, Van Kruiningen HJ y Merkal RS. 1984. Ruminant paratuberculosis (Johne's disease): The current status and future prospects. *Cornell Vet*. 74:218-62.

Chiodini RJ, Kreeger JM y Thayer WR. 1993. Use of rifabutin in treatment of systemic *Mycobacterium paratuberculosis* infection in mice. *Antimicrob.Agents Chemother*. 37(8):1645-8.

Chiodini RJ. 1996. Immunology: resistance to paratuberculosis. *Vet Clin North Am.Food Anim Pract*. 12(2):313-43.

Chiodini RJ. 1997. Debate: *M. paratuberculosis* in foods and the public health implications (Pro associacion between Johne's disease and Crohn's disease). En: Chiodini, Hines, y Collins editores. Proc.5th Int.Coll.Paratub., pp. 353-65. IAP, Rehoboth, MA, USA.

Chui LW, King R, Lu P, Manninen K y Sim J. 2004. Evaluation of four DNA extraction methods for the detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* by polymerase chain reaction. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 48: 39-45.

Cocito C, Gilot P, Coene M, de Kesel M, Poupart P y Vannuffel P. 1994. Paratuberculosis. *Clin Microbiol Rev* 7: 328-345.

Coetsier C, Vannuffel P, Blondeel N, Denef JF, Cocito C y Gala JL. 2000. Duplex PCR for differential identification of *Mycobacterium bovis, M. avium* and *M. avium* subsp. *paratuberculosis* in formalin-fixed paraffin-embedded tissues from cattle. *J Clin Microbiol*. 38(8):3048-54.

Collins DM, Gabric DM y de Lisle GW. 1989. Identification of a repetitive DNA sequence specific to *Mycobacterium paratuberculosis*. *FEMS Microbiol Lett*. 60(2):175-8.

Collins DM, Gabric DM y de Lisle GW. 1990. Identification of two groups of *Mycobacterium paratuberculosis* strains by restriction endonuclease analysis and DNA hybridization. *J Clin Microbiol.* 28: 1591-1596.

Collins DM, Hilbink F, West DM, Hosie BD, Cooke MM y de Lisle GW. 1993a. Investigation of *Mycobacterium paratuberculosis* in sheep by fecal culture, DNA characterisation and the polymerase chain reaction. *Vet Rec*. 133:599-600.

Collins DM, Stephens DM y de Lisle GW. 1993b. Comparison of polymerase chain reaction tests and faecal culture for detecting *Mycobacterium paratuberculosis* in bovine feces. *Vet Microbiol*. 36:289-99.

Collins MT. 1996. Diagnosis of paratuberculosis. Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract. 12**:**357–371.

Collins MT. 1997. *Mycobacterium paratuberculosis*: a potential food-borne pathogen? *J Dairy Sci.* 80(12):3445-8.

Collins MT, Lisby G, Moser C, Chicks D, Christensen S, Reichelderfer M, *et al*. 2000. Results of multiple diagnostic tests for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in patients with inflammatory bowel disease and in controls. *J Clin Microbiol*. 38(12):4373-81.

Collins DM, De Zoete M, y Cavaignac SM. 2002. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* strains from cattle and sheep can be distinguished by a PCR test based on a novel DNA sequence difference. *J Clin Microbiol* 40: 4760-4762.

Committee on Diagnosis and Control of Johne's Disease, and Board on Agriculture and Natural Resources. Diagnosis and control of Johne's disease. 2003, Washington, D.C, The National Academies Press.

Consejo Técnico Consultivo Nacional de Salud Animal (CONASA). 2010. Plan estratégico del programa para la atención de la paratuberculosis en ganado bovino, ovino y caprino en México [en línea] http://www.conasamexico.org.mx/conasa/pdf/. Consultado 27 jul, 2012.

Corpa JM, Garrido JM, García Marín JF y Pérez V. 2000. Classification of lesions observed in natural cases of paratuberculosis in goats. *J Comp Pathol*. 122(4):255-65.

Cousins DV, Evans RJ y Francis BR. 1995. Use of BACTEC radiometric culture method and polymerase chain reaction for the rapid screening of faeces and tissues for *Mycobacterium paratuberculosis*. *Aust Vet J.* 72(12):458-62.

Coussens PM, Colvin CJ, Wiersma K, Abouzied A y Sipkovsky S. 2002. Gene expression profiling of peripheral blood mononuclear cells from cattle infected with *Mycobacterium paratuberculosis*. *Infect Immun*. 70(10):5494-502.

Coussens PM. 2004. Model for immune responses to *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in cattle. *Infect. Immun.*, 72, 3089-3096.

Dalziel TK. 1913. Chronic interstitial enteritis. *Br.Med.J*. (ii):1068-70.

Damato JJ y Collins MT. 1990. Growth of *Mycobacterium paratuberculosis* in radiometric, Middlebrook and egg-based media. *Vet Microbiol.* 22: 31-42.

de Juan, L, Mateos A, Domínguez L, Sharp JM y Stevenson K. 2005. Genetic diversity of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* isolates from goats detected by pulsed-field gel electrophoresis. *Vet Microbiol.* 106: 249-257.

de Juan L, Álvarez J, Aranaz A, Rodríguez A, Romero B, Bezos J, *et al.* 2006. Molecular epidemiology of Types I/III strains of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* isolated from goats and cattle. *Vet Microbiol*. 115: 102-110.

Deka R, De Croo S, Yu LM y Ferrell RE. 1992. Variable number of tandem repeat (VNTR) polymorphism at locus D17S5 (YNZ22) in four ethnically defined human populations. *Hum Genet.* 90: 86-90.

Djonne B, Jensen MR, Grant IR y Holstad G. 2003.Detection by immunomagnetic PCR of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in milk from dairy goats in Norway. *Vet Microbiol*. 92: 135-143.

Dohmann K, Strommenger B, Stevenson K, de Juan L, Stratmann J, Kapur V, *et al*. 2003. Characterization of genetic differences between *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* type I and type II isolates. *J Clin Microbiol.* 41: 5215-5223.

Dombek PE, Johnson LK, Zimmerley ST y Sadowsky MJ. 2000. Use of repetitive DNA sequences and the PCR to differentiate *Escherichia coli* isolates from human and animal sources. *Appl Environ Microbiol. 66:2572–2577.*

Dominguez-Punero MC, Del Rio-Alfaro J, Cervantes-Oliveres R.A, Suarez-Güemes F, Trigo JF, Chaves-Gris G. Immune response pathological features and bacteriological findings after vaccination of a goat flock. Proceedings of the 7th International Colloquim 0n Paratuberculosis 2002, 11-14 June, Bilbao, España.

Eda S, Bannantine JP, Waters WR, Mori Y, Whitlock RH, Scott MC y Speer CA. 2006. A highly sensitive and subspecies-specifi c surface antigen enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of Johne's disease. *Clin and Vaccine Immunol.* 13, 837–844.

Ellingson JL, Bolin CA y Stabel JR. 1998. Identification of a gene unique to *Mycobacterium avium* subespecies *paratuberculosis* and application to diagnosis of paratuberculosis. *Mol.Cell.Probes*, 12(3):133-42.

Ellingson JL, Stabel JR, Bishai WR, Frothingham R y Miller JM. 2000. Evaluation of the accuracy and reproducibility of a practical PCR panel assay for rapid detection and differentiation of *Mycobactrium avium* subspecies. *Mol.Cell.Probes*, 14(3):153-61.

Ellingson JL, Stabel JR, Radcliff RP, Whitlock RH y Miller JM. 2005. Detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in free-ranging bison (*Bison bison*) by PCR. *Mol Cell Probes* 19: 219-225.

Englund S, Ballagi-Pordany A, Bolske G y Johansson KE. 1999. Single PCR and nested PCR with a mimic molecule for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 33:163–171.

Englund S, Bolske G y Johansson KE. 2002. An IS*900*-like sequence found in a *Mycobacterium* sp. other than *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *FEMS Microbiol.Lett*. 209(2):267-71.

Estévez-Denaives I, Hernández-Castro R, Trujillo-García AM, Chávez-Gris GG. 2007. Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* in goat and sheep flocks in Mexico. *Small Rumin Res*. 72:209–213.

Favila-Humara LC, Chávez-Gris GG, Carrillo-Casas EM, Hernández-Castro R. 2010. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* detection in Individual and bulk tank milk samples from bovine herds and caprine flocks. *Foodborne Pathog Dis*. 7(4):351-355.

Fecteau ME y Whitlock RH. 2010. Paratuberculosis in Cattle. Paratuberculosis, Organism, Disease, Control/edited by Marcel A. Behr and Desmond M. Collins. CAB International.

Fischer OA, Matlova L, Bartl J, Dvorska L, Svastova P, du MR, *et al*. 2003. Earth worms (*Oligochaeta*, *Lumbricidae*) and mycobacteria. *Vet Microbiol*. 91(4):325-38.

Fischer OA, Matlova L, Dvorska L, Svastova P, Peral DL, Weston RT, *et al*. 2004. Beetles as possible vectors of infections caused by *Mycobacterium avium* species. *Vet Microbiol*.102(3-4):247-55.

Florou M, Leontides L, Kostoulas P, Billinis C, Sofia M, Kyriazakis I y Lykotrafitis F. 2008. Isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from non-ruminant wildlife living in the sheds and on the pastures of Greek sheep and goats. *Epidemiol and Infection* 136, 644–652.

Fyock TL, Sweeney RW, Whitlock RH. 2005. MGIT, liquid culture system for detection of MAP in bovine fecal samples. Proceedings of the 8th International Colloquium on Paratuberculosis, International Association for Paratuberculosis, Copenhagen, Denmark, 93.

García Marín JF, Pérez V, García de Jalón JA, De las Heras M, Barberá M, Fernández de Luco D y Badiola JJ. 1994. Diagnóstico de casos clínicos de paratuberculosis ovina y caprina. *Med Vet*. 11(9):491-502.

García Marín JF, Pérez V y González J. 2000. La interacción bovino-bacteria y los mecanismos de la enfermedad. En: Juste editor. Paratuberculosis. Bovis, Aula Veterinaria, vol.nº98, pp. 29-38. Luzán 5, Madrid, España.

García-Pariente C, González J, Ferreras MC, Fuertes M, Benavides J, Reyes LE, *et al*. 2003. Paratuberculosis vaccination of adult animals in two flocks of dairy sheep. En: Juste, Geijo, y Garrido editores. Proc.7th Int.Coll.Paratub., pp. 507-10. IAP, Madison, WI, USA.

Garrido JM, Aduriz G, Juste RA y Geijo MV. 2000a. Los métodos de diagnóstico de la paratuberculosis en el ganado vacuno. En: Juste editor. Paratuberculosis. Bovis, Aula Veterinaria, vol.nº93, pp. 49-61. Luzan 5, Madrid, España.

Garrido JM, Cortabarria N, Oguiza JA, Aduriz G y Juste RA. 2000b. Use of a PCR method on fecal samples for diagnosis of sheep paratuberculosis. *Vet Microbiol*. 77:379-86.

Gioffré A, Correa M, Alvarado-Pinedo MF, Montenegro V, Vaca J, Morsella C, *et al*. Exploiting multiple-locus variable number tandem repeat analysis to evaluate strain diversity of *M. avium* complex in Argentina. Proceedings of the 11th International Colloquium on Paratuberculosis. February 5 to 10, 2012. p264.

Glawischnig W, Awad-Masalmeh M, Khaschabi D y Schonbauer M. 2004. Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from the testicles of a clinically infected breeding animal. *Berl Munch Tierartzl Wochenschr*. 117(3-4):136-9.

Grant IR, Ball HJ y Rowe MT. 2002. Incidence of *Mycobacterium paratuberculosis* in bulk raw and commercially pasteurized cows' milk from approved dairy processing establishments in the United Kingdom. *Appl Environ Microbiol*. 68(5):2428-35.

Grant IR, Williams AG, Rowe MT y Muir DD. 2005. Efficacy of various pasteurization time-temperature conditions in combination with homogenization on inactivation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk. *Appl Environ Microbiol*. 71(6):2853-61.

Green EP, Tizard ML, Moss MT, Thompson J, Winterbourne DJ, McFadden JJ y Hermon-Taylor J.1989. Sequence and characteristics of IS*900*, an insertion element identified in a human Crohn's disease isolate of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Nucleic Acids Res* 17: 9063-9073.

Greig A, Stevenson K, Pérez V, Pirie AA, Grant JM y Sharp JM. 1997. Paratuberculosis in wild rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). *Vet Rec*. 140:141-3.

Greig A, Stevenson K, Henderson D, Perez V, Hughes V, Pavlik I, *et al*. 1999. Epidemiological study of paratuberculosis in wild rabbits in Scotland. *J Clin Microbiol*. 37(6):1746-51.

Gumber S, Eamens G, Whittington RJ. 2006. Evaluation of a Pourquier ELISA kit in relation to agar gel immunodiffusion (AGID) test for assessment of the humoral immune response in sheep and goats with and without Mycobacterium paratuberculosis infection. *Vet Microbiol*. 115(1-3):91-101.

Harris NB y Barletta RG. 2001. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in veterinary medicine. *Clin Microbiol Rev*. 14(3):489-512.

Hatfull GF y Jacobs Jr WR. 2000. Molecular genetics of mycobacteria. *American Society for Microbiology*. Book Molecular genetics of mycobacteria. edited by Graham F.

Hendrick SH, Duffield TE, Kelton DE, Leslie KE, Lissemore KD y Archambault M. 2005. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays performed on milk and serum samples for detection of paratuberculosis in lactating dairy cows. *J Am Vet Med Assoc*. 226(3):424-8.

Herman L, De Jonghe V, Dumon I, Grijspeerdt K, Naydenski H y D'Haese E. 2006. Clumping of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk and feces and growth activation after milk heating. En: Manning y Nielsen editores. Proc.8th Int.Coll.Paratub., pp. 304-10. IAP, Madison, WI, USA.

Hermon-Taylor J, Bull T, Sheridan JM, Cheng JSML y Sumar N. 2000. Causation of Crohn's disease by *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Can J Gastroenterol*. 14(6):521-39.

Hermon-Taylor J y El-Zaatari FAK. 2004. Pathogenic mycobacteria in water. *World Health Organization (WHO)* 74-93.

Hernandez-Perez M, Fomukong NG, Hellyer T, Brown IN y Dale JW**.** 1994. Characterization of IS*1110*, a highly mobile genetic element from *Mycobacterium avium*. *Mol Microbiol*. 12**:**717–724.

Hett EC y Rubin EJ. 2008. Bacterial growth and cell division: a mycobacterial perspective. *Microbiol Mol Biol Rev* 72: 126-56.

Hulten K, El-Zimaity HM, Karttunen TJ, Almashhrawi A, Schwartz MR, Graham DY y El-Zaatari FA. 2001. Detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in Crohn's diseased tissues by in situ hybridization. *Am J Gastroenterol*. 96(5):1529-35.

Hunter PR, Gaston MA. 1988. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *J Clin Microbiol.* 26: 2465–2466.

Inderlied CB, Kemper CA y Bermudez LE.1993.The *Mycobacterium avium* complex. *Clin Microbiol Rev* 6: 266-310.

Irenge LM, Walravens K, Govaerts M, Godfroid J, Rosseels V, Huygen K y Gala JL. 2009. Development and validation of a triplex real-time PCR for rapid detection and specific identification of *M. avium* sub sp. *paratuberculosis* in faecal samples. *Vet Microbiol.* 136: 166-172.

Jeffreys AJ, Wilson V y Thein SL. 1985. Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA. *Nature* 314: 67-73.

Johansen TB, Djonne B, Jensen MR y Olsen I. 2005. Distribution of IS*1311* and IS*1245* in *Mycobacterium avium* subspecies revisited. *J Clin Microbiol*. 43(5):2500-2.

Johansen TB, Olsen I, Jensen MR, Dahle UR, Holstad G y Djonne B. 2007. New probes used for IS*1245* and IS*1311* restriction fragment length polymorphism of *Mycobacterium avium* subsp. *avium* and *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* isolates of human and animal origin in Norway. *BMC Microbiol* 7: 14.

Johne HA y Frothing ham L. 1895. Ein eigenthümlicher Fall von Tuberculose beim Rind. Deut.Zeits.Tiermed. Vergl. *Patho*l. 21:438- 54.

Johnson-Ifearulundu YJ y Kaneene JB 1997. Relationship between soil type and *Mycobacterium paratuberculosis*. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 210: 1735-1740.

Jorgensen JB y Jensen PT.1978. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of antibodies to *Mycobacterium paratuberculosis* in cattle. *Acta Vet Scand*. 19:310-2.

Jorgensen JB. 1982. An improved medium for culture of *Mycobacterium paratuberculosis* from bovine feces. *Acta Vet Scand*. 23:325-35.

Juste RA y Aduríz JJ. 1990. Diagnóstico. En: Juste editor. Paratuberculosis. Ovis, Aula Veterinaria, pp. 49-62. Luzán 5, Madrid, España.

Juste RA, Marco JC, Saez de Ocariz C y Aduriz JJ. 1991. Comparison of different media for the isolation of small ruminant strains of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Vet Microbiol*. 28:385-90.

Juste RA, Aduriz G, Bascones M, Foley E, Bargar TW y Barletta RG. 1993. Effect of iron on mycobactin production and dependence in Mycobacteria. Proc.74th Annu.Meet.CRWAD, p. 64. Chicago, IL, USA.

Juste RA, García Marín JF, Peris B, Saez de Ocariz CS y Badiola JJ. 1994. Experimental infection of vaccinated and non-vaccinated lambs with *Mycobacterium paratuberculosis*. *J Comp Pathol* 110: 185-194.

Juste RA, Garrido JM, Geijo M, Elguezabal N, Aduriz G, Atxaerandio R y Sevilla I. 2005. Comparison of blood polymerase chain reaction and enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Mycobacterium avium s*ubsp. *paratuberculosis* infection in cattle and sheep. *J Vet Diagn Invest.* 17: 354-359.

Kalis CHJ, Hesselink JW y Barkema HW. 1999. Vaccination does not prevent faecal shedding of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. En: Manning y Collins editores. Proc.6th Int.Coll.Paratub., pp. 153-6. IAP, Madison, WI, USA.

Kalis CH, Hesselink JW, Barkema HW y Collins MT. 2000. Culture of strategically pooled bovine fecal samples as a method to screen herds for paratuberculosis. *J Vet Diagn Invest*. 12(6):547-51.

Kalis CHJ, Collins MT, Barkema HW y Hesselink JW. 2004. Certification of herds as free of *Mycobacterium paratuberculosis* infection: actual pooled faecal results versus certification model predictions. *Prevent Vet Med.* 65, 189–204.

Katayama N, Suzuki T, Ootake M, Totsuka T, Kamata S y Yokomizo Y. 2003. Effects of ammonia treatment under various conditions on viability of *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* inoculated in low moisture roughage. En: Juste, Geijo, y Garrido editores. Proc.7th Int.Coll.Paratub., pp. 16-20. IAP, Madison, WI, USA.

Kaur P, Filia G, Singh SV, Patil PK y Sandhu KS. 2010. Molecular detection and typing of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* from milk samples of dairy animals. *Trop Anim Health Prod*. 42(5):1031-5.

Kawaji S, Taylor DL, Mori Y y Whittington RJ. 2007. Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in ovine feces by direct quantitative PCR has similar or greater sensitivity compared to
radiometric culture. *Vet Microbiol.*125: 36-48.

Keim P, Price LB, Klevytska AM, Smith KL, Schupp JM, Okinaka R, *et al*. 2000. Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis reveals genetic relationships within *Bacillus anthracis*. *J Bacteriol.* 182: 2928- 2936.

Kennedy DJ y Benedictus G. 2001. Control of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in agricultural species. *Rev Sci Tech* 20: 151-179.

Kim YG, Bech-Nielsen S, Slemons RD y Spangler E. 1989. Comparison of two methods for isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from bovine fecal samples. *Am J of Vet Res* 50, 1110–1113.

Kluge JP, Merkal RS, Monlux WS, Larsen AB, Kopecky KE, Ramsey FK. y Lehmann RP.1968. Experimental paratuberculosis in sheep after oral, intratracheal, or intravenous inoculation lesions and demonstration of etiologic agent. *Am J Vet Res* 29: 953-962.

Koets AP, Rutten VP, Hoek A, Bakker D, van Zijderveld F, Müller KE y van Eden W. 1990. The T(h) 1 to T(h) 2 shift in bovine paratuberculosis and the role of apoptotic cell death. In Proc. 6th International Colloquium on paratuberculosis (E.J.B. Manning & M.T. Collins, eds), 14-18 February, Melbourne. International Association for Paratuberculosis, Madison, Wisconsin, 585-592.

Kostoulas P, Leontides L, Enoe C, Billinis C, Florou M, Sofia M. 2006. Bayesian estimation of sensitivity and specificity of serum ELISA and faecal culture for diagnosis of paratuberculosis in Greek dairy sheep and goats. *Prev Vet Med*. 76, 56-73.

Kudahl AB, Nielsen SS y Østergaard S. 2008. Economy, effi cacy, and feasibility of a risk-based control program against paratuberculosis. *J of Dairy Sci.* 91, 4599– 4609.

Kumar S, Singh SV, Singh AV, Singh PK, Sohal JS y Maitra A. 2008. Wildlife (*Boselaphus tragocamelus*)- small ruminant (goat and sheep) interface in the transmission of 'Bison type' genotype of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in India. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 33: 155-159.

Kunze ZM, Wall S, Appelberg R, Silva MT, Portaels F y McFadden JJ. 1991. IS901, a new member of a widespread class of atypical insertion sequences, is associated with pathogenicity in *Mycobacterium avium*. *Mol Microbiol*. 5(9):2265-72.

Lambeth C, Reddacliff LA, Windsor P, Abbott KA, McGregor H y Whittington RJ. 2004. Intrauterine and transmammary transmission of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in sheep. *Aust Vet J*. 82(8):504-8.

Lambrechet SR and Collins MT. 1993. Inability to detect mycobactin in *Mycobacteria*-infected tissues suggest an alternative iron acquisition mechanism by *Mycobacteria in vivo. Microbial Pathog*.14: 229-238.

Lehmann KB y Neumann R. 1896. Atlas und Grundriss der Bakteriologie und Lehrbuch der speziellen bakteriologischen Diagnostik. 1st. ed.lesions and their relationship with bacterial isolation, fecal shedding, and immune responses during progressive stages of experimental infection of lambs with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Vet Pathol* 41: 378-387.

Levy-Frebault VV y Portaels F. 1992. Proposed minimal standards for the genus *Mycobacterium* and for description of new slowly growing *Mycobacterium* species. *Int J Syst Bacteriol* 42: 315-323.

Li L, Bannantine JP, Zhang Q, Amonsin A, May BJ, Alt D, Banerji N, Kanjilal S y Kapur V. 2005. The complete genome sequence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci.U.S.A*. 102(35):12344-9.

Lindstedt BA. 2005. Multiple-locus variable number tandem repeats analysis for genetic fingerprinting of pathogenic bacteria. *Electrophoresis* 26: 2567-2582.

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.

Machackova M, Svastova P, Lamka J, Parmova I, Liska V, Smolik J, *et al*. 2004. Paratuberculosis in farmed and free-living wild ruminants in the Czech Republic (1999-2001). *Vet Microbiol* 101: 225-234.

Mackintosh CG, de Lisle GW, Collins DM y Griffin JF. 2004. *Mycobacterial* diseases of deer. *N.Z.Vet J* 52(4):163-74.

Mahillon J y Chandler M. 1998. Insertion sequences. *Microbiol Mol Biol Rev* 62: 725-774.

Maiden MC, Bygraves JA, Feil E, Morelli G, Russell JE, Urwin R, *et al.* 1998. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 3140-3145.

Manning EJ, Steinberg H, Rossow K, Ruth GR y Collins MT. 1998. Epizootic of paratuberculosis in farmed elk. *J Am Vet Med Assoc*. 213(9):1320-1.

Manning EJ y Collins MT. 2001. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: pathogen, pathogenesis and diagnosis. *Rev Sci Tech* 20: 133-150.

Marsh I, Whittington R y Cousins D. 1999. PCR-restriction endonuclease analysis for identification and strain typing of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and *Mycobacterium avium* subsp. *avium* based on polymorphisms in IS*1311*. *Mol Cell Probes*. 13(2):115-26.

Marsh IB y Whittington RJ. 2005. Deletion of an *mmp*L gene and multiple associated genes from the genome of the S strain of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* identified by representational difference analysis and in silico analysis. *Mol Cell Probes* 19: 371-384.

Marsh IB, Bannantine JP, Paustian ML, Tizard ML, Kapur V y Whittington RJ. 2006. Genomic comparison of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* sheep and cattle strains by microarray hybridization. *J Bacteriol*. 188(6):2290-3.

McKenna SLB, Barkema HW, Keefe GP, Sockett DC. 2006. Agreement between three ELISAs for Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in dairy cattle. *Vet Microbiol* 114: 285-291.

Mendoza JL, Lana R, Diaz-Rubio M. 2009. Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis and its relationship with Crohn's disease. *World J Gastroenterol*. 15:417–422.

Merkal RS y Larsen AB. 1973. Clofazimine treatment of cows naturally infected with *Mycobacterium paratuberculosis*. *Am J Vet Res*. 34:27-8.

Merkal RS y Curran BJ. 1974. Growth and metabolic characteristics of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Appl Microbiol*. 28:276- 9.

Merkal RS, Miller JM, Hintz AM y Bryner JH. 1982a. Intrauterine inoculation of *Mycobacterium paratuberculosis* into guinea pigs and cattle. *Am J Vet Res*. 43(4):676-8.

Merkal RS y Whipple DL. 1982b. Effectiveness of disinfectants on *Mycobacterium paratuberculosis*. Proc.86th Annu.Meet.USAHA, pp. 514-8.

Merkal RS. 1984. Paratuberculosis: Advances in cultural, serologic and vaccination methods. J *Am Vet Med Assoc*. 184(8):939-43.

Möbius P, Luyven G, Hotzel H y Kohler H. 2008. High genetic diversity among *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* strains from German cattle herds shown by combination of IS*900* restriction fragment length polymorphism analysis and mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem-repeat typing. *J Clin Microbiol* 46: 972-981.

Momotani E, Whipple DL, Thiermann AB y Cheville NF. 1988. Role of M cells and macrophagos in the entrance of *Mycobacterium paratuberculosis* into domes of ileal Peyer's patches in calves. *Vet Pathol*. 25:131-7.

Moss MT, Malik ZP, Tizard MLV, Green EP, Sanderson JD y Hermon-Taylor J. 1992. IS902, an insertion element of the chronicenteritis- causing *Mycobacterium avium* subsp.*silvaticum*. *J Gen Microbiol*. 138:139-45.

Motiwala AS, Strother M, Amonsin A, Byrum B, Naser SA, Stabel JR, *et al*. 2003. 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(5):2015-26.

Motiwala AS, Amonsin A, Strother M, Manning EJ, Kapur V y Sreevatsan S. 2004. Molecular epidemiology of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolates recovered from wild animal species. *J Clin Microbiol*. 42(4):1703-12.

Motiwala AS, Li L, Kapur V y Sreevatsan S. 2006. Current understanding of the genetic diversity of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Microbes Infect* 8: 1406-1418.

Mura M, Bull TJ, Evans H, Sidi-Boumedine K, McMinn L, Rhodes G, Pickup R y Hermon-Taylor J. 2006. Replication and longterm persistence of bovine and human strains of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* within *Acanthamoeba polyphaga*. *Appl Environ Microbiol*. 72(1):854-9.

Murcia MI, Tortoli E, Menendez MC, Palenque E y Garcia MJ. 2006. *Mycobacterium colombiense* sp. nov., a novel member of the *Mycobacterium avium* complex and description of MAC-X as a new ITS genetic variant. *Int J Syst Evol Microbiol*. 56(Pt 9):2049-54.

Naser SA, Felix J, Liping H, Romero C, Naser N, Walsh A y Safranek W. 1999. Occurrence of the IS*900* gene in *Mycobacterium avium* complex derived from HIV patients*. Mol Cell Probes*. 13(5):367-72.

Naser SA, Schwartz D y Shafran I. 2000. Isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from breast milk of Crohn's disease patients*. Am J Gastroenterol.* 95(4):1094-5.

Naser SA, Ghobrial G, Romero C y Valentine JF. 2004. Culture of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* from the blood of patients with Crohn's disease. Lancet, 364(9439):1039-44.

Nielsen SS, Houe H, Thamsborg SM y Bitsch V. 2001. Comparison of two enzyme-linked immunosorbent assays for serologic diagnosis of paratuberculosis (Johne's disease) in cattle using different subspecies strains of *Mycobacterium avium*. *J Vet Diagn Invest*. 13(2):164-6.

Nielsen SS, Kolmos B y Christoffersen AB. 2004. Comparison of contamination and growth of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* on two different media. *J Appl Microbiol*. 96(1):149-53.

Nielsen SS y Toft N. 2006. Age-specific characteristics of ELISA and fecal culture for purpose-specific testing for paratuberculosis. *J Dairy Sci*. 89(2):569-79.

Nielsen SS y Toft N. 2008. Ante mortem diagnosis of paratuberculosis: a review of accuracies of ELISA, interferon-gamma assay and faecal culture techniques. *Vet Microbiol* 129, 217–235.

Nielsen S.S, y Toft N. 2009. A review of prevalence of paratuberculosis in farmed animals in Europe. *Prev Vet Med* 88: 1-14.

Nielsen SS. 2010. Immune-based Diagnosis of Paratuberculosis. Book. Paratuberculosis, Organism, Disease, Control/edited by Marcel A. Behr and Desmond M. Collins. CAB International.

Odumeru J, Gao A, Chen S, Raymond M y Mutharia, L. 2001. Use of the bead beater for preparation of Mycobacterium paratuberculosis template DNA in milk. *Can J Vet Res*. 65: 201-205.

OIE. (2008) Manual de test diagnósticos y vacunas para animales terrestres, 6ª Edición. *Organización Internacional de Epizootías* (OIE). 1-2.

Olsen I, Wiker HG, Johnson E, Langeggen H y Reitan LJ. 2001. Elevated antibody responses in patients with Crohn's disease against a 14-kDa secreted protein purified from *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Scand J Immunol.* 53: 198-203.

Olsen I, Johansen TB, Billman-Jacobe H, Nilsen SF y Djonne B. 2004. A novel IS element, ISMpa1, in *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Vet Microbiol.* 98: 297-306.

Overduin P, Schouls L, Roholl P, van der Zanden A, Mahmmod N, Herrewegh A y van Soolingen D. 2004. Use of multilocus variable-number tandem-repeat analysis for typing *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *J Clin Microbiol.* 42: 5022-5028.

Patterson DS y Berrett S. 1969. Malabsorption in Johne's disease in cattle: an in vitro study of L-histidine uptake by isolated intestinal tissue preparations. *J Med Microbiol*. 2:327-334.

Paustian ML, Amonsin A, Kapur V y Bannantine JP. 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.

Paustian ML, Zhu X, Sreevatsan S, Robbe-Austerman S, Kapur V y Bannantine JP. 2008. Comparative genomic analysis of *Mycobacterium avium* subspecies obtained from multiple host species. *BMC Genomics* 9: 135.

Pavlik I, Horvathova A, Dvorska L, Bartl J, Svastova P, du Maine MR y Rychlik I. 1990. Standardization of restriction fragment length polymorphism analysis for *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis. J microbiol Meth.* 38, 155-167.

Pavlik I, Bartl J, Dvorska L, Svastova P, du MR, Machackova M, *et al*. 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.

Pavlik I, Falkinham III JO, Kazda J. 2009. Environments providing favourable conditions for the multiplication and transmission of mycobacteria, 89-197. In: Kazda J, Pavlik I, Falkinham III JO, Hruska K (eds.): The Ecology of Mycobacteria: Impact on Animal's and Human's Health. 2nd ed. Springer. 522 pp.

Payne JM y Rankin JD. 1961. The pathogenesis of experimental Johne's disease in calves. *Res Vet Sci*. 2:167-74.

Pérez V. 1992. Estudio de la paratuberculosis en la especie ovina. Tesis Doctoral. Universidad de Zaragoza, Aragón, España.

Pérez V, Tellechea T, Badiola JJ, Gutierrez M y Garcia-Marin JF. 1997. Relation between serologic response and pathologic findings in sheep with naturally acquired paratuberculosis. Am. J. Vet. Res. 58:799–803.

Pérez V, Corpa JM y García Marín JF. 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.

Pickup RW, Rhodes G, Bull TJ, Arnott S, Sidi-Boumedine K, Hurley M y Hermon-Taylor J. 2006. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in lake catchments, in river water abstracted for

domestic use, and in effluent from domestic sewage treatment works: diverse opportunities for environmental cycling and human exposure. *Appl Environ Microbiol* 72: 4067-4077.

Poupart P, Coene M, Van Heuverswyn H y Cocito C. 1993. Preparation of a 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.

Radomski N, Thibault VC, Karoui C, de Cruz K, Cochard T, Gutiérrez C, Supply P, *et al.* 2010. Determination of genotypic diversity of *Mycobacterium avium* subspecies from human and animal origins by mycobacterial interspersed repetitive-unit-variable-number tandem-repeat and IS*1311* restriction fragment length polymorphism typing methods. *J Clin Microbiol*. (48):1026-34.

Raizman EA, Wells SJ, Godden SM, Bey RF, Oakes MJ, Bentley DC y Olsen KE. 2004. The distribution of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* in the environment surrounding Minnesota dairy farms. *J Dairy Sci*. 87:2959-66.

Rajeev S, Zhang Y, Sreevatsan S, Motiwala AS y 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.

Ratledge C. 1982. Nutrition, Growth and Metabolism. En: Ratledge, C. y Stanford, J. editores. Physiology, Identification and Classification. The Biology of the Mycobacteria. pp. 185-271. Academic Press. London.

Ratledge C. 2004. Iron, mycobacteria and tuberculosis. *Tuberculosis*, 84(1-2):110-30.

Reddacliff LA, Vadali A y Whittington RJ. 2003. The effect of decontamination protocols on the numbers of sheep strain *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolated from tissues and feces. *Vet Microbiol*. 95(4):271-82.

Reddacliff, L., Eppleston, J., Windsor, P., Whittington, R. and Jones, S. 2006. Efficacy of a killed vaccine for the control of paratuberculosis in Australian sheep flocks. *Vet Microbiol.* 115, 77–90.

Richards WD, Harris SK y Jarnagin JL. 1983. The isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from animals in the United States: A 16-year summary. En: Merkal editor. Proc.1st Int.Coll.Paratub., pp. 30-41. NADC, USDA, Ames, IA, USA.

Ringuet H, Akoua-Koffi C, Honore S, Varnerot A, Vincent V, Berche P, *et al.* 1999. hsp65 sequencing for identification of rapidly growing mycobacteria. *J Clin Microbiol*. 37(3):852-7.

Rosenfeld G y Bressler B. 2010. Mycobacterium avium paratuberculosis and the etiology of Crohn's disease: A review of the controversy from the clinician's perspective. *Can J Gastroenterol*. October; 24(10): 619–624.

Rossiter CA. 1996. Farm-specific approach to paratuberculosis (Johne's disease) control. Vet.Clin.North *Am.Food Anim.Pract*.12(2):383-415.

Roussel AJ, Fosgate GT, Manning EJB, Collins MT. 2007. Association of fecal shedding of mycobacteria with high ELISA-determined seroprevalence for paratuberculosis in beef herds. *J Am Vet Med Assoc*. 230, 890–895.

Rowe MT y Grant IR. 2006. *Mycobacterium avium* ssp. *Paratuberculosis* and its potential survival tactics. *Lett in Appl Microbiol* ISSN 0266-8254.

Schroen CJ, Kluver PF, Butler KL, McDonald WL, Hope AF y Condron RJ. 2003. Factors affecting the survival of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in soil. En: Juste, Geijo, y Garrido editores. Proc.7th Int.Coll.Paratub., pp. 10-5. IAP, Madison, WI, USA.

Schwartz D, Shafran I, Romero C, Piromalli C, Biggerstaff J, Naser N, *et al*. 2000. Use of short-term culture for identification of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in tissue from Crohn's disease patients*. Clin Microbiol Infect*. 6:303e307.

Scott MC, Bannantine JP, Yumiko K, Branscum AJ, Whitlock RH, Mori Y, *et al*. 2010. Absorbed EVELISA: A Diagnostic Test with Improved Specificity for Johne's Disease in Cattle. *Foodborne pathogens and disease*. Volume 7, Number 11:1291-1296.

Sechi LA, Scanu AM, Molicotti P, Cannas S, Mura M, Dettori G, *et al*. 2005. Detection and isolation of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* from intestinal mucosal biopsies of patients with and without Crohn's disease in Sardinia. *Am J Gastroenterol*. 100(7):1529-36.

Secott TE, Lin TL y Wu CC. 2004. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* fibronectin attachment protein facilitates M-cell targeting and invasion through a fibronectin bridge with host integrins. *Infect.Immun*. 72(7):3724-32.

Sergeant ES. 2001. Ovine Johne's disease in Australia: the first 20 years. *Aust Vet J*. 79(7):484-91.

Sevilla I, Singh SV, Garrido JM, Aduriz G, Rodríguez S, Geijo MV. *et al*. 2005. Molecular typing of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* strains from different hosts and regions. *Rev Sci Tech.* 24: 1061- 1066.

Sevilla I, Garrido JM, Geijo M y Juste RA. 2007. Pulsed-field gel electrophoresis profile homogeneity of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolates from cattle and heterogeneity of those from sheep and goats. *BMC Microbiol.* 7: 18.

Shinnick TM y Good RC. 1994. Mycobacterial taxonomy. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*.13(11):884-901.

Shin JS, Yoo HS, McDonough SP, Chang Y. 2004. Comparative antibody response of 5 recombinant antigens in related to bacterial shedding levels and development of serological diagnosis based on 35KDa antigen for Map. *J. Vet. Sci.*, 5, 111-117.

Sigurdardottir OG, Bakke-McKellep AM, Djonne B y Evensen O. 2005. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* enters the small intestinal mucosa of goat kids in areas with and without Peyer's patches as demonstrated with the everted sleeve method. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 28(3):223-30.

Singh SV, Sohal JS, Singh PK y Singh AV. 2009. Genotype profiles of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* isolates recovered from animals, commercial milk, and human beings in North India. *Int J Infect Dis* 13: e221-e227.

Snow GA y Waite AJ. 1969. Chemical and biological properties of mycobactins isolated from various mycobacteria. *Biochem J*. 115:1031-45.

Snow GA. 1970. Mycobactins: iron chelating growth factors from mycobacteria. *Bacteriol Rev*. 34:99-125.

Sohal JS, Sheoran N, Narayanasamy K, Brahmachari V, Singh S y Subodh S. 2009. Genomic analysis of local isolate of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Vet Microbiol* 134: 375-382.

Stabel JR y Bannantine JP. 2005. Development of a nested PCR method targeting a unique multicopy element, IS*Map02*, for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in fecal samples. *J Clin Microbiol*. 43(9):4744-50.

Stabel JR. 2010. Immunology of Paratuberculosis, Infection and Disease. Book. Paratuberculosis, Organism, Disease, Control/edited by Marcel A. Behr and Desmond M. Collins. CAB International.

Stackebrandt E, Rainey FA y Ward-Rainey NL. 1997. Proposal for a new hierarchic classification system, *Actinobacteria* Classi nov. *Int J Syst Bacteriol*. 47(2):479-91

Stehman, S.M. 1996. Paratuberculosis in small ruminants, deer, and South American camelids. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 12: 441-455.

Stevenson K, Hughes VM, de Juan L, Inglis NF, Wright F y Sharp JM. 2002. Molecular characterization of pigmented and nonpigmented isolates of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *J Clin Microbiol*. 40(5):1798-804.

Stevenson K, Álvarez J, Bakker D, Biet F, de Juan L, Denham S. *et al*, 2009. Occurrence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* across host species and European countries with evidence for transmission between wildlife and domestic ruminants. *BMC Microbiol* 9: 212.

Sugeden EA, Corner AH, Samagh DS, Duncan JR, Brooks BW, Turcotte C, *et al*.1989. Serodiagnostic of ovine paratuberculosis using lipoaabinomannan in an enzyme-linked immunosorbetnt assay. *Am J Vet Res*. 50:850-854.

Supply P, Mazars E, Lesjean S, Vincent V, Gicquel B y Locht C. 2000. Variable human minisatellite-like regions in the *Mycobacterium tuberculosis* genome. *Mol Microbiol*. 36(3):762-71.

Sweeney RW, R. Whitlock RH, Buckley CL y Spencer PA. 1995. Evaluation of a commercial enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of paratuberculosis in dairy cattle. J. Vet. Diagn. Investig. 7**:**488**–** 493.

Sweeney RW. 1996. Transmission of paratuberculosis. *Vet Clin North Am Food Anim* Pract.12(2):305-12.

Taddei R, Barbieri I, Pacciarini ML, Fallacara F, Belletti GL, Arrigoni N. 2008. Mycobacterium porcinum strains isolated from bovine bulk milk: implications for Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis detection by PCR and culture. *Vet Microbiol*. 25; 130 (3-4):338-47.

Telenti A, Marchesi F, Balz M, Bally F, Böttger EC y Bodmer T. 1993. Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction enzyme analysis. *J Clin Microbiol*. 31(2):175-8.

Tessema MZ, Koets AP, Rutten VP y Gruys E. 2001. How does *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* resist intracellular degradation? *Vet Q.* 23(4):153-62.

Thibault VC, Grayon M, Boschiroli ML, Hubbans C, Overduin P, Stevenson K. *et al.* 2007. New variable-number tandem-repeat markers for typing *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and *M. avium* strains: comparison with IS*900* and IS*1245* restriction fragment length polymorphism typing. *J Clin Microbiol* 45: 2404-2410.

Thoen CO y Muscoplat CC. 1979. Recent developments in diagnosis of paratuberculosis. *J Am Vet Med Assoc*. 174(8):838-40.

Thorel MF.1984. Review of the occurrence of mycobactin dependence among micobacteria species. *Annales de Recherches Vétérinaires* 15, 405–409.

Thorel MF, Krichevsky MI y Levy-Frebault VV. 1990. Numerical taxonomy of mycobactin-dependent mycobacteria, emended description of *Mycobacterium avium*, and description of *Mycobacterium avium* subsp. *avium* subsp. nov., *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* subsp. nov., and *Mycobacterium avium* subsp. *silvaticum* subsp. nov. *Int J Syst Bacteriol*. 40(3):254-60.

Thorel M.F. 1991.Taxonomic and genomic research on mycobactin-dependent mycobacteria. In: Paratuberculosis: Diagnostic Methods, Their Practical Application and Experience with Vaccination. Proceedings of the Third International Colloquium on Paratuberculosis. International Association for Paratuberculosis, Orlando, FL, USA, 222–235.

Thorel MF, Huchzermeyer H, Weiss R y Fontaine JJ. (1997) *Mycobacterium avium* infections in animals. Literature review. *Vet Res* 28: 439-447.

Timpe A y Runyon EH. 1954. The relationship of "atypical" acid-fast bacteria to human disease. *J Lab Clin Med*. 44:202-9.

Tiwari A, VanLeeuwen JA, Dohoo IR, Keefe GP, Weersink A. 2008. Estimate of the direct production losses in Canadian dairy herds with subclinical *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection. *Can Vet J.* 49(6): 569–576.

Tortoli E. 2003. Impact of genotypic studies on mycobacterial taxonomy: the new mycobacteria of the 1990s*. Clin Microbiol Rev.*16(2):319-54.

Tortoli E, Rindi L, Garcia MJ, Chiaradonna P, Dei R, Garzelli C, *et al*. 2004. Proposal to elevate the genetic variant MAC-A, included in the *Mycobacterium avium* complex, to species rank as *Mycobacterium chimaera* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*. 54(Pt 4):1277-85.

Turenne CY, Collins DM, Alexander DC y Behr MA. 2008. Mycobacterium avium subsp. Paratuberculosis and M. avium subsp. avium are independently evolved pathogenic clones of a much broader group of M. avium organisms. *J Bacteriol*. 190: 2479-2487.

Twort FW y Ingram GLY. 1911. Further experiments with the *Mycobacterium enteriditis chronicae pseudotuberculosae bovis,* Johne, and with vaccines prepared from this micro-organism. *Zentralbl.Bakteriol*.[Orig A], 67(3):126-35.

USDA. 2005. Pages 126–130 in Johne's disease on U.S. dairy operations, 2002. #N427.0205. USDA-APHIS-VS, CEAH, NAHMS,Fort Collins, CO.

Vaerewijck MJ, Huys G, Palomino JC, Swings J y Portaels F.2005.Mycobacteria in drinking water distribution systems: ecology and significance for human health. *FEMS Microbiol Rev.* 29, 911–934.

Valentin-Weigand P y Goethe R.1999. Pathogenesis of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infections in ruminants: still more questions than answers. *Microbes Infect*.1(13):1121-7.

van der Giessen J, van Dijk L, Bleumink-Pluym N, Eger T, Haagsma J y van der Zeijst B. 1995. The spatial distribution of *Mycobacterium paratuberculosis* in infected cattle. Implications for pathogenesis and diagnosis. En: Chiodini, Collins, y Bassey editores. Proc.4th Int Coll Paratub. pp. 61-6. IAP, Rehoboth, MA, USA.

van Ingen, J., Boeree, M.J., Kosters, K., Wieland, A., Tortoli, E., Dekhuijzen, R.P.N. and van Soolingen, D. 2009. Proposal to elevate *Mycobacterium avium* complex ITS sequevar MAC-Q to *Mycobacterium vulneris* sp. nov. *Int J of System and Evol Microbiol*. 59, 2277–2282.

Vansnick E, De Rijk P, Vercammen F, Geysen D, Rigouts L y Portaels F. 2004. Newly developed primers for the detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Vet Microbiol* 100: 197-204.

Vary PH, Andersen PR, Green E, Hermon-Taylor J y McFadden JJ.1990. Use of highly specific DNA probes and the polymerase chain reaction to detect *Mycobacterium paratuberculosis* in Johne's disease. *J Clin Microbiol* 28: 933-937.

Verna AE, García-Pariente C, Muñoz M, Moreno O, García-Marin JF, Romano MI, *et al*, 2007. Variation in the immuno-pathological responses of lambs after experimental infection with different strains of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Zoonoses Public Health* 54: 243-252.

Wayne LG y Díaz GA. 1986. A double staining method for differentiating between two classes of mycobacterial catalase in polyacrylamide electrophoresis gels. *Anal Biochem* 157: 89-92.

Wells SJ, Ott, SL y Seitzinger AH. 1998. Key health issues for dairy cattle. New and old. *J Dairy Sci.* 81:3029–3035.

Whan LB, Grant IR, Ball HJ, Scott R y Rowe MT. 2001. Bactericidal effect of chlorine on *Mycobacterium paratuberculosis* in drinking water. *Lett.Appl.Microbiol*. 33(3):227-31.

Whitlock RH, Rosenberger AE, Sweeney RW y Hutchinson LJ. 1992. Culture techniques and media constituents for the isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from bovine fecal samples. En: Chiodini y Kreeger editores. Proc.3rd Int.Coll.Paratub., pp. 94-111. IAP, Providence, RI, USA.

Whitlock RH y Buergelt C. 1996. Preclinical and clinical manifestations of paratuberculosis (including pathology). *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 12: 345-356.

Whitlock RH, Wells SJ, Sweeney RW y 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, Marsh I, Choy E, y Cousins D. 1998a Polymorphisms in IS*1311*, an insertion sequence common to *Mycobacterium avium* and *M. avium* subsp. *paratuberculosis*, can be used to distinguish between and within these species. *Mol Cell Probes* 12: 349-358.

Whittington RJ, Marsh I, Turner MJ, McAllister S, Choy E, Eamens GJ, *et al*. 1998b. Rapid detection of *Mycobacterium paratuberculosis* in clinical samples from ruminants and in spiked environmental samples by modified BACTEC 12B radiometric culture and direct confirmation by IS*900* PCR. *J Clin Microbiol*. 36(3):701-7.

Whittington R, Marsh I, McAllister S, Turner MJ, Marshall DJ y Fraser CA. 1999. Evaluation of a modified BACTEC12B radiometric medium and solid media for culture of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from sheep. *J Clin Microbiol*. 37(4):1077-83.

Whittington RJ, Fell S, Walker D, McAllister S, Marsh I, Sergeant E, *et al*. 2000a. Use of pooled fecal culture for sensitivite and economic detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *J Clin Microbiol*. 38(7):2550-6.

Whittington RJ, Hope AF, Marshall DJ, Taragel CA. y Marsh I. 2000b. Molecular epidemiology of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: IS*900* restriction fragment length polymorphism and IS*1311*polymorphism analyses of isolates from animals and a human in Australia. *J Clin Microbiol* 38: 3240-3248.

Whittington RJ, Reddacliff LA, Marsh I, McAllister S, Saunders V. 2000c. Temporal patterns and quantification of excretion of *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* in sheep with Johne's disease. Aust. Vet. J. 78, 34-37.

Whittington RJ, Lloyd JB y Reddacliff LA. 2001. Recovery of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from nematode larvae cultured from the feces of sheep with Johne's disease. *Vet Microbiol*. 81(3):273-9.

Whittington RJ, Marsh IB y Reddacliff LA. 2005. Survival of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in dam water and sediment. *Appl Environ Microbiol*. 71(9):5304-8.

Whittington RJ, Marshall DJ, Nicholls PJ, Marsh IB y Reddacliff LA. 2004. Survival and dormancy of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in the environment. *Appl Environ Microbiol*.70 (5):2989-3004.

Whittington RJ. 2009. Factors Affecting Isolation and Identification of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from Fecal and Tissue Samples in a Liquid Culture System. *J Clin Microbiol.* 47(3):614-622.

Willemsen PTJ, Bakker D, Damman M, Eger A, and van Zijderveld FG. (Food Animal Practice) 1996; 12 (2): 305-12. An error in the reported IS900 nucleotide sequence affects the proposed expression of ORF2 (Hed) and the detection of *M.a.paratuberculosis* using the polymerase chain reaction. In: Proceedings of the Sixth the International Colloquium on Paratuberculosis. Eds Manning EJB and Mycobacterium enteritides chronicae pseudotuberculosae bovis Johne Collins MT. 2000: 466-71.

Wilson DJ, Rossiter CA, Han HR y Sears PM. 1997. Financial effects of *Mycobacterium paratuberculosis* on mastitis, culling and milk production in clinically normal dairy cattle. En: Chiodini, Hines, y Collins editores. Proc.5th Int.Coll.Paratub., pp. 151-8. IAP, Rehoboth, MA, USA.

Yadav D, Singh SV, Singh AV, Sevilla I, Juste RA, Singh PK y Sohal JS. 2008. Pathogenic 'Bison type' *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* genotype characterized from riverine buffalo (*Bubalus bubalis*) in North India. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 31: 373-387.

Yokomizo Y, Merkal RS y Lyle PAS. 1983. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of bovine immunoglobulin G1 antibody to a protoplasmatic antigen of *Mycobacterium paratuberculosis* . *Am J Vet Res*. 44(11):2205-7.

Zhao BY, Collins MT y Czuprynsky CJ. 1997. Effects of gamma interferon and nitric oxid on the interaction of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* with bovine monocytes. *Infect.Immun*. 65(5):1761-6.

Zimmer K, Drager KG, Klawonn W y Hess RG. 1999. Contribution to the diagnosis of Johne's disease in cattle. Comparative studies on the validity of Ziehl-Neelsen staining, faecal culture and commercially available DNA-ProbeR test in detecting *Mycobacterium paratuberculosis* in feces from cattle. J. Vet. Med. 46**:**137–140.

CAPÍTULO 3

Artículos generados durante el presente estudio

3.1 Aislamiento y caracterización molecular de *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* en ganado bovino y ovino en el Municipio de Mexicali Baja California, México.

Isolation and molecular typification of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in cattle and sheep in the Municipality of Mexicali Baja California, Mexico.

Correa-Muñoz M, Medina-Basulto G, Rentería-Evangelista T, Monge-Navarro F, González-Vizcarra V, López-Valencia G*.

*Autor para correspondencia. Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias, Universidad Autónoma de Baja California. Carretera Mexicali-San Felipe Km. 3.5 S/N Fracc. Laguna Campestre C.P. 21386. Mexicali, Baja California, México. Tel/Fax: (686)5.63.69.06. gilbertolopez@uabc.edu.mx.

Articulo enviado a revisión a la Revista Mexicana de Técnicas Pecuarias.

RESÚMEN

El presente estudio es el primer reporte sobre aislamiento y tipificación molecular de *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* (*Map*) en ganado bovino y ovino en Mexicali-Baja California; región con antecedentes serológicos de paratuberculosis en pequeños rumiantes. En este estudio, se analizaron muestras de suero y heces de 5 ovinos y un bovino. Los resultados de la serología mostraron que 3 ovinos y un bovino, reaccionaron positivos al ELISA con una razón S/P superior al 70%. Mediante el cultivo bacteriológico se obtuvieron 3 aislamientos, dos de origen ovino y uno de origen bovino, los cuales fueron identificados como *Map* según la PCR IS*900* y f*57* y tipificados como Tipo C de *Map*, mediante el ensayo de PCR IS*1311* y análisis de endonucleasas de restricción (IS*1311* PCR-REA). Los datos obtenidos en este estudio confirman la presencia de *Map* en la región y contribuyen a tener mayor conocimiento sobre su distribución en el país, así como también sugieren la presencia, circulación y transmisión del tipo C de *Map* entre el ganado bovino y ovino; sin embargo no se descarta la presencia de otros tipos de *Map* en la región. Se requiere de más estudios que incluyan una mayor cantidad de animales para lograr un mejor conocimiento acerca de la biodiversidad de *Map* en Baja California.

Palabras clave: *Mycobacterium avium* subspecie *paratuberculosis*, paratuberculosis, aislamientos, cepas tipo C.

ABSTRACT

This study reports for the first time microbiological isolation and molecular typing of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (*Map*) in cattle and sheep in Mexicali Baja California, a region with serological evidence only of paratuberculosis in small ruminants. In this study, serum samples and feces from five sheep and one bovine were analyzed. The serology results showed that the bovine and three out of five sheep reacted positive to ELISA with an S/P ratio above 70%. From the bacteriological cultures three isolates were obtained, two from ovine and one from bovine samples which were identified as *Map* by PCR IS*900* and f*57* and later classified as *Map* Type C, using IS*1311* polymorphism analysis and restriction endonuclease analysis (IS*1311* PCR-REA). The data obtained in this study confirm the presence of *Map* in the region and provide more knowledge about the distribution of the pathogen in the country. It also suggests the presence; distribution and transmission of *Map* type C in cattle and sheep but do not rule out the presence of other types of *Map* in the region. More studies that include a larger number of animals are needed to achieve a better knowledge about *Map* biodiversity in Baja California.

Kay words: *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*, paratuberculosis, isolates, type C strains.

INTRODUCCIÓN

Mycobacterium avium subspecie *paratuberculosis* (*Map)* es el agente etiológico de la enfermedad de Johne o paratuberculosis (Ptb), la cual ocasiona una enteritis granulomatosa crónica que causa pérdidas económicas a la industria pecuaria[1]. Fenotípicamente los aislamientos de *Map* se distinguen por la lentitud en su crecimiento, la dependencia a la micobactina[2] y por la pigmentación que es típica solo de algunos aislamientos de origen ovino[3]. Para la identificación de *Map*, a nivel genotípico se utiliza la secuencia de inserción IS*900* (IS*900*)[4] la cual junto con el resultado positivo de otros blancos específicos de *Map* como f*57*[5], confirman su presencia en un aislamiento.

El análisis de ensayos moleculares como IS*900*-RFLP (Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción), ha permitido la tipificación de *Map* en tres grupos: Tipo I o Tipo S del inglés "*sheep*", Tipo II o Tipo C del inglés "*cattle*" y Tipo intermedio "I" o Tipo III, considerado como un subtipo del Tipo I[6,7,8]. Los tipos I y II identificados por IS*900*-RFLP, corresponden a los tipos S y C obtenidos mediante el ensayo de PCR de la secuencia de inserción *1311* y análisis de enzimas de restricción (IS*1311* PCR-REA)[9,10].

En México, existen pocos estudios moleculares de identificación y tipificación de *Map*. La primera identificación molecular de este microorganismo fue realizada en caprinos, por medio del ensayo IS*900*-RFLP en el Valle de México[11]. Este estudio reveló la presencia de *Map* del Tipo C1, uno de los tipos más diseminados a nivel mundial entre las diferentes especies de animales[7]. Investigaciones posteriores realizadas en muestras de leche de ganado caprino y bovino en la zona central de México, encontraron que además del Tipo C otros tipos de *Map* como el I y el S también estaban presentes en estas especies[12].

La Ptb también ha sido detectada en otras regiones del país como: San Luis Potosí, Guanajuato, Querétaro, Distrito Federal, Estado de México, Veracruz y Jalisco; en donde por medio de metodologías como cultivo bacteriológico, PCR IS*900* y PCR

IS*900* anidada, se identificó *Map* en muestras de ovinos y caprinos[13,14]. Aunque en estos estudios no se realizó la tipificación de *Map*, sus resultados indican que la Ptb en México está afectando a rumiantes de diferentes especies. De igual manera, otro reporte documenta la presencia de la Ptb en ganado bovino, ovino y caprino en 16 estados del país[15], indicando la amplia distribución de la enfermedad en el territorio nacional. En Baja California, estado fronterizo con los Estados Unidos no se cuenta con estudios previos sobre aislamientos y caracterización molecular de *Map*. El conocimiento sobre los tipos de *Map* presentes en las distintas explotaciones de ganado de esta región es de suma importancia para el mejoramiento de las estrategias de control y prevención de esta enfermedad. El objetivo del presente estudio fue evidenciar la presencia de *Map* en ganado bovino y ovino en el Municipio de Mexicali, Baja California y realizar la caracterización molecular de las cepas encontradas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Descripción del área de estudio y obtención de muestras:

Se muestrearon 6 animales provenientes de dos ranchos, los cuales tenían antecedentes de animales con signos compatibles con la Ptb. El rancho 1 está ubicado al noroeste de la ciudad de Mexicali. De este hato se muestrearon 5 ovinos hembras adultos de 2 años de edad con crías en lactancia, estos animales presentaban caquexia y dos de ellos estaban en grave estado de emaciación. El rancho 2 está ubicado al este, en el área conurbada de la ciudad. De este hato se tomaron muestras de un bovino hembra adulto de 3 años de edad, en estado de gestación y que presentaba diarrea acuosa profusa y emaciación. A todos los animales se les tomaron muestras de sangre completa por punción yugular para la obtención del suero y posterior análisis serológico. Las heces se tomaron directamente del ámpula rectal, empleando guantes estériles. Las muestras fueron almacenadas a -70ºC, hasta el momento de realizar el cultivo bacteriológico.

Análisis serológico

Las muestras de suero obtenidas fueron probadas por medio del kit comercial POURQUIER®ELISA PARATUBERCULOSIS ANTYBODY SCREENING (Institut Pourquier, Francia). Para el desarrollo de la prueba y la interpretación de los resultados, se siguieron las instrucciones del fabricante. Los puntos de corte para cada muestra se calcularon con base en la razón de la DO del suero problema sobre la DO del suero control positivo (S/P). Una muestra con una razón S/P igual o menor al 60% fue considerada negativa, entre el 60% y 70% dudosa y mayor al 70% positiva.

Cultivo bacteriológico:

La muestra obtenida del bovino fue procesada de forma individual mientras que las muestras provenientes de los 5 ovinos fueron procesadas en dos grupos: El grupo 1 contenía las heces de los ovinos 1 y 2, los cuales presentaban emaciación severa. El grupo 2 contenía las heces de los ovinos 3, 4 y 5, los cuales al momento de la toma de las muestras presentaban caquexia (Cuadro 1). Para cada grupo se pesaron 2 g de heces individualmente, se homogenizaron y de ahí se tomaron 2 g para la realización del cultivo bacteriológico, el cual se realizó según la metodología descrita por Harris *et al*[16]; con una modificación relacionada con la concentración del antibiótico, el cual se utilizó en una dilución de 1:2. Las muestras procesadas se sembraron por duplicado en los medios de cultivo Middlebrook 7H11 (M7H11) suplementado con yema de huevo, Lowenstein-Jensen (LJ) y Middlebrook 7H9 (M7H9); con y sin suplemento de 2µg/ml de micobactina (Institut Pourquier). Los inóculos se incubaron a 37ºC y su crecimiento fue verificado cada semana hasta la observación de colonias. Después del crecimiento primario, se aisló una colonia que fue diluida en 150µl de agua destilada estéril y sometida a ciclos seriados de enfriamiento y calentamiento para la obtención de un lisado. Del sobrenadante se tomó 5µl para las reacciones de PCR.

Identificación y tipificación molecular de *Map*

La identificación de *Map* se realizó empleando los marcadores moleculares IS*900* y f57 y la tipificación por medio del análisis IS*1311* PCR-REA. Todas las reacciones de PCR se hicieron a un volumen final de 50 µl utilizando como control positivo la cepa referencia de *Map* ATCC19698 y como control negativo agua grado biología molecular (SIGMA). Las mezclas de PCR fueron amplificadas en un termociclador iCycler (BioRad). Los productos fueron visualizados en geles de agarosa al 2% y teñidos con bromuro de etidio a una concentración final de 0.5 µg/ml.

PCR IS*900*: Se utilizaron los iniciadores MP10-1 (5'- ATGCGCCACGACTTGCAGCCT-3') y MP11.1 (5'–GGCACGGCTCTTGTTGTAGTCG-3'); descritos por Kawaji *et al*[17] que amplifican un fragmento de 183 pb. La mezcla consistió de: 1U de *Taq* polimerasa, 20mM Tris-HCl, 50mM de KCl, 2.5 mM de $MgCl_2$, 2.5 mM de una mezcla de dNTP's y 20pmol de cada iniciador. Las condiciones de amplificación fueron las descritas por el autor[17].

PCR f*57*: Se utilizaron los iniciadores F57 (5'- CCTGTCTAATTCGATCACGGACTAGA-3') y R57 (5'- TCAGCTATTGGTGTACCGAATGT-3'); descritos por Vansnick *et al*[5] que amplifican un fragmento de 432 pb. La mezcla consistió de: 1 U de *Taq* polimerasa, 20mM Tris-HCl, 50mM de KCl, 1.6mM de $MgCl_2$**,** 2.0mM de una mezcla de dNTP's y 20pmol de cada iniciador. Las condiciones de la amplificación fueron las descritas por el autor[5].

PCR IS*1311*: Se utilizaron los iniciadores M56 (5'-GCGTGAGGC TCTGTGGTG AA-3') y M119 (5'-ATGACGACCGCTTGGGAGAC-3'); descritos por Marsh *et al*[10] que amplifican un fragmento de 608 pb. La mezcla consistió de: 2 U de *Taq* polimerasa, 20mM Tris-HCl, 50mM de KCl, 2.5mM de $MgCl_2$**,** 2.0mM de una mezcla de dNTP's y 0.8 µM de cada iniciador. Las condiciones de la amplificación fueron las indicadas por el autor[10].

El análisis de restricción enzimática se realizó en un volumen final de 30µl, el cual consistió de 1µl de la enzima *Hinf* I, 2.0 µl del buffer *FastDigest*®10X (Fermentas), 10 µl del amplificado IS*1311* y agua destilada estéril. La digestión se realizó por 1 h a 37°C y los fragmentos fueron visualizados por electroforesis en gel de agarosa al 3.5 % y tinción con bromuro de etidio. La interpretación de los resultados se realizó según lo reportado por Marsh[10], donde un aislado es clasificado como perteneciente al Tipo C, si presenta un patrón de digestión correspondiente a los fragmentos de 67 pb, 218 pb, 285 pb y 323 pb. Las cepas del tipo S son definidas por las bandas de 285 y 323pb.

RESULTADOS

Los 6 animales analizados en este estudio presentaban síntomas compatibles con la Ptb al momento de la toma de las muestras (Cuadro 1).

Cuadro 1. Signos compatibles con la paratuberculosis observados en los animales muestreados y resultados del análisis serológico. Una muestra de suero fue considerada como positiva cuando la relación S/P fue superior al 70%.

Animales	Signos compatibles con la paratuberculosis				Serología S/P(%)
	Caquexia	Diarrea	Heces pastosas	Emaciación	
Ovino 1	+	-	+	+	121.16
Ovino 2	+	-	+	+	135.36
Ovino 3	+	-	-	-	13.25
Ovino 4	+	-	+	+	75.91
Ovino 5	+	-	-	-	5.41
Bovino	+	+	-	+	223.60

Análisis serológico

Los resultados del ELISA se presentan en el Cuadro 1. El análisis mostró que los ovinos 1, 2 y 4 así como el bovino, resultaron positivos al ELISA con una razón S/P

superior al 70%. Los ovinos 3 y 5 fueron negativos al ELISA al mostrar una razón S/P menor al 70%.

Aislamiento de *Map* por cultivo bacteriológico

El cultivo primario obtenido a partir del grupo 1, no creció en ninguno de los medios sólidos utilizados. Debido a lo anterior, se procedió a la identificación de *Map* por PCR a partir del cultivo líquido M7H9 suplementado con micobactina. Una vez confirmada la presencia de *Map* por PCR, se inoculó una placa de petri con medio Middlebrook 7H10 (M7H10) con y sin suplemento de micobactina, observándose un escaso crecimiento de colonias (8 colonias) solamente en el medio que contenía micobactina, después de 5 semanas de incubación. Las colonias en este medio presentaron morfologías hemisféricas, lisas y opacas.

El aislamiento obtenido a partir del grupo 2 creció únicamente en el medio M7H11 suplementado con micobactina; el tiempo de crecimiento fue de 6 semanas, el número de colonias bacterianas aisladas fue escaso (12 colonias) de color semejante al medio de cultivo y con morfología similar a las observadas en el grupo 1.

El aislamiento de la muestra de origen bovino, se obtuvo solo en el medio LJ suplementado con micobactina, después de 6 semanas de cultivo; sin embargo a diferencia de los aislados de origen ovino, estas colonias se observaron translúcidas, brillantes, muy pequeñas, hemisféricas, abundantes y distribuidas en toda la superficie del medio.

Identificación y tipificación molecular de *Map*

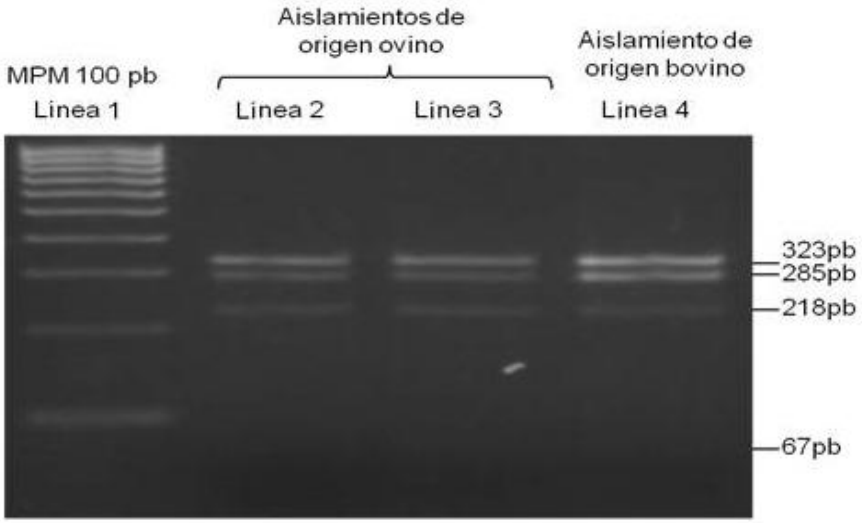
La identificación molecular de *Map* en los tres aislamientos se realizó mediante la PCR IS*900* y f*57*, a partir de una colonia obtenida de cada aislamiento. Para el caso del grupo 1, la identificación de *Map* se realizó tanto del cultivo primario en medio M7H9 como de una colonia obtenida posteriormente en el medio M7H10 suplementado con

micobactina. Los resultados de las PCR IS900 y f57 fueron positivos para todos los casos, confirmándose la presencia de *Map* en los tres aislamientos (Cuadro 2). La tipificación de los aislamientos identificados como *Map*, se realizó por medio del ensayo IS*1311* PCR-REA; el cual permite identificar el polimorfismo presente en el nucleótido 223 en algunas copias de IS*1311* en cepas del tipo C y ausente en las cepas del tipo S[9,10]. La amplificación de IS*1311* generó un producto de 608 pb el cual fue sometido posteriormente a digestión enzimática empleando *Hinf*I, observándose en los tres aislamientos el mismo patrón de digestión característico de las cepas del tipo C de *Map* (Figura 1 y Cuadro 2).

Cuadro 2. Resultados de las pruebas de cultivo bacteriológico, PCR IS*900*, PCR f*57* y análisis IS*1311* PCR-REA utilizadas para la identificación y tipificación de *Map* en las muestras de heces de origen bovino y ovino.

Aislamientos	Identificación de *Map*			Tipificación IS*1311* PCR-REA
	Cultivo	PCR IS*900*	PCR f*57*	
Grupo 1	+	+	+	C
Grupo 2	+	+	+	C
Bovino	+	+	+	C

Figura 1. Análisis IS*1311* PCR-REA. Los aislamientos de *Map*, fueron tipificados como Tipo C, debido a la presencia de fragmentos característicos de 218 y 67pb, después de la digestión con *Hinf*I. Línea 1. MPM (100pb. Bioline), Línea 2 y 3 aislamientos de origen ovino y Línea 4 aislamiento de origen bovino.



DISCUSIÓN

Este es el primer reporte de aislamientos y tipificación de *Map* en el Municipio de Mexicali Baja California, región en donde se ha encontrado una seroprevalencia del 7.8 % en ganado ovino y del 2.5 % en ganado caprino (datos no publicados). Los animales muestreados en este estudio pertenecían a distintos ranchos, los cuales presentaban factores de riesgo para la infección por *Map* tales como ser hatos abiertos, tener antecedentes de animales con signos compatibles con la Ptb, malas condiciones de higiene en los corrales y la convivencia de animales enfermos con sanos dentro del mismo corral. Adicionalmente, estos animales fueron hembras en las cuales estaba comprometido su estado hormonal debido a que se encontraban en estado de gestación o tenían crías en lactancia. Dichas condiciones de estrés, han sido reportadas como favorables para la aparición de los síntomas clínicos de la Ptb, los

cuales en bovinos suelen presentarse a los 2 años mientras que para pequeños rumiantes estos síntomas pueden aparecer antes de esta edad[18,19].

El análisis serológico, mostró resultados positivos para las muestras del bovino y tres de los cinco ovinos, con razones S/P superiores al 70%. Los animales que presentaron los títulos más altos de anticuerpos se encontraban en avanzado estado de la enfermedad. Los ovinos que resultaron negativos al ELISA, no presentaban emaciación ni la presencia de heces pastosas observada en los otros animales; es posible que estos animales no se encontraran infectados por *Map* y la caquexia observada pudo haber sido ocasionada por causas no determinadas, sin embargo se debe tener en cuenta la baja sensibilidad del ELISA cuando se prueban muestras de animales que estan en estadio subclínico de la enfermedad, así como también la variabilidad del huésped relacionada con la producción de anticuerpos y proteínas enteropáticas en respuesta a la infección por *Map*[20,21].

Los cultivos bacteriológicos de origen ovino presentaron mayores dificultades para lograr el aislamiento comparado con el cultivo de origen bovino. Inicialmente, no se logró obtener crecimiento alguno en los cultivos de muestras individuales de heces ovinas. La dificultad en aislar *Map* a partir de heces ovinas ha sido reportada por otros estudios[22,23], donde factores tales como bajas concentraciones de micobacterias excretadas, la presencia de acúmulos densos de heces[22] o la inactivación de *Map*, durante el proceso de descontaminación, pueden interferir con la obtención del aislamiento. En la búsqueda de condiciones que favorecieran el crecimiento bacteriano, se redujo en un 50% la concentración del antibiótico aplicado a las muestras durante el procesamiento de las mismas. Es posible que esta modificación pudiera haber influido positivamente en la obtención de los aislamientos de *Map* de origen ovino. Por otro lado, la utilización de mezclas de material fecal para la obtención de aislamientos de *Map* a partir de muestras de rebaños de ovinos y en programas de vigilancia de ganado bovino ha sido recomendada, debido a que los resultados obtenidos a partir de dichas mezclas, han mostrado ser equivalentes a los del cultivo bacteriológico individual[24,25].

Con respecto a los cultivos primarios de *Map*, se observó que los tres aislamientos presentaron dependencia a la micobactina. El aislamiento primario obtenido en el grupo 1 se logró solo en el medio de cultivo líquido M7H9 (base del medio BACTEC). Este tipo de medio ha sido recomendado particularmente para muestras de origen ovino[23] debido a que producen crecimientos más rápidos con una mejor sensibilidad analítica y diagnóstica, comparado con los resultados obtenidos en los medios sólidos[26,27]. Sin embargo los medios de cultivo líquido presentan desventajas tales como la dificultad para la visualización de colonias y la dependencia a la micobactina[28]. Debido a lo anterior, después de identificar *Map* por PCR en el medio de cultivo líquido, se realizó una resiembra en medio 7H10, observándose crecimiento de colonias solamente en el medio suplementado con micobactina; comprobándose así la dependencia a dicho sideróforo.

El asilamiento primario obtenido a partir del grupo 2, se logró solamente en el medio de cultivo M7H11 y el aislamiento de origen bovino, en el medio LJ. En ambos casos, se detectó crecimiento de colonias a las 6 semanas de incubación. Los medios de cultivo de donde se aislaron y el tiempo de crecimiento, son característicos de las cepas del tipo C de *Map*; comprobando el hecho de que el tiempo de crecimiento de una cepa de *Map*, se correlaciona con el tipo de cepa mas no con el origen del huésped[29]. Igualmente las morfologías de las colonias observadas en el medio de cultivo en donde creció cada aislamiento, coinciden con las descripciones reportadas por otros estudios[29].

La identificación de *Map*, se realizó mediante la PCR IS*900* y f57. La combinación de estos resultados es necesaria debido al hallazgo de elementos similares a IS*900* (IS*900*-like) en otras micobacterias[30]; lo cual podría conducir a la obtención de resultados falsos positivos[5]. De igual manera, el análisis de tipificación realizado mediante el ensayo IS*1311* PCR-REA, permitió clasificar a los tres aislamientos como tipo C de *Map*; cepa que ha mostrado tener un amplio rango de huéspedes. En distintos estudios de tipificación molecular de *Map* realizados en otras regiones de México, también se ha encontrado este tipo de cepa en ganado caprino y bovino[11,12].

En estos estudios se utilizaron metodologías de tipificación diferentes a la empleada en este trabajo, como IS*900*-RFLP y PCR tipo específico. El ensayo IS*1311* PCR-REA permite también tipificar a las cepas de *Map*. La amplificación de un fragmento de 608 pb de IS*1311* combinado con el análisis de restricción enzimática con *Hinf*I, pone de manifiesto la mutación presente en el nucleótido 223 (C/T), presente en algunas copias de IS*1311* en cepas del tipo C y ausente en las del tipo S[9,10]. Aunque los tipos C y S obtenidos mediante esta técnica corresponden con los descritos por IS*900*-RFLP[9], IS*1311* PCR-REA no permite subtipificar a las cepas de *Map*; para lo cual es necesario utilizar técnicas como IS*900*-RFLP o el ensayo de unidades repetitivas intercaladas micobacterianas-repeticiones en tándem de número variable (MIRU-VNTR).

Los tres aislamientos obtenidos en este estudio, fueron analizados por medio del ensayo MIRU-VNTR, según la metodología reportada por Thibault *et al*[31], identificándose el patrón INMV2 en el aislamiento de origen bovino, mientras que para los dos aislamientos de origen ovino los resultados no fueron concluyentes ya que solamente en uno de ellos se pudieron amplificar algunos de los locus que contempla la prueba de tipificación (A.K. Gioffré, comunicación personal). En México, no se conocen estudios de genotipificación de *Map* por medio de esta técnica; sin embargo distintos reportes muestran que es uno de los patrones predominantes que circulan en varios países de Europa y también en Argentina[31,32]. Por lo tanto este resultado indicaría que al menos, uno de los genotipos más frecuentes está presente en el país.

Los resultados presentados en este estudio confirman la presencia de *Map* en la región y contribuyen a tener mayor conocimiento sobre su distribución en el país. Los resultados sugieren la presencia, circulación y transmisión del tipo C de *Map* entre el ganado bovino y ovino sin embargo, no se descarta la presencia de otros tipos de *Map* en la región. Lo anterior hace necesario el desarrollo de mas estudios como el que aquí se presenta con la inclusión de técnicas adicionales de subtipificación como IS*900* RFLP o MIRU-VNTR y la incorporación de una mayor cantidad de animales tanto domésticos como silvestres, para lograr un mejor conocimiento acerca de la

biodiversidad de *Map*, las dinámicas de transmisión y las fuentes de infección en Baja California.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a la Dra. Andrea Gioffré del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) de Buenos Aires Argentina, por la realización del análisis MIRU-VNTR en los tres aislamientos obtenidos en el presente estudio.

El primer autor fue estudiante de doctorado con beca CONACYT, correspondiente a la CONVOCATORIA DE BECAS CONACYT NACIONALES ENERO-JUNIO 2009, durante el desarrollo del estudio.

LITERATURA CITADA

1. Harris NB, Barletta RG. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* Veterinary Medicine. Clin Microbiol Rev 2001; 14:489-512.

2. Cocito C, Gilot P, Coene M, de Kesel M, Poupart P, Vannuffel P. Paratuberculosis. Clin Microbiol Rev 1994; 7(3):328-45.

3. Stevenson K, Hughes VM, de Juan L, Inglis NF, Wright F, Sharp JM. Molecular characterization of pigmented and nonpigmented isolates of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. J Clin Microbiol 2002; 40:1798-1804.

4. Collins DM, Gabric DM, De Lisle GW. Identification of a repetitive DNA sequence specific to *Mycobacterium paratuberculosis*. *FEMS* Microbiol *Letters* 1989; 51:175e 178.

5. Vansnick E, De Rijk P, Vercammen F, Geysen D, Rigouts L, Portaels F. Newly developed primers for the detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. Vet Microbiol 2004; 100:197-204.

6. Collins DM, Gabric DM, de Lisle GW. Identification of two groups of *Mycobacterium paratuberculosis* strains by restriction endonuclease analysis and DNA hybridization. J Clin Microbiol 1990; 28(7):1591–1596.

7. Pavlik I, Horvathova A, Dvorska l, Bartl J, Svastova P, de Maine R, *et al*. Standardisation of restriction fragment length polymorphism analysis for

Mycobacterium avium subspecies *paratuberculosis*. J Microbiol Methods 1999; 38:155–167.

8. Alexander DC, Turenne CY, Beher MA. Insertion and deletion events that define the pathogen Mycobacterium avium subsp. Paratuberculosis. J of Bacteriol 2009; 191:1018-1025.

9. Whittington RJ, Marsh I, Choy E, Cousins D. Polymorphisms in IS*1311*, an insertion sequence common to *Mycobacterium avium* and *M. avium* subsp. *paratuberculosis*, can be used to distinguish between and within these species. Mol Cell Prob 1998; 12:349-358.

10. Marsh I, Whittington RJ, Cousins D. PCR-restriction endonuclease analysis for identification and strain typing of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and *Mycobacterium avium* subsp. *avium* based on polymorphisms in IS*1311*. Mol Cell Prob 1999; 13:115–126.

11. Chávez-Gris GG, Trigo-Tavera FJ, Svastova P, Pavlik I. Genetic polimorphism identification from *Mycobacterium avium* subspecie *paratuberculosis* in goats in Central Mexico. Vet Mex 2004; 35:75–82.

12. Favila-Humara LC, Chávez-Gris GG, Carrillo-Casas EM, Hernández-Castro R. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* detection in Individual and bulk tank milk samples from bovine herds and caprine flocks. Foodborne Pathog Dis 2010; 7(4):351-355.

13. Estévez-Denaives I, Hernández-Castro R, Trujillo-García AM, Chávez-Gris GG. Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* in goat and sheep flocks in Mexico. Small Rumin Res 2007; 72:209–213.

14. Jaimes NG, Santillán MA, Hernández OA, Córdova D, Guzmán CC, Arellano B, *et al*. Detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* by nested-PCR of ovine fecal samples. Vet. Mex 2008; 39(4):377-386.

15. Consejo Técnico Consultivo Nacional de Salud Animal (CONASA). Plan estratégico del programa para la atención de la paratuberculosis en ganado bovino, ovino y caprino en México. 2010 [en línea] http://www.conasamexico.org.mx/conasa/pdf/. Consultado 27 jul, 2012.

16. Harris B, Robbe-Austerman S, Dykema P, Fett K, Stuber T, Stokes K. Laboratory Methods for isolation and identification of *Mycobacterium avium* spp. *paratuberculosis* (Johne´s Disease). Manual for isolation and identification of *Mycobacterium paratuberculosis.* USDA; 2009.

17. Kawaji S, Taylor DL, Mori Y, Whittington RJ. Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in ovine feces by direct quantitive PCR has similar or

greater sensitivity compared to radiometric culture. Vet Microbiol 2007; 125(1–2):36–48.

18. Chiodini RJ, Van Kruiningen HJ, Merkal RS. Ruminant paratuberculosis (Johne's disease): The current status and future prospects. Cornell Vet 1984; 74:218-62.
19. García-Marín JF, Pérez V, García de Jalón JA, De las Heras M, Barberá M, Fernández de Luco D, *et al*. Diagnóstico de casos clínicos de paratuberculosis ovina y caprina. Med Vet 1994; 11(9):491-502.

20. Gumber S, Eamens G, Whittington RJ. Evaluation of a Pourquier ELISA kit in relation to agar gel immunodiffusion (AGID) test for assessment of the humoral immune response in sheep and goats with and without Mycobacterium paratuberculosis infection. Vet Microbiol 2006; 115(1-3):91-101.

21. Attili AR, Ngu-Ngwa V, Preziuso S, Pacifici L, Domesi A, Cuteri V. Ovine Paratuberculosis: A Seroprevalence Study in Dairy Flocks Reared in the Marche Region, Italy. Vet Med Int 2011; 2011:782875.

22. Collins DM, Hilbink F, West DM, Hosie BD, Cooke MM, de Lisle GW. Investigation of *Mycobacterium paratuberculosis* in sheep by faecal culture, DNA characterization and the polymerase chain reaction. Vet Rec 1993; 133:599–600.

23. Whittington RJ, Marsh I, Mcallister S, Turner MJ, Marshall DJ, Fraser CA. Evaluation of modified BACTEC 12B radiometric medium and solid media for the culture of *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* from sheep. J Clin Microbiol 1999; 37:1077–1083.

24. Whittington RJ, Fell S, Walker D, McAllister S, Marsh I, Sergeant E, *et al*. Use of pooled fecal culture for sensitive and economic detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in flocks of sheep. J Clin Microbiol 2000; 38:2550-2556.

25. Kalis CH, Hesselink JW, Barkema HW, Collins MT. Culture of strategically pooled bovine fecal samples as a method to screen herds for paratuberculosis. J Vet Diagn Invest 2000; 12:547-551.

26. Cousins DV, Evans RJ, Francis BR. Use of BACTEC radiometric culture method and polymerase chain reaction for the rapid screening of feces and tissues for *Mycobacterium paratuberculosis*. Aust Vet J 1995; 72:458–462.

27. Eamens GJ, Whittington RJ, Marsh IB, Turner MJ, Saunders V, Kemsley PD, *et al*. Comparative sensitivity of various faecal culture methods and ELISA in dairy cattle herds with endemic Johne's disease. Vet Microbiol 2000; 77:357–367.

28. Whittington RJ. Factors Affecting Isolation and Identification of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from Fecal and Tissue Samples in a Liquid Culture System. J Clin Microbiol 2009*;* 47(3):614-622.

29. de Juan L, Álvarez J, Romero B, Bezos J, Castellanos E, Aranaz A, *et al*. Comparison of four different culture media for isolation and growth of type II and type I/III *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* strains isolated from cattle and goats. Appl Environ Microbiol 2006; 72(9):5927-32.

30. Englund S, Bolske G, Johansson KE. An IS900-like sequence found in a Mycobacterium sp. other than *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *FEMS* Microbiol Lett 2002; 209:267-271.

31. Thibault VC, Grayon M, Boschiroli ML, Hubbans C, Overduin P, Stevenson K, *et al*. New variable-number tandem-repeat markers for typing *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and *M. avium* strains: comparison with IS*900* and IS*1245* restriction fragmentlength polymorphism typing. J Clin Microbiol 2007; 45:2404-10.

32. Gioffré A, Correa M, Alvarado-Pinedo MF, Montenegro V, Vaca J, Morsella C, *et al*. Exploiting multiple-locus variable number tandem repeat analysis to evaluate strain diversity of *M. avium* complex in Argentina. Proceedings of the 11th International Colloquium on Paratuberculosis. February 5 to 10, 2012. p264.

3.2 Seroprevalence survey of Johne's disease in sheep flocks in the Mexicali Valley of Baja California, Mexico.

Correa-Muñoz M[1], Rodríguez-Castillo JL[2], Cárdenas-Reyna T[1], De la Mora-Valle A[1], López-Valencia G[2], Rentería-Evangelista TB[2], Monge-Navarro FJ[2], Medina-Basulto GE[1], Eda S[3], Hori-Oshima S[1]*

*Corresponding author

Affiliation:

[1] *Division of Animal Health, and [2] Division of Disease Diagnosis, Research Institute of Veterinary Sciences, Autonomous University of Baja California, Mexico. [3]Center for Wildlife Health, Department of Forestry, Wildlife and Fisheries,University of Tennessee, USA.

Correspondence to:

Tel: +52-686-563-6906, Fax: +52-686-563-6906, Ext. 113

E-mail: shori@uabc.edu.mx

Articulo enviado a revisión a la revista: Tropical Animal Health and Production.

Abstract

Purpose To determine the prevalence of ovine Johne's disease (OJD) in Mexicali Valley in the State of Baja California, Mexico.

Methods A serological surveillance of OJD was carried out. Blood samples from individual animals of 44 sheep flocks in the Mexicali Valley were obtained between August 2010 to February 2011. A total of 690 sera were analyzed by an in-house enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies specific to ethanol-extracted MAP surface antigen. A cut-off value (S/P=0.4) was set 2 SD above the mean of negative control sera. One ELISA-positive animal with clinical signs of OJD was examined for histopathology and fecal bacteriology.

Results The overall prevalence of was 13.5% (93/690). The flock level prevalence was 39% (17/44) if the flocks were considered positive when at least 2 seropositive animals were present. MAP isolate was successfully obtained from a clinical case of ovine JD in a heavily infected flock, confirming the dissemination of MAP in environment.

Conclusions Due to the chronic nature of the OJD and the lack of hygiene practices in small farmers in Baja California, there is a increased risk of disease propagation. The effective disease control measures should be taken to reduce the accumulation of MAP in environment and improve the animal health in both sides of the countries in US-Mexico border.

Keywords: Ovine Johne's Disease, prevalence, Mexico, Ethanol-vortex ELISA, *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*

Introduction

Johne's disease (JD) is a chronic enteritis of ruminant species caused by infection with *Mycoabcterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) (Harris and Barletta 2001). JD causes substantial economic loss to livestock and dairy industry due to the low productive and reproductive performance (Hutchinson 1996), particularly in subclinical animals with moderate and heavy fecal MAP shedding (Raizman et al. 2007, 2009).

In Mexico, serological studies in cattle, goat and sheep in the south-central region of the country demonstrated the disease prevalence from 0 - 42% in different cities during the period from 2004 to 2010 (Esteves-Denaives et al. 2007; Jaimes et al. 2008; CONASA 2010), nevertheless the nationwide estimation of the prevalence of JD is not available. The economic impact of the JD on Mexican dairy cattle due to the reduced production was estimated at approximately 800 US dollars per cow per year for a population size of 30,000 with a prevalence of 8.87% in the central Mexico (CONASA 2010). Our previous study showed a similar seroprevalence in dairy cattle in the state of Baja California in northwestern Mexico (Hori-Oshima et al. 2007), however, the sole impact of JD in Baja California is not determined. We also have observed several sheep flocks severely affected by ovine JD (OJD) in different cities of the state of Baja California, where producers are generally not aware of this disease, and do not take any action to prevent the spread of the disease.

Objective of this study was to conduct a serological survey of OJD in sheep flocks in the Mexicali Valley in the state of Baja California, Mexico, to provide the basis of information to implement the appropriate disease control measures in the region. We used the in-house made ELISA test called EVELISA, to detect the antibodies specific to ethanol-extracted MAP antigens. The EVELISA test has demonstrated high sensitivity and specificity for diagnosis of cows with JD (Eda et al 2005, 2006, 2007).

Materials and Methods

Study area The study was conducted in total of 44 sheep flocks in the Mexicali Valley, Mexico. The Mexicali Valley is located in the State of Baja California northwest of the country, and represents the agricultural center in the state. The valley is on the Colorado River delta's coastal which extends to the Gulf of California. To the north lies the State of California, United States, with its continuation of the plain into the Imperial Valley. To the south and west is the Sierra Cucapá, a natural extension of the California cordillera. For its latitudinal location (≅32° N), elevation (-8m below sea level) and geographical position bound to the western edge of the Arizona-Sonora desert, the climate condition of Mexicali Valley is very hot and dry, reaching 50ºC during summer and minimum temperatures of -5ºC in winter, with precipitation averages of approximately 75mm/year (Garcia, 2009).

Study design A cross-sectional study design based on serological survey was conducted. Convenience sampling was applied. Serum samples were originally taken for the routine test for brucellosis and sent to the Laboratory of Brucellosis and Tuberculosis in the Research Institute of Veterinary Sciences of Autonomous University of Baja California. All the samples received from August 2010 to February 2011, a total of 690 animals over 2 months old, from 44 sheep flocks were included in this study. The number of animals tested per flock varied from 1 to 65 according to the flock size. According to census (INEGI, 2007) the sample size (n=690) corresponds approximately 4.5% and 1.9% of the sheep population in the city of Mexicali, and the state of Baja California, respectively. The general information of flock, including animal strain, production purpose, flock size, management type and vaccination program was recorded.

Serology In-house ELISA, named EVELISA, using ethanol-extracted surface antigen of MAP was developed as described by Eda et al. (2006). Briefly, a MAP strain ATCC19698 was used for the antigen preparation after bacterial culture in Middlebrook 7H9 medium (Becton Dickinson, NJ) with 2mg/L Mycobactin J (Institut Pourquier, France) at 37 °C until used for experiments. Harvested mycobacteria were suspended in 80% ethanol and agitated by vortex to dislodge surface lipid antigens. After removing the bacilli by centrifugation, ethanol-extracted antigen was immobilized on a 96-well

plate (20µg/well) by evaporating the solution for overnight. The coated-plates were sealed and stored at 4°C and used less than 2 months. For the ELISA test, the immobilized plates were reacted with serum samples diluted 1:100 in buffer A (10mM phosphate-buffered saline, pH 7.0, containing 0.05% [v/v] Tween 80 and 10% bovine serum albumin). After washing 4 times with buffer A, rabbit anti-sheep IgG (H+L) antibody conjugated with horseradish peroxidase (KPL Inc., MD) was added, and the antigen-antibody complexes were detected using a horseradish peroxidase substrate (TMB single solution chromogen substrate, Invitrogen, CA) according to the manufacturer's instructions. Optical densities at 450nm were measured by a plate reader. A ratio of sample/positive (S/P) value was determined for each sample using a commercial positive control serum (Allied Monitor, Inc., MO) and a cut-off S/P value of 0.4 was applied as a value 2 SD above the mean of negative control sera (n=20). Control sera used to standardize the EVELISA included positive and negative reagents of 3 commercial ELISA kits (Allied Monitor, Inc., MO; Institut Pourquier, France; Kyoritsu Seiyaku, Co., Japan), 7 positive sera of naturally infected ruminants (1 dairy cow, 3 sheep, 3 goat) from the states of Baja California or Aguascalientes, confirmed by histopathology and fecal bacteriology, and negative sera from 16 lambs of a sheep flock of the Research Institute of Veterinary Sciences of the Autonomous University of Baja California, in which all the reproducers were negative to a commercial ELISA test (Institut Pourquier, France) at the beginning of this study. Our preliminary estimation of sensitivity (Se) and specificity (Sp) of the EVELISA test applied in this study was 70% and 95%, respectively (not shown). The statistical analyses of prevalence of OJD were performed by using the χ^2 test. Differences with a ρ value of < 0.05 were considered significant.

Clinical case of OJD To confirm the presence of clinical disease and the dissemination of MAP in environment, a necropsy was performed in a > 3 year old ELISA-positive sheep with clinical signs of OJD. For histological analysis ileum and intestine sections were collected and preserved in 10% neutral buffered formalin. Tissues embedded in paraffin were prepared for microtome sectioning 4µm and for staining with hematoxylin and eosin or Ziehl-Neelsen staining as described in Payeur et al. (1993). Fecal bacteriological culture was carried out in modified Middlebrook 7H10

medium according to Harris et al. (2009). The flock of origin had history of suspected OJD cases for last 4 years. A commercial ELISA test (Institut Pourquier, France) was applied to all reproducers (n=89) of this flock in August 2012.

Results

Out of the 690 sera tested in this study, 93 were classified as seropositive for MAP. The overall seroprevalence of JD in 44 sheep flocks in Mexicali Valley was 13.5% (93/690). Table 1 summarize the results in 3 groups of flocks classified according to the number of animals tested per flock, as follows: group 1, less than 10, group 2, between 11 and 20, group 3, more than 21. The prevalence for each group was 13.5% (15/111) for group 1, 31.0% (36/116) for group 2, and 9.1% (42/463) for group 3, showing the significant differences ($\rho < 0.01$) in each group analyzed (Table 1). The observed flock level prevalence was 39% (17/44) if the flocks were considered positive when at least 2 seropositive animals were present.

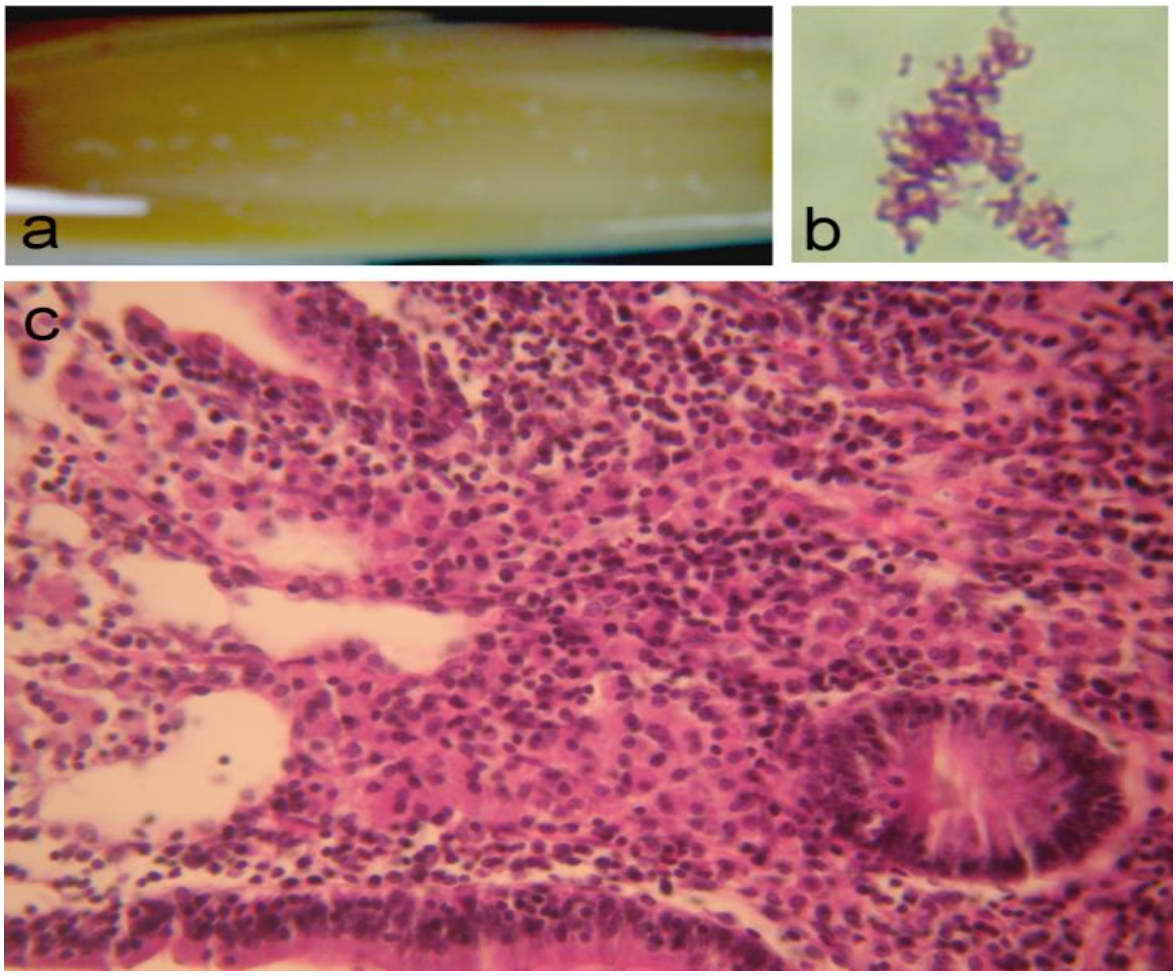
To confirm the presence of clinical diseases, we carried out the fecal culture and necropsy of a seropositive sheep which died with severe clinical signs such as mandibular edema, diarrhea and weight loss. The flock of origin had history of suspected clinical OJD cases since 2009. The in-flock seroprevalence determined by a commercial ELISA test was 30.3% (27/89) in August 2012. The fecal culture resulted in a growth of numerous colonies (>50 colonies in 3/4 replicate tubes) after 8 weeks, revealed as acid-fast bacilli by Ziehl-Neelsen staining (Figure 1 A, B). Gross pathological changes in intestine were not observed in this sheep and Taenia tapeworm infestation was thought to be a direct cause of death. However, histological changes in ileum mucosa and submucosa were observed with large numbers of acid-fast bacilli and infiltration of macrophages, which resembled a “multibacillary” form of OJD (Clarke and Little 1996).

Table 1. Seroprevalence of OJD determined by ELISA using ethanol-extracted MAP antigen. A total of 690 sheep blood samples collected from 44 flocks in the Mexicali Valley were analyzed. Flocks were classified into three groups by number of animals tested per flock, depending on its size. The prevalence (%) in each group analyzed and the distribution of positive animals within group are presented.

No.Tested per flock (mean)	Prevalence rate (%)		No.Positive per flock	No.Flock (n=44)
	Overall	In-flock range		
1-10	15/111 (13.5)*	0/1 (0)–1/2(50)	0	12
(4.6)			1	9
			2	3
11-20	36/116 (31.0)*	1/18(5.6)–11/16 (68.6)	1	2
(16.6)			2	2
			>3	3
21≤, ≤65	42/463 (9.1)*	0/32 (0)–6/24 (25)	0	3
(35.6)			1	1
			2	1
			>3	8
total	93/690 (13.5)			

*ρ < 0.01, significant difference between these columns

Figure 1. Diagnosis of a clinical case of OJD from a heavily infected flock (prevalence of 30.1%. **a)** Result of a fecal culture. Mycobactin-dependent colony growth were observed in modified Middlebrook 7H10 medium. Photographed after 12 weeks. **b)** Acid fast stain of the isolate (×1000). Bar, 5µm. **c)** Granulomatous lesion in ileum. Hematoxylin-Eosin staining (×1000).



Discussion

We determined the seroprevalence in 44 sheep flocks in the Mexicali Valley, the area with non-temperate subtropical climate in in US-Mexican international boundary in northwestern Mexico. Due to the sampling method applied in this study the prevalence

data should not be explored for a total population in the Mexicali Valley, however, the global prevalence (13.5%) of OJD reported here was comparable with the data obtained from a systematic survey for bovine JD in the California-Mexican border region (Adaska et al. 2003; Hori-Oshima et al. 2007). Considering the potential risk of MAP to human health (Nacy and Buckley 2008; Momotani et al. 2012), the contamination and accumulation of MAP in water, soil, and wildlife animals, due to heavy shedding from infected farm animals would have impact for both countries in both animal and public health. Out results provide sufficient evidence for the need of implementing appropriate control measures of OJD in Baja California.

We have observed the enormous animal loss associated with JD in several local sheep flocks heavily contaminated with MAP (unpublished). Despite the fact that the JD is a very common disease in ruminants in Mexico (Denaives et al. 2007; CONASA 2010), there is a lack of knowledge of this disease in the country, especially in small scale operations with backyard production of sheep and goat. Paez-Rubio et al. (2005) reported the profiles of microorganisms in wastewater in the city of Mexicali and showed that the viable microorganisms can be aerosolized. The presence of *Mycobacterium* spp. was not shown in their results, partly because the conventional method used for DNA extraction as well as PCR condition were not suitable for the sensitive detection of the mycobacterial DNA from environmental samples (Cook and Britt 2007; Kaser et al. 2009). It would be important to detect MAP as well as other infectious pathogens in farm environment waste in the Mexicali Valley that includes samples of aerosols, waterway and soils, and minimize the source of exposure between and within farms and reduce propagation of the disease.

Although there is a growing concern of MAP contamination in foods, water and environment (USDA 2010), the control of JD is still a challenge primarily because the lack of effective vaccines and affordable diagnostic tests with high sensitivity levels that help to implement the surveillance of the disease. ELISA test has been used widely in the epidemiological studies to describe the magnitude of the JD because of its low cost and rapid test time. Sensitivity (Se) and specificity (Sp) of ELISA test in the detection of JD often vary substantially by antigen choice (Collins et al. 2005; Harris y Barleta 2001)

and infection status of animals (Sweeney et al. 1995; Dargatz et al. 2001; Nielsen and Toft 2008). The EVELISA, which uses ethanol-extracted MAP antigen, has previously reported to have higher sensitivity than commercial ELISA tests in cattle (Eda et al. 2005, 2006, Speer et al. 2006). The simple procedure of our in-house EVELISA test with preliminary results of Se (70%) and Sp (95%) used in this study suggest that the EVELISA might be first choice for diagnosis of JD including small ruminants. A more extensive study using a larger sample size is required to evaluate the accuracy of EVELISA test in small ruminants. Although we did not used the serum samples pre-absorbed with antigens of *Mycobacterium phlei* to reduce the antibodies cross-reactive to environmental mycobacterias (Yokomizo 1986), specificity of EVELISA test in detecting OJD could be improved when used in combination with pre-absorbed samples as reported recently in diagnosis of bovine JD (Scott et al. 2010).

The strain of MAP that infects sheep will vary according to the geographical region and the presence of other animal species (Begg and Whittington, 2008). There are very few reports on genotypes of MAP recovered in Mexico. Chavez-Gris et al. (2004) reported the “C1” type MAP determined by IS900 polymorphism in a goat flock in central Mexico. Favila-Humara et al. (2010) showed the concurrent infection of C, I and S type in milk of cow and goat. Verna et al. (2007) demonstrated that the MAP strain type can have significant influence on the severity of pathological lesions and immunological outcomes. The molecular typing of the MAP isolate was not performed in this report, but the growth rate (< 8 weeks) in solid medium does not resemble the S type strain (Whittington et al. 1999). Recently, in other dairy farms from the Mexicali Valley we have isolated different genotypes of MAP (unpublished). Thus, MAP strain could be responsible for the severity of the disease in some sheep flocks in Baja California. Detection and culling strategy directed to the heavily shedding animals as well as the surveillances of genetic variations of circulating MAP might contribute the better control of the disease.

Acknowledgements

Authors thank Gerardo Segura Bernal, DVM, M.Sc. of the Autonomous University of Aguascalientes for providing the positive sera from goat and sheep. MMC, JLR and TCR received the Fellowship for Graduate Students from Mexican Council for Science and Technology (CONACyT). This study was partially supported by a research grant from Autonomous University of Baja California (UABC, CA201/5/C/20/14).

References

Adaska, J.M. and Anderson, R.J., 2003. Seroprevalence of Johne's-disease infection in dairy cattle in California, USA, Preventive Veterinary Medicine, 60, 255-261

Begg, D.J. and Whittington, R.J., 2008. Experimental animal infection models for Johne's disease, an infectious enteropathy caused by *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis*, Veterinary Journal, 176, 129-145

Chavez-Gris, G., Trigo-Tavera, F.J., Svastova, P. and Pavlik, I., 2004. Genetic polymorphism identification from *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis in goats in central Mexico, Veterinaria Mexicana, 35, 71-82

Clarke, C.J. and Little, D., 1996. The pathology of ovine paratuberculosis: Gross and histological changes in the intestine and other tissues, Journal of Comparative Pathology, 114, 419-437

Collins, M.T., Wells, S.J., Petrini, K.R., Collins, J.E., Schultz, R.D. and Whitlock, R.H., 2005. Evaluation of five antibody detection tests for diagnosis of bovine paratuberculosis, Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, 12, 685-692

Cook, K.L. and Britt, J.S., 2007. Optimization of methods for detecting *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* in environmental samples using quantitative, real-time PCR, Journal of Microbiological Methods, 69, 154-160

CONASA, 2010. Plan estratégico del programa para la atención de la paratuberculosis en ganado bovino, ovino y caprino en México. Consejo Técnico Consultivo Nacional de Sanidad Animal, México.

Dargatz, D.A., Byrum, B.A., Barber, L.K., Sweeney, R.W., Whitlock, R.H., Shulaw, W.P., Jacobson, R.H. and Stabel, J.R., 2001. Evaluation of a commercial ELISA for diagnosis of paratuberculosis in cattle, Journal of the American Veterinary Medical Association, 218, 1163-1166

Eda, S., Elliott, B., Scott, M.C., Waters, W.R., Bannantine, J.P., Whitlock, R.H. and Speer, C.A., 2005. New method of serological testing for *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* (Johne's disease) by flow cytometry, Foodborne Pathogens and Disease, 2, 250-262

Eda, S., Bannantine, J.P., Waters, W.R., Mori, Y., Whitlock, R.H., Scott, M.C. and Speer, C.A., 2006. A highly sensitive and subspecies-specific surface antigen enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of Johne's disease, Clinical and Vaccine Immunology, 13, 837-844

Eda, S., Branscum, A.J., Kaneko, Y., Scott, M.C. and Speer, C.A., 2007. Development of a novel enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of Johne's disease, Poultry Science, 86, 7-8

Estevez-Denaives, I., Hernandez-Castro, R., Trujillo-Garcıa, A.M. and Chavez-Gris, G., 2007. Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in goat and sheep flocks in Mexico, Small Ruminant Research, 72, 209–213

García, C.O.R., Tejada, M.A. and Bojórquez, M.G. 2009. Urbanization effects upon the air temperature in Mexicali, B. C., México. Atmósfera 22(4), 349-365.

Harris, N.B. and Barletta, R.G., 2001. *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* in veterinary medicine, Clinical Microbiology Reviews, 14, 489-512

Harris, N.B., Robbe-Austerman, S., Dykema, P., Fett, K., Stuber, T. and Stokes, K., 2009. Laboratory Methods for Isolation and Identification of *Mycobacterium avium* spp. *paratuberculosis* (Johne's Disease). National Veterinary Services Laboratories, United States Department of Agriculture.

Hori-Oshima, S., Campos-Barba, L.A., Moreno-Rosales, J.F., Renteria-Evangelista, T.B., Lopez-Valencia, G., De la Mora, A. and Corral-Madrid, A., 2007. Seroprevalence of bovine paratuberculosis in dairy cattle herds in the Mexico-U.S. border area in Baja California, Mexico, Proceedings of 9th International Colloquium on Paratuberculosis, 71

Hutchinson, L.J., 1996. Economic impact of paratuberculosis, Veterinary Clinics of North America-Food Animal Practice, 12, 373-81

INEGI, Estados Unidos Mexicanos, Censo Agropecuario 2007.

Jaimes, N.G., Santillán, F.M.A., Hernández, C.O.A., López, D.C., Guzmán, R.C.C., Arellano, R.B., Díaz, A.E., Tenorio, G.V.R. and Cuéllar, O.A., 2008. Detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* by nested-PCR of ovine fecal samples. Veterinaria Mexico, 39, 377-386

Kaser, M., Ruf, M.T., Hauser, J., Marsollier, L., and Pluschke, G., 2009. Optimized Method for Preparation of DNA from Pathogenic and Environmental Mycobacteria, Applied and Environmental Microbiology, 75, 414-418

Martínez, C.A.G., Santillán, F.M.A., Guzmán, R.C.C., Favila, H.L.C., Córdova, L.D., Díaz, A.E., Hernández, A.L. and Blanco, O.M.A., 2012. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the diagnosis of bovine paratuberculosis, Revista Mexicana en Ciencias Pecuarias, 3, 1-18

Momotani, E., Romona, N.M., Yoshihara, K., Momotani, Y., Hori, M., Ozaki, H., Eda, S. and Ikegami, M. 2012. Molecular pathogenesis of bovine paratuberculosis and human inflammatory bowel diseases, Veterinary Immunology and Immunopathology, 148, 55-68

Nacy, C., and Buckley, M., 2008. *MYCOBACTERIUM AVIUM PARATUBERCULOSIS*: Infrequent Human Pathogen or Public Health Threat? Report from the American Academy of Microbiology.

Nielsen, S.S. and Toft, N., 2008, Ante mortem diagnosis of paratuberculosis: A review of accuracies of ELISA, interferon-gamma assay and faecal culture techniques, Veterinary Microbiology, 129, 217-235

Ott, S.L., Wells, S.J. and Wagner, B.A., 1999. Herd-level economic losses associated with Johne's disease on US dairy operations, Preventive Veterinary Medicine, 40, 179-92

Payeur, J.B., Jarnagin, J.L., Marquardt, J.G., Schaper, L.A. and Martin, B.M., 1993. Laboratory methods in veterinary mycobacteriology for the isolation and identification of mycobacteria. Iowa, USA, USDA, Animal and Plant Health Inspection Service. National Veterinary Services Laboratories, 39-40

Raizman, E.A., Fetrow, J., Wells, S.J., Godden, S.M., Oakes, M.J. and Vazquez, G., 2007. The association between *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* fecal shedding or clinical Johne's disease and lactation performance on two Minnesota, USA dairy farms, Preventive Veterinary Medicine, 78, 179-195

Raizman, E.A., Fetrow, J.P. and Wells, S.J., 2009. Loss of income from cows shedding *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* prior to calving compared with cows not shedding the organism on two Minnesota dairy farms, Journal of Dairy Science, 92, 4929-4936

Scott, M.C., Bannantine, J.P., Kaneko, Y., Branscum, A.J., Whitlock, R.H., Mori, Y., Speer, C.A. and Eda, S., 2010. Absorbed EVELISA: a diagnostic test with improved specificity for Johne's disease in cattle, Foodborne Pathogens and Disease, 7, 1291-6

Speer, C.A., Scott, M.C., Bannantine, J.P., Waters, W.R., Mori, Y., Whitlock, R.H. and Eda, S., 2006. A novel enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* infections (Johne's disease) in cattle, Clinical and Vaccine Immunology, 13, 535-540

Sweeney, R.W., Whitlock, R.H., Buckley, C.L. and Spencer, P.A., 1995. Evaluation of a commercial Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay for the diagnosis of paratuberculosis in dairy-cattle, Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 7, 488-493

USDA, National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods, 2010. Assessment of food as a source of exposure to *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (MAP), Journal of Food Protection, 73, 1357-1397

Verna, A.E., Garcia-Pariente, C., Munoz, M., Moreno, O., Garcia-Marin, J.F., Romano, M.I., Paolicchi, F., and Perez, V., 2007. Variation in the immuno-pathological responses of lambs after experimental infection with different strains of *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis*, Zoonoses and Public Health, 54, 243-252

Whittington, R.J., Marsh, I., McAllister, S., Turner, M.J., Marshall, D.J., and Fraser, C.A., 1999. Evaluation of modified BACTEC 12B radiometric medium and solid media for culture of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from sheep, Journal of Clinical Microbiology, 37, 1077-1083

Whittington, R.J., Fell, S., Walker, D., McAllister, S., Marsh, I., Sergeant, E., Taragel, C.A., Marshall, D.J. and Links, I.J., 2000. Use of pooled fecal culture for sensitive and economic detection *of Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* infection in flocks of sheep, Journal of Clinical Microbiology, 38, 2550-2556

Whittington, R.J. and Sergeant, E.S.G., 2001. Progress towards understanding the spread, detection and control of *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* in animal populations, Australian Veterinary Journal, 79, 267-278

Yokomizo, Y., 1986. Evaluation of an Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay (Elisa) using Mycobacterium-phlei - absorbed serum for the diagnosis of bovine paratuberculosis in a field-study. Jarq-Japan Agricultural Research Quarterly, 20, 60-67

CAPÍTULO 4

Conclusiones

CONCLUSIONES GENERALES

1. En el presente estudio por medio del cultivo fecal se obtuvieron tres aislamientos de *Map*, dos de origen ovino y uno de origen bovino.

2. Los aislamientos de origen ovino, mostraron mayor grado de dificultad para crecer *in vitro*, en comparación con el aislamiento de origen bovino.

3. El período de incubación de los aislamientos 2 y 3 fue de 6 semanas, tiempo que está de acuerdo con lo reportado para las cepas del tipo C de *Map*; lo anterior confirma el hecho de que el tiempo requerido para el crecimiento de las cepas de *Map*, esta correlacionado con el origen del huésped, mas no con el tipo de cepa.

4. Los tres aislamientos fueron identificados como *Map* por medio de la PCR IS*900*, resultado que fue confirmado por la PCR f57.

5. La tipificación realizada mediante la técnica IS*1311* PCR-REA, identificó a los tres aislamientos como pertenecientes al Tipo C o Tipo II de *Map*.

6. No se puede descartar la presencia de otros tipos de *Map* en la región, por lo tanto son necesarios más estudios que incluyan una mayor cantidad de animales para poder determinarlo.

7. La seroprevalencia global de la paratuberculosis ovina en el Valle de Mexicali fue del 13.5% (93/690); mientras que a nivel de rebaño fue del 39% (17/44), considerando el resultado seropositivo de al menos dos animales/rebaño.

8. Debido al método de muestreo utilizado (muestreo por conveniencia), la seroprevalencia encontrada no puede ser extrapolada a todos los rebaños ovinos del Valle de Mexicali.

9. La estimación preliminar de la sensibilidad y especificidad del EVELISA fue del 70% y 95%, respectivamente.

10. Se considera que el EVELISA puede ser una buena alternativa para el diagnóstico de la paratuberculosis ovina en Baja California, sin embargo son necesarios más estudios de investigación en donde se realice la preabsorción con antígenos *de M. phlei.*

11. En el presente estudio se encontraron evidencias moleculares y serológicas de la presencia de *Map* y de la enfermedad ocasionada por *Map*.

12. Los resultados obtenidos ayudarán al diseño de mejores estrategias para reducir la contaminación por *Map* en el ambiente, y de esta manera lograr un mejor control de la paratuberculosis en el Valle de Mexicali.