

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

Instituto de Ciencias Agrícolas

Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias



**DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO DE
LA PARATUBERCULOSIS OVINA
EN BAJA CALIFORNIA**

T E S I S

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

PRESENTA

M.C. ELIZAMA PONCE BARRAZA

DIRECTORA

DRA. SAWAKO OSHIMA

COMITÉ ASESOR

La presente tesis “**Diagnóstico serológico de la paratuberculosis ovina en Baja California**” realizada por la **C. Elizama Ponce Barraza**, dirigido por la **Dra. Sawako Oshima**, ha sido evaluada y aprobada por el Comité Particular abajo indicado, como requisito parcial para obtener el grado de:

Doctor en Ciencias Agropecuarias

Comité particular:

Dra. Sawako Oshima
Directora de tesis



Dr. Shigetoshi Eda
Co-Director

Dr. Gerardo Enrique Medina Basulto
Sinodal

Dr. Gilberto López Valencia
Sinodal

Dr. José Carloman Herrera Ramírez
Sinodal

AGRADECIMIENTOS

To Dr. Eda, who with great affection and dedication received me in his laboratory, always kind, patient and with the best disposition to help in my project, sharing his knowledge. Thanks you very much!

To Hunter Rice, thank you for always help me, for your patience and determination.

Al Dr. Gilberto López, por siempre tener un consejo certero, por sus enseñanzas la cuales son muchas, un ejemplo a seguir sin duda alguna!

A la Dra. Sawako, por su confianza, su apoyo y por todo el conocimiento brindado durante todo este tiempo.

A cada uno de mis maestros, durante mi posgrado en especial; Al Dr. Carlomán Herrera, Dr. Gerardo Median, por compartir sus conocimientos y siempre tener un consejo.

Al Consejo Nacional en Ciencia y Tecnología (CONACyT), por otorgar la beca para la realización de mis estudios de doctorado.

Al Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias, y al Instituto en Ciencias Agropecuarias por permitirme realizar el doctorado.

DEDICATORIA

A mis padres:

“Onoria Barraza y Juan Ponce”

Por ser mi mejor motivación en la vida, por estar en cada momento importante brindándome su apoyo, confianza y amor.

A mis herman@s y sobrinos:

Por su apoyo incondicional, gracias por siempre alegrar mis días.

A mi “Chucky”:

Por ser mi ejemplo a seguir, siempre impulsarme a ser mejor cada día.

Te amo.

ÍNDICE

| | |
|--|------|
| ÍNDICE DE FIGURAS..... | v |
| ÍNDICE DE CUADROS..... | vi |
| RESUMEN GENERAL..... | vii |
| ABSTRACT..... | viii |
| CAPÍTULO 1..... | 1 |
| I. INTRODUCCIÓN GENERAL..... | 2 |
| CAPÍTULO 2..... | 4 |
| II. ANTECEDENTES..... | 5 |
| 2.1. Generalidades..... | 5 |
| 2.2. Historia..... | 5 |
| 2.3. Clasificación..... | 6 |
| 2.4. Etiología..... | 7 |
| 2.5. Pared celular..... | 7 |
| 2.6. Genoma de MAP..... | 9 |
| 2.7. Cepas de MAP..... | 11 |
| 2.8. Metabolismo y Nutrición..... | 13 |
| 2.8.1. Dependencia a la micobactina..... | 15 |
| 2.9. Resistencia..... | 17 |
| 2.10. Epidemiología..... | 21 |
| 2.10.1. Transmisión..... | 21 |
| 2.10.1.1. Dosis infectiva..... | 22 |
| 2.10.2. Prevalencia de la Paratuberculosis..... | 23 |
| 2.10.3. Factores de riesgo..... | 24 |
| 2.11. Patogenia..... | 26 |
| 2.12. Diagnóstico..... | 33 |
| 2.12.1. Serología..... | 33 |
| 2.12.1.1. ELISA (Ensayo de Inmunoadsorción Ligado a Enzima)..... | 35 |
| 2.12.1.1.1. EVELISA (Etanol-Vortex ELISA)..... | 36 |
| 2.11.1.1.2. Reacción cruzada..... | 36 |

| | |
|--|-----|
| 2.12.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) | 37 |
| 2.12.3. Bacteriología | 38 |
| 2.12.3.1. Medios de cultivo sólidos y líquidos | 39 |
| 2.12.4. Necropsia..... | 39 |
| 2.12.5. Histopatología | 40 |
| 2.13. Control y prevención..... | 41 |
| BIBLIGRAFÍA CITADA..... | 43 |
| CAPÍTULO 3..... | 70 |
| III. ARTÍCULOS DERIVADOS DEL ESTUDIO..... | 71 |
| 3.1. Seroprevalence of Johne’s disease in sheep flocks in the Mexicali Valley of Baja California, Mexico. | 71 |
| 3.2. Evaluation of two in-house immunoenzymatic test for serodiagnosis of paratuberculosis in a sheep flock of mexicali valley, mexico. | 90 |
| CAPÍTULO 4..... | 104 |
| IV. CONCLUSIONES GENERALES | 105 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| Figura | Título | Página |
|---------------|---|---------------|
| 1 | Composición de la pared celular de MAP..... | 8 |
| 2 | Representación circular del genoma de MAP K-10..... | 11 |
| 3 | Filogenia de los tipos de cepa MAP..... | 12 |
| 4 | Casos de paratuberculosis en México 2004-2009 (ELISA) | 24 |
| 5 | Riesgo predicho de paratuberculosis en ganado lechero en México..... | 25 |
| 6 | Pared intestinal y tácticas de invasión de macrófagos utilizadas por MAP..... | 27 |
| 7 | Cinética de la respuesta inmune durante la infección experimental por MAP en ovejas..... | 30 |
| 8 | Fase clínica en rumiantes..... | 32 |

ÍNDICE DE CUADROS

| Cuadro | Título | Página |
|---------------|---|---------------|
| 1 | Características variables y diferenciales de MAP y otras micobacterias relacionadas | 14 |
| 2 | Presentación de MAP en bovinos y ovinos..... | 33 |
| 3 | Proteínas inmunogénicas utilizadas en pruebas serológicas dirigidas al diagnóstico de la PTB..... | 34 |
| 4 | Tipos de ELISAs..... | 35 |
| 5 | Vacuna actual vs. Vacuna ideal..... | 42 |

RESUMEN GENERAL

La paratuberculosis (PTB) es una enfermedad con implicación en salud pública, la cual causan grandes pérdidas económicas al sector salud y agropecuario, debido a la disminución en la producción tanto de carne como leche, baja fertilidad, y desecho prematuro del animal. El control se basa en la detección oportuna y eliminación de reactores, con el fin de evitar nuevas infecciones en el rebaño. En los reportes se evaluó la capacidad diagnóstica de ELISAs no comerciales en ovinos sin signos clínicos. 1) En el primer ensayo se estimó la prevalencia de la PTB en 40 rebaños ovinos del Valle de Mexicali, 681 muestras de suero fueron evaluados por EVELISA, ELISA no comercial en el cual se inmovilizó antígeno de superficie de *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* (MAP). En este estudio EVELISA fue capaz de diagnosticar como positivo a 180 animales (26.4%), se estimó una prevalencia verdadera del 82.45%, con una sensibilidad (Se) del 31% y especificidad (Sp) del 95%, el 65% de los rebaños ovinos fueron clasificados como positivos. En este ensayo no se utilizó el paso de preabsorción para eliminar posibles reacciones cruzadas. 2) En este ensayo se compararon dos ELISAs no comerciales (PPA y EVELISA) dirigidas al diagnóstico de la PTB ovina, se evaluaron 31 sueros de animales sin signos clínicos. En ELISA con PPA se utilizó *M. phlei* como preabsorción y en EVELISA *M. flavescens*. Obteniéndose una Se del 83.9% y 29%, una Sp de 100% y 100% respectivamente. EVELISA con preabsorción ha logrado mejorar la sensibilidad de pruebas comerciales, y podría ser una gran herramienta para el control de la PTB en México. El mismo protocolo ha sido empleado en el diagnóstico de la TB con resultados prometedores.

Palabras clave: Serología, ovinos, paratuberculosis, EVELISA.

ABSTRACT

Paratuberculosis (PTB) is a disease with public health implications, which cause great economic losses to the health and agricultural sector, due to the decrease in the production of meat and milk, low fertility, and premature waste of the animal. The control is based on the early detection and elimination of reactors, in order to avoid new infections in the flock. In the reports, the diagnostic capacity of homemade ELISAs in animals without clinical signs was evaluated. 1) In the first assay we estimated the prevalence of PTB in 40 sheep flocks of the Mexicali Valley, 681 serum samples were evaluated by EVELISA, a homemade ELISA in which the surface antigen of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (MAP) was immobilized. In this study EVELISA was able to diagnose 180 animals as positive (26.4%), a true prevalence of 82.45% was estimated, with a sensitivity (Se) of 31% and specificity (Sp) of 95%, 65% of the sheep flocks were classified as positive. In this test no preabsorption was used to eliminate possible cross-reactions. 2) In this assay, two domestic ELISAs (PPA and EVELISA) for the diagnosis of ovine PTB were compared, 31 sera from animals without clinical signs were evaluated. In ELISA with PPA, *M. phlei* was used as preabsorption and in EVELISA *M. flavescens*. Obtaining a Se of 83.9% and 29%, a Sp of 100% and 100% respectively. EVELISA with preabsorption has been able to improve the sensitivity of commercial tests, and could be a great tool for the control of PTB in Mexico. The same protocol has been used in the diagnosis of TB with promising results.

Keywords: Serology, ovine, paratuberculosis, EVELISA.

CAPÍTULO 1

I. INTRODUCCIÓN GENERAL

La paratuberculosis (PTB) es una enfermedad infectocontagiosa causada por *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* (MAP), patógeno intracelular el cual afecta a rumiantes domésticos y silvestres, produciendo grandes pérdidas económicas relacionadas con la eliminación prematura de animales infectados, disminución en la producción tanto de carne como de leche y limitaciones en el comercio (Barkema *et al.*, 2010), aunado a esto la PTB tienen implicación en salud pública y se conoce la presencia de esta enfermedad en el estado de Baja California (Hori-Oshima *et al.*, 2007; Correa *et al.*, 2013). Para el control y erradicación de la PTB es de suma importancia realizar el diagnóstico en etapas tempranas de la infección con el objetivo de eliminar animales positivos y evitar nuevas infecciones en el hato. Las pruebas serológicas son las pruebas más utilizadas en el diagnóstico de enfermedades infecciosas, por ser pruebas rápidas y económicas. Sin embargo se han reportado sensibilidades muy bajas para el diagnóstico de esta enfermedad micobacterianas en etapas tempranas de la infección (Sweeney *et al.*, 2006). Eda *et al.* (2006), utilizando antígeno de superficie de *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* (MAP), reportaron una sensibilidad del 97.4% y una especificidad del 100% en el diagnóstico de PTB bovina en etapa temprana, el mismo protocolo ha sido probado en el diagnóstico de TB bovina obteniendo una sensibilidad del 77.2% y una especificidad del 92.5% (Wadhwa *et al.*, 2014). En México se desconoce el estatus sanitario de la PTB en algunos estados, un ELISA con una alta sensibilidad y especificidad sería una gran herramienta para el control de la PTB. Por lo que el objetivo de la presente fue evaluar pruebas serológicas en el diagnóstico temprano de la PTB ovina y determinar la seroprevalencia en rebaños de Mexicali Baja California.

CAPÍTULO 2

II. ANTECEDENTES

2.1. Generalidades

La paratuberculosis (PTB) es una enteritis granulomatosa de curso crónico, ocasionada por *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* (MAP) (Abalos, 2010). La PTB es endémica a nivel mundial, con altos niveles de prevalencia, fuerte impacto económico e importancia en salud pública, debido a que se le ha asociado con la enfermedad de Crohn en humanos. Afecta principalmente animales domésticos y silvestres ocasionando grandes pérdidas económicas a la industria ganadera, atribuibles a la disminución en la producción tanto de carne como de leche, baja en la fertilidad, mayor incidencia de mastitis, desecho prematuro del animal, disminución en el potencial genético y pérdida de valor del animal al sacrificio (Kennedy & Bennedictus, 2001; Kudahl & Nielsen, 2009). La PTB es considerada por SAGARPA como una de las dos prioridades de salud animal junto con la leptospirosis. Se ha propuesto implementar un programa nacional para el control de la PTB, debido a que en México se han calculado pérdidas económicas de 800 dólares por vaca al año (CONASA, 2010). Uno de los grandes retos en el control de la PTB, es la detección de la enfermedad en etapas tempranas, debido a que su curso es fundamentalmente subclínico, y no puede ser determinada mediante una sola prueba diagnóstica.

2.2. Historia

En 1826 se reportó una forma de enteritis la cual ocurre en bovinos con diarrea crónica, Hansen y Nielsen (1981) observaron el engrosamiento y corrugación en mucosa intestinal de bovinos moribundos, con esta forma de enteritis. H. Johne y L. Frothingham (1895) fueron los primeros en detectar bacilos ácido alcohol resistentes (BAAR) en casos de enteritis en el ganado bovino. En ese momento no se podía diferenciar los BAAR encontrados con el bacilo tuberculoso, por lo que se pensó que era una forma atípica de la tuberculosis. Este pensamiento fue compartido con Robert Koch. Bang *et al.* (1906) reevaluaron el desorden, determinando que no era tuberculosis, por lo que la llamaron enteritis pseudo-tuberculosa o enfermedad de Johne.

Twort aisló al microorganismo en 1910 y le dio el nombre de *Mycobacterium enteritidis chronicae pseudotuberculosis bovis Johne*, después la enfermedad llegó a ser conocida como paratuberculosis o enfermedad de Johne's y el microorganismo como *Mycobacterium paratuberculosis* (Twort & Ingram, 1911a; Twort & Ingram, 1911b).

2.3. Clasificación

El género *Mycobacterium* fue inicialmente propuesto en 1896 por Lehmann y Newmann para incluir los agentes de la tuberculosis (*M. tuberculosis*) y de la lepra (*M. leprae*). *Mycobacterium* 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 (Collins & Cummins, 1986).

El complejo *Mycobacterium avium* o MAC, son un grupo de micobacterias de crecimiento lento pertenecientes al grupo de "Micobacterias no tuberculosas" (MNT) o "Micobacterias atípicas" (Inderlied *et al.*, 1993). Este complejo incluye 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 intracellulare* (*M. intracellulare*) (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 bouchedurhonense*, *Mycobacterium marseillense* y *Mycobacterium timonense* (Ben Salah *et al.*, 2009).

2.4. Etiología

Morfológicamente, las micobacterias son bacilos inmóviles rectos o ligeramente incurvados, de 1.0 a 10.0 μm de largo y 0.2 a 0.6 μm de ancho, no forman endosporas, conidias, cápsulas ni hifas visibles microscópicamente, aunque puede tener un crecimiento micelar o filamentoso.

Se desarrollan en condiciones aerobias y se tiñe mal con métodos Gram, pese a lo cual son considerados Gram positivos, su temperatura óptima de crecimiento es de 37°C (Chiodini, 1986).

2.5. Pared celular

Una de las características más destacadas en cuanto a su estructura es la complejidad de la pared celular, dotada de un alto contenido lipídico, y especialmente de ceras constituidas por ácidos micólicos de 60-90 átomos de carbono que impiden la eliminación de colorantes una vez absorbidos, lo que confiere a las micobacterias su característica ácido-alcohol resistente. La estructura de la pared celular es común en todas las micobacterias y está formada por cuatro capas. La más interna es el glicopéptido o peptidoglicano con moléculas de N-acetilglucosamina (GlcNac) y ácido-N-glucolilmurámico (en lugar del habitual N-acetilmurámico) con cadenas cortas de alanina. Ésta capa es el esqueleto de la bacteria que le da forma y rigidez. A continuación hay una capa compuesta por polímeros de arabinosa y galactosa que es la responsable de mantener en contacto los peptidoglicanos con la siguiente capa formada por ácidos micólicos. Éstos son ácidos grasos derivados de 60 a 90 átomos de carbono en cadenas ramificadas y con un punto de fusión muy alto (Goodfellow *et al.*, 1982), son de gran importancia taxonómica en micobacterias y otros géneros relacionados como *Nocardia*, siendo además los principales responsables del ácido-alcohol resistencia de este grupo bacteriano. La capa más superficial está formada por glicolípidos y lipopolisacáridos. El LAM (lipoarabinomanano) juega un papel importante en la patogénesis de la paratuberculosis (Nigou *et al.*, 2003; Jolly *et al.*, 2006).

Se han descrito microorganismos con una pared celular deficiente (*Cell Wall Deficient, CWD*), denominados esferoplastos, aislados a partir de tejidos de pacientes con la enfermedad de Crohn (Chiodini, 1989) y en animales con la enfermedad de Johne (El Zaatari *et al.*, 2003).

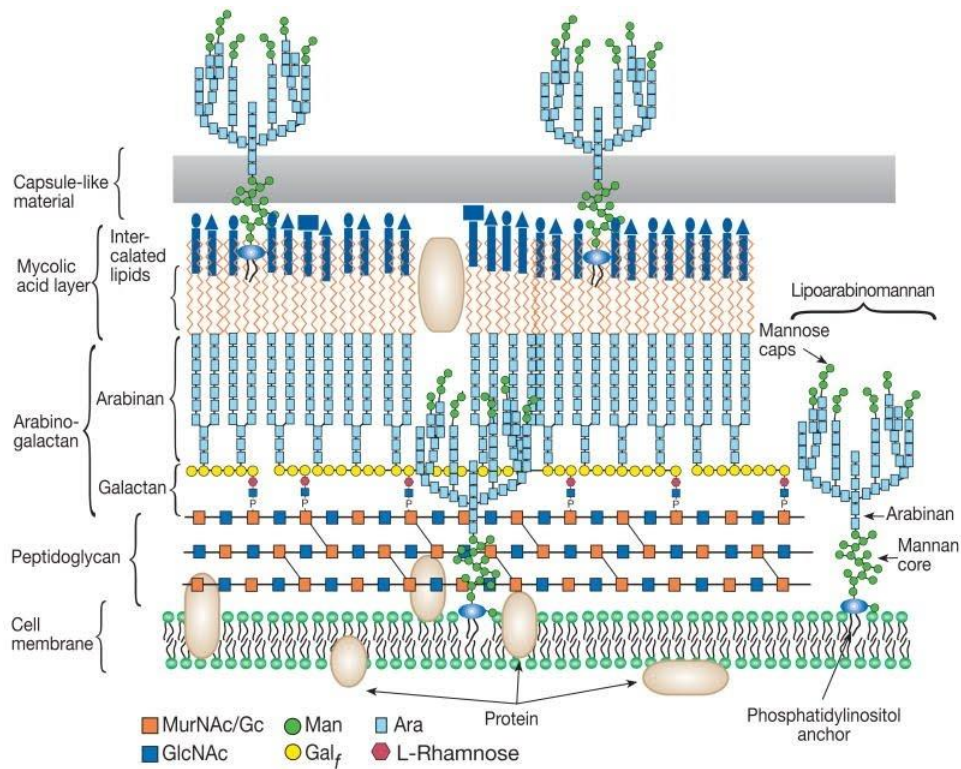


Figura 1. Composición de la pared celular de MAP

Esta composición tan especial de la pared confiere a MAP dos características muy importantes: 1) Ácido-alcohol resistencia, gracias a la elevada composición lipídica de su pared que varía entre el 20-40% del peso celular seco (Smith, 1969). En las tinciones específicas, como la tinción de Ziehl-Neelsen (ZN) se observa la disposición de estos bacilos en agrupaciones formando grumos (o *clumps*). 2) Elevada capacidad de supervivencia en ambientes desfavorables durante períodos de tiempo elevados, siendo uno de los factores que dificultan el control de la enfermedad. Varios informes describen la supervivencia de MAP *in vitro* bajo diferentes condiciones físicas y ambientales, incluyendo la supervivencia en agua, orina y estiércol a temperaturas extremas (Lombard *et al.*, 2006). El

organismo puede sobrevivir en agua de estanque hasta 270 días en condiciones in vitro y hasta 246 días en heces bovinas en condiciones naturales donde la temperatura ambiente varió entre -3°C y 23°C (Lovel *et al.*, 1944). También se ha evaluado su viabilidad frente al almacenamiento, encontrándose bacterias viables después de un almacenamiento a -14°C durante cinco meses, después a 4°C durante cinco meses y finalmente a 38°C durante ocho meses. Las bacterias almacenadas durante 12 meses a -14°C y luego a 4°C durante cinco meses fueron también viable (Larsen *et al.*, 1956). La pared celular de MAP está implicada en los mecanismos de restricción de adsorción de nutrientes, ocasionando baja actividad metabólica que conlleva a una velocidad de crecimiento en condiciones óptimas 24 veces inferior que la de bacterias como *Escherichia coli* (Juste *et al.*, 1993). Otras de las características comunes esenciales del género, es el alto contenido de G+C del ADN cromosómico (61-71%), (Li *et al.*, 2005) crecimiento lento, difícil de cultivar y que requiere un aporte externo de micobactina (Cocito *et al.*, 1994; Taylor, 1949). En medio de cultivo sólido forma colonias pequeñas (1-5 mm), rugosas y generalmente no pigmentadas visibles a las 4-8 semanas (Chiodini *et al.*, 1984) aunque puede alargarse incluso hasta los 6 meses.

2.6. Genoma de MAP

Li *et al.* (2005) lograron secuenciar el genoma del MAP a partir de un clon común de MAP, utilizando la cepa K-10, la cual es un asilado de origen bovino. Ellos reportaron que el genoma de MAP es un único cromosoma circular de 4, 829,781 pb, que codifica para 4,350 marcos de lecturas abiertos (ORFs; en inglés open Redding frames), 45 ARNt y un operon de ARNr. El análisis in silico ha identificado >3,000 genes homólogos al patógeno humano (*M. tuberculosis*) y 161 regiones genómicas únicas que codifican 39 genes de MAP.

El genoma está caracterizado por el alto contenido de G+C (69.3%) el cual es constante en todo el genoma. Así como también 58 secuencias de inserción (IS), incluyendo 17 copias de IS900, 7-10 copias de IS1311 y 3 de ISMav2 (Li *et al.*, 2005), 3 copias de ISMpa1 (Olsen *et al.*, 2004), 6 copias de

ISMap02 (Stabel *et al.*, 2005), MAP no contiene IS1245, 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).

El conocimiento de la secuencia del genoma de MAP ha posibilitado grandes avances en todos los campos de la investigación, como estudios genómicos comparativos con relación a otras micobacterias y entre diferentes cepas, ya que se ha encontrado notable homogeneidad entre los genomas de las especies bovinas, humana y fauna silvestre, sin observarse diferencias fenotípicas entre cepas ovinas (S) y bovinas (C) (Bannantine *et al.*, 2012).

Sin embargo se han encontrado diferencias al hacer comparaciones basadas en microarreglos de tres aislados de MAP aislados, incluyendo una cepa "S" y dos cepas de "C", identificaron tres grandes deleciones genómicas en la cepa S, totalizando 29, 208 pb y 24 marcos de lectura abiertos. Estas deleciones pueden ayudar a explicar algunas de las diferencias en la patogenicidad y la especificidad del huésped observado entre las cepas de bovinos y ovinos de MAP (Marsh *et al.*, 2006).

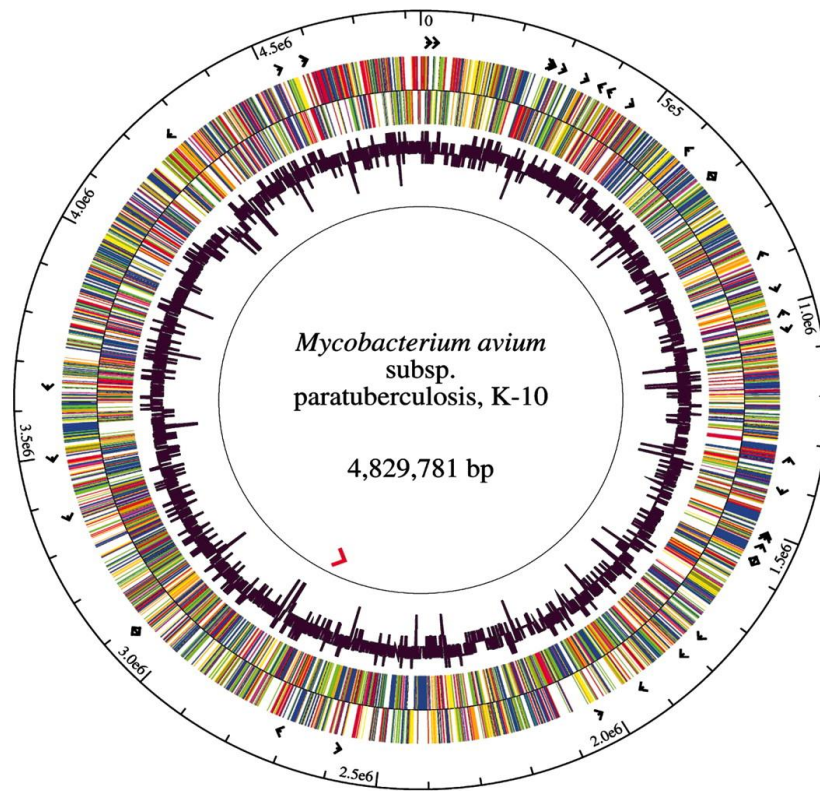


Figura 2. Representación circular del genoma de MAP K-10.

Desde el interior: las flechas rojas ARNr operon; histograma de color púrpura oscuro, contenido de guaninas (G) y citocinas (C); histograma multicolor, ORF de MAP codificado de acuerdo a la clasificación funcional (azul, metabolismo de moléculas pequeñas; rojo, metabolismo de macromoléculas; púrpura, procesos celulares; amarillo, otros procesos; verde, hipotéticos; naranja, incógnitas). El histograma de color exterior indica la misma dirección de la transcripción como el origen de replicación. El histograma de color interior indica la dirección opuesta de la transcripción como el origen de la replicación. Las flechas negras, 45 ARNt. Escalas círculo exterior. (Li *et al.*, 2005).

2.7. Cepas de MAP

La existencia de cepas fenotípicamente distintas de MAP ha sido conocida desde la década de 1930, pero la diferenciación genética de los tipos de cepa MAP ha sido un desafío y sólo las tecnologías recientes han demostrado ser suficientemente discriminatorias para las comparaciones de las cepas. Es importante comprender las diferencias que existen entre las cepas MAP y cómo influyen en el desarrollo y la transmisión de la enfermedad. Hay dos grupos principales de cepas conocidas como "Sheep-

type" o "S" y "Cattle-type" o "Tipo C" llamado así de acuerdo a la especie huésped de la que fueron aislados por primera vez (Collins *et al.*, 1990). El grupo de Tipo C es sinónimo de las cepas de Tipo II como se define por electroforesis en gel de campo pulsado y descritas por Stevenson *et al.* (2002). Originalmente se pensó que un tercer grupo de cepas denominado "intermedio" o "Tipo III" (Castellanos *et al.*, 2007) era intermedio entre cepas de Tipo S y de Tipo C, pero la secuenciación completa del genoma ha confirmado que es realmente un subtipo de Tipo S (Figura 3). Las cepas de tipo S y C pueden ser diferenciadas por la mayoría de los sistemas de tipificación, pero distinguir entre aislamientos dentro de estos tipos de cepa es más difícil y requiere el uso de más de un método de tipado y para sistemas basados en PCR la detección de múltiples loci (Collins, 2010; Bannantine *et al.*, 2012). Secuenciación del genoma completo proporciona la última resolución y ha revelado la diversidad genética entre aislados de MAP estrechamente relacionados. En Baja California se ha reportado la presencia de la cepa C tanto en ganado bovino como en ovino, el cual se confirmó por medio de PCR IS1311 y análisis de endonucleasas de restricción (Correa *et al.*, 2013)

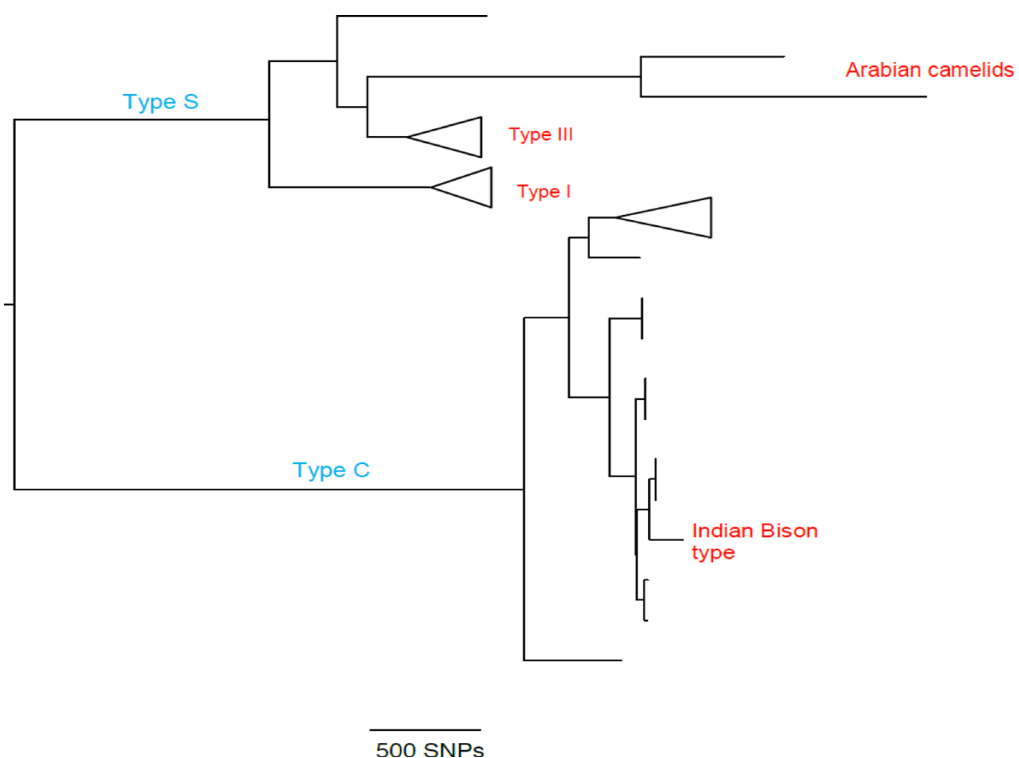


Figura 3. Filogenia de los tipos de cepa MAP (Stevenson *et al.*, 2002)

2.8. Metabolismo y Nutrición

Los requerimientos nutricionales de MAP son similares a los del resto de las micobacterias. Entre los diversos compuestos utilizados como potenciadores del crecimiento se encuentran los detergentes, empleados para conseguir la dispersión de las micobacterias y además son una fuente de lípidos, los triglicéridos, la albúmina sérica bovina y la yema de huevo. El efecto estimulador del crecimiento de estos últimos radicaría en la eliminación de compuestos potencialmente destructivos del medio, más que en su aporte de nutrientes. Otro de los elementos esenciales para el crecimiento de las micobacterias es la micobactina, dióxido de carbono (Co_2), como carbonato de sodio (Na_2Co_3) en el medio, Co_2 en fase gaseosa, así como la biotina ya que es un cofactor esencial para la fijación de Co_2 (Ratledge, 1982).

Las fuentes de carbono más comúnmente empleadas son el glicerol y piruvato, aunque la glucosa y otros azúcares pueden ser también utilizados. En un estudio realizado por Thorel *et al.* (1990), se puede apreciar que la presencia de piruvato en medios de cultivo estimulo el crecimiento de las cepas del grupo 1, la cual contiene 16 cepas de MAP y 2 de la enfermedad de Crohn (Cuadro 1). El citrato es añadido frecuentemente en forma de citrato de amonio férrico, este no es asimilado como fuente de carbono, sin embargo aporta hierro. Dentro de los hidrocarburos, todos los alcanos, a excepción del metano, olefinas e hidrocarburos cíclicos pueden ser utilizados, así como los alcoholes, cetonas mono-, di-, o tricarbóxicos. El compuesto nitrogenado de elección es la asparraguina, aunque puede sustituirse por la glutamina, ácido aspártico, glutamato e incluso por sales de amonio. En cuanto a los elementos inorgánicos esenciales, se dividen en dos grupos. Por una parte encontramos el potasio, magnesio, azufre y fósforo que son necesarios en cantidades más elevadas, por otra, se encuentran los elementos traza principales como el hierro, zinc, manganeso y molibdeno, elementos traza menores como aluminio, plata, cromo, cobalto, cobre y otros, cuyas necesidades se satisfacen mediante su aporte como

contaminantes en otros constituyentes del medio, incluida el agua o el material de vidrio (Ratledge, 1982).

La baja tasa de crecimiento y elevado tiempo de generación característico de MAP, que en condiciones óptimas sería de unas 8 horas (Juste *et al.*, 2000), han sido explicados como una consecuencia de la ausencia de una vía metabólica respiratoria clave, como es la vía malato-vitamina K reductasa, lo que limita la capacidad de producción de energía, aunque una explicación alternativa podría ser la dificultad de difusión de oxígeno y nutrientes a través de la gruesa cubierta lipídica de las micobacterias (Ratledge, 1982). En un estudio más reciente, Bannantine *et al.* (2003) intentaron buscar una explicación a la diferencia entre las tasas de crecimiento de MAP y de *M. avium* subespecie *avium* mediante la comparación del genoma de ambos bacilos, y más concretamente de la región *oriC* pero la alta homología hallada entre ambos (97%) no justifica dicha diferencia.

Cuadro 1. Características variables y diferenciales de MAP y micobacterias relacionadas

| Características | Grupos | | | |
|--|---------------|----------|----------|----------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 |
| Rectos | 5/18 | 1/6 | 13/13 | 0/1 |
| Cocobacilar | 13/18 | 5/6 | 0/13 | 1/1 |
| Colonias suaves | 0/18 | | 0/13 | 0/1 |
| Colonias rugosas | 18/18 | 0/6 | 13/13 | 1/1 |
| Crecimiento a 42°C | 16/18 | 5/6 | 13/13 | 0/1 |
| Estimulación de crecimiento con piruvato | 18/18 | 4/6 | 3/13 | 0/1 |
| Estimulación de crecimiento en medios pH 5.5 | 0/18 | 0/6 | 13/13 | 0/1 |
| Micobactina (2 mg/L) | 18/18 | 0/6 | 0/0 | 0/1 |
| Crecimiento en medio de huevo | 18/18 | 6/6 | 2/13 | 0/1 |
| Tolerancia a NaCl (5%) en medio 7H10 | 0/18 | 5/6 | 0/13 | 0/1 |
| Actividad enzimática | | | | |

| | | | | |
|-------------------------------------|-------|-----|-------|-----|
| Catalasa después de calentar a 68°C | 18/18 | 5/6 | 13/13 | 0/1 |
| Fosfatasa acida (2 horas) | 0/18 | 0/6 | 1/13 | 0/1 |
| Fosfatasa alcalina (2 horas) | 1/18 | 5/6 | 13/13 | 0/1 |
| Threhalasa (5 horas) | 6/18 | 0/6 | 3/13 | 1/1 |
| Crecimiento en presencia de: | | | | |
| Para-nitrobenzoato (50 µg/mL) | 4/18 | 6/6 | 0/13 | 0/1 |
| D-ciclocerina (30 µg/mL) | 18/18 | 6/6 | 11/13 | 1/1 |
| D-ciclocerina (50 µg/mL) | 17/18 | 1/6 | 0/13 | 0/0 |
| Etambutol (7.5 µg/mL) | 18/18 | 6/6 | 12/13 | 0/1 |
| Lapirazinamida (50 µg/mL) | 14/18 | 6/6 | 13/13 | 1/1 |
| Rifampin(1 µg/mL) | 13/18 | 5/6 | 1/13 | 0/1 |
| Ansamicina (1 µg/mL) | 15/18 | 5/6 | 1/13 | 0/1 |
| Estreptomina (2 µg/mL) | 13/18 | 6/6 | 7/13 | 0/1 |

Grupo1= 18 cepas. Contiene cepas de MAP y 2 de la enfermedad de Crohn's
 Grupo 2= 6 cepas. Contiene cepas de referencia *M. avium* y *M. intracellulare*
 Grupo 3= 13 cepas. Micobacterias de palomas wood
 Grupo 4= 1 cepa de MAP 316F (utilizada para vacuna)

(Thorel *et al.*, 1990)

2.8.1. Dependencia a la micobactina

Las micobactinas son moléculas liposolubles del grupo de los hidroxamatos producidas por las micobacterias en condiciones de deficiencia de hierro, cuya función consiste en secuestrar y facilitar el transporte de ese metal a través de su compleja pared celular. (Swartz & de Voss, 2001). Sin embargo, MAP, *M. silvaticum* y algunos aislamientos primarios de *M. avium* carecen de esta capacidad y requieren micobactina para crecer en el laboratorio (Thorel *et al.*, 1990; Cocito, 1994). La identificación de MAP se ha basado principalmente en su requerimiento de micobactina y su patogenicidad en el hospedador. Se llegó a esta conclusión gracias a los estudios pioneros realizados por Twort e Ingram, después de que Jonhe y Fronthingham en 1985 no lograran aislar al patógeno en un brote de diarrea bovina en Alemania. Por lo que llegaron a la conclusión de que debía faltar algún nutriente esencial para su asilamiento, que probablemente podría encontrarse en el bacilo tuberculoso. Al añadir bacilos

secos e inactivos de la tuberculosis humana a un medio a base de huevo lograron un buen crecimiento de MAP (Twort & Ingram, 1911). Aunque se utilizaron habitualmente extractos de *M. phlei* en los cultivos de MAP, no se logró la extracción y purificación de la micobactina hasta 1953 (Francis *et al.*, 1953). Actualmente la micobactina empleada es la Micobactina J (MJ) producida y purificada por primera vez por Merkal *et al.* (1982), logrando reducir el tiempo de incubación e incluso aislar colonias de cepas incultivables de MAP en medios con otras micobactinas con la P, de uso generalizado hasta este momento (Merkal y McCullogh, 1982). La estructura química de la Micobactina MJ ha sido descrita por Schwartz (Schwartz & de Voss, 2001).

La concentración mínima de micobactina para el aislamiento de MAP es de 0.006 μ M mientras que la concentración óptima es de 1.2 μ M (Lambrecht & Collins, 1992). Se han propuestos diferentes teorías para explicar el hecho de que la micobactina sea un suplemento esencial para el aislamiento de MAP. Podría deberse a una represión de su capacidad para producir este compuesto, derivada de su vida parásita en el interior de macrófagos que le permite obtener los nutrientes directamente de las células a las que parasita, más que a una carencia de la información genética necesaria para sintetizar su propia micobactina. La imposibilidad para detectar micobactina en tejidos infectados apoya esta teoría según la cual MAP utilizaría como fuente de hierro, proteínas quelantes del hospedador (Lambrecht & Collins, 1993), sin embargo otras micobacterias las cuales también son intracelulares no requieren el aporte externo de micobactina para su crecimiento. *M. tuberculosis* posee un grupo de diez genes denominado mbtA-J responsable de la producción de micobactina y el transporte de hierro. La secuenciación del genoma completo de MAP ha revelado la presencia de un homólogo dembtA-J con diferencias significativas en la estructura primaria de estas regiones al compararla con *M. tuberculosis* o *M. avium* subespecie *avium*, y más concentradamente en el gen MbtA que se supone responsable de la iniciación de la producción de micobactina y que en MAP aparece truncado. Es decir, sería esta diferencia en el genoma de MAP el factor limitante en la producción de micobactina (Li

et al., 2005).

Aunque se ha demostrado el crecimiento de cepas ovinas de MAP en el medio Middlebrook 7H11 con OADC y sin adición de micobactina (Aduriz *et al.*, 1995), así como la necesidad de micobactina para el cultivo de algunas cepas de *M. avium* subespecie *avium* aisladas de animales domésticos y silvestres (Matthews *et al.*, 1978; Barclay *et al.*, 1985), el requerimiento de micobactina para su aislamiento y cultivo es un rasgo que se ha considerado específico de MAP y ha sido empleado tradicionalmente como clave de su identificación (Thorel, 1984, Chiodini *et al.*, 1984). No obstante, diversos autores han descrito la pérdida de dicha dependencia después de sucesivos pases en laboratorio, así como la posibilidad de sustituir ésta por citrato amónico férrico 1% en el medio de cultivo, el cual aportaría el hierro necesario para poner en marcha el metabolismo de MAP (Merkal & Curran, 1974). Otros autores, sin embargo, explican, esta pérdida de la dependencia de la micobactina como resultado de un arrastre de micobactina desde el medio primario, de forma que una eliminación de la micobactina asociada a la pared celular reestablece dicha dependencia (Lambrecht & Collins, 1992).

2.9. Resistencia

MAP es un patógeno intracelular obligado, el cual solo puede multiplicarse en el interior de los macrófagos de un hospedador susceptible (Collins, 2003). Al ser excretado, ya sea en heces o leche es incapaz de multiplicarse fuera del hospedador (Grant, 2005a) pero puede sobrevivir durante periodos prolongados debido a su gran resistencia, pudiendo permanecer viable en desechos bovinos hasta 287 días, dependiendo de la temperatura y composición de los mismos (Jorgensen, 1977), en estudios realizados en heces ovinas naturalmente infectadas aplicadas al suelo se observó MAP viable a los 385 días (Whittington *et al.*, 2004). En este último estudio la protección de luz solar directa que proporciona la vegetación demostró tener un efecto determinante en la sobrevivencia de MAP en el suelo. Según Whittington sería debido a una menor fluctuación de la

temperatura de las partículas fecales protegidas de la luz solar directa, más que una protección de las radiaciones UV, ya que éstas podrían actuar sobre la superficie, pero no penetrarían en el interior de dichas partículas. Las observaciones realizadas por Whittington parecen indicar que MAP es capaz de entrar en un estado de latencia en el que la bacteria es viable pero no cultivable, pudiendo posteriormente revertir a una forma vegetativa (Whittington *et al.*, 2004).

En este mismo estudio, factores como el grado de humedad y pH del suelo no influyeron en el tiempo de supervivencia. Aunque en otros estudios han sugerido el pH del suelo como factor de riesgo para MAP, su efecto parece estar más relacionado con la disponibilidad de hierro (Johnson-Ifearewande & Kaneene, 1999). Al compararse con otros patógenos zoonóticos como *E. coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* o *Salmonella spp.*, MAP presenta una supervivencia muy superior en estiércol sometido a diferentes técnicas de compostaje, pero especialmente en desechos líquidos (Grewal *et al.*, 2006) por lo que sería recomendable evitar la utilización de desechos de explotaciones infectadas como fertilizantes de pastos que vayan a ser utilizados en un corto periodo de tiempo ya que podría contribuir a la difusión de la infección.

En cuanto a la resistencia a la congelación, la conservación de muestras fecales a -70°C produce una reducción mayor de la viabilidad de MAP en cepas procedentes de aislamiento que en las naturales, pero con una supervivencia suficiente como para poder detectar su presencia en el cultivo bacteriológico rutinario durante, al menos, 15 semanas (Richards & Thoen, 1977). Temperaturas de congelación más suaves permiten la supervivencia de MAP durante un periodo de al menos un año (Hole, 1958; Chiodini *et al.*, 1984).

La mayoría de los desinfectantes como el formol (5%), los desinfectantes cresólicos (1:32), fenol (1:40), biocloruro de mercurio (1:1000), hipoclorito de calcio (1:50), cianamida cálcica o la clorina (2 µg/ml) son activos frente a MAP en suspensión acuosa (Whan *et al.*, 2001), sin embargo su eficiencia disminuye en presencia de materia orgánica, por lo que la incorporación de un detergente en solución germicida favorecería su

acción (Merkal & Whipple, 1982).

Otro de los aspectos a los que se ha dedicado más interés en los últimos años, es la resistencia de MAP a los tratamientos de la leche destinada a consumo humano, ya que obviamente tiene grandes implicaciones en salud pública. En 1993 Chiodini & Hermon-Taylor demostraron que cepas de MAP de origen bovino y humano sobrevivían a la pasteurización y que las cepas humanas eran generalmente más resistentes a una temperatura de 72°C que las bovinas (Chiodini & Hermon-Taylor, 1993). Posteriormente surgió una cierta controversia acerca de la capacidad de MAP para sobrevivir a los diferentes tratamientos de pasteurización habitualmente empleados en la industria. Por una parte, ciertos autores sostenían que los métodos de pasteurización industrial no habían sido adecuadamente reproducidos en el laboratorio, ya que en condiciones reales de leche se somete a un flujo turbulento, esencial para la completa inactivación de MAP (Stabel *et al.*, 1997) y por lo tanto, las bajas cantidades de MAP que pueden estar presentes en la leche cruda no sobrevivían a estos tratamientos (Pearce *et al.*, 2001). Otros autores, sin embargo, han demostrado la capacidad de MAP para sobrevivir a los métodos de pasteurización especialmente cuando en la leche existe una presencia elevada de MAP (Grant *et al.*, 2002b), puesto que mediante la pasteurización puede conseguirse reducciones de al menos 4 log₁₀ UFC, y en procedimientos que emplean temperaturas de 72- 78°C y tiempos de 15-25 segundos, una reducción de más de 6 log₁₀ (McDonald *et al.*, 2005) que no serían suficientes para asegurar una total eliminación de MAP. Se han empleado estos procesos también en, leche descrema (67-90 °C) y crema (85-100 °C) por tiempos de 15-60 s. En la leche descremada 54 de 93 experimentos mostraron un pequeño número de MAP viables. La reducción obtenida a partir de la concentración inicial de MAP estuvo entre 3-7 ciclos log. Experimentos con crema, 9 de 57, se observó una pequeña cantidad de bacilos viables a pesar de una reducción de hasta 7 ciclos log (Hammer *et al.*, 2005).

Esta controversia podría explicarse para una subestimación de la viabilidad de MAP debido a la limitada sensibilidad de los métodos de asilamientos empleados, ya que el tratamiento descontaminante necesario para minimizar el crecimiento de otros microorganismos podría inactivar células viables de MAP (Ayele *et al.*, 2005), por otra parte, las condiciones de cultivo *in vitro* que afectan directamente a la expresión de proteínas y a la formación de la pared celular, provocando diferencias en la resistencia térmica (Sung *et al.*, 2004). Estudios desarrollados en diferentes países han hallado bacilos viables, en cerca de un 2% de las unidades de leche pasteurizada comercial en el Reino Unido (Grant *et al.*, 2002a) en un 1.6% en la Republica Checa (Ayele *et al.*, 2005) y en un 2.8% en los EE.UU (Elligson *et al.*, 2005). Según Grant *et al.* (2005b) la modificación de las temperaturas y los tiempos de pasterización no aseguraría por sí sola la completa inactivación del bacilo, si no que sería necesario combinar ésta con un adecuado proceso de homogenización que rompa los agregados de MAP haciéndolos así más sensibles a la acción del calor.

Otro método eficaz para la inactivación de MAP en leche es el tratamiento con elevada presión hidrostática a baja temperatura, el cual ha demostrado ser, al menos, tan eficiente como la pasteurización en cuanto a la inactivación de MAP, pero sin los inconvenientes del calentamiento sobre las propiedades organolépticas de la leche (Sevilla *et al.*, 2005; López-Pedemonte *et al.*, 2006). Por otra parte, la exposición de leche a campos electrostáticos pulsátiles (Rowan *et al.*, 2001) también ha demostrado ser un método efectivo para la inactivación de MAP.

En cuanto a los procesos de elaboración y curación del queso, éstos disminuyen la viabilidad de las micobacterias, siendo el factor determinante un pH bajo, aunque la resistencia a medios ácidos es superior en cepas naturales que en aquellas adaptadas al laboratorio, puesto que los diferentes medios de cultivo afectan a la expresión de proteínas y por lo tanto a la ácido-alcohol resistencia (Sung & Collins, 2003). El periodo de curación necesario para la inactivación de 10^3 a 10^4 células de MAP/mL sería de 60 días en un queso blanco blando de tipo español, elaborado con leche sometida a tratamiento térmico (Sung & Collins, 2000), y de 90-120 días

para quesos Suizos de tipo curado y semi-curado (Spahr & Schafroth, 2001), sin embargo en quesos tipo cheddar sería preciso un mínimo de 3 meses de curación a baja temperatura para lograr una reducción de $1 \log_{10}$ (Donaghy *et al.*, 2004). Recientemente se han detectado en Grecia y en República Checa un 31.7% de quesos de venta al público, positivos a PCR y en un 3.6% se ha logrado aislar MAP viable (Ikonomopoulos *et al.*, 2005), lo que confirma que un cierto número de bacterias resisten los tratamientos de elaboración de estos quesos.

2.10. Epidemiología

La infección causada por MAP, afecta tanto a animales domésticos como a silvestres, se ha confirmado la presencia de MAP, en ciervos, antílopes, alces y bisontes (Hines *et al.*, 2007). También se le ha considerado como posible agente causal de la enfermedad de Crohn en humanos, debido a la gran similitud en la patología causada en el intestino y a que en algunas ocasiones ha sido aislada de muestras intestinales en pacientes con dicha infección (Chiodini *et al.*, 1997; Timms *et al.*, 2016).

Estudios en el ganado ovino han tenido muy poco interés en comparación con el ganado bovino. La dificultad de determinar la prevalencia de la enfermedad se ha visto agravado por la falta de pruebas diagnósticas con altos niveles de sensibilidad y especificidad, así como también los altos costos que implica la identificación de la enfermedad en comparación con el bajo valor de la oveja (Sergeant, 2001; Sevilla *et al.*, 2005).

2.10.1. Transmisión

La principal vía de transmisión de MAP es mediante la vía oro fecal (Clarke, 1997) al ingerir agua de bebida o alimento contaminado con bacilos. Animales infectados son capaces de eliminar grandes cantidades de bacterias ya sea en heces o leche y en menor porcentaje en semen. En bovinos se estima que se elimina entre 1.3×10^6 MAP/g de heces (Jorgensens, 1982), mientras que ovinos en fase subclínica, eliminan hasta

1.09×10^8 MAP viables (Whittington *et al.*, 2000a). Estudios recientes han comprobado excreciones de bacilos en ovinos experimentalmente infectados desde el primer mes post-inoculación con excreciones intermitentes durante todo el experimento. (Ponce *et al.*, 2014).

2.10.1.1. Dosis infectiva

Bovinos. Animales jóvenes son más susceptibles que animales adultos, sin embargo a dosis altas también podrían contraer la infección. Concentraciones de 10^6 a 10^8 UFC por g/heces ingeridos por un becerro sería suficiente para generar la infección (Jorgensen, 1982, Whittington *et al.*, 2000b). Chiodini (1996) sugirió que 50-1000 UFC eran infecciosas para los terneros jóvenes. Sin embargo estudios experimentales han demostrado que 1.5×10^6 UFC administrada oralmente a los 21 y 22 días de edad induce la infección en múltiples tejidos, aunque a un nivel bajo (Sweeney *et al.*, 2006). Las dosis más altas a edades más jóvenes dieron como resultado una mayor infección en los tejidos.

Ovinos. En infecciones experimentales la dosis del inóculo y el número de dosis utilizadas han variado considerablemente entre los diferentes modelos de infección utilizados hasta la fecha. Dosis de 10^3 a 10^{10} UFC son utilizadas para causar la infección (Nisbet *et al.*, 1962). Mientras que dosis más bajas pueden establecer la infección en el 50% de los animales expuestos y no parecen producir enfermedad clínica. Begg *et al.* (2005) reportaron que las condiciones óptimas necesarias para producir la enfermedad implican la inoculación oral de corderos de 3 meses de edad con cuatro dosis de 5×10^8 UFC de asilado de MAP directamente de los tejidos linfáticos del intestino de oveja clínicamente infectada. Mostrando la fase clínica a los 11 meses post-inoculación, y lesiones histopatológicas a los 9 meses post-inoculación.

2.10.2. Prevalencia de la Paratuberculosis

La PTB se encuentra ampliamente distribuida a nivel mundial en rumiantes domésticos como; vacas, ovejas, camélidos y caprinos. En Latinoamérica y Caribe se reportó una prevalencia del 16% en bovinos y 4.3% en ovinos y caprinos (Fernández-Silva *et al.*, 2014). En México se desconoce el estado zoonosario real, sin embargo se ha reportado la presencia de MAP en varios estados (Millán-Suazo *et al.*, 2015). Un estudio realizado por el Dr. Chávez-Gris en estados del centro de la República Mexicana, dirigido al diagnóstico serológico en ovinos, bovinos y caprinos del 2004 al 2009, dio a conocer la importancia de esta enfermedad en México, de 7, 461 casos analizados, 1, 370 (18.36%) fueron positivos a ELISA (Figura 4) (CONASA, 2010), de igual forma se han reportado prevalencias para algunos estados del país: 46% en vacas lecheras en Baja California (Salman *et al.*, 1990), 9.99% en ovinos en San Luis Potosí (Morón-Cedillo *et al.*, 2015), 5.6% en ovinos en Nayarit (Mejía-Martínez *et al.*, 2015), y 9.87% en cabras en Guanajuato (Guzmán-Ruiz *et al.*, 2016). Estas prevalencias podrían estar subestimadas, debido a la naturaleza subclínica de la enfermedad y a su difícil diagnóstico, debido a la baja sensibilidad de las pruebas disponibles. En México no existe un programa de control y erradicación de la PTB como lo es el caso de la tuberculosis bovina (Estevéz-Denaives *et al.*, 2007; CONASA, 2010, Millán-Suazo *et al.*, 2015). Sin embargo es considerada como una enfermedad de gran impacto económico en México (CONASA, 2010). Por lo que el principal reto para el control de la infección es el diagnóstico oportuno y buenas prácticas de manejo.

sin un análisis previo. La mayoría de estas explotaciones se encuentran situadas en la región del pacifico sur (Figura 5).

Animales que pastan en campo abierto mostraron un OR del 2.1 (95% IC 1.1-4.2), sin embargo el riesgo en sistemas de producción intensivas podrían ser mayores debido a que el espacio de confinamiento es menor, lo cual favorecería la transmisión (Lee *et al.*, 2006), otro riesgo documentado fue animales con serología positiva a tuberculosis, estos animales mostraron 2.9 veces (95% IC 1.9-4.2) más probabilidad de contraer la infección causada por MAP (Millan-Suazo *et al.*, 2015).

La introducción de animales al hato o la compra de ganado es uno de los principales factores de riesgo para la introducción de la PTB en un rebaño (Rangel *et al.*, 2015).

En caprinos la raza Alpina tiene 2.1 veces más probabilidad de contraer la infección. Hembras con dos partos OR 2.94, tres a cinco partos OR 5.88 y 6 partos OR 7 (Guzmán-Ruiz *et al.*, 2016). En pequeños rumiantes el inicio de la fase clínica coincide con el estrés producido tras el parto y la lactancia (Manning 7 Collins., 2001, García *et al.*, 1994).

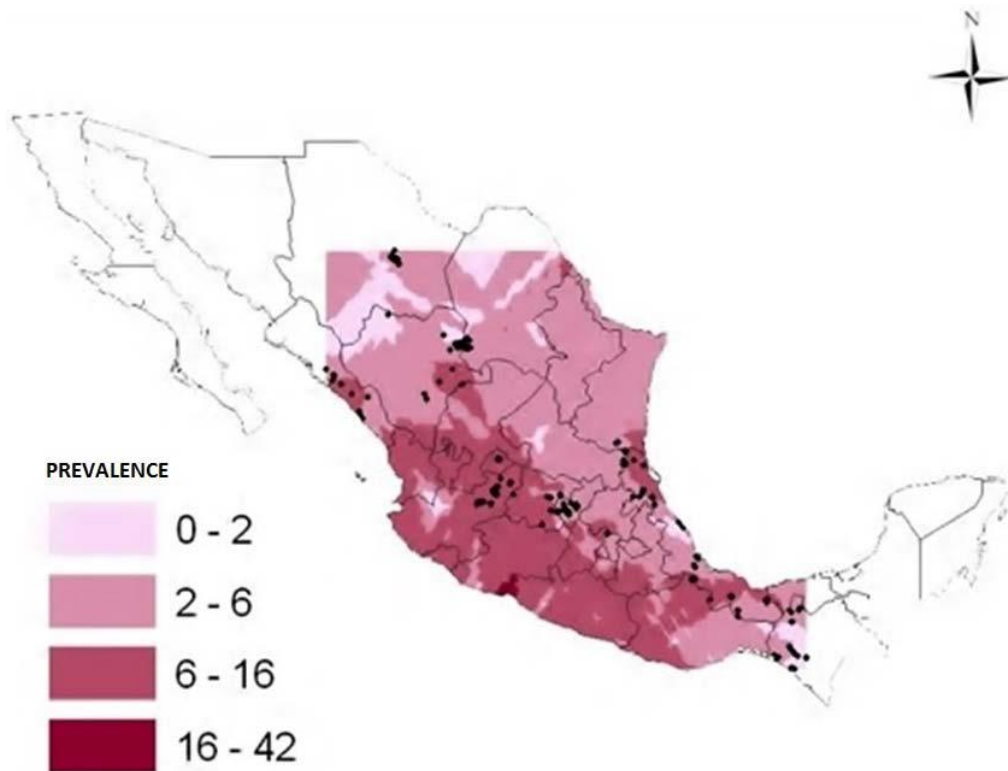


Figura 5. Riesgo predicho de paratuberculosis en ganado lechero en México (Milián-Suazo *et al.*, 2015).

2.11. Patogenia

La fuente primaria de infección, son los animales adultos infectados y los hatos que los albergan. La principal vía de transmisión es oro-fecal a través de pasturas y agua contaminada con materia fecal, calostro o leche de animales infectados, así como en menor porcentaje, a través de placenta y semen. Los animales más susceptibles son los terneros menores de 30 días, posiblemente debido a la extensa superficie que abarcan las placas de Peyer-intestinales en los animales jóvenes, la cual va reduciéndose gradualmente, si bien animales de más edad pueden infectarse dependiendo de su condición sanitaria y carga bacteriana (Gilardoni & Mundo, 2008). El sitio de infección primaria son las mucosas intestinales, aunque algunos estudios hayan indicado que son las amígdalas y los ganglios retrofaríngeo (Payne & Rankin, 1961, Lugton, 1999). MAP invade preferentemente las células M mediante la creación de puentes de fibronectina (Sigurdardottir *et al.*, 2005, Secott *et al.*, 2004), que recubren las cúpulas de las placas de Peyer del íleon y yeyuno. La entrada al macrófago se logra mediante la unión de ManLaM a CR3 y receptores de manosa. La invasión de la lámina propia también puede ser adquirida a través de las células epiteliales del intestino por un mecanismo desconocido. Las células dendríticas también pueden transportar bacilos al interior de la lámina propia durante el muestreo a través de las uniones estrechas, debido a que la función primaria de las células dendríticas intestinales es muestrear y presentar bacterias comensales a través de las uniones estrechas en el tejido linfoide asociado al intestino. Por lo tanto MAP sería capaz de superar las barreras de las uniones estrechas y se transportaría directamente a la lámina propia para interactuar con macrófagos subepiteliales (Figura 6). Sin embargo, parece ser que las células M no son el único sitio de entrada de MAP, al menos en cabras, se ha encontrado que en esta especie, la entrada de MAP a la mucosa intestinal está restringida a los enterocitos yeyunales no asociados a las placas de Peyer (Sigurdardottir *et al.*, 2005).

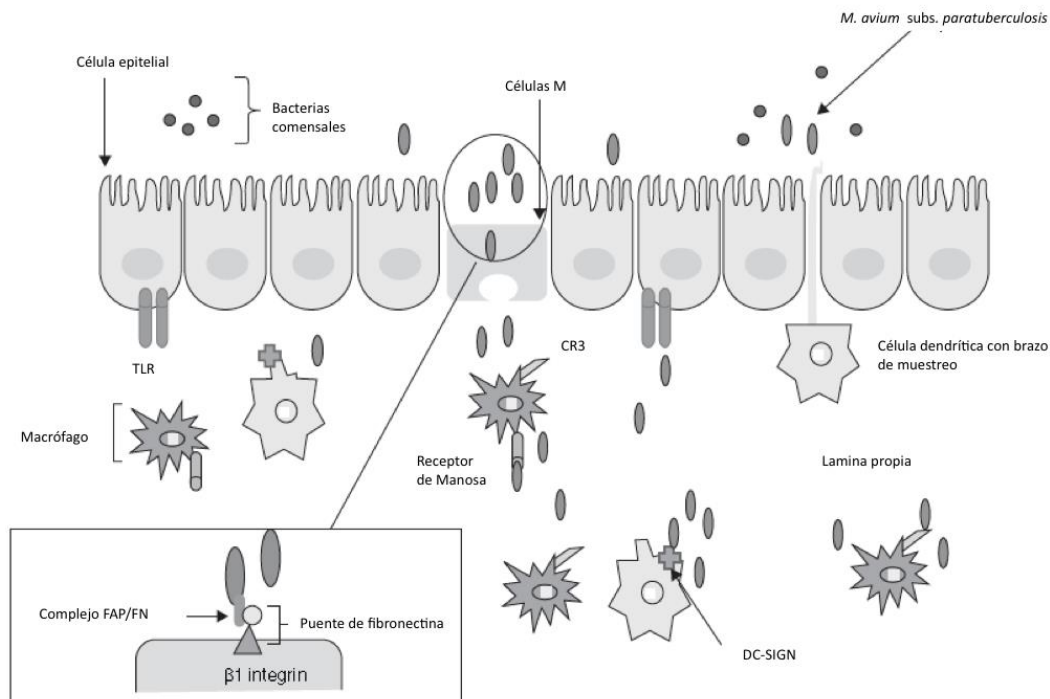


Figura 6. Pared intestinal y tácticas de invasión de macrófagos utilizadas por MAP

Man-LAM de MAP es capaz de interactuar con receptores de superficie celular de macrófagos. La interacción mejor documentada, es entre PAM y el receptor de manosa, que mejora la fagocitosis. Al entrar al macrófago hay replicación simultánea de MAP. La destrucción de MAP refleja una primera respuesta Th1, sin embargo la mayoría de los fagosomas que contienen al bacilo no maduran. Al ser fagocitado por los macrófagos MAP se localiza y reside preferentemente en los fagosomas o endosomas inmaduros de los macrófagos del hospedador, con predominio de aquellos asociados a las placas de Peyer ileales y yeyunales (Momotami *et al.*, 1988, Corpa *et al.*, 2000). Los bacilos de MAP, son capaces de sobrevivir intracelularmente inhibiendo la acidificación del fagosoma e impidiendo su maduración a fago-lisosoma (Cheville *et al.*, 2001), MAP es resistente a la degradación por las enzimas lisosómicas, el óxido nítrico y además mecanismos bactericidas que producen los macrófagos, debido entre otros mecanismos a su envoltura celular lipídica (Zhao *et al.*, 1997, Harris y Barleta, 2001, Tessema *et al.*, 2001). La extraña habilidad de MAP y otras

micobacterias para invadir y sobrevivir dentro del macrófago se ha sugerido como una selección evolutiva conservada para el crecimiento intracelular dentro de los protozoos. MAP al ser ingerido por *Ancanthamoeba castellanii* no solo mejora la entrada del patógeno a las células epiteliales si no también la virulencia, tal vez debido a la selección de un fenotipo más virulento. Estudios de interacciones entre *M. tuberculosis* y macrófagos indican que Man-LAM es indispensable para el bloqueo de la maduración del fagosomas.

Los macrófagos epiteliales que logran activarse, estimulan a las dos subpoblaciones celulares (Th1 y Th2) de las células T ayudadoras (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 citocinas causan la formación de un granuloma intestinal para contener la infección (Coicito *et al.*, 1994, Lugton, 1999). La respuesta Th1 también se caracteriza por la producción de gamma interferón (INF- γ) una de las primeras citocinas detectables en la infección por MAP, así como la Interleucina 2 (IL-2) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α). Estas citocinas dirigen las funciones inmunitarias mediadas por células que son necesarias para contener la infección intracelular. Durante la etapa subclínica temprana de la infección por MAP, la actividad de la respuesta celular Th1 parece predominar. Esta etapa puede durar meses o años durante la cual los bacilos permanecen microscópicos dentro de los macrófagos y granulomas; las células T de memoria y su respuesta es requerida para controlar la diseminación y el daño del tejido ocasionado por la infección; debido a esto se cree que este tipo de respuesta es protectora. A medida que la enfermedad avanza, la respuesta inmune celular disminuye, reflejando un cambio de respuesta de Th1 a Th2 (Chiodini, 1996). Cuando los animales entran a la etapa de infección lepromatosa o Th2, comienza a manifestar signos clínicos inespecíficos de la infección, tales como pérdida de peso, en algunos casos diarrea y excreción intermitente de la bacteria (Koets, *et al.*, 1990). El cambio de respuesta inmune Th1 a Th2, se ha

asociado con la progresión de la PTB del estado subclínico al clínico (Stabel, 2010). Th2 estimula la producción de las citocinas reguladoras IL-4, IL-5 e IL-10 las cuales activan la respuesta inmune humoral caracterizándose por la expansión de los linfocitos B, la secreción de inmunoglobulinas, y el control de la respuesta mediada por Th1. A diferencia de la respuesta celular, el tipo de respuesta humoral no es protectora y no 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 deficiencia en la absorción de nutrientes que desencadena una enteropatía (Patterson *et al.*, 1969). 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).

Begg *et al.* (2011) al realizar un estudio en ovejas observaron que no todos los animales siguen el patrón clásico. Alrededor del 50% de los animales infectados mostraron una respuesta combinada Th1/Th2 (Figura 7B y 7C), el 39% de los animales mostraron el "clásico" interruptor de Th1/Th2 (Figura 7A), mientras que el 11% mostraron una única respuesta Th1 (Figura 7D). Los animales multibacilares tuvieron una disminución en la capacidad funcional para producir IFN- γ a partir de células estimuladas con antígenos-MAP y mitógenos no específicos. Esto indica que las respuestas inmunes frente a infecciones por MAP son más complejas de lo que se pensaba, donde ambos anticuerpos y la inmunidad celular pueden desempeñar un papel clave en las primeras etapas de manifestación de la enfermedad o la resistencia. La pérdida de la respuesta celular en los animales multibacilares puede ser una indicación de que toda la respuesta inmune es disfuncional (Begg *et al.*, 2011).

Los mecanismos que controlan el interruptor Th1/Th2 siguen siendo poco conocidos, no está claro porque una respuesta Th1 la cual es muy fuerte al inicio de la enfermedad se pierde con el tiempo. El uso de un novedoso modelo matemático de la respuesta inmune indican que los

siguientes factores pueden determinar el tiempo de interruptor de Th1/Th2: (i) las bacterias dosis tamaño y el tamaño de ráfaga de macrófagos infectados, (ii) la longevidad de las bacterias extracelulares, (iii) grado de competencia entre Th1 y respuestas Th2, y (iv) Th1 agotamiento inmune (Magombedze *et al.*, 2014).

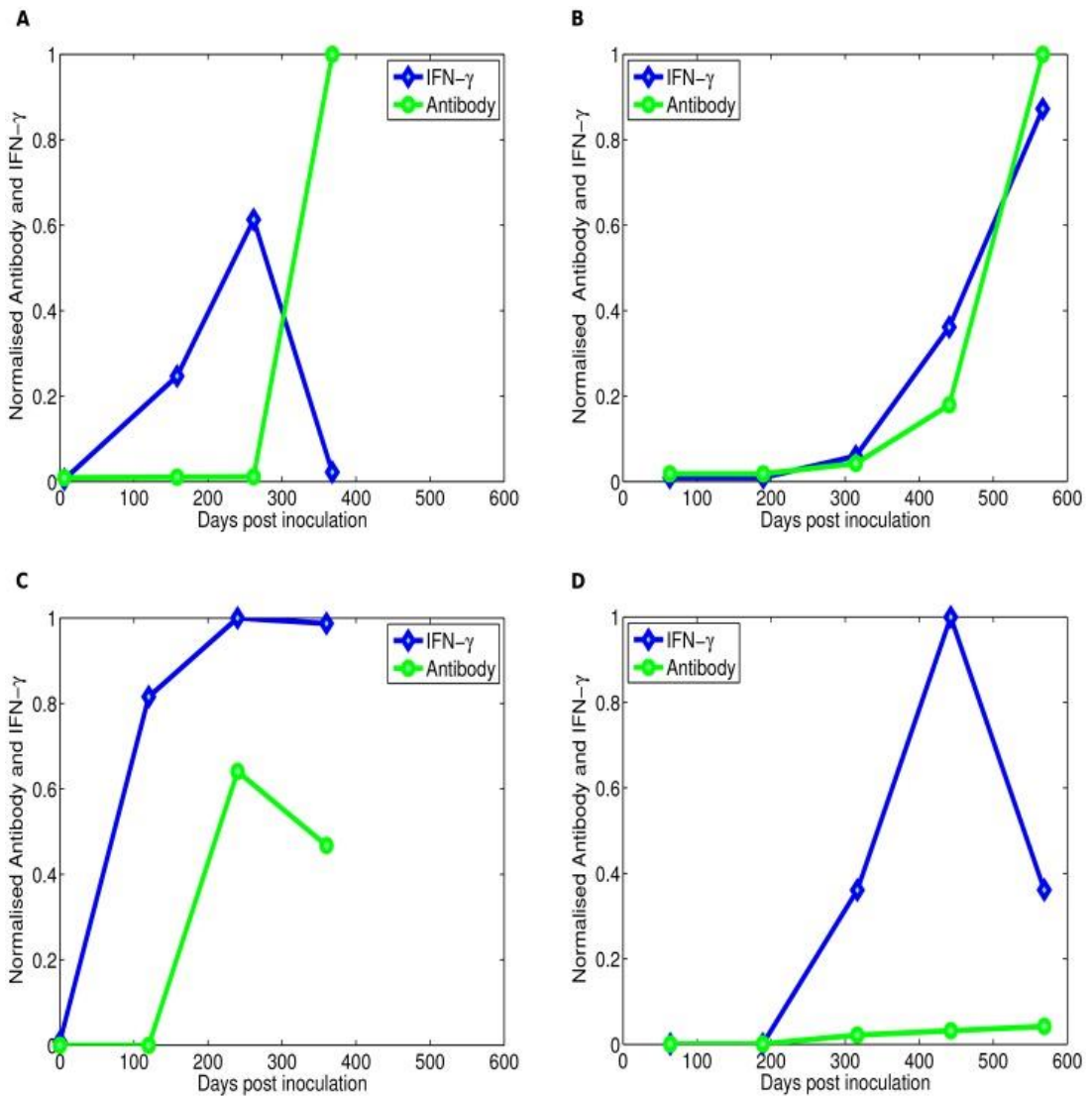


Figura 7. Cinética de la respuesta inmune durante la infección experimental por MAP en ovejas (Begg *et al.*, 2011).

De acuerdo a la relación huésped patógeno que se presente, los animales cursaran las siguientes fases:

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

Fase II. *Fase subclínica.* La infección no está completamente controlada, algunos animales la controlan parcialmente pero excretan la bacteria de forma intermitente, mientras que otros incuban la enfermedad y excretan grandes cantidades de bacterias. La mayoría de los animales infectados en una explotación se encuentran en esta fase. En la cual no muestran signos clínicos evidentes de la enfermedad, aunque si lesiones microscópicas (Pérez *et al.*, 2000), también pueden presentar anticuerpos circundantes o respuestas inmunes celulares alteradas. En esta fase los animales comienzan a perder productividad, en el caso de los bovinos se disminuye la producción láctea entre el 4-14% (Wilson *et al.*, 1997), se observa la aparición de síntomas inespecíficos como la disminución de la fertilidad y la mastitis (Valentin-Weigand *et al.*, 1999).

Fase III. *Fase clínica.* Esta fase sólo se desarrolla tras varios años de infección por MAP, en bovinos puede comenzar entre los 3-4 años y en pequeños rumiantes el inicio de la enfermedad puede empezar antes de los 2 años; en ambos casos esto coincide con el estrés producido tras el parto y el inicio de la lactancia (Manning y Collins., 2001, García *et al.*, 1994). Los signos clínicos característicos que se presentan son diarrea intermitente, que afecta principalmente a los bovinos, la cual no responde a tratamiento debido a que el agente persiste en la mucosa intestinal, las bacterias son fagocitadas por los macrófagos, los cuales proliferan e infiltran la submucosa del intestino, provocando una menor absorción, se reduce la absorción de nutrientes; lo que provoca en la vaca hipoproteinemia (Fecteau & Whitlock, 2010), disminución de la masa muscular y edema. En ovinos y caprinos no es común la presencia de diarrea, aunque esta puede aparecer en algunos casos en la fase final de la enfermedad, cuando las lesiones afectan ampliamente el intestino (Carrigan & Seaman, 1990) (Cuadro 2).

Fase IV. Fase final. A esta fase pertenecen los animales en estado clínico avanzado, cuyas características principales son, debilidad, emaciación, diarrea acuosa o profusa, caquexia extrema, edema intramandibular y deshidratación que conduce a la muerte del animal (Figura 8).



Figura 8. Fase clínica en rumiantes

Cuadro 2. Presentación de MAP en bovinos y ovinos

| Características | Bovinos | Ovinos | |
|---------------------------------|---|---|-----------------------|
| Signos | Diarrea | Si | Rara vez |
| | Edema | Si | Rara vez |
| | Emaciación | Si | Si |
| Lesiones histológicas | Engrosamiento de la mucosa (íleo-cecal) | Engrosamiento de la mucosa (íleo, ciego, colon) | |
| | Tipos de MAP | Tipo C (Tipo II) | Tipo S (Tipo I y III) |
| Susceptibilidad genética | Jersey | Merino | |
| Estrategia de control | Práctica de manejo | Vacunación | |

Fuente: Paratuberculosis, organism, disease control.

2.12. Diagnóstico

El diagnóstico de la paratuberculosis es difícil debido a su naturaleza fundamentalmente subclínica, el diagnóstico se puede llevar a cabo mediante el uso de pruebas serológicas como ELISA, las cuales son utilizadas como pruebas tamices, posteriormente se confirman demostrando la presencia de MAP en las heces mediante microscopía, cultivo o empleando sondas de ADN y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (OIE, 2008).

2.12.1. Serología

La serología es el estudio que permite comprobar la presencia de anticuerpos específicos contra algún patógeno en sangre. Los animales infectados con MAP en etapa clínica, son grandes excretores de bacilos y presentan una respuesta inmune humoral alta en esta etapa de la infección, la cual es detectable por las técnicas inmunoenzimáticas (ELISAs), inmunodifusión en gel de agar (AGID) y fijación del complemento (CFT) (Gilardoni & Mundo, 2008). Sin embargo se han reportado sensibilidades tan bajas como 13.5%, cuando se emplean ELISAs comerciales en el diagnóstico de animales en etapas tempranas de la infección (Sweeney *et al.*, 2006). La sensibilidad y especificidad de una prueba serológica varía

sustancialmente debido a al estatus del animal (Sweeney *et al.*, 1995; Whitlock *et al.*, 2000; Dargatz *et al.*, 2001; Nielsen & Toft 2008) y a la elección del antígeno (Harris y Barleta, 2001; Collins *et al.*, 2005) (Cuadro 2).

Las pruebas serológicas son rápidas y económicas, por lo que son muy utilizadas en el diagnóstico de la PTB, sin embargo como se mencionó anteriormente los ELISAs que se encuentran disponibles en el mercado tienen baja sensibilidad en etapas tempranas de la infección, lo cual es una desventaja para el control de la enfermedad, debido a que estas pruebas detectan como positivos a aquellos animales los cuales están en etapa avanzada y excretan grandes cantidades de bacterias, sin embargo se han detectado excreciones bacterianas en etapas tempranas de la infección (Ponce *et al.*, 2014), las cuales podrían causar nuevas infecciones en el rebaño.

Cuadro. 3. Proteínas inmunogénicas utilizadas en pruebas serológicas dirigidas al diagnóstico de la PTB

| Antígeno | Sensibilidad | Especificidad | Referencia |
|--------------------------------|--------------|---------------|---------------------------------|
| PPA-3 | 47.5% | 86.8% | Ferreira <i>et al.</i> , 2002 |
| LAM | 87.9% | 65.5% | McKenna <i>et al.</i> , 2005 |
| LP5 | 37% | 100% | Costanzo <i>et al.</i> , 2012 |
| WLC | 74.1% | 100% | |
| P35 | 84% | 100% | El-Zaatari <i>et al.</i> , 2002 |
| Superficie de MAP (EVELISA) | 96.6% | 100% | Eda <i>et al.</i> , 2006 |

PPA-3= Antígeno protoplasmático paratuberculosis
LAM= Lipoarabinomannan
LP5=Lipopentapeptido
WCL= Antígeno lisado de células enteras (whole cell lysates)
P35= Proteína recombinante

2.12.1.1. ELISA (Ensayo de Inmunoadsorción Ligado a Enzima)

ELISA por definición explora el uso de una enzima unida a uno de los reactivos utilizados en el ensayo. La posterior adición de sustratos/ cromógenos enzimáticos provoca un cambio de color; Los resultados pueden leerse tanto a simple vista como cuantificados usando espectrómetro especialmente diseñado. El hecho de que la proteína (incluyendo el anticuerpo) y los carbohidratos puede estar pasivamente unida a la placa de microtitulación (fase sólida) ha sido explotada en la mayoría de las aplicaciones de ELISA. Dado que uno de los componentes está unido a una fase sólida por adsorción pasiva, se pueden añadir reactivos subsiguientes, y después de un periodo de incubación, el material sin reaccionar puede ser simplemente lavado. Tal ensayo se denomina ELISA (Crowther, 1995).

Cuadro 4. Tipos de ELISAs

| Tipo de ELISA | | Representación |
|---------------|----------------------|---|
| Directo | Anticuerpo | $I\text{-Ag } w + Ab^*E w + S \rightarrow R$ |
| | Antígeno | $I\text{-Ab } w + Ab^*E w + S \rightarrow R$ |
| Indirectos | | $I\text{-Ag } w + Abw + \text{Anti-}Ab^*E + S \rightarrow R$ |
| Sándwich | Directo | $I\text{-Ab } w + Agw + AB^*Ew + S \rightarrow R$ |
| | Indirecto | $I\text{-Ab } w + Agw + AB + \text{Anti-}AB^*Ew + S \rightarrow R$ |
| Competitivo | Directo-Anticuerpo | $I\text{-Ag } w + Ab^*Ew + S \rightarrow R$ +AB |
| | Directo-Antígeno | $I\text{-Ag } w + Ab^*Ew + S \rightarrow R$ +Ag como rango de dilución |
| | Indirecto-Anticuerpo | $I\text{-Ag } w + Ab + \text{Anti-}Ab^*Ew + S \rightarrow R$ +AB |
| | Indirecto-Antígeno | $I\text{-Ag } w + Ab + \text{Anti-}Ab^*Ew + S \rightarrow R$ +Ag |

Ag= Antígeno

Ab= anticuerpo dirigido contra el antígeno

AB= anticuerpo de otra especie animal comparado con Ab

Anti-Ab= antisuero específico de la especie

*E= Enzima unida a anticuerpo

I= placa de microtitulación (fase sólida)

W= lavado

S= Sustrato

R=lectura

2.12.1.1.1. EVELISA (Etanol-Vortex ELISA). EVELISA es una prueba diagnóstica con mayor especificidad para la enfermedad de Johne's en el ganado la cual utiliza antígenos extraídos de la superficie de MAP, esta prueba fue probada por Eda *et al.* (2006), con el objetivo de mejorar las técnicas de ELISA disponibles en el mercado e identificar tanto animales de baja excreción como medios excretores, debido a que una de las deficiencias de las ELISAs comerciales es la baja sensibilidad en muestras de animales que cursan una etapa temprana de la enfermedad. En este estudio EVELISA fue capaz de identificar el 96.6% de los animales con excreción fecal baja y el 100% de los excretores de nivel medio y alto, mientras que ELISA comercial detectó el 13.7% de los animales de bajo nivel excretor, el 25% en excretores de nivel medio y 96.2% en los excretores de alto nivel. Así EVELISA fue sustancialmente superior a ELISA comercial, especialmente en la detección de excretores de bajo y medio nivel. EVELISA podría ser la base para un ensayo específico y muy sensible para el diagnóstico de paratuberculosis (Cuadro 3).

2.11.1.1.2. Reacción cruzada. Por definición, un anticuerpo es específico para un antígeno que lo crea. Sin embargo, muchos 'antígenos' que ocurren naturalmente son una mezcla de macromoléculas que contienen varios epítopos. En el caso de MAP, varios informes han indicado la presencia de micobacterias ambientales como *Mycobacterium avium subespecie avium* (MAA), *Mycobacterium scrofulaceum*, *Mycobacterium intracellulare*, *Mycobacterium terrae* y *M. phlei*, en medioambiente de rebaños ganaderos (Osterstock *et al.*, 2007; Roussel *et al.*, 2007; Norby *et al.*, 2007) los cuales causan reacciones falsas positivas en las pruebas ELISA, disminuyendo la sensibilidad de la prueba. Roussel *et al.* (2007) informaron una correlación positiva entre la recuperación de micobacterias ambientales (no-MAP) de heces y resultados de ELISA falso positivo, lo que indica que la infección de bovinos con micobacterias ambientales está ligada a reacciones falso positivas en los ELISA dirigidos al diagnóstico de la PTB.

Para evitar reacciones cruzadas se emplean micobacterias ambientales como preabsorción, para disminuir los falsos positivos, sin afectar la sensibilidad, comúnmente se utiliza *M. phlei* (Yokomizo, 1985), también se ha reportado el uso de *M. fortuitum* como alternativa a *M. phlei* en el paso de preabsorción en el diagnóstico de bovinos, mediante ELISA con PPA, debido a que esta micobacteria ambiental ha sido frecuentemente aislada en Brasil, lugar en donde se llevó a cabo el estudio (Marassi *et al.*, 2008). En la prueba de EVELISA en bovinos, Scott *et al.* (2010) utilizaron *M. phlei* para eliminar reacciones cruzadas observadas en un rebaño libre de MAP, logrando obtener una especificidad del 100%.

Probablemente sería de gran ayuda conocer las poblacionales de micobacterias ambientales de cada región o rebaño y optimizar el preabsorbante correspondiente (Marassi *et al.*, 2008).

2.12.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Las regiones únicas del ADN genómico de MAP más ampliamente utilizados para PCR son el gen ARNr 16S y el elemento de inserción IS900. Esta técnica permitió grandes avances en el diagnóstico molecular de la PTB, debido a la rapidez en la detección de la bacteria, comparado con el tiempo requerido por el cultivo fecal (Whittington *et al.*, 2009). MAP ha podido ser identificado por PCR aun antes de su aislamiento por cultivo, a partir de muestras fecales, (Kawaji *et al.*, 2007, Irengé *et al.*, 2009), leche (Djonne *et al.*, 2003, Kaur *et al.*, 2010), sangre y tejidos. Siendo una gran ventaja sobre todo para aquellas cepas difíciles de aislar como las del tipo I/III. A pesar de estas ventajas que representa, tiene como gran limitante la baja sensibilidad para identificar pequeñas cantidades de bacterias en comparación con el cultivo fecal (Collins *et al.*, 1993) y la presencia de inhibidores contenidos en los especímenes que se van a amplificar, particularmente cuando el ADN es preparado a partir de extractos fecales (Englund *et al.*, 1999), así como tampoco puede distinguir bacilos viables o muertos.

2.12.3. Bacteriología

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

El cultivo de MAP se basa en los métodos tradicionales para el cultivo de micobacterias de crecimiento lento a partir de muestras clínicas (Merkal *et al.*, 1964; Gillespie, 1999). Hay cuatro pasos críticos:

1. La descontaminación de muestras clínicas para destruir o suprimir, los microorganismos en su mayoría irrelevantes y de rápido crecimiento, que incluyen bacterias y hongos, que se encuentran presentes en heces en grandes cantidades.
2. Incubación prolongada en los medios de cultivos adecuados los cuales contienen antibióticos para suprimir cualquier contaminante restante.
3. Reconocimiento de colonias de MAP en medios sólidos o un signo particular de crecimiento en medios de caldo.
4. Identificación de MAP por medio de fenotipificación y/o genotipificación.

2.12.3.1. Medios de cultivo sólidos y líquidos

Ambos medios, se pueden utilizar para cultivar MAP. Los medios sólidos son probablemente más utilizados, ya que son más baratos, se requiere menos instrumentación y la identificación del organismo puede ser más simple. Los medios de cultivo para MAP deben incluir nutrientes esenciales, a menudo incluyen antimicrobianos para desalentar el crecimiento de contaminantes y pueden incluir colorantes para ayudar al reconocimiento de las colonias. Muchos medios evaluados por los primeros trabajadores en micobacteriología llevaron al refinamiento progresivo de sesgos a base de huevos, como medio Dubos, pero estos han caído en desuso y no parecen haber sido utilizados por más de 20 años. En lugar de ello, se llegó a un consenso en dos medios más adecuados: medio de Lowenstein Jensen (LJ), y medio de yema de huevo Herrold (HEYM). Middlebrook 7H10 o 7H11 agar y 7H9 caldo también son la base para medios, pero, para el crecimiento óptimo de MAP hay que añadir yema de huevo. En la mayoría de las circunstancias MJ es un componente esencial de los medios de cultivos primarios para MAP.

2.12.4. Necropsia

El diagnóstico por necropsia se lleva a cabo para la búsqueda de lesiones patognomónicas de la enfermedad en intestino (Pérez *et al.*, 1996), o simplemente con la demostración de los típicos microorganismos ácido-alcohol resistentes en frotis de impresión de las lesiones o histológicamente (Argenté, 1988), y mediante el aislamiento de MAP en cultivo.

La PTB no se puede diagnosticar a través de un examen superficial del intestino buscando lesiones de engrosamiento. El intestino debe abrirse desde el duodeno al recto para exponer la mucosa (OIE, 2008). No siempre existe una relación estrecha entre la gravedad de los signos clínicos y la extensión de las lesiones intestinales. Se inspecciona la mucosa, especialmente la del íleon terminal, para detectar el plegamiento y el engrosamiento patognomónicos. En ciervos con paratuberculosis se ha observado hiperemia, erosiones y petequias en las mucosas. Las primeras lesiones se manifiestan como el engrosamiento y el encadenamiento de los

vasos linfáticos. Los nódulos linfáticos mesentéricos se encuentran habitualmente prominentes y edematosos.

Las muestras deberán ser fijadas en formol al 10% para su posterior utilización en histopatología.

2.12.5. Histopatología

El análisis macroscópico de los tejidos procedentes de animales sospechosos es un diagnóstico presuntivo debido a que existen casos en los que no se observa ninguna alteración aparente en la mucosa intestinal a pesar de que los animales presenten signos clínicos (Burgelt *et al.*, 1978). En estos casos el diagnóstico puede ser complementado con un estudio histopatológico del tejido intestinal, sobre todo de la válvula ileocecal (Carrigan y Seaman, 1990). Esta metodología tiene la ventaja de identificar no sólo animales con lesiones graves sino que también con lesiones focales asociadas a fases subclínicas de la enfermedad (Corpa *et al.*, 2000; Pérez *et al.*, 1996). Para poder identificar correctamente las lesiones es muy importante la realización de una correcta obtención de muestras incluyendo siempre tejido linfoide intestinal que es donde se localizan las lesiones iniciales y latentes de la paratuberculosis (Juste *et al.*, 1994; Nisbet *et al.*, 1962). Para la observación de las lesiones histológicas se ha empleado de forma rutinaria la técnica convencional de la Hematoxilina-Eosina (H&E) siempre en combinación con la tinción de Ziehl-Neelsen (ZN) para la observación de bacilos ácido-alcohol resistentes. Sin embargo, en algunos casos con lesiones visibles en las muestras el número de bacilos es escaso o incluso nulo (Burgelt *et al.*, 1978; Stamp & Watt, 1954). La sensibilidad de la técnica histopatológica varía según los distintos autores, hay algunos que la consideran inferior al cultivo microbiológico (55%) sobre todo en ganado bovino (De Lisle *et al.*, 1980), y otros por el contrario han identificado un mayor número de animales con lesiones características de paratuberculosis en ganado ovino y caprino comparándolo con el diagnóstico microbiológico (Dimareli-Malli & Sarris, 2001; Pérez *et al.*, 1996). Esta disparidad de resultados se debe principalmente a las características de los aislados de MAP ya que en concreto los procedentes de pequeños rumiantes son muy

difíciles de cultivar y requieren condiciones especiales para su aislamiento en laboratorio. El principal inconveniente de esta metodología es el requerimiento del animal muerto, aunque en algunos casos se ha propuesto la aplicación en animales vivos mediante el análisis de biopsias pero es muy costoso, y además se requiere un manejo especializado de los animales.

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

2.13. Control y prevención

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

Para tener éxito en el control de la paratuberculosis es necesario implementar ciertas medidas sanitarias en nuestro rebaño:

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

La vacuna para la paratuberculosis ha sido comercialmente disponible por muchos años, pero por desgracia no es completamente eficaz en la prevención de la enfermedad. Los animales vacunados contra la paratuberculosis desarrollan tanto hipersensibilidad de tipo retardada como anticuerpos séricos, ayuda a prevenir la enfermedad clínica pero no evita necesariamente la infección. También interfiere con los programas de diagnóstico y de control de la tuberculosis bovina. Así, si se necesita diagnosticar la infección en animales vacunados, sólo se pueden utilizar pruebas de detección para MAP en heces (Jorgense, 1984), por lo que las características de la vacuna ideal para PTB se observan en el cuadro 4.

Cuadro 5. Vacuna actual vs. Vacuna ideal

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

(De Lisle, 2010)

BIBLIGRAFÍA CITADA

- Abalos, P. 2010. Actualidades en Paratuberculosis. Departamento de Medicina Preventiva Animal. Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias Universidad de Chile. Disponible en:<http://www.ovinos-caprinos.com.ar/SANIDAD/Actualidad%20en%20Paratuberculosis.pdf>
- Adúriz, J.J., Juste, R. A., & Cortabarría, N. 1995. Lack of mycobactin dependence of mycobacteria isolated on Middlebrook 7H11 from clinical cases of ovine paratuberculosis. *Veterinary Microbiology*, 45(2-3), 211-217.
- Argenté G. 1988. Utilisation de la culture fécale dans un plan de prévention de la paratuberculose dans 500 troupeaux; Justifications techniques et économiques In: Proceedings of the International Colloquium on Paratuberculosis, II; Laboratoire Central de Recherches Veterinaires. Maisons-Alfort. France. Thorel MF, Merkal RS, editor. International Association for Paratuberculosis; pp. 30–35.
- Ayele, W.Y., Svastova, P., Roubal, P., Bartos, M. & Pavlik, I. 2005. *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis cultured from locally and commercially pasteurized cow's milk in the Czech Republic. *Applied And Environmental Microbiology*, 71(3), 1210-1214.
- Bang, B. 1906. *Chronische pseudotuberkulose* darmentzuendung beim rinde. *Berlinereraerztliche Wochenschrift*, 42, 759-763.
- Bang, D., Herlin, T., Stegger, M., Andersen, A.B., Torkko, P., Tortoli, E. & Thomsen, V.O. 2008. *Mycobacterium arosiense* sp. nov., a slowly growing, scotochromogenic species causing osteomyelitis in an immunocompromised child. *International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology*, 58(Pt 10), 2398-2402.

- Bannantine, J.P., Baechler, E., Zhang, Q., Li, L., & Kapur, V. 2002. Genome scale comparison of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* with *Mycobacterium avium* subsp. *avium* reveals potential diagnostic sequences. *Journal Of Clinical Microbiology*, 40(4), 1303-1310.
- Bannantine, J.P., Zhang, Q., Li, L. & Kapur, V. 2003. Genomic homogeneity between *Mycobacterium avium* subsp. *avium* and *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* belies their divergent growth rates. *BMC Microbiology*, 310.
- Bannantine, J.P., Wu, C., Hsu, C., Zhou, S., Schwartz, D.C., Bayles, D.O. & Talaat, A.M. 2012. Genome sequencing of ovine isolates of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* offers insights into host association. *BMC Genomics*, 1389.
- Barclay, R., Ewing, D.F. & Ratledge, C. 1985. Isolation, identification, and structural analysis of the mycobactins of *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, *Mycobacterium scrofulaceum*, and *Mycobacterium paratuberculosis*. *Journal Of Bacteriology*, 164(2), 896-903.
- Barkema, H.W.; Hesselink, J.W.; McKenna, S.L.; Benedictus, G. & Groenendaal, H. Global prevalence and economics of infection with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in ruminants. *Paratuberculosis: Organism, Disease, Control*, 2010. p.10-21.
- Begg, D.J., O'brien, R., Mackintosh, C.G. & Griffin, J. T. 2005. Experimental infection model for Johne's disease in sheep. *Infection And Immunity*, 73(9), 5603-5611.

- Begg, D.J., de Silva, K., Carter, N., Plain, K.M., Purdie, A. & Whittington, R. J. 2011. Does a Th1 over Th2 dominancy really exist in the early stages of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infections?. *Immunobiology*, 216(7), 840-846.
- Ben Salah, I., Adékambi, T., Raoult, D. & Drancourt, M. 2008. rpoB sequence-based identification of *Mycobacterium avium* complex species. *Microbiology* 154, 3715–3723.
- Buergelt, C.D., Hall, C., McEntee, K. & Duncan, J.R. 1978. Pathological evaluation of paratuberculosis in naturally infected cattle. *Vet. Pathol.* 15, 196-207.
- Carrigan, M.J., & Seaman, J.T. 1990. The pathology of Johne's disease in sheep. *Australian Veterinary Journal*, 67(2), 47-50.
- Castellanos, E., Aranaz, A., Romero, B., de Juan, L., Alvarez, J., Bezos, J., & Domínguez, L. 2007. Polymorphisms in gyrA and gyrB genes among *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* type I, II, and III isolates. *Journal Of Clinical Microbiology*, 45(10), 3439-3442.
- Cheville, N., Hostelles, J., Thomsen, B., Simutis, T., Vanloubbeeck & Steadham, E. 2001. Intracelular trafficking of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in magrophages. *Dtsch. Tierarztl. Wochenschr.* 108(6):236-43.
- Chiodini, R J., Van Kruiningen, H.J. & Merkal, R.S. 1984. Ruminant paratuberculosis (Johne's disease): the current status and future prospects. *The Cornell Veterinarian*, 74(3), 218-262.

- Chiodini, R.J. 1986. Debate. M. Paratuberculosis in food and the public health implications (pro association between Johne's disease and Crohn's disease): en Chiodini, Hines y Collins editors. Proc 5th Int Coll. Paratube. Pp. 353-365. IAP, Rehoboth, MA, USA.
- Chiodini, R. J. 1989. Crohn's disease and the mycobacterioses: a review and comparison of two disease entities. *Clinical Microbiology Reviews*, 2(1), 90-117.
- Chiodini, R J. & Hermon-Taylor, J. 1993. The thermal resistance of *Mycobacterium paratuberculosis* in raw milk under conditions simulating pasteurization. *Journal Of Veterinary Diagnostic Investigation: Official Publication Of The American Association Of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc*, 5(4), 629-631.
- Chiodini, R.J. 1996. Immunology: resistance to paratuberculosis. *The Veterinary Clinics Of North America. Food Animal Practice*, 12(2), 313-343.
- Clarke, C.J. 1997. The Pathology and Pathogenesis of Paratuberculosis in Ruminants and Other Species. Department of Veterinary Pathology, University of Edinburgh, Easter Bush, Roslin, Midlothian, EH25 9RG, UK.
- Cocito C, Gilot P, Coene M, De Kesel M, Poupart P, Vannuffel P. 1994. Paratuberculosis. *Clinical Microbiology Reviews*; 7 (3): 328-345.
- Coetsier, C., Havaux, X., Mattelard, F., Sadatte, S., Cormont, F., Buergelt, K., Limbourg, B., Latinne, D., Bazin, H., Deneff, J.F. & Cocito, C. 1998. Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in infected tissues by new species-specific immunohistological procedures. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 5, 446-451.

- Collins, M.D. & Cummins, C.S. 1986. «Genus *Corynebacterium* Lehmann and Neumann 1896, 350AL». En *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 2, pp. 1266-1276.
- Collins, D.M., Gabric, D.M. & de Lisle, G.W. 1990. Identification of two groups of *Mycobacterium paratuberculosis* strains by restriction endonuclease analysis and DNA hybridization. *Journal Of Clinical Microbiology*, 28(7), 1591-1596.
- Collins, D.M., Hilbink, F., West, D.M., Hosie, B.D., Cooke, M.M. & de Lisle, G.W. 1993. Investigation of *Mycobacterium paratuberculosis* in sheep by faecal culture, DNA characterisation and the polymerase chain reaction. *The Veterinary Record*, 133(24), 599-600.
- Collins, M. T. 2003. Paratuberculosis: review of present knowledge. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 44(3-4), 217-221.
- Collins, M.T., Wells, S.J., Petrini, K.R., Collins, J.E., Schultz, R.D. & Whitlock, R.H. 2005. Evaluation of five antibody detection tests for diagnosis of bovine paratuberculosis. *Clinical And Diagnostic Laboratory Immunology*, 12(6), 685-692.
- Collins, M. T., Eggleston, V. & Manning, E. B. 2010. Successful control of Johne's disease in nine dairy herds: results of a six-year field trial. *Journal Of Dairy Science*, 93(4), 1638-1643.
- Consejo Técnico Constitutivo Nacional de Salud Animal (CONASA). 2010. Plan estratégico del programa para la atención de la paratuberculosis en Ganado bovino, ovino y caprino en México. Disponible en: <http://www.conasamexico.org.mx/conasa/pdf/>.

- Costanzo, G., Pinedo, F.A., Mon, M.L., Viale, M., Gil, A., Illia, M.C., & Romano, M.I. 2012. Accuracy assessment and screening of a dairy herd with paratuberculosis by three different ELISAs. *Veterinary Microbiology*, 156(1-2), 183-188.
- Corpa, J. M., Garrido, J., García Marín, J. F. & Pérez, V. 2000. Classification of lesions observed in natural cases of paratuberculosis in goats. *Journal Of Comparative Pathology*, 122(4), 255-265.
- Correa, M.M., Medina B.G., Rentería E.T., Monge, N.F., González V.V. & López V.G. 2013. Caracterización molecular de *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* en bovinos y ovinos de Mexicali, Baja California, México. (Spanish). *Revista Mexicana De Ciencias Pecuarias*, 4(4), 489-500.
- Crowther, J.R. ELISA, Theory and practice. Totowa, NJ: Humana Press, 1995. 152p.
- Dargatz, D.A., Byrum, B.A., Barber, L.K., Sweeney, R.W., Whitlock, R.H., Shulaw, W.P., Jacobson, R.H. & 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.
- De Lisle, G.W., Samagh, B.S. & Duncan, J.R. 1980. Bovine paratuberculosis II. A comparison of fecal culture and the antibody response. *Can. J. Comp. Med.* 44, 183-191.
- Dimareli-Malli, Z. & Sarris, K. 2001. Comparison of DNA probe test and cultivation methods for detection of *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* in caprine and ovine faeces. *Aust. Vet. J.* 79, 47-50.

- Djonne, B., Jensen, M. R., Grant, I.R. & Hostad, G. 2003. Detection by immunomagnetic PCR of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in milk from dairy goats in Norway. *Vet. Microbiol.* 92:135-143.
- Donaghy, J.A., Totton, N.L. & Rowe, M. T. 2004. Persistence of *Mycobacterium paratuberculosis* during manufacture and ripening of cheddar cheese. *Applied And Environmental Microbiology*, 70(8), 4899-4905.
- Eda, S., Bannantine, J., Waters, W. Mori Y., Whitlock, R., Scott, M. & Speer. 2006. A highly sensitive and subspecies-specific surface antigen enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of Johne's disease. *Clin and Vaccine Immunol.* 13, 837-844.
- El Zaatari, F.A., Hulten, K., Collins, M.T., Huchzermeier R & Graham, D.Y. 2002. p35-based ELISA assay for the detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in cattle with Johne's disease. *Proceedings of the Seventh International Colloquium on Paratuberculosis.*
- El Zaatari, F.A., Hulten, K., El-Zimaity, H.M., Collins, M.T. & Graham, D.Y. 2003. Pathogenesis of Johne's disease; a possible role of cell-wall deficient forms of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. En: *Proceedings of the Seventh International Colloquium on Paratuberculosis.* Juste, R.A, Geijo, M.V., Garrido, J.M. Eds. Bilbao, España. 45-48.
- Ellingson, J., Bolin, C. y Stabel, J. 1998. Identification of gene unique to *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* and application to diagnosis of paratuberculosis. *Mol. Cell. Probes*, 12(3):133-42.

- Ellingson, J.L., Stabel, J.R., Bishai, W.R., Frothingham, R. & Miller, J.M. 2000. Evaluation of the accuracy and reproducibility of a practical PCR panel assay for rapid detection and differentiation of *Mycobacterium avium* subspecies. *Molecular And Cellular Probes*, 14(3), 153-161.
- Ellingson, J., Stabel, J., Radicloff, R., Whitlock, R. & Miller, J. 2005. Detection of *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* in free-ranging bison (*Bison bison*) by PCR. *Mol. Cell Probes* 19:219-225.
- Englund, S., Ballagi-Pordany A, Bolske, G. & Johansson, K. E. 1999. Single PCR with a mimic molecule for detection of *Mycobacterium avium* subespecies *paratuberculosis*. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 33:163-171.
- Estevez-Denaives, I., Hernandez-Castro, R., Trujillo-Garcia, A.M. & Chavez-Gris, G., 2007. Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in goat and sheep flocks in Mexico, *Small Ruminant Research*, 72, 209–213.
- Fecteau, M.E. & Whitlock, R.W. 2010. Paratuberculosis: organism, disease, control, in *Paratuberculosis cattle*, eds M. A. Behr and D.M. Collins (Oxfordshire: CAB international), 144-153.
- Fernández-Silva, J., Correa-Valencia, N. & Ramírez, N. 2014. Systematic review of the prevalence of paratuberculosis in cattle, sheep, and goats in Latin America and the Caribbean. *Tropical Animal Health & Production*, 46(8), 1321-1340.
- Ferreira, R., Fonseca, L.S., Oelemann, W.M. & Lilenbaum, W. 2010. An ELISA for detection of bovine paratuberculosis in Rio de Janeiro, Brazil. *Proceedings of the Seventh International Colloquium on Paratuberculosis*.

- Francis, J., Macturk, H.M., Madinaveitia, J. & Snow, G.A. 1953. Mycobactin, a growth factor for *Mycobacterium johnei*. I. Isolation from *Mycobacterium phlei*. The Biochemical Journal, 55(4), 596-607.
- García, M.J., Pérez, V. García de Jalón, J. DE las Heras, M. Barberá, M. Fernández de Luco, D. & Badiola, J. 1994. Diagnóstico de casos clínicos de paratuberculosis ovina y caprina. Pathol. 122, 255-265.
- Gillespie, S.H. 1999. Microbiological diagnosis of granulomatous infections. In: James, D.G. and Zumla, A. (eds) The Granulomatous Disorders. University Press, Cambridge, UK, pp. 122–131.
- Giraldoni, M.V. & Mundo, S.L. 2008. Paratuberculosis Bovina. Infovet. Sitio Argentino de Producción Animal. Infovet, 13(102).
- Goodfellow, M. & L.G. Wayne. 1982. Taxonomy and nomenclature, The biology of the mycobacteria, In C. Ratledge and J. L. Stanford (ed.), . Academic Press, Inc., London vol. 1. p. 471-521.
- Grant, I.R., Ball, H.J. & Rowe, M.T. 2002a. Incidence of *Mycobacterium paratuberculosis* in bulk raw and commercially pasteurized cows' milk from approved dairy processing establishments in the United Kingdom. Applied And Environmental Microbiology, 68(5), 2428-2435.
- Grant, I.R., Hitchings, E.I., McCartney, A., Ferguson, F. & Rowe, M. T. 2002b. Effect of commercial-scale high-temperature, short-time pasteurization on the viability of *Mycobacterium paratuberculosis* in naturally infected cows' milk. Applied And Environmental Microbiology, 68(2), 602-607.

- Grant, I.R. 2005a. Zoonotic potential of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*: the current position. *Journal Of Applied Microbiology*, 98(6), 1282-1293.
- Grant, I.R., Williams, A.G., Rowe, M.T. & Muir, D.D. 2005b. Efficacy of various pasteurization time-temperature conditions in combination with homogenization on inactivation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk. *Applied And Environmental Microbiology*, 71(6), 2853-2861.
- Grewal, S.K., Rajeev, S., Sreevatsan, S. & Michel, F.J. 2006. Persistence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and other zoonotic pathogens during simulated composting, manure packing, and liquid storage of dairy manure. *Applied And Environmental Microbiology*, 72(1), 565-574.
- Guzmán-Ruiz, C.C., Santillán, F. M. & Córdova, L.D. 2016. Prevalence and possible risk factors for caprine paratuberculosis in intensive dairy production units in Guanajuato, Mexico. *Journal of Veterinary Medicine and Animal Health*, 8 (11), 156-162.
- Hammer, P., Walte, H.G., Kiesner, C. & Teufel, P. 2005. Heat resistance of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in skim milk and cream tested in a pilot plant pasteurizer. Theme 3b: Implications for Public Health.
- Harris, N. & Barletta, R. 2001. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in veterinary medicine. *Clin Microbiol Rev.* 14(3):489-512.

- Hines, M.E., Stiver, S., Giri, D., Whittington, L., Watson, C., Johnson, J., Musgrove, J., Pence, M., Hurley, D., Baldwin, C., Gardner, I.A. & Aly, S. 2007. Efficacy of spheroplastic and cell-wall competent vaccines for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in experimentally-challenged baby goats. *Veterinary Microbiology* 120, 261–283.
- Hole, N.H. 1958. Johne's disease. *Adv Vet Sci*, 4: 341*387.
- Hori-Oshima, S., Campos-Barba, L.A., Moreno-Rosales, J.F., Renteria-Evangelista, T.B., Lopez-Valencia, G., De la Mora, A. & 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.
- Ikonomopoulos, J., Pavlik, I., Bartos, M., Svastova, P., Ayele, W. Y., Roubal, P. & Gazouli, M. 2005. Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in retail cheeses from Greece and the Czech Republic. *Applied And Environmental Microbiology*, 71(12), 8934-8936.
- Inderlied, C.B., Kemper, C, & Bermudez, L. 1993. The *Mycobacterium avium* Complex. *Clinical Microbiology Reviews*, 6 (3), 266-310.
- Irenge, L. M., Walravens, K. Govaerts, M. Gosfroid, J., Rosseels, V., Huygen, K. & Gala, J.L. 2009. Development and validation of a triplex real-time PCR for rapid detection and specific identification of *M. avium* subespecie *paratuberculosis* in fecal sample. *Vet. Microbiol.* 136: 166-172.
- Johansen, T.B., Dønne, B., Jensen, M. R. & Olsen, I. 2005. Distribution of IS1311 and IS1245 in *Mycobacterium avium* subspecies revisited. *Journal Of Clinical Microbiology*, 43(5), 2500-2502.

- Johne, H. A. & Frothingham, L. 1895: Ein eigenthümlicher Fall von Tuberkulose beim Rind. Deutsch. Z. Thiermed. Vergl. Path. 21, 438-454.
- Johnson-Ifearegulu, Y. & Kaneene, J.B. 1999. Distribution and environmental risk factors for paratuberculosis in dairy cattle herds in Michigan. American Journal Of Veterinary Research, 60(5), 589-596
- Jørgensen, J.B. 1977. Survival of *Mycobacterium paratuberculosis* in slurry. Nordisk Veterinærmedicin, 29(6), 267-270.
- Jørgensen, J.B. 1982. An improved medium for culture of *Mycobacterium paratuberculosis* from bovine faeces. Acta Veterinaria Scandinavica, 23(3), 325-335.
- Jørgensen, J.B. 1984. The effect of vaccination on the excretion of *Mycobacterium paratuberculosis*. In: Paratuberculosis: Diagnostic Methods, Their Practical Application and Experience with Vaccination. Commission of the European Communities Agriculture Publication, Luxembourg, 131–136.
- Jolly, A., Colavecchia, S., Jar, A., Fernández, E., Bernardelli, A., & Mundo, S. 2006. Lipoarabinomannan (LAM) de *Mycobacterium* spp: Respuesta inmune inducida en terneros. InVet, 8(1), 103-109.
- Juste, R., Aduriz, J., Bascones, M., Foley, E., Bargar, T. & Barletta, R. 1993. Effect of iron on mycobactin production and dependence in mycobacteria. Proc. 74th Annu. Meet. CRWAD, p.64. Chicago, IL, USA.

- Juste, R.A., García Marín, J.F., Peris, B., Sáez de Ocáriz, C.S. & Badiola, J.J. 1994. Experimental infection of vaccinated and non-vaccinated lambs with *Mycobacterium paratuberculosis*. *Journal Of Comparative Pathology*, 110(2), 185-194.
- Juste, R.A., Garrido, J.M. & Aduriz, G. 2000. El agente causal de la paratuberculosis y su situación taxonómica. *Bovis (Madrid)*. (93): 13-28.
- Kaur, P., Folia, G., Singh, S V., Patil, P.K. & Sandhu, K. S. 2010. Molecular detection and typing of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* from milk samples of dairy animals. *Tropical Animal Health And Production*, 42(5), 1031-1035.
- Kawaji, S., Taylor, D.L., Mori, Y. & Whittington, R.J. 2007. Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in ovine faeces by direct quantitative PCR has similar or greater sensitivity compared to radiometric culture. *Veterinary Microbiology*, 125(1/2), 36-48
- Kennedy, D. & Benedictus, D. 2001. Control of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in agriculture species. *Rev Sci Tech* 20: 151-179.
- Koets, A., Rutten, V. Hoek, A., Bakker, D., Van Zijderveld, F., Müller, K. & Van Eden, W. 1990. The T(h) 1 to T(h) 2 shift in bovines paratuberculosis and the role of apoptotic cell death. In *Proc. 6th International Colloquium on paratuberculosis* (E.JB. Manning & M.T. Collins, eds) 14-18 February, Melbourne. International Association for Paratuberculosis, Madison, Wisconsin, 585-592.
- Kudah, A., Nielsen, S. & OStergaard, S. 2008. Economy efficacy, and feasibility of a risk-based control program against paratuberculosis. *J of Dairy Sci.* 91, 4599-4609.

- Lambrecht, R.S. & Collins, M.T. 1992. *Mycobacterium paratuberculosis*. Factors that influence mycobactin dependence. Diagnostic Microbiology And Infectious Disease, 15(3), 239-246.
- Lambrecht, R.S. & Collins, M.T. 1993. Inability to detect mycobactin in mycobacteria-infected tissues suggests an alternative iron acquisition mechanism by mycobacteria in vivo. Microbial Pathogenesis, 14(3), 229-238.
- Larsen, A.B., Merkal, R.S. & Vardaman, T.H. 1956. "Survival time of *Mycobacterium paratuberculosis*," American Journal of Veterinary Research, vol. 17, no. 64, pp. 549–551.
- Lee, K.W., Jung, B.Y., Moon, O.K., Yang, D.K., Lee, S. Kim, J.Y. & Kweon, C.H. 2006. Seroprevalencia of *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* in Korea Black Goat (*Capra hircus aegagrus*). J.Vet. Med. Sci., 68(12):1379-1381.
- Li, L., Bannantine, J.P., Zhang, Q., Amonsin, A., May, B.J., Alt, D. & Kapur, V. 2005. The complete genome sequence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America, 102(35), 12344-12349.
- Lombard, J. E., Wagner, B. A. & Smith, R. L. 2006. "Evaluation of environmental sampling and culture to determine *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* distribution and herd infection status on US dairy operations," Journal of Dairy Science, vol. 89, no. 11, pp. 4163–4171.

- López-Pedemonte, T., Sevilla, I., Garrido, J. M., Aduriz, G., Guamis, B., Juste, R. A. & Roig-Sagués, A.X. 2000. Inactivation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in cow's milk by means of high hydrostatic pressure at mild temperatures. *Applied And Environmental Microbiology*, 72(6), 4446-4449.
- Lovel, R., Levi, M. & Francis, J. 1944. "Studies on the survival of Johne's bacilli," *Journal of Comparative Pathology*, vol. 54, pp. 120–129.
- 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.
- Magombedze, G., Eda, S. & Ganusov, V.V. 2014. Competition for antigen between Th1 and Th2 responses determines the timing of the immune response switch during *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection in ruminants. *Plos Computational Biology*, 10(1).
- Manning, E. J. & Collins, M. T. 2001. *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* Pathogen, Pathogenesis and diagnosis: *Rev. Sci. Tech* 20: 133-150.
- Marassi, C. D., Silva, M., Oelemann, W. R., de Souza Fonseca, L., Ristow, P. & Lilenbaum, W. 2008. An alternative for the preadsorption step in the paratuberculosis serodiagnosis: *Mycobacterium fortuitum*. *Brazilian Journal Of Microbiology*, 39(3), 511-513.
- Marsh, I.B., Bannantine, J.P., Paustian, M.L., Tizard, M.L., Kapur, V., & Whittington, R.J. 2006. Genomic comparison of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* sheep and cattle strains by microarray hybridization. *Journal Of Bacteriology*, 188(6), 2290-2293.

- Massone, A.R., Martín, A. A., Ibargoyen, S. & Gimeno, E.J. 1990. Immunohistochemical methods for the visualization of *Mycobacterium paratuberculosis* in bovine tissues. Zentralblatt Für Veterinärmedizin. Reihe B. Journal Of Veterinary Medicine. Series B, 37(4), 251-253.
- Matthews, P.R., McDiarmid, A., Collins, P. & Brown, A. 1978. The dependence of some strains of *Mycobacterium avium* on mycobactin for initial and subsequent growth. Journal Of Medical Microbiology, 11(1), 53-57.
- McDonald, W.L., O'Riley, K.J., Schroen, C.J. & Condrón, R.J. 2005. Heat inactivation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk. Applied And Environmental Microbiology, 71(4), 1785-1789.
- McKenna, S.B., Sockett, D.C., Keefe, G.P., McClure, J., VanLeeuwen, J.A. & Barkema, H.W. 2005. Comparison of two enzyme-linked immunosorbent assays for diagnosis of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. Journal Of Veterinary Diagnostic Investigation: Official Publication Of The American Association Of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc, 17(5), 463-466.
- Mejía-Martínez, K., Flores, C.L., González-Morteo, C., Resendiz, G.P., Díaz-Aparicio, E. & Segura-Correa, J.C. 2015. Seroprevalence of paratuberculosis in sheep of Nayarit, Mexico. Research Opinions in Animal & Veterinary Sciences, v.5, p.494-498.
- Merka, L.R. S., Kopecky, K.E., Larsen, A.B. & Thurston, J.R. 1964. Improvements in the techniques for primary cultivation of mycobacterium paratuberculosis. American Journal Of Veterinary Research, 25:1290-1294.

- Merkal, R.S. & Curran, B.J. 1974. Growth and metabolic characteristics of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Applied Microbiology*, 28(2), 276-279.
- Merkal, R.S. & McCullough, W.G. 1982. A new mycobactin, mycobactin J, from *Mycobacterium paratuberculosis*. *Current Microbiology*, 7: 333-335.
- Merkal, R.S. & Wipple, D.L. 1982. Effectiveness of disfectants of *Mycobacterium Paratuberculosis*. Proc. 86th Annu.Meet. USAHA, 514-8.
- Merkal, R.S., Miller, J.M., Hintz, A.M. & Bryner, J.H. 1982. Intrauterine inoculation of *Mycobacterium paratuberculosis* into guinea pigs and cattle. *American Journal Of Veterinary Research*, 43(4), 676-678.
- Merkal, R. 1984. Paratuberculosis. Advances in cultural. Serologic and vaccination methods. *J Am Vet Med Assoc*. 184(8):939-43.
- Meyer, L A. & Hall, H.H. 1994. Economic Analysis of the Impact of Paratuberculosis on the Kentucky Cattle Industry. University of Kentucky. Department of Agricultural Economics. 7 pp.
- Milian-Suazo, F., Santillan, F.M., Zendejas, M.H., Garcia, C.L., Hernadez, A.L. & Canton, A.G. 2015. Prevalence and associated risk factors for *Mycobacterium avium* subes. *paratuberculosis* in dairy cattle in Mexico. *Journal of Veterinary Medicine and Animal Health*. 7(10), 302-307.
- Momotani, E., Whipple, D., Thiermann, A. & Cheville, N. 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.

- Morón-Cedillo, F. G., Cortez-Romero, C., Gallegos-Sánchez J., Figueroa-Sandoval, B. Aquino-Pérez, G. & Amante-Orozco, A. 2013. Prevalencia de la infección por *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* en rebaños de ovinos de dos municipios de San Luis Potosí, México, Revista Científica, FCV-LUZ, 4, 293-299.
- Motiwala, A.S., Strother, M., Amonsin, A., Byrum, B., Naser, S. A., Stabel, J.R. & Sreevatsan, S. 2003. Molecular epidemiology of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: evidence for limited strain diversity, strain sharing, and identification of unique targets for diagnosis. Journal Of Clinical Microbiology, 41(5), 2015-2026.
- Murcia, M.I., Tortoli, E., Menendez, M.C., Palenque, E. & Garcia, M.J. 2006. *Mycobacterium colombiense* sp. nov., a novel member of the *Mycobacterium avium* complex and description of MAC-X as a new ITS genetic variant. International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology, 56(Pt 9), 2049-2054.
- Navarro, J.A., Bernabe, A., Gomez, M.A., Sanchez, J. & Gomez, S. 1991. Mycobacterial antigen detection by immunohistochemistry in goat paratuberculosis. Zentralbl. Veterinarmed. [B] 38, 231-237.
- Nielsen, S.S. & Toft, N. 2006. Age-specific characteristics of ELISA and fecal culture for purpose-specific testing for paratuberculosis. Journal Of Dairy Science, 89(2), 569-579.
- Nigou, J., Gilleron, M. & Puzo, G. 2003. Lipoarabinomannans: from structure to biosynthesis. Biochimie, 85(1-2), 153-166

- Nisbet, D.I., Gilmour, N.J.I. & Brotherston, J.G. 1962. Quantitative studies of *Mycobacterium johnei* in tissues of sheep. *J. Comp. Pathol.* 72, 80-91.
- Norby, B., Fosgate, G. T., Manning, E. B., Collins, M. T. & Roussel, A. J. 2007. Environmental mycobacteria in soil and water on beef ranches: association between presence of cultivable mycobacteria and soil and water physicochemical characteristics. *Veterinary Microbiology*, 124(1-2), 153-159.
- OIE. 2008. Manual de Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres. Paratuberculosis Enfermedad de Johne.
- Olsen, I., Johansen, T.B., Billman-Jacobe, H., Nilsen, S.F., & Djønnø, B. 2004. A novel IS element, ISMpa1, in *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Veterinary Microbiology*, 98(3/4), 297-306.
- Osterstock, J. B., Fosgate, G. T., Norby, B., Manning, E. B., Collins, M. T. & Roussel, A. J. 2007. Contribution of environmental mycobacteria to false-positive serum ELISA results for paratuberculosis. *Journal Of The American Veterinary Medical Association*, 230(6), 896-901.
- Patterson, D. & Berrett, S. 1969. Malabsorption in Johne's disease in cattle: and in vitro study of L-histidine uptake by isolated intestinal tissue preparations. *J Med Microbiol.* 2:327-334.
- Payne, J. & Rankin, J. 1961. The pathogenesis of experimental Johne's disease in calves. *Res Vet Sci.* 2:167-74.
- Pearce, L.E., Truong, H.T., Crawford, R.A., Yates, G.F., Cavaignac, S. & de Lisle, G.W. 2001. Effect of turbulent-flow pasteurization on survival of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* added to raw milk. *Applied And Environmental Microbiology*, 67(9), 3964-3969.

- Pérez, V., García Marín, J.F. & Badiola, J.J. 1996. Description and classification of different types of lesion associated with natural paratuberculosis infection in sheep. *J. Comp. Pathol.* 114, 107-122.
- Peréz, V., Corpa, J. & García- Marin, J. 2000. El cuadro clínico y lesional de la paratuberculosis bovina. En: Juste editor. *Paratuberculosis, Bovis*, Aula Veterinaria, Vol. nº93, pp. 39-47. Luzan 5, Madrid, España.
- Ponce, B.E., Cardenas R.T., González, V.V., Medina B.G. & Hori-Oshima, S. 2014. Fecal shedding of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in early stage of paratuberculosis; study in sheep model. V. congreso internacional de manejo de pastizales, I congreso de ciencias veterinarias y zootenicas Amado Nervo, I reunion Red Latina de Ciencia Animal. Nuevo Vallarta, Memoria 079.
- Poupart, P., Coene, M., Van Heuverswyn, H. & Cocito, C. 1993. Preparation of a specific RNA probe for detection of *Mycobacterium paratuberculosis* and diagnosis of Johne's disease. *Journal Of Clinical Microbiology*, 31(6), 1601-1605.
- Rangel, S. J., Paré, J., Doré, E., Arango, J. C., Côté, G., Buczinski, S. & Fecteau, G. 2015. A systematic review of risk factors associated with the introduction of *Mycobacterium avium* spp. *paratuberculosis* (MAP) into dairy herds. *The Canadian Veterinary Journal = La Revue Vétérinaire Canadienne*, 56(2), 169-177.
- Ratledge C. 1982. Nutrition, growth and metabolism. In: Ratledge C, Stanford J, editors. *The biology of the mycobacteria*. Academic Press, Ltd; London, United Kingdom, 186–212.
- Richards, W.D. & Thoen, C.O. 1977. Effect of freezing on the viability of *Mycobacterium paratuberculosis* in bovine feces. *Journal Of Clinical Microbiology*, 6(4), 392-395.

- Roussel, A. J., Fosgate, G. T., Manning, E. B. & Collins, M. T. 2007. Association of fecal shedding of mycobacteria with high ELISA-determined seroprevalence for paratuberculosis in beef herds. *Journal Of The American Veterinary Medical Association*, 230(6), 890-895.
- Rowan, N.J., MacGregor, S.J., Anderson, J.G., Cameron, D. & Farish, O. 2001. Inactivation of *Mycobacterium paratuberculosis* by pulsed electric fields. *Applied And Environmental Microbiology*, 67(6), 2833-2836.
- Salman. M.D., Hernadez, J.A. & Braun, I. 1990. A seroepidemiological study of five bovine diseases in dairy farms of the coastal region of Baja California, Mexico. *Prev. Vet. Med*, v. 9, p.143-152.
- Scott, M. C., Bannantine, J. P., Kaneko, Y., Branscum, A. J., Whitlock, R. H., Mori, Y. & Eda, S. 2010. Absorbed EVELISA: a diagnostic test with improved specificity for Johne's disease in cattle. *Foodborne Pathogens And Disease*, 7(11), 1291-1296.
- Secott, T.E., Lin, T.L. & Wu, C.C. 2004. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* fibronectin attachment protein facilitates M-cell targeting and invasion through a fibronectin bridge with host integrins. *Infection And Immunity*, 72(7), 3724-3732.
- Schwartz, B. & De Voss, J. 2001. Structure and absolute configuration of mycobactin J. *Tetrahedron Letters*, 42(21), 3653-3655.
- Sergeant, E.S.G., 2001. Ovine Johne's disease in Australia—the first 20 years. *Aust. Vet. J.* 79, 484–491.

- Sevilla, I.X., Singh, S.V., Garrido, J.M., Aduriz, G., Rodríguez, S., Geijo, M.V. & Juste, R.A. 2005. Molecular typing of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* strains from different hosts and regions. *Revue Scientifique Et Technique (International Office Of Epizootics)*, 24(3), 1061-1066.
- Sigurdardottir, O., Cakke-McKellp, A. Djonne, B. & Evensen, O. 2005. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* enters the small intestinal mucosa of goat kids in areas with ad without Peyer'spathes as demonstrated with the everd sleeve method. *Comp Immunol Microbiol Infec Dis.* 28 (3):223-30.
- Smith, H.A. & Thomas, C.J. 1997. *Patología Veterinaria*. Unión Tipográfica Hispanoamericana. S.A. México D.F., México. Pp. 418-420.
- Smith, K. 1969. Electron microscopical observations on *Mycobacterium johnei*. *Res. Vet. Sci.* 10, 1-3.
- Spahr, U. & Schafroth, K. 2001. Fate of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Swiss hard and semihard cheese manufactured from raw milk. *Applied And Environmental Microbiology*, 67(9), 4199-4205.
- Stabel, J.R. 1997. An improved method for cultivation of *Mycobacterium paratuberculosis* from bovine fecal samples and comparison to three other methods. *Journal Of Veterinary Diagnostic Investigation: Official Publication Of The American Association Of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc*, 9(4), 375-380.
- Stabel, J.R. 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, F.A. & Ward-Rainey, N.L. 1997. Proposal for a new hierarchical classification system, Actinobacteria classis nov. *Int J Syst Bacteriol* 47: 479–491.
- Stamp, J.T. & Watt, J.A. 1954. Johne's disease in sheep. *J. Comp. Pathol.* 64, 26-40.
- Stevenson, K., Hughes, V.M., de Juan, L., Inglis, N.F., Wright, F. & Sharp, J.M. 2002. Molecular characterization of pigmented and nonpigmented isolates of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Journal Of Clinical Microbiology*, 40(5), 1798-1804.
- Sung, N. & Collins, M.T. 2003. Variation in resistance of *Mycobacterium paratuberculosis* to acid environments as a function of culture medium. *Applied And Environmental Microbiology*, 69(11), 6833-6840.
- Sung, N., Takayama, K. & Collins, M. T. 2004. Possible association of GroES and antigen 85 proteins with heat resistance of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Applied And Environmental Microbiology*, 70(3), 1688-1697.
- Sung, N. & Collins, M.T. 2000. Effect of three factors in cheese production (pH, salt, and heat) on *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* viability. *Applied And Environmental Microbiology*, 66(4), 1334-1339.
- Sweeney, R. W., Whitlock, R.H., Buckley, C.L. & 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: Official Publication Of The American Association Of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc*, 7(4), 488-493.

- Sweeney, R.W., Whitlock, R.H., McAdams, S. & Fyock, T. 2006. Longitudinal study of ELISA seroreactivity to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in infected cattle and culture-negative herd mates. *Journal Of Veterinary Diagnostic Investigation: Official Publication Of The American Association Of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc*, 18(1), 2-6.
- Taylor, A.W. 1949. Observations on the incidence of infection with *M. johnei* in cattle. *Vet. Rec.* 61, 539-540.
- Tessema. M., Koets, A., Rutten, V. & Gruys, E. 2001. How does *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* resist intracellular degradation?. *Vet Q.* 23(4)153-62.
- Thorel, M.F. 1984. Review of the occurrence of mycobactin dependence among mycobacteria species. *Annales De Recherches Vétérinaires. Annals Of Veterinary Research*, 15(3), 405-409.
- Thorel, M.F., Krichevsky, M. & Lévy-Frébault, V.V. 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. *International Journal Of Systematic Bacteriology*, 40(3), 254-260.
- Timms, V.J., Daskalopoulos, G., Mitchell, H.M. & Neilan, B.A. 2016. The Association of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* with Inflammatory Bowel Disease. *Plos One*, 11(2), e0148731.

- Tortoli, E., Rindi, L., Garcia, M.J., Chiaradonna, P., Dei, R., Garzelli, C. & Scarparo, C. 2004. Proposal to elevate the genetic variant MAC-A, included in the *Mycobacterium avium complex*, to species rank as *Mycobacterium chimaera* sp. nov. International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology, 54(Pt 4), 1277-1285.
- Twor, F.W. & Ingram, G.L. 1991a. A method for isolating and cultivating the *Mycobacterium enteritidis chronicae pseudotuberculosis bovis*, Johne, and some experiments on the preparation of a diagnostic vaccine for pseudo-tuberculosis enteritis of bovine. Roy Soc Proc B, 84:517-542.
- Twor, F.W. & Ingram, G.L. 1991b. Further experiment with the *Mycobacterium enteritidis chronicae pseudotuberculosis bovis*, Johne and with vaccines prepared from this micro-organism. Zbl Bakt Abt I, 67(3):126-135.
- Valentin-Weigand, P. & Goethe R. 1999. Pathogenesis of *Mycobacterium avium subsp. 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. & Van der Zeijl, B. 1995. The spatial distribution of *Mycobacterium paratuberculosis* in infected cattle. Implications for pathogenesis and diagnosis en: Chiodini, Collins y Cassey editores. Proc 4th Int Coll Paratub. Pp 61-6 IPA, Rehoboth, MA, USA.
- Wadhwa, A., Johnson, R.E., Eda, K., Waters, W.R., Palmer, M.V., Bannantine, J.P. & Eda, S. 2014. Evaluation of ethanol vortex ELISA for detection of bovine tuberculosis in cattle and deer. BMC Veterinary Research, 10:147.

- Whan, L.B., Grant, I.R., Ball, H.J., Scott, R. & Rowe, M.T. 2001. Bactericidal effect of chlorine on *Mycobacterium paratuberculosis* in drinking water. *Letters In Applied Microbiology*, 33(3), 227-231.
- Whitlock, R. H., Wells, S. J., Sweeney, R. W. & Van Tiem, J. 2000. ELISA and fecal culture for paratuberculosis (Johne's disease): sensitivity and specificity of each method. *Veterinary Microbiology*, 77(3-4), 387-398.
- Whittington, R.J., Reddacliff, L.A., Marsh, I., McAllister, S. & Saunders, V. 2000a. Temporal patterns and quantification of excretion of *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* in sheep with Johne's disease. *Australian Veterinary Journal*, 78(1), 34-37.
- Whittington, R. J., Hope, AF., Marshall, D.J., Taragel, C.A. & Marsh, I. 2000b. Molecular epidemiology of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: IS900 restriction fragment length polymorphism and IS1311 polymorphism analyses of isolates from animals and a human in Australia. *Journal Of Clinical Microbiology*, 38(9), 3240-3248.
- Whittington, R.J., Marshall, D.J., Nicholls, P.J., Marsh, I.B. & Reddacliff, L.A. 2004. Survival and dormancy of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in the environment. *Applied And Environmental Microbiology*, 70(5), 2989-3004.
- Whittington, R. J. 2009 Factors Affecting isolation and identification of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* from fecal and tissue samples in a liquid culture system. *J. Clin. Microbiol.* 47 (3): 614-622.
- Wilson, D., Rossiter, C., Han, H. & Sears, P. 1997. Financial Effects of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* on mastitis, Culling and milk production in clinically normal dairy cattle. En: Chiodini, Hines y Collins Editores.

YoKomizo, Y., Yugi, H. & Merkal, R.S. 1985. A method of avoiding false-positive reactions in an enzyme-linked immunosorbant assay (ELISA) for the diagnosis of bovine paratuberculosis. *Nippon Juigaku Zasshi*. 47;111-119.

Zhao, B., Collins, M. & Czuprynsky, C. 1997. Effects of gamma interferon and nitric oxid on the interaction of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* whit bovine monocytes. *Infect. Immune*. 65(5):1761-6.

CAPÍTULO 3

III. ARTÍCULOS DERIVADOS DEL ESTUDIO

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

Enviado a la revista: *Pesquisa Veterinária Brasileira -Brazilian Journal of Veterinary Research*

Authors:

Elizama P. Barraza⁽¹⁾, Alfonso M. Valle⁽¹⁾, José R. Castillo⁽²⁾, Magnolia C. Muñoz⁽²⁾, Gilberto L. Valencia⁽²⁾, Tomas R. Evangelista⁽¹⁾, Gerardo M. Basulto⁽¹⁾, Eda Shigetoshi⁽³⁾ and Sawako Hori-Oshima^{(1)*}.

Authors' address

⁽¹⁾ Division of Animal Health, Research Institute of Veterinary Sciences, Autonomous University of Baja California, Mexico, ⁽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.

*Corresponding author E-mail: shori@uabc.edu.mx

ABSTRACT.-The seroprevalence of ovine Johne's disease (OJD) among sheep in the Mexicali Valley, Mexico, was investigated. Forty sheep flocks were selected between August 2010 and February 2011, with a total of 681 sera samples, which were analyzed via enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies specific to ethanol-extracted *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (MAP) surface antigen (ethanol-vortex ELISA; EVELISA). The test sensitivity and specificity was determined at 31% and 95%, respectively. Positive results were obtained for 180 samples (26.4%). The adjusted true sheep-level seroprevalence was 82.4%. EVELISA showed infection of 65% of flocks. Most MAP seropositive sheep were recorded in large flocks (group III), where 100% of flocks were affected by OJD, with apparent within-flock prevalence of 9.1%–47.5%. A MAP isolate was successfully obtained from a clinical case in a heavily infected flock, confirming the dissemination of MAP in the environment. Due to the chronic nature of OJD and the lack of hygiene practices among small farmers in Baja California, there is an increased risk of disease propagation. Effective disease control measures should be adopted to reduce the accumulation of MAP in the environment and to improve animal health, in both the United States and Mexico.

INDEX TERMS: *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*, Ovine Johne's disease, prevalence, ethanol-vortex ELISA

Resumo.-[Seroprevalência da doença de Johne em rebanhos de ovinos no vale de Mexicali, Baja California, México.] Foi investigada a soroprevalência da doença de Johne ovina (OJD) entre ovinos no Vale Mexicali, México. Quarenta rebanhos ovinos foram selecionados entre Agosto de 2010 e Fevereiro de 2011, com um total de 681 amostras de soros, que foram analisadas via ensaio imunoenzimático (ELISA) para a detecção de anticorpos específicos para o antígeno da superfície de *Mycobacterium avium* subespécie paratuberculose (MAP) extraído com etanol (ELISA de etanol-vortex, EVELISA). A sensibilidade e especificidade do teste foram determinadas em 31% e 95%, respectivamente. Foram obtidos resultados positivos para 180 amostras (26,4%). A soroprevalência real ajustada de ovinos foi de 82,4%. EVELISA mostrou infecção em 65% dos rebanhos. A maioria dos ovinos seropositivos para MAP foi registrada em grandes rebanhos (grupo III), no qual 100% dos rebanhos foram afectados por OJD, com uma prevalência aparente dentro de rebanhos de 9,1% -47,5%. Um isolado de MAP foi obtido com sucesso de um caso clínico em um rebanho fortemente infectado, confirmando a disseminação do MAP no ambiente. Devido à natureza crônica do OJD e à falta de práticas de higiene entre os pequenos agricultores da Baja Califórnia, existe um maior risco de propagação da doença. Devem ser adotadas medidas efetivas de controle da doença para reduzir a acumulação de MAP no ambiente e melhorar a saúde animal, tanto nos Estados Unidos quanto no México.

TERMOS PARA INDEXAÇÃO: *Mycobacterium avium* subespécies paratuberculosis, Ovine Johne's disease, prevalência, etanol-vortex ELISA.

INTRODUCTION

Ovine Johne's disease (OJD) is a chronic enteritis of ruminant species caused by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) infection (Harris & Barletta 2001). Johne's disease (JD) results in substantial economic loss to the livestock and dairy industries due to low productivity and reproductive performance (Barkema et al. 2010). In Latin American and Caribbean countries, the prevalence rate of JD ranges from 16% in cattle to 4.3% in sheep and goats (Fernández-Silva et al. 2014). In Mexico, serological studies in cattle, goats, and sheep in the south-central region of the country demonstrated the disease prevalence as 0%–42% in different cities (Esteves-Denaives et al. 2007, Jaimes et al. 2008, Córdova et al. 2010, CONASA, 2010). The economic impact of JD on Mexican dairy cattle due to reduced production was estimated at approximately 800 US dollars per cow per year (population size of 30,000 with a prevalence of 8.87%) in central Mexico (CONASA 2010). Early diagnosis of the disease is important to control and eradicate the disease; however, achieving this is a challenge, mainly due to the subclinical course of the disease and the low levels of sensitivity of the serological tests used for screening purposes.

Because of its low cost and rapid test time, the ELISA test has been used widely in epidemiological studies to describe the magnitude and to support the control of OJD. Sensitivity and specificity of protein antigen-based commercial ELISA tests in the detection of OJD often vary substantially by infection status of animals (Sergeant et al. 2003, Robbe-Austerman et al. 2006, Gumber et al. 2006, Nielsen & Toft 2008). Previous reports showed low sensitivity of commercial ELISA during early stages of the disease (Robbe-Austerman et al. 2006) among animals with mild focal lesions (Gumber et al. 2006). Eda et al. (2006) compared ethanol-vortex ELISA (EVELISA) and a commercial ELISA in cattle with different stages of infection and showed that EVELISA was substantially superior in detecting the disease (97.4%), particularly in detecting low-level and mid-level shedders; however, this antigen has not been tested in sheep.

In Baja California, a prevalence of 46% (3,726/8,100) was reported in dairy cattle (Salman et al. 1990), 4.6% (89/1950) in dairy cattle along the California–Mexico border (Adaska & Anderson 2003). In Mexicali Valley of Baja California, the presence of MAP has been reported (Correa et al. 2013), however the seroprevalence of OJD in this region is unknown. Thus, the aim of the present study was to determine the seroprevalence of OJD in the Mexicali Valley in the state of Baja California, Mexico, using the EVELISA.

MATERIALS AND METHODS

Study area. The present study was conducted with a total of 40 sheep flocks in the Mexicali Valley, Mexico. The Mexicali Valley is located in the state of Baja California in the northwest region of Mexico and represents the agricultural center in the state.

Study design. A cross sectional design study based on the serological test EVELISA was performed. Convenience sampling was applied during a period from August, 2010 to February, 2011. A total of 681 animals over 2 months old from 40 sheep flocks were included in the present study. The number of animals tested per flock varied from 1 to 63 according to the flock size. According to a census (INEGI, 2007), the sample size of the present study ($n = 681$) corresponds to approximately 4.5% and 1.9% of the sheep populations in the city of Mexicali, and the state of Baja California, respectively. The flocks were classified in relation to the number of animals tested per flock to compare results between flocks, as follows: group I ($n = 19$ flocks), less than 10 animals per flock; group II ($n = 8$ flocks), 11–20 animals per flock; group III ($n = 13$ flocks), more than 21 animals per flock.

Antigen preparation. EVELISA was developed as described by Eda et al. (2006) using ethanol-extracted surface antigen of MAP strain ATCC19698. MAP was cultured in Middlebrook 7H9 medium (Becton Dickinson, NJ) with 2 mg/L Mycobactin J (Institut Pourquier, France) at 37 °C until used for experiments. Harvested mycobacteria were suspended in 80% ethanol at 80

mg wet weight of bacterial/mL and agitated by vortex at room temperature for 2 min. After removing the bacilli by centrifugation, the supernatant was diluted 1:80 with absolute ethanol and 50 µl of the diluted antigen was inoculated overnight into each well of a 96-well plate (PolySorp, Nunc-Immuno 96 microwell plate; Nalge Nunc International, Rochester, NY).

EVELISA. For the EVELISA test, the antigen-coated plate was incubated with 150 µL of buffer A (10 mM phosphate-buffered saline, pH 7.0, containing 0.05% [v/v] Tween 80 and 10% bovine serum albumin) at room temperature for 30 min. The plate was then washed four times with 150 µL PBST (10 mM phosphate-buffered saline (PBS) [pH 7.0] containing 0.05% Tween 20). Plates were reacted with serum samples diluted 1:100 in buffer A and incubated at room temperature for 1 h. After washing the wells four times with 150 µL PBST, 100 µL of horseradish peroxidase (HRP)-conjugate rabbit anti-sheep IgG (H + L) (KPL Inc., MD) was added to each well and incubated for 1 h. The antigen-antibody complexes were detected using a HRP substrate (TMB single solution chromogen substrate, Invitrogen, CA) according to the manufacturer's instructions. Optical densities (OD) at 450 nm were measured using a plate reader (Model 3550, BioRad, Hercules, CA). A cut-off value was applied as a value two standard deviations ($2 \times SD$) above the mean $O.D._{450}$ of the negative control sera ($n = 20$) (Crowther, 1995). Negative sera were obtained from lambs in a flock located at the Research Institute of Veterinary Sciences, in which no clinical case of OJD has been documented since 1995, and all ewes tested negative for OJD at least twice by commercial ELISA (Institut Pourquier, France) prior to the study. Thirteen positive sera were also included to evaluate sensitivity and specificity of the EVELISA (Figure 1). The positive sera were all naturally infected sheep from central and northwest Mexico (Aguascalientes and Baja California, respectively). Five animals were found to show clinical signs of OJD, confirmed by histopathology, commercial ELISA, and/or blood polymerase chain reaction (PCR). The remaining eight animals were obtained from flocks containing clinical cases of OJD, as confirmed by fecal-culture and commercial ELISA.

Clinical case of OJD. To confirm the presence of clinical disease and the dissemination of MAP in the 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 at 4 μ m and for staining with hematoxylin and eosin (H&E) and Ziehl-Neelsen (ZN) staining. Fecal bacteriological culture was conducted in modified Middlebrook 7H10 medium according to Correa et al. (2013).

Statistical analysis. Overall animal-level seroprevalence was calculated by dividing the number of seropositive sheep by the total number of sheep tested. True seroprevalence was calculated to adjust for a test sensitivity of 31% and specificity of 95% (the present study). For large size flocks (group III), the within-flock apparent prevalence was calculated for each flock, and the true prevalence was estimated with a test sensitivity of 31% and specificity of 95%. The 95% confidence limits by Blaker's test were determined according to Reiczigel et al. (2010).

RESULTS AND DISCUSSION

In the present study, EVELISA with ethanol-extracted MAP antigen was standardized to detect OJD using control sera from central and north Mexico, and was applied for the first systematic survey of OJD in the Mexicali Valley, US-Mexican international boundary in northwestern Mexico. Sensitivity and specificity of the EVELISA test standardized in the present study was 30.1% and 95%, respectively (Figure 1). Of the 681 sera tested in the present study, 180 were classified as seropositive for MAP using the same cut-off value. Table 1 summarizes the results in three groups of flocks classified according to the flock size. Overall seroprevalence of OJD in 40 sheep flocks in Mexicali Valley was determined as 26.4%. If a flock was classified as positive based on at least one test-positive animal in the flock, the flock-level apparent prevalence was 35% (14/40, 95% CI, 22.1%–50.5%). Considering

the potential for false-positive results, if a flock was classified as positive when two or more positive animals were present, the flock-level prevalence was 65% (26/40, 95% CI, 49.5%–77.9%). The flock-level prevalence for groups I, II, and III were 36.9% (7/19), 75% (6/8), and 100% (13/13), respectively (Table 1). Individual within-flock seroprevalence was determined for the 13 flocks of group III (Table 2). Numbers of sera sampled per flock in this group varied from 21–63 samples, and were proportional to the flock size. The apparent within-flock prevalence of group III ranged from 9.1% to 47.5% with a mean prevalence of 25.52%. The estimated true prevalence for each flock ranged between 15.8%–100% (Table 2). The flock-level prevalence was highest in the flocks of largest size (group III). Flock size had been reported previously as a risk factor for OJD status of sheep flocks (Daniels et al. 2002). Environmental MAP contamination and exposure of young sheep to contaminated pasture (Dhand et al. 2007) as well as purchasing behaviors of producers might be important factors responsible for presence of OJD in these flocks. Further investigation is required to define risk factors for OJD in Mexico.

The apparent animal-level seroprevalence was 26.4% (95% CI, 23.3%–29.9%) and the estimated true prevalence was 82.4% (95% CI, 69.8%–95.6%), which was surprisingly high compared to animal-level seroprevalence of JD reported for small ruminants in Mexico: 9.99% (n = 242) for sheep in San Luis Potosí (Morón-Cedillo et al. 2015), 5.6% (n = 368) for sheep in Nayarit (Mejia-Martinez et al. 2015), and 9.87% (n = 821) for goats in Guanajuato (Guzman-Ruiz et al. 2016). Despite the fact that OJD is a very common disease in ruminants in Mexico (Estevez-Denaives et al. 2007, CONASA 2010, Milian-Suazo et al. 2015), knowledge of this disease in Mexico remains limited, especially in small scale operations with backyard production of sheep and goats.

To confirm the presence of clinical diseases, we conducted a fecal culture and necropsy of a seropositive sheep which had died with severe clinical signs of ODJ, such as mandibular edema, diarrhea, and weight loss. The fecal culture resulted in a growth of colonies after 8 weeks (Figure 2B), revealed as acid-fast bacilli by Ziehl-Neelsen staining. Histological changes

in ileum mucosa and submucosa were observed, with large numbers of acid-fast bacilli and infiltration of macrophages, resembling a “multibacillary” form of OJD (Clarke & Little 1996). In Mexicali Valley, devastating damage due to OJD has been observed in several small-scale sheep flocks, years after an animal with unknown status of OJD was introduced. Generally there is lack of consciousness of biosecurity and hygiene practices in these small farms. Thus, urgent control measures of OJD are required for this region to minimize the source of exposure between and within farms and reduce propagation of the disease.

Eda et al. (2006) demonstrated substantially superior performance of the EVELISA as compared to a commercial ELISA test for the detection of JD in cattle. The sensitivity (31%) of our in-house EVELISA test on the basis of positivity of histopathology and fecal shedding confirmed by culture or PCR was comparable to those of commercial serum ELISA tests for sheep (16-44%) (Nielsen & Toft 2008, Robbe-Austerman et al. 2006, Gumber et al. 2006, Sergeant et al. 2003). The positive sheep sera used to standardize the test in our study were mostly from the animals undergoing a late clinical stage of the OJD, and all were positive to a commercial ELISA test (Institut Pourquier) based on protein antigens. The low sensitivity of the in-house EVELISA test compared to a Pourquier ELISA may be due to the limited duration of antibodies specific to ethanol-extracted lipid antigen and/or due to the decreased overall humoral immune responses because of the end-stage of the disease. The type of MAP strain used for antigen preparation could affect the test sensitivity. However, a more extensive study using a larger sample size is required to evaluate the accuracy of the EVELISA test in small ruminants in Mexico. The specificity (95%) of the EVELISA test in detecting OJD could be improved when used in combination with pre-absorbed samples (Scott et al. 2010). *Mycobacterium phlei* is widely used as a pre-absorbent in ELISA tests for JD; however, pre-absorption with other species of mycobacteria could be more effective to reduce the antibodies cross-reactive to environmental mycobacteria present in a specific geographical region (Marassi et al. 2008).

MAP contamination in foods, water, and the environment is generating growing concern (Gill et al. 2011). In the present study, we confirmed the viability of MAP in fecal samples (Figure 2), and also in other environmental samples in sheep flocks where the infected animals can easily walk across waterways (unpublished data). Paez-Rubio et al. (2005) reported on the profiles of microorganisms in wastewater in the city of Mexicali in Baja California, and showed that the viable microorganisms can be aerosolized. Due to the heavy shedding from infected farm animals, particularly of group III flocks with high in-flock prevalence, aerosolized MAP could contaminate and accumulate in water, soil, and wildlife animals in Mexicali Valley; thus, MAP would have impacts on both the US and Mexican animal and public health. It is important to implement the OJD surveillance and control program in this region, so as to allow livestock producers to detect and cull animals before they enter the heavy shedder stage; thus reducing environmental contamination.

CONCLUSIONS

The seroprevalence of OJD is high in Mexicali, Mexico. Surveillance and control programs are required to reduce the economic and environmental impacts of the disease in this US–Mexico border city, particularly with a focus on testing animals newly introduced in a flock. An extended study is required to determine the accurate sensitivity and specificity of EVELISA for small ruminants.

ACKNOWLEDGEMENTS

To Gerardo Segura Bernal, DVM, M.Sc. of the Autonomous University of Aguascalientes for providing the positive sera. To the Mexican Council for Science and Technology (CONACyT) for Graduate Student Fellowship to EPB, MMC, and JLR. This study was partially supported by a research grant from Autonomous University of Baja California (UABC, CA201/5/C/20/14), and by Fundación Produce Baja California, A.C.

REFERENCES

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

Barkema H.W., Hesselink J.W., McKenna S.L., Benedictus G., Groenendaal H. 2010. Global prevalence and economics of infection with Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in ruminants. Paratuberculosis: Organism, Disease, Control. p10-21.

Clarke C.J. & 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.

CONASA 2010. Plan estratégico del programa para la atención de la paratuberculosis en ganado bovino, ovino y caprino en México, 2010. Available at: <<http://www.conasamexico.org.mx/conasa/pdf/>> accessed on: 27 jul, 2012.

Córdova L.D. Guzmán R.C., Santillán F.M., Favila H.L., Urrutia M.J., GÁMEZ V. 2010. La paratuberculosis en la ganadería bovina de San Luis Potosí, México. 2010, Monterrey N. L. México. XXXIV Congreso Nacional de Buiatría. (1) p35-40.

Correa M.M., Medina B.G., Rentería E.T., Monge N.F., González V.V. & López V.G. 2013. Caracterización molecular de Mycobacterium avium subespecie paratuberculosis en bovinos y ovinos de Mexicali, Baja California, México. (Spanish). Revista Mexicana De Ciencias Pecuarias. 4(4), 489-500.

Crowther J.R. 1995. ELISA, Theory and practice.: Humana Press, Totowa, NJ., p152.

Daniels M.J., Hutchings M.R., Allcroft D.J., McKendrick J. & Greig A. 2002. Risk factors for Johne's disease in Scotland--the results of a survey of farmers. *The Veterinary Record*. 150(5), 135-139.

Dhand N.K., Eppleston J., Whittington R.J. & Toribio J.L. 2007. Risk factors for ovine Johne's disease in infected sheep flocks in Australia. *Preventive Veterinary Medicine*. 82(1-2), 51-71.

Eda S., Bannantine J.P., Waters W.R., Mori Y., Whitlock R.H., Scott M.C. & 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.

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

Fernández-Silva J., Correa-Valencia N. & Ramírez N. 2014. Systematic review of the prevalence of paratuberculosis in cattle, sheep, and goats in Latin America and the Caribbean. *Tropical Animal Health & Production*. 46(8), 1321-1340.

Gill C.O., Saucier L. & Meadus, W J. 2011. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in dairy products, meat, and drinking water. *Journal Of Food Protection* 74(3), 480-499.

Gumber S., Eamens G. & Whittington R.J. 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. *Veterinary Microbiology*. 115(1-3), 91-101.

Guzmán-Ruiz C.C., Santillán F.M. & Córdova L. D. 2016. Prevalence and possible risk factors for caprine paratuberculosis in intensive dairy production units in Guanajuato, Mexico. *Journal of Veterinary Medicine and Animal Health*. 8 (11), 156-162.

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

INEGI 2007: Estados Unidos Mexicanos, Censo Agropecuario, 2007. Available at: http://www.inegi.org.mx/est/contenidos/proyectos/Agro/ca2007/Resultados_Agricola/. Accessed on 15 November, 2016.

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. & Cuéllar O.A. 2008. Detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* by nested-PCR of ovine fecal samples. *Veterinaria Mexico*. 39, 377-386.

Marassi C. D., Silva M., Oelemann W. R., de Souza Fonseca L., Ristow P. & Lilienbaum, W. 2008. An alternative for the preadsorption step in the paratuberculosis serodiagnosis: *Mycobacterium fortuitum*. *Brazilian Journal Of Microbiology*. 39(3), 511-513.

Mejía-Martínez K., Flores C. L., González-Morteo C., Resendiz G. P., Díaz Aparicio E. & Segura Correa J. C. 2015. Seroprevalence of paratuberculosis in sheep of Nayarit, Mexico. *Research Opinions In Animal & Veterinary Sciences*. 5(12), 494-498.

Milian-Suazo F., Santilla, F.M., Zendejas M.H., Garcia C.L., Hernandez A.L. & Canton A.G. 2015. Prevalence and associated risk factors for *Mycobacterium avium* subes. Paratuberculosis in dairy cattle in Mexico. *Journal of Veterinary Medicine and Animal Health*. 7(10), 302-307.

Morón-Cedillo F. G., Cortez-Romero C., Gallegos-Sánchez J., Figueroa-Sandoval B. Aquino-Pérez G. & Amante-Orozco A. 2013. Prevalencia de la infección por *Mycobacterium avium* subespecie paratuberculosis en rebaños de ovinos de dos municipios de San Luis Potosí, México. *Revista Científica, FCV-LUZ*. 4, 293-299.

Nielsen S.S. & 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.

Reiczigel J., Földi J. & Ózsvári L. 2010. Exact confidence limits for prevalence of a disease with an imperfect diagnostic test, *Epidemiology and Infection*. 138, 1674-1678.

Robbe-Austerman S., Gardner I.A., Thomsen B.V., Morriscal D.G., Martin B.M., Palmer M.V. & Ewing C. 2006. Sensitivity and specificity of the agar-gel-immunodiffusion test, ELISA and the skin test for detection of paratuberculosis in United States Midwest sheep populations. *Veterinary Research*. 37(4), 553-564.

Salman M.D., Hernandez J.A. & Braun I. 1990. A seroepidemiological study of five bovine diseases in dairy farms of the coastal region of Baja California, Mexico. *Prev. Vet. Med*. 9(2), 143-152.

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

Sergeant E.G., Marshall D.J., Eamens G.J., Kearns C. & Whittington R.J. 2003. Evaluation of an absorbed ELISA and an agar-gel immuno-diffusion test for ovine paratuberculosis in sheep in Australia. *Preventive Veterinary Medicine*. 61(4), 235-248.

Table 1. Seroprevalence of ovine Johne’s disease as determined by ethanol-vortex enzyme-linked immunosorbent assay using the ethanol-extracted *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* antigen. Flocks were classified into three groups by number of animals tested per flock.

| | Group | | | Total |
|--|---------------------|--------------------|----------------------|----------------------|
| | I | II | III | |
| Number of flocks | 19 | 8 | 13 | 40 |
| Number of animals tested | 95 | 132 | 454 | 681 |
| Number of seropositive animals (%) | 23 (24.2%) | 47 (35.6%) | 110 (24.2%) | 180 (26.4%) |
| Adjusted true seroprevalence (% , 95% CI*) | 73.8% (43.3–100) | 100% (86.5–100) | 73.8% (59.3–89.9) | 82.3% (69.8–95.6) |
| % Flocks w/ ≥ 2 test positive | 36.9% (7/19) | 75% (6/8) | 100% (13/13) | 65% (26/40) |
| % Flocks w/ 1 test positive | 21.1% (4/19) | 25% (2/8) | 0% (0/13) | 15% (6/40) |
| % Flocks w/ no test positive | 42.1% (8/19) | 0% (0/8) | 0% (0/13) | 20% (8/40) |

Group I = 1–10 sheep

Group II = 11–20 sheep

Group III = ≥ 21 sheep

*Blaker’s confidence limits calculated as described by Reiczigel et al. (2010).

Table 2. Summary of within-flock prevalence of ovine Johne’s disease for group III flocks

| Flocks ID | No. of sheep tested | No. of positive sheep | Apparent prevalence rate | Estimated true prevalence (95% CI*) |
|------------------|----------------------------|------------------------------|---------------------------------|--|
| A | 22 | 2 | 9.1% | 15.8% (0%–91%) |
| B | 27 | 2 | 7.4% | 9.2% (0%–70.2%) |
| C | 63 | 3 | 4.8% | 0.0% (0%–30.7%) |
| D | 37 | 4 | 10.8% | 22.3% (0%–77.2%) |
| E | 25 | 5 | 20% | 57.7% (12.4%–100%) |
| F | 30 | 7 | 23.3% | 70.4% (21.6%–100%) |
| G | 52 | 8 | 15.4% | 40% (7.6%–86.6%) |
| H | 23 | 9 | 39.1% | 100% (60.4%–100%) |
| I | 33 | 9 | 27.3% | 85.8% (36%–100%) |
| J | 38 | 10 | 26.3% | 81.9% (33%–100%) |
| K | 28 | 15 | 53.6% | 100% (100%–100%) |
| L | 36 | 17 | 47.2% | 100% (100%–100%) |
| M | 40 | 19 | 47.5% | 100% (100%–100%) |

*Blakers confidence limits calculated as described by Reiczigel et al. (2010).

Figure 1. Diagnostic specificity and sensitivity of ethanol-vortex enzyme-linked immunosorbent assay. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* negative samples were obtained from lambs from the Research Institute of Veterinary Sciences, in which no clinical case of ovine Johne's disease has been documented since 1995. The positive sera were all of five naturally infected animals confirmed by histopathology, commercial ELISA, and/or blood polymerase chain reaction (PCR), and eight by fecal-culture and commercial ELISA.

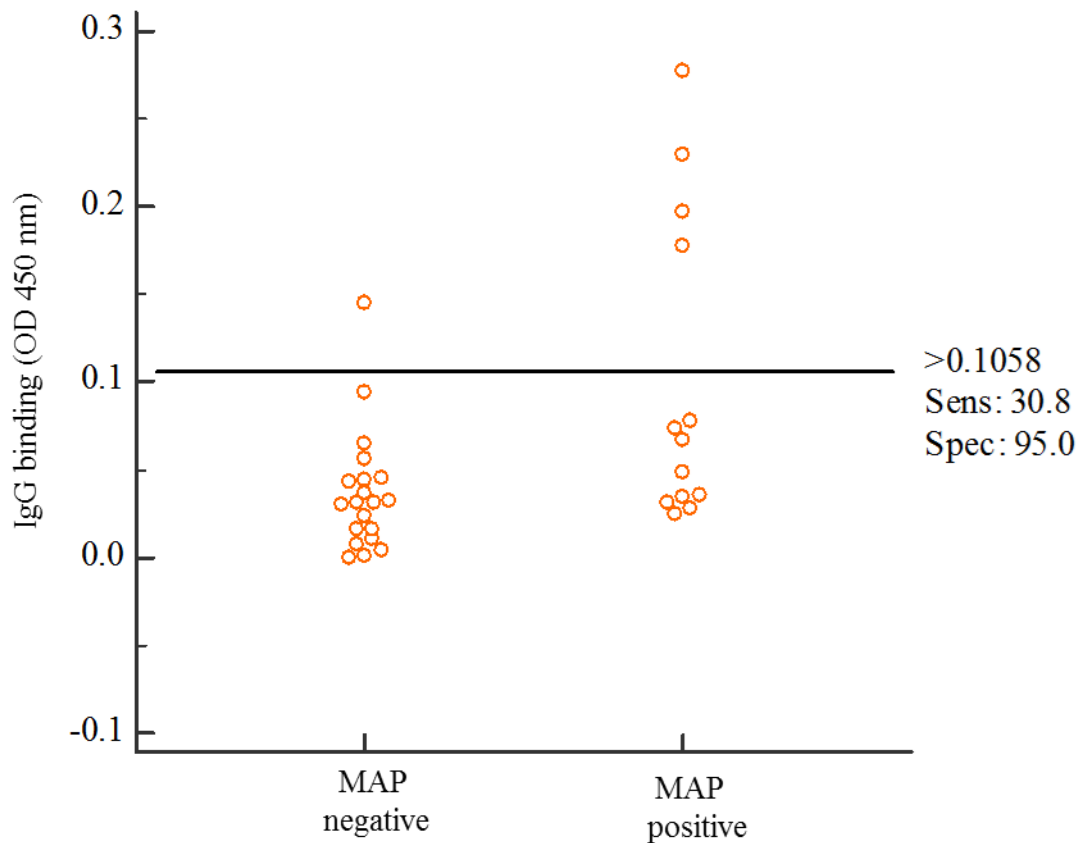
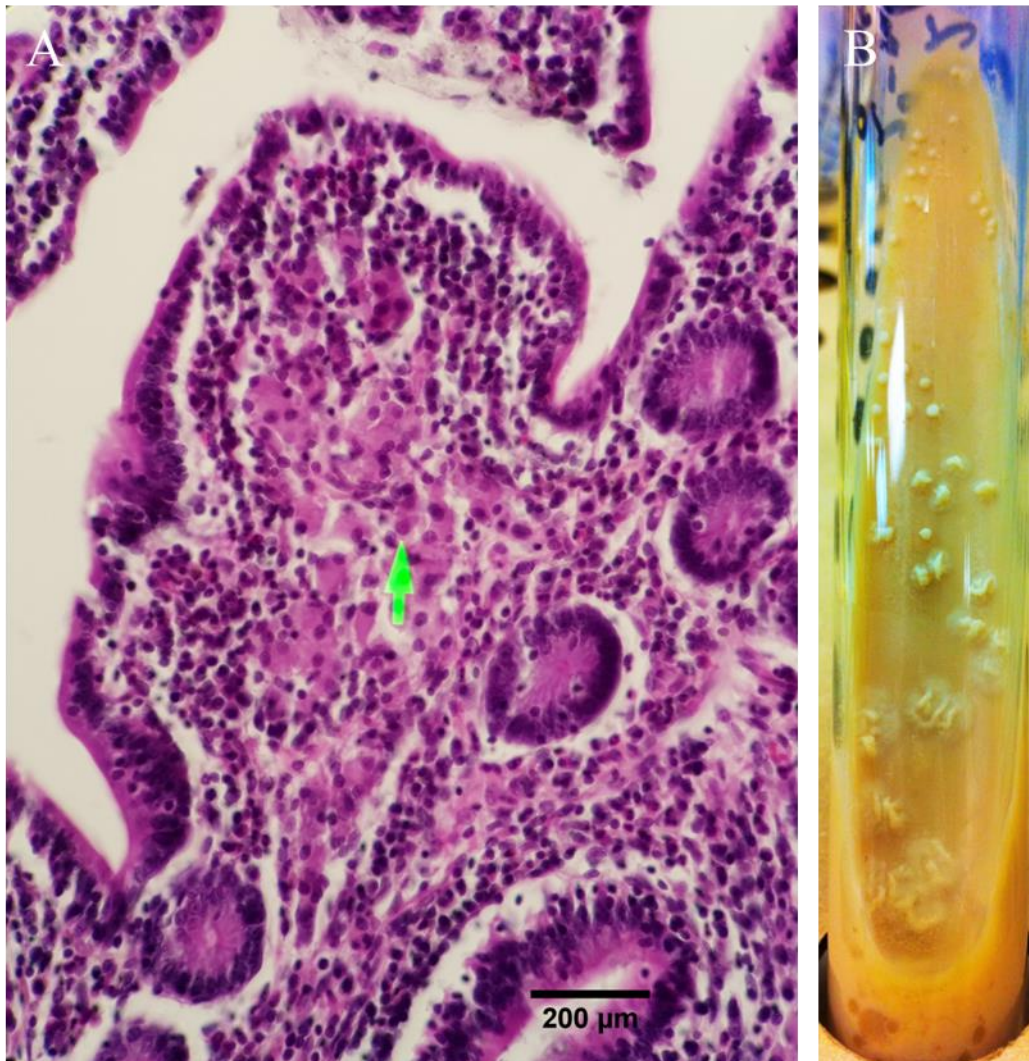


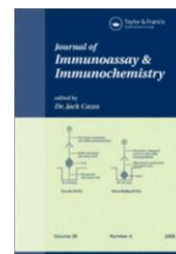
Figure 2. Diagnosis of a clinical case of ovine Johne's disease from a heavily infected flock (prevalence of 30.1%). A). Granulomatous lesion in the ileum showing numerous macrophages expanding the submucosa, hematoxylin and eosin (H&E) staining (40×). Magnification is represented by a scale bar. B) Result of a fecal culture. Mycobactin dependent colony growth was observed in modified Middlebrook 7H10 medium and was photographed after 8 weeks.



Title:

3.2. Evaluation of two in-house immunoenzymatic tests to serodiagnose subclinical paratuberculosis in a sheep flock in Mexicali Valley, Mexico.

Enviada a la revista: Journal of Immunoassay and Immunochemistry



Authors:

Elizama Ponce Barraza¹, Tomás Cárdenas Reyna¹, Carlos Angulo², José Carlomán Herrera Ramírez¹, Gilberto V. López¹, Gerardo Enrique Medina-Basulto¹, Shigetoshi Eda³, Sawako Hori-Oshima^{1*}

Affiliations:

¹ Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias, Universidad Autónoma de Baja California, Km 3.5 Road, Mexicali-San Felipe S/N 21386, Mexicali Baja California, Mexico. E-mail: elizama.ponce@uabc.edu.mx, tomas.cardenas.reyna@uabc.edu.mx, cherrera3@uabc.edu.mx, gilbertolopez@uabc.edu.mx, gerardom@uabc.edu.mx, shori@uabc.edu.mx

² Immunology & Vaccinology Group. Centro de Investigaciones Biológicas en Noroeste, A.C., Km. 1 Carretera a San Juan de La Costa "EL COMITAN" Apdo. Postal 128, La Paz, BCS 23097, México. E-mail: eangulo@cibnor.edu.mx

³Center for Wildlife Health, Department of Forestry, Wildlife and Fisheries, the University of Tennessee, Knoxville, Tennessee 37996. E-mail: seda@utk.edu

*Corresponding author. E-mail: shori@uabc.edu.mx

ABSTRACT

Paratuberculosis (PTB) or Johne's disease is a common ruminant infectious disease caused by *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* (MAP). In this study, two MAP antigens were compared for their diagnostic utility to detect subclinical PTB in a sheep flock in Mexicali, Mexico. Sheep (n = 31) without clinical signs but positive on a direct fecal-polymerase chain reaction were tested with two preabsorbed in-house enzyme linked immunosorbent assays (ELISAs) using: (1) an ethanol-extracted surface lipid antigen (EVELISA) and (2) a protoplasmic antigen (ELISA-PPA). Sensitivities of the EVELISA and ELISA-PPA were 84% (95% CI; 66-95%) and 29% (95% CI; 14-48%), respectively. The EVELISA test could be a fast and effective way to identify subclinical ovine PTB for severely affected flocks.

Key words: *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis*, Johne's disease, sheep, ELISA, EVELISA, PPA.

Running head: ELISAs for subclinical ovine paratuberculosis

INTRODUCTION

Paratuberculosis (PTB) or Johne's disease is a chronic granulomatous enteritis of ruminants caused by *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (MAP) ⁽¹⁾. PTB causes substantial economic losses in the livestock industry, particularly in sheep, goats and cattle, mainly due to decreased production and premature disposal of affected animals ⁽²⁾. Control of the disease depends on detection and culling of infected animals, along with biosecurity measures to reduce in-herd transmission. The use of serological tests such as enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for diagnosing ovine PTB has been described ⁽³⁻⁹⁾. Although ELISAs are fast and affordable, their sensitivity depends on the population of animals tested due to the different immune responses of infected animals ⁽³⁻⁹⁾. Previous reports showed low sensitivity of a commercial ELISA during the early stages of the disease ⁽⁷⁾ among animals with mild focal lesions ⁽⁸⁾. Several antigens have been tested to improve sensitivity and specificity of ELISAs for diagnosing animals in the early stages of PTB ⁽¹⁰⁻¹³⁾. The use of *Mycobacterium phlei* to pre-absorb the serum samples improves ELISA specificity by reducing cross-reactivity with environmental mycobacteria ⁽¹⁴⁾. Eda *et al.* ⁽¹⁰⁾ compared an ethanol-vortex ELISA (EVELISA) with a commercial ELISA in cattle at different stages of infection and showed that the EVELISA was substantially superior for detecting the disease (97.4%), particularly in low-level and mid-level shedders. The molecular nature of the ethanol-extracted lipid antigen used in the EVELISA has not been fully characterized. An optimized EVELISA has been evaluated to detect PTB in domestic animals ⁽¹⁴⁾ and to detect bovine tuberculosis (TB) in red deer and cattle including animals with experimental infections ⁽¹⁵⁾. However, this antigen has not been evaluated in sheep.

Early detection of ovine PTB and removal of positive animals are important to successfully control and prevent within-herd transmission, as approximately 80% of positive fecal cultures are due to early subclinical animals ⁽¹⁶⁾. The aim of this study was to evaluate and compare two in-house

ELISAs; an ELISA that uses a protoplasmic-paratuberculosis antigen (PPA) and an EVELISA that uses a surface lipid antigen of MAP to diagnose a subclinically infected sheep from a flock in Mexicali Valley, Mexico, in which a herd-level control program had been implemented.

MATERIALS AND METHODS

Flock and serum samples. Sera from 31 female adult Pelibuey sheep (age, 3–46-months-old) were obtained from a commercial sheep flock located in Mexicali Valley, Baja California, Mexico in October 2012. The flock had a history of ovine PTB, with the first clinical case confirmed in 2009 by fecal culture and histology. A control program was implemented in this flock in 2012 due to the continuing number of animals with clinical signs and a severe decrease in production. The control strategy included improving biosecurity measures, applying a commercial ELISA to detect specific antibodies, and culling or quarantining ELISA-positive animals. No vaccines have been applied to this flock. The sera used in this study were from animals that were seronegative on a commercial PTB ELISA test (Institute Pourquier, Montpellier, France). In this study early subclinical ovine PTB was defined as sheep without visible signs of clinical PTB, seronegative on a commercial ELISA, but detectable fecal excretion of MAP was confirmed by direct fecal-polymerase chain reaction (PCR) test based on the IS900 segment ⁽¹⁷⁾. Sera from five lambs (<3-months-of-age) in a PTB-free facility located in the city of Mexicali, Baja California, were used as the negative control. This flock had no history of PTB for at least 15 years, and all animals were confirmed to be ELISA-negative (Institut Pourquier) at the time of sampling and 2 year prior to sampling.

Antigens. An ethanol-extracted surface antigen of MAP was prepared as described by Eda *et al.* ⁽¹⁰⁾. MAP (Linda strain) was cultured at 37°C in Middlebrook 7H9 medium (Becton Dickinson, Linwood Park, NJ, USA) supplemented with 2 mg/L Mycobactin J (Institut Pourquier), 0.05% Tween 80 (Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ, USA), and 10% oleic acid-albumin-dextrose-NaCl (Becton Dickinson). MAP bacilli were harvested from stationary phase cultures, suspended in 80% ethanol at 80 mg wet weight

bacterial/ml, and vortexed at room temperature for 30 sec at maximum speed to prepare the antigen. After removing the bacilli by centrifugation at $10,621 \times g$ for 10 min, the supernatant was diluted 1:60 with absolute ethanol and 50 μ l of the diluted antigen was immobilized overnight on wells of a 96-wells plate (Costar™ Corning Inc., Corning, NY, USA) ⁽¹⁰⁾.

A commercial PPA (Allied Monitor Inc., Fayette, MO, USA) was diluted to a final concentration of 40 μ g/ml in carbonate buffer (Sigma, St. Louis, MO, USA), and a volume of 100 μ l per well was inoculated overnight at 4°C in microtiter plates.

EVELISA. The antigen-coated plate was incubated with 200 μ l of Buffer B (10 mM phosphate buffered saline, pH 7.0 [PBS] containing 0.05% Tween 20 [Fisher Scientific] and 10% (v/v) SuperBlock [Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA]) at room temperature for 30 min. The plate was washed four times with 100 μ l PBS-T (10 mM PBS [pH 7.0] containing 0.05% Tween 20). Sera were treated with heat killed *Mycobacterium flavescens* [2 mg/ml] for 30 min to remove cross-reactive antibodies (preabsorption). Initially, high cross-reactivity was observed in the negative control sera, which could not be reduced by using *M. phlei* as the preabsorbant. Several mycobacterial species were tested for use in the preabsorption step, and *M. flavescens* resulted in the highest reduction in cross-reactivity (data not shown). The preabsorbed serum sample (50 μ l) was incubated at room temperature for 1 hr. After washing the wells four times with 100 μ l PBS-T, 50 μ l of horseradish peroxidase (HRP)-conjugated donkey anti-sheep IgG (1:1000 dilution; Jackson ImmunoResearch Lab, Westgroup, PA, USA) was added to each well and incubated at room temperature for 1 hr. After washing the wells four times with 100 μ l of PBS-T, antigen-antibody complex was detected using a 100 μ l of the 3, 3', 5, 5'-Tetramethylbenzidine (TMB) solution (Thermo Scientific), as suggested by the manufacturer. Optical density (OD) values were measured at 650 nm using a microplate reader (Model 680 reader; Bio-Rad, Hercules, CA, USA). The color reaction was stopped after 10 min with 100 μ l of 2 M H₂SO₄, and the plate was read a second time at 450 nm.

ELISA-PPA. The antigen-coated plates were washed with 100 μ l of Buffer B at room temperature for 1 hr, then washed three times with 200 μ l of PBS-T. Serum samples were absorbed with a saline solution (1:2) containing 2.5 mg/ml lyophilized *M. phlei* (Allied Monitor, Inc.) for 2 hours at room temperature, with vortexing every 10 min. The preabsorbed sera were centrifuged at $1,157 \times g$ for 1 min, and the supernatant was further diluted with Buffer B (1:300). A 100 μ l aliquot of diluted serum sample was incubated for 2 hours at room temperature, and then washed three times with 200 μ l of PBS-T. A 100 μ l aliquot of HRP-conjugated rabbit anti-sheep IgG (dilution 1:1000; KPL Laboratories, Gaithersburg, MD, USA) was added to each well and incubated at room temperature for 2 hours. After washing three times with 200 μ l PBS-T, 100 μ l of TMB solution was used for color development. The OD value was determined in the same way as for the EVELISA.

Statistical Analysis All samples were analyzed in duplicate in each ELISA. A cut-off value was applied as two standard deviations above the mean OD of the negative control sera ($n = 5$)⁽¹⁸⁾. Diagnostic sensitivity was determined as the percent proportion of the number of positive tests in the positive control group (subclinical sheep, $n = 31$) and specificity was determined as the percent proportion of the number of negative tests in the negative control group ($n = 5$). The results of two tests were evaluated by McNemar's chi-square test and kappa agreement statistical analysis. Differences were considered significant at $p, 0.05$.

RESULTS AND DISCUSSION

Figure 1 shows the results of two in-house ELISA tests for detecting subclinical ovine PTB in a sheep flock in Mexicali, Baja California. The ELISA-PPA test identified 9 of 31 subclinical sheep (Figure 1A). The sensitivity and the specificity of the ELISA-PPA were 29% (95% CI; 14-48%) and 100% (95% CI; 48-100%), respectively. The EVELISA identified 26 of 31 subclinical animals as positive (Figure 1B), and its sensitivity and specificity were 84% (95% CI; 66-95%) and 100% (95% CI; 48-100%), respectively.

The two assays demonstrated a significant difference in diagnostic performance (McNemar's test; $P=0.0005$). The agreement between two test was not observed, as Kappa value was calculated -0.069 (95% IC; $-0.265-0.127$).

The humoral immune response to the MAP lipid surface antigen using an EVELISA has not been tested in sheep. The EVELISA obtained better results detecting cattle at the early stages of PTB than those of a commercial ELISA ⁽¹⁰⁾. In the present study, the subclinical positive group consisted of MAP shedding sheep but they were seronegative on the commercial ELISA. The high frequency of EVELISA positive results in subclinical sheep indicates its usefulness as a complementary test to other tests or its use alone in a control program for severely affected flocks. Due to the absence of an authorized MAP vaccine (bacterin) to control ovine PTB in Mexico, early detection of MAP-infected animals, particularly MAP shedding animals, is crucial to accelerate the disease control process ⁽¹⁹⁾. A highly specific ELISA that consistently detects MAP shedders would be a big advantage over other expensive laboratory tests for MAP, such as fecal culture and fecal PCR; hence, minimizing the cost of individual diagnosis during the actual control scheme (test and cull) in Mexico.

Juste *et al.* ⁽²⁰⁾ analyzed sheep from 53 herds and found no significant agreement between PPD-based ELISA results and those of the fecal IS900 PCR test ⁽²⁰⁾. The concordance between the ELISA results and those of fecal IS900 qPCR could not be determined here because qPCR positivity was used as the criterion in the subclinical positive group. However, the ability of the EVELISA to detect subclinical shedders (84%) was higher than shown by previous reports in cattle where a direct correlation was found between specific antibody titers and the level of fecal-MAP excreted ⁽²⁰⁻²³⁾. Mogombedze *et al.* suggested that humoral immunity may reflect the increase in MAP shedding ⁽²⁴⁾.

Pérez *et al.* ⁽²⁵⁾ reported the diagnostic sensitivities of a PPA-based ELISA for detecting ovine PTB with or without histological lesions as 48.4% and 11.1%, respectively. It was interesting to examine the possible

association between histopathological lesions and the onset of humoral response in the positive animals in our study ⁽²⁵⁾.

Five animals in the subclinical positive group (n = 31), had negative results on the EVELISA; two were > 36-months-of-age and were positive on the ELISA-PPA. This result suggests that the antigenicity of the MAP lipid antigen might decrease in later stages of the disease. A longitudinal prospective study in a sheep model, such as the one reported by Verna *et al.* ⁽²⁶⁾, is required to determine the duration of specific antibodies against MAP surface lipid antigen. Of the five negative EVELISA samples, three were also negative in the ELISA-PPA. All of them were from young lambs. These lambs may represent passive shedders that were detected as false positives by direct fecal-qPCR, considering the history of the flock and that the high number of MAP shedders had not been quarantined before this study.

M. phlei have been commonly used in the ELISA preabsorption step for PTB to remove cross-reactivity ⁽²⁷⁾ caused by mycobacterial species in herd environment ^(28, 29) and hence reduce the false positive rate. Scott *et al.* ⁽¹⁴⁾ developed preabsorbed EVELISA using *M. phlei* and successfully removed false positives in a MAP-free cattle herd and reported 100% specificity ⁽¹⁴⁾. As we initially could not remove the high cross-reactivity in our negative control sera using the method of Scott *et al.*, *M. flavescens* was used as preabsorbant in our EVELISA. *M. flavescens* is environmentally detectable mycobacteria with an intermediate growth rate ⁽³⁰⁾. This species has not been used as a preabsorbant to diagnose PTB. The efficacy of *M. flavescens* as preabsorbant could be limited for particular flocks, as we have observed that this bacteria does not remove false positive in other PTB-free sheep flocks located outside the state of Baja California (date not shown). It would be helpful to determine the population structure of environmental mycobacteria in different sheep flocks prior to selecting the candidate preabsorbant bacteria to optimize the EVELISA in sheep ⁽³¹⁾.

Further investigations are necessary to validate the sensitivity and specificity of the EVELISA in a larger number of sheep samples, particularly animals in different stages of the disease and from multiple flocks. The

results of the present study provide a basis for future research of an ethanol-extracted MAP surface antigen for early detection of ovine PTB, with promising opportunities for use in a microfluidics platform ⁽³²⁾ as rapid and economic on-site test.

Acknowledgments

Authors are thankful to the Mexican Council for Science and Technology (CONACyT) for Graduate Student Fellowship to EPB and TCR. This study was partially supported by a research grant from Autonomous University of Baja California (UABC, CA201/5/C/20/14, 201/5/C/3/18), and by Fundación Produce Baja California, A.C.

REFERENCES

1. Harris, N.B.; Barletta, R.G., *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis in Veterinary Medicine. *Clin. Microbiol. Rev.* **2001**, 14(3), 489-512.
2. Barkema, H.W.; Hesselink, J.W.; McKenna, S.L.; Benedictus, G.; Groenendaal, H. Global prevalence and economics of infection with *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis in ruminants. In *Paratuberculosis: Organism, Disease, Control*. Behr, M.A., Collins, D.M., Eds.; CAB International, Oxford, UK. 2010; Ch.2, p10-21.
3. Hilbink, F.; West, D.M.; de Lisle, G.W.; Kittelberger, R.; Hosie, B.D.; Hutton, J.; Cooke, M.M.; Penrose, M. Comparison of a complement fixation test, a gel diffusion test and two absorbed and unabsorbed ELISAs for the diagnosis of paratuberculosis in sheep. *Vet Microbiol.* **1994**, 41(1-2), 107-16.
4. Gwozdz, J.M.; Thompson, K.G.; Murray, A.; Reichel, M.P.; Manktelow, B.W.; West, D.M. Comparison of three serological tests and an interferon-gamma assay for the diagnosis of

- paratuberculosis in experimentally infected sheep. *Aust. Vet. J.* **2000**, 78(11), 779-83.
5. Singh, A.V.; Singh, S.V.; Sohal, J.S.; Singh, P.K. Comparative potential of modified indigenous, indigenous and commercial ELISA kits for diagnosis of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis in goat and sheep. *Indian J Exp Biol* **2009**, 47, (5), 379-82.
 6. Sergeant, E.G.; Marshall, D.J.; Eamens, G.J.; Kearns, C.; Whittington, R.J. Evaluation of an absorbed ELISA and an agar-gel immuno-diffusion test for ovine paratuberculosis in sheep in Australia. *Prev. Vet. Med.* **2003**, 61(4), 235-248.
 7. Robbe-Austerman, S.; Gardner I.A.; Thomsen, B.V.; Morriscal, D.G.; Martin, B. M.; Palmer, M.V.; Ewing, C. Sensitivity and specificity of the agar-gel-immunodiffusion test, ELISA and the skin test for detection of paratuberculosis in United States Midwest sheep populations. *Vet. Res.* **2006**, 37(4), 553-564.
 8. Gumber, S.; Eamens, G.; Whittington, R.J. 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.
 9. Nielsen, S.S.; Toft, N. Ante mortem diagnosis of paratuberculosis: A review of accuracies of ELISA, interferon-gamma assay and faecal culture techniques, *Vet. Microbiol.* **2008**, 129, 217-235.
 10. Eda, S.; Bannantine, J.P.; Waters, W.R.; Mori, Y.; Whitlock, R.H.; Scott, M.C.; Speer, C.A. A highly sensitive and subspecies-specific surface antigen enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of Johne's disease. *Clin. Vacc. Immunol.* **2006**, 13(8), 837-844.
 11. Waters, W.R.; Miller, J.M.; Palmer, M.V.; Stabel, J.R.; Jones, D.E.; Koistinen, K.A.; Steadham, E.M.; Hamilton, M.J.; Davis, W.C.; Bannantine, J.P., Early induction of humoral and cellular immune responses during experimental *Mycobacterium avium* subsp.

- paratuberculosis infection of calves. *Infect. Immun.* **2003**, 71(9), 5130-8..
12. Mortier, R.A.; Barkema, H.W.; Negron, M.E.; Orsel, K.; Wolf, R.; De Buck, J., Antibody response early after experimental infection with *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis in dairy calves. *J. Dairy Sci.* **2014**, 97, (9), 5558-65.
 13. Speer, C.A.; Scott, M.C.; Bannantine, J.P.; Waters, W.R.; Mori, Y.; Whitlock, R.H.; Eda, S. A novel enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis infections (Johne's Disease) in cattle. *Clin. Vacc. Immunol.* **2006**, 13(5), 535-540.
 14. Scott, M.C.; Bannantine, J.P.; Kaneko, Y.; Branscum, A.J.; Whitlock, R.H.; Mori, Y.; Eda, S. Absorbed EVELISA: a diagnostic test with improved specificity for Johne's disease in cattle. *Foodborne Pathog. Dis.* **2010**, 7(11), 1291-1296.
 15. Wadhwa, A.; Johnson, R.E.; Eda, K.; Waters, W.R.; Palmer, M.V.; Bannantine, J.P.; Eda, S. Evaluation of ethanol vortex ELISA for detection of bovine tuberculosis in cattle and deer. *BMC Vet. Res.* **2014**, 10(147), 1746-6148.
 16. Whitlock, R.H.; Wells, S.J.; Sweeney, R.W.; Van Tiem, J. ELISA and fecal culture for paratuberculosis (Johne's disease): sensitivity and specificity of each method. *Vet. Microbiol.* **2000**, 77(3-4), 387-398.
 17. Kawaji, S.; Taylor, D.L.; Mori, Y.; Whittington, R.J. Detection of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis in ovine faeces by direct quantitative PCR has similar or greater sensitivity compared to radiometric culture. *Vet. Microbiol.* **2007**, 125(1-2), 36-48.
 18. Crowther J.R. in *ELISA, Theory and practice*: Humana Press, Totowa, NJ, 1995; p152.
 19. Consejo Técnico Constitutivo Nacional de Salud Animal (CONASA). Plan estratégico del programa para la atención de la paratuberculosis en Ganado 2010. bovino, ovino y caprino en México. <http://www.conasamexico.org.mx/conasa/pdf/>. [Accessed Nov 23, 2016]

20. Juste, R.A.; Garrido, J.M.; Geijo, M.; Elguezabal, N.; Aduriz, G.; Atxaerandio, R.; Sevilla, I. Comparison of blood polymerase chain reaction and enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis infection in cattle and sheep. *J. Vet. Diag. Inv.* **2005**, 17(4), 354-359.
21. Collins, M.T.; Wells, S.J.; Petrini, K.R.; Collins, J.E.; Schultz, R.D.; Whitlock, R. H. Evaluation of five antibody detection tests for diagnosis of bovine paratuberculosis. *Clin. Diag. Lab. Immunol.* **2005**, 12(6), 685-692.
22. Roussel, A.J.; Fosgate, G.T.; Manning, E.B.; Collins, M.T. Association of fecal shedding of mycobacteria with high ELISA-determined seroprevalence for paratuberculosis in beef herds. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **2007**, 230(6), 890-895.
23. Ganusov, V.V.; Klinkenberg, D.; Bakker, D.; Koets, A.P. Evaluating contribution of the cellular and humoral immune responses to the control of shedding of *Mycobacterium avium* spp. paratuberculosis in cattle. *Vet. Res.* **2015**, 46(1), 62.
24. Magombedze, G.; Eda, S.; Ganusov, V.V. Competition for antigen between Th1 and Th2 responses determines the timing of the immune response switch during *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis infection in ruminants. *PLoS Comput. Biol.* **2014**, 10(1), e1003414.
25. Pérez, V.; Tellechea, J.; Badiola, J.J.; Gutiérrez, M.; García Marín, J.F. Relation between serologic response and pathologic findings in sheep with naturally acquired paratuberculosis. *Am. J. Vet. Res.* **1997**, 58(8), 799-803.
26. Verna, A.E.; Garcia-Pariente, C.; Muñoz, M.; Moreno, O.; García-Marin, J.F.; Romano, M.I.; Pérez, V. Variation in the immunopathological responses of lambs after experimental infection with different strains of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis. *Zoonoses Public Health.* **2007**, 54(6-7), 243-252.
27. Yokomizo, Y.; Yugi, H.; Merkal, R.S. A method of avoiding false-positive reactions in an enzyme-linked immunosorbant assay

- (ELISA) for the diagnosis of bovine paratuberculosis. *Nippon Juigaku Zasshi*. **1985**, 47, 111-119.
28. Norby, B.; Fosgate, G.T.; Manning, E.B.; Collins, M.T.; Roussel, A.J. Environmental mycobacteria in soil and water on beef ranches: association between presence of cultivable mycobacteria and soil and water physicochemical characteristics. *Vet.Microbiol.* **2007**, 124(1-2), 153-159.
29. Osterstock, J.B.; Fosgate, G.T.; Norby, B.; Manning, E.B.; Collins, M.T.; Roussel, A.J. Contribution of environmental mycobacteria to false-positive serum ELISA results for paratuberculosis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **2007**, 230(6), 896-901.
30. Bojalil, L.F.; Cerbon, J.; Trujillo, A. Adansonian classification of mycobacteria. *J. Gen. Microbiol.* **1962**, 28, 333-346.
31. Marassi, C.D.; Silva, M.; Oelemann, W.R.; de Souza Fonseca, L.; Ristow, P.; Lilenbaum, W. An alternative for the preadsorption step in the paratuberculosis serodiagnosis: *Mycobacterium fortuitum*. *Braz.J. Microbiol.* **2008**, 39(3), 511-513.
32. Wadhwa, A.; Foote, R.S.; Shaw, R.W.; Eda, S., Bead-based microfluidic immunoassay for diagnosis of Johne's disease. *J. Immunol. Methods.* **2012**, 382(1-2), 196-202.

CAPÍTULO 4

IV. CONCLUSIONES GENERALES

1. La seroprevalencia de la PTB ovina en Mexicali es alta.
2. Programas de control son requeridos para reducir el impacto económico y ambiental producido por la PTB y TB, en la ciudad fronteriza. Con un enfoque en animales recién introducidos a los rebaños.
3. Es importante conocer la presencia de micobacterias ambientales en la zona de estudio. Con el fin de aplicar la preabsorción adecuada y obtener mejores resultados sin afectar la sensibilidad de la prueba.
4. Se requiere, mayor número de muestras para determinar la sensibilidad y especificidad exacta de EVELISA.