

01674



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

MAESTRIA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCION
Y DE LA SALUD ANIMAL

Identificación de aislamientos de *Mycobacterium
avium* subsp. *paratuberculosis* en pequeños
rumiantes de México mediante RFLP.

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

P R E S E N T A :

ISABEL ESTEVEZ DENAIVES

TUTOR: GILBERTO CHAVEZ GRIS
COMITE TUTORAL:
GABRIELA BARCENAS MORALES
ANTONIO VERDUGO RODRIGUEZ



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría en Ciencias de la
Producción y de la Salud Animal

Identificación de aislamientos de *Mycobacterium
avium* subsp. *paratuberculosis* en pequeños
rumiantes de México mediante RFLP.

T E S I S

Para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS

Presenta:

ISABEL ESTEVEZ DENAIVES

Tutor: Gilberto Chávez Gris
Comité tutorial: Gabriela Barcenas Morales
Antonio Verdugo Rodríguez

México, D.F.

2004

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México y al Programa de Maestría en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal.

A los Médicos Veterinarios y productores que donaron las muestras de los caprinos y ovinos que conformaron este trabajo.

Al Departamento de Patología y de Microbiología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia así como al laboratorio de Micobacteriología Molecular del Veterinary Research Institute de la República Checa, por todas las facilidades otorgadas para realizar la parte experimental de la tesis.

A CONACYT por financiar parte de esta tesis con el proyecto 25395-B y por haberme otorgado una beca para realizar mis estudios de maestría.

A PAPIIT por contribuir al financiamiento de esta tesis con el proyecto IN22 1999 y por brindarme una beca suplementaria.

A mi Comité Tutoral y Jurado Dr. Gilberto Chávez Gris, Dra. Gabriela Barcenas Morales, Dr. Antonio Verdugo Rodríguez, Dra. Camila Arriaga Díaz y Dr. Francisco Suárez Güemes por su contribución a esta tesis.

A Abel, Adriana, Marycruz, Rigo, Héctor, Daniel, Xóchitl, Mario, Jaromir, Pavel, Ivo Pavlik y Milan Bartos por su aportación a este trabajo.

A Don Aureliano y Don Benito por toda su ayuda en la sala de necropsias.

A Luis Antonio Morales, Eduardo Miranda y Guadalupe Juárez por realizar las preparaciones histológicas y tinciones especiales.

A Jaime Eugenio Córdova por la elaboración del material fotográfico.

A los compañeros y amigos de Patología, Microbiología y del Veterinary Research Institute que me apoyaron durante mis estudios.

Resumen

Isabel Estevez Denaives. “Identificación de aislamientos de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* en pequeños rumiantes de México mediante RFLP”. Bajo la supervisión del Dr. Gilberto Chávez Gris, de la Dra. Gabriela Barcenas Morales y del Dr. Antonio Verdugo Rodríguez.

La paratuberculosis es una enfermedad de curso crónico que afecta principalmente a los rumiantes, causada por *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (Map). Se caracteriza por provocar enteritis y linfadenitis granulomatosas. Los estudios empleando la técnica de detección de polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) han demostrado un polimorfismo genético de Map. El objetivo de este estudio fue establecer mediante RFLP las diferencias genéticas de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* entre aislamientos de origen caprino y ovino así como de zonas geográficas diferentes. Con este fin se detectaron en diferentes estados de México animales con signos clínicos sugestivos de paratuberculosis. El diagnóstico se confirmó mediante las pruebas de inmuno difusión en gel de agar e inmuno ensayo enzimático. Se realizó la necropsia de animales positivos y se seleccionaron las muestras de animales con lesiones de tipo multibacilar. Las micobacterias se concentraron a partir de las muestras congeladas de intestino. A partir de los concentrados de micobacterias se llevó a cabo la extracción del ADN y el estudio de RFLP, empleando las endonucleasas de restricción *BstEII* y *PstI* y la secuencia de inserción *IS900* como sonda. Finalmente, se realizó el aislamiento de Map en medio de cultivo. Se obtuvo suero de 1043 animales, de los cuales 137 (13.14%) resultaron positivos a paratuberculosis. Se incluyeron en el estudio anatomopatológico 51 animales, 22 de ellos (43.14%) presentaron lesiones de tipo multibacilar. Para el estudio de RFLP, se obtuvo ADN en cantidad suficiente de las 12 muestras que presentaron la mayor cantidad de micobacterias en tejido intestinal. Se identificaron dos patrones nuevos (C33 en una cabra e I3 en 6 ovinos), así como infecciones mixtas en un mismo individuo. El ADN de Map obtenido a partir de muestras de intestino de las 4 cabras se identificó con el tipo C. A partir de las muestras de origen ovino se identificaron los tipos C e I. Los tipos de Map más comunes en las diferentes zonas geográficas fueron el C1 e I3. Se obtuvo el aislamiento de Map en medio de cultivo a partir de las 22 muestras de animales con lesiones de tipo multibacilar.

Palabras clave: paratuberculosis, polimorfismo, RFLP, *IS900*, caprino, ovino, México.

Abstract

Isabel Estevez Denaives. "RFLP identification of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolated from small ruminants of Mexico". Under the supervision of Dr. Gilberto Chávez Gris, Dr. Gabriela Barcenas Morales and Dr. Antonio Verdugo Rodríguez.

Paratuberculosis is a chronic disease of small ruminants, caused by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (Map). It produces a granulomatous enteritis and lymphadenitis. A genetic polymorphism of Map has been demonstrated by RFLP. The object of this study was to establish by RFLP genetic differences of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* between caprine and ovine origin isolates as well as between different geographic areas. In several states of Mexico, animals with clinical signs of paratuberculosis were detected, diagnosis was confirmed by IDGA and ELISA. Necropsy of positive animals was performed and samples of animals with multibacillary lesions were selected. Micobacterias from freezed intestinal samples, were concentrated. From this micobacteria concentrate, DNA extraction and RFLP were performed, employing *Bst*EII y *Pst*I as restriction endonucleases and *IS900* as probe. Finally, Map was cultured. Serum samples of 1043 animals were obtained, and 137 (13.14%) were positive to paratuberculosis. Of 51 animals included in the anatomopathologic study, 22 (43.14%) presented multibacilar lesions. Enough DNA for RFLP was obtained only from 12 samples with larger amounts of micobacteria in intestinal tissue. Two new profiles were identified (C33 and I3 in 6 ovines), as well as mixed infection in a same animal. Map DNA obtained from 4 goat intestinal samples were identified as C type. Types C and I were identified in the ovine origin samples. In the different geographic areas, the types most commonly found were C1 and the new type I3. From all the samples of animals with multibacillary lesions, Map culture was obtained.

Key words: paratuberculosis, polymorphism, RFLP, *IS900*, caprine, ovine, Mexico.

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	1
REVISIÓN DE LA LITERATURA	2
1. AGENTE CAUSAL	2
A. ASPECTOS HISTÓRICOS	2
B. ESTUDIOS DE PARATUBERCULOSIS EN MÉXICO	2
C. NOMENCLATURA ACTUAL	3
D. CARACTERÍSTICAS	3
E. CULTIVO	4
F. IS900	5
G. GENOMA	6
H. CEPAS DIFERENTES	8
2. INFECCIÓN	8
A. TRANSMISIÓN	8
B. SUSCEPTIBILIDAD	9
3. SIGNOS CLÍNICOS	9
4. LESIONES	10
A. LESIONES MACROSCÓPICAS	10
B. LESIONES MICROSCÓPICAS	10
5. INMUNOLOGÍA	12
A. RESPUESTA INMUNE	12
B. RELACIÓN ENTRE RESPUESTA INMUNE Y LESIONES	13
6. DIAGNÓSTICO	14
A. LESIONES MACROSCÓPICAS E HISTOPATOLOGÍA	14
B. RESPUESTA INMUNE CELULAR	14
C. RESPUESTA INMUNE HUMORAL	15
D. DETECCIÓN DEL AGENTE ETIOLÓGICO	16
7. PARTICIPACIÓN EN ZOONOSIS	17

8. ESTUDIOS DE POLIMORFISMO	19
A. METODOLOGÍA	19
B. ESPECIFICIDAD DE HUÉSPED	20
C. DIFERENCIAS GEOGRÁFICAS	21
D. UTILIDAD DEL ESTUDIO	22
OBJETIVOS	24
1. GENERAL	24
2. ESPECÍFICOS	24
MATERIAL Y MÉTODOS	25
1. ORIGEN DE LAS MUESTRAS	25
2. ESTUDIO SEROLÓGICO	25
A. OBTENCIÓN DE MUESTRAS DE SUERO	25
B. INMUNO DIFUSIÓN EN GEL DE AGAR	25
C. INMUNO ENSAYO ENZIMÁTICO	26
3. ESTUDIO ANATOMOPATOLÓGICO	27
4. CONCENTRACIÓN DE LAS MICOBACTERIAS	28
5. EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO	29
6. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA	31
7. POLIMORFISMO EN LA LONGITUD DE LOS FRAGMENTOS DE RESTRICCIÓN	33
A. DIGESTIÓN DEL ADN GENÓMICO MEDIANTE <i>BstEII</i> Y <i>PstI</i>	33
B. SEPARACIÓN DE FRAGMENTOS DE ADN MEDIANTE ELECTROFORESIS	33
C. TRANSFERENCIA DEL ADN A MEDIO SÓLIDO (<i>SOUTHERN BLOTTING</i>)	34
D. PREPARACIÓN DE LA SONDA	34
E. MARCAJE DE LA SONDA PARA HIBRIDACIÓN	36
F. HIBRIDACIÓN DE LA MEMBRANA	36
G. DETECCIÓN DE LAS BANDAS DE LA MEMBRANA Y REVELADO	37
8. AISLAMIENTO BACTERIOLÓGICO	37
RESULTADOS	39
1. ORIGEN DE LAS MUESTRAS	39
2. ESTUDIO SEROLÓGICO	40

3. ESTUDIO ANATOMOPATOLÓGICO	40
4. CONCENTRACIÓN DE LAS MICOBACTERIAS	41
5. EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO	43
6. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA	44
7. POLIMORFISMO EN LA LONGITUD DE LOS FRAGMENTOS DE RESTRICCIÓN	44
8. AISLAMIENTO BACTERIOLÓGICO	49
DISCUSIÓN	50
ABREVIATURAS Y SIGLAS USADAS	63
REFERENCIAS	64
ANEXOS	75
ANEXO 1: PREPARACIÓN DEL GEL PARA IDGA	76
ANEXO 2: REACTIVOS EMPLEADOS EN LA REALIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE ELISA	77
ANEXO 3: SOLUCIONES PARA LA EXTRACCIÓN DEL ADN.	78
ANEXO 4: SOLUCIONES PARA EL RFLP.	80
ANEXO 5: POSICIÓN DE LOS INICIADORES EN LA IS900.	81

Introducción

La paratuberculosis es una enfermedad de curso crónico causada por un bacilo ácido alcohol resistente denominado *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (Map). En rumiantes domésticos se caracteriza por provocar tanto enteritis como linfadenitis granulomatosas. El signo típico de esta enfermedad es la progresiva pérdida de peso en animales adultos. La importancia de esta enfermedad radica en las pérdidas económicas que conlleva así como su posible relación con la enfermedad de Crohn en el hombre. Sin embargo, y a pesar de haber sido reconocida como una enfermedad de importancia desde hace más de un siglo, aún prevalecen muchas dudas en cuanto a las características y patogenicidad del microorganismo.

La biología molecular es una herramienta reciente que ha sido aplicada al estudio de las micobacteriosis. De esta forma se ha progresado en conocimientos de genética bacteriana y se han mejorado los métodos diagnósticos. Los estudios mediante la técnica de detección de polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) han demostrado un polimorfismo genético de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. Al parecer existe cierta relación entre cepas, especies afectadas y zonas geográficas.

En algunas áreas de México, los rebaños caprinos y ovinos están formados por animales importados de países donde la paratuberculosis existe con alta incidencia. Sin embargo, se tiene poca información acerca de la prevalencia de la enfermedad y de los tipos de Map involucrados en nuestro país. Este estudio pretende identificar la o las cepas de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* que afectan a los caprinos y ovinos de algunas zonas de México, mediante la caracterización de la bacteria por medio de estudios de RFLP.

Revisión de la Literatura

1. Agente causal

A. Aspectos históricos

La paratuberculosis fue claramente reportada por primera vez en 1895 por Johne y Frothingham. Fue descrita como un caso inusual de tuberculosis en una vaca con enteritis crónica con presencia de bacilos ácido alcohol resistentes (BAAR) en las lesiones.^{7,29,70} Bang en 1906, al reconocer que la enfermedad no era tuberculosis la llamó enfermedad de Johne o pseudotuberculosis.^{25,29} En 1912, el agente causal fue aislado, cultivado, caracterizado y usado para reproducir la enfermedad experimentalmente por Twort e Ingram, quienes denominaron al microorganismo *Mycobacterium enteritidis chronicae pseudotuberculosis bovis johne*.^{7,29,70} Posteriormente se observó que esta bacteria también afectaba a otras especies, por lo tanto se propusieron nombres más simples como *Mycobacterium johnei* y *Mycobacterium paratuberculosis*.^{29,70} En 1990, la micobacteria causante de la enfermedad de Johne fue denominada *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*.¹²³

B. Estudios de paratuberculosis en México

En México, existen pocos trabajos sobre paratuberculosis, el primer reporte de la enfermedad en México lo publicó Unzueta en 1936. En bovinos lecheros del Distrito Federal este autor diagnosticó la enfermedad a través de las pruebas de johnina y tuberculina aviaria así como con la observación del bacilo en frotis de heces. Bustamante y Garibay en 1974 reportan, mediante pruebas inmunológicas, ovinos de un rebaño del Estado de México positivos a paratuberculosis. Ramírez *et al.* logran el primer aislamiento de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* en bovinos lecheros del estado de Hidalgo en 1979. Este mismo autor demuestra mediante pruebas serológicas la presencia de paratuberculosis en caprinos de los estados de Querétaro y Guanajuato y ovinos del Estado de México y Querétaro. Logra también este grupo de trabajo el aislamiento de Map en cultivo a partir de cabras de Querétaro y Guanajuato. De Lucas (1984) comprueba la presencia de la paratuberculosis en un rebaño caprino de Guanajuato y compara cuatro diferentes formas de diagnóstico. La prevalencia de la

paratuberculosis en caprinos y ovinos sacrificados en cuatro rastros del Estado de México es determinada por Pradexis (1985), mediante la inmuno difusión en gel agar (IDGA). En toros de lidia de los estados de Nuevo León, Guanajuato, Estado de México y Tlaxcala esta enfermedad ha sido reportada. (Barajas *et al.*, 1987; Aburto, 1989; Morales, 1994) Otros estudios reportan la prevalencia de la enfermedad en rebaños de ovinos del Estado de México y caprinos del Distrito Federal y comparan diferentes pruebas diagnósticas, respuestas a vacunación o ambas (Hernández, 1991; Oviedo, 1991; Vélez *et al.*, 1995; Vélez, 1998; Domínguez, 2000). Chávez-Gris *et al.* (2004) al realizar un estudio de RFLP de *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* cultivados a partir de caprinos del Distrito Federal, encontraron el tipo C1. Los estudios más recientes en México sobre la paratuberculosis son de Torres (2001) y Alarcón (2002), que comparan la respuesta inmune temprana de cabritos inoculados con Map obtenidos de una cabra y de una oveja.

C. Nomenclatura actual

El género *Mycobacterium* se define en la actualidad como parte de la familia *Mycobacteriaceae*, suborden *Corynebacterinae*, orden *Actinomycetales*, subclase *Actinobacteridae*, clase *Actinobacteria*, división *Fimacutes*, superreino *Bacteria*.⁷⁰ Thorel *et al.* (1990), basados en diversas pruebas como determinación de morfología celular y colonial, estudios bioquímicos y necesidades para cultivo, clasifican al microorganismo como una subespecie de *Mycobacterium avium*.

D. Características

En general las micobacterias son bacilos rectos o ligeramente incurvados de 1 a 10 μm , que no forman endosporas. En ocasiones presentan un crecimiento filamentosos del que pueden desprenderse formas bacilares o cocáceas. Las micobacterias se caracterizan por ser ácido alcohol resistentes. La tinción de Gram no es de utilidad en la detección de las micobacterias. La pared bacteriana es la responsable de estas propiedades tintoriales.⁷⁰

Las paredes micobacterianas constan de 4 capas y contienen un 30-60% de lípidos incluyendo entre otros, ceras, lipoarabinomanano y ácidos micólicos.⁸⁸ La ácido alcohol

resistencia de la bacteria se debe a este carácter ceroso de la pared que dificulta la penetración de los colorantes así como su eliminación.⁷⁰

Mycobacterium avium subsp. *paratuberculosis* es un bacilo de 1-2 μm que se tiñe bien con el método Ziehl-Neelsen (ZN). En frotis realizados a partir de tejidos o heces el rasgo más característico es que conforma grumos más o menos grandes de bacilos. Se han reportado formas de Map deficientes en pared celular en bovinos con enfermedad de Johne. Estas formas deficientes en pared celular no son ácido alcohol resistentes.^{67,68,70}

E. Cultivo

Todas las micobacterias son aerófilas o microaerófilas y crecen a temperaturas de entre 25 y 53°C. En general no exigen para su multiplicación ningún factor de crecimiento específico y se comportan como muchas bacterias respecto a sus requerimientos de medios de cultivo. Las colonias de *Mycobacterium avium* crecen lentamente, más de 7 días a una temperatura óptima de 37°C, tienden a formar grumos y su apariencia es lisa o rugosa.^{70,123}

Los medios más empleados para el cultivo del bacilo de Johne son Lowenstein-Jensen, Herrold y Middlebrook 7H9 o 7H11 (con OADC).^{2,25,59,69,90,101,134} Los medios de cultivo para el aislamiento primario de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* que llevan huevo en su composición son suplementados con micobactina J (2mg/l).^{25,69} Las colonias son pequeñas, lisas, húmedas, convexas y no pigmentadas. Para la identificación de Map, son de gran utilidad considerar su lento crecimiento (8 semanas o más) así como su dependencia a micobactina.^{2,77,78,83,102,123} Las micobactinas al igual que las carboximicobactinas y exoquelinas son moléculas con gran capacidad de captación de hierro. Las micobacterias las usan para extraer del medio que las rodea este oligoelemento necesario para sus sistemas enzimáticos.^{13,74,122,123} La micobactina P que se origina de *Mycobacterium phlei* fue producida para el cultivo de Map hasta que se logró extraer la micobactina producida por *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, que se nombró micobactina J. Esta micobactina J permitió obtener colonias a partir de muestras difíciles de cultivar en medios estándares adicionados con micobactina P.⁷⁸ El cultivo de Map a partir de ovinos con paratuberculosis es difícil. Su crecimiento es lento y ocasionalmente los intestinos de ovinos infectados con esta bacteria y su cultivo presentan una coloración amarillenta.^{6,19,29,118,134} Las colonias de *Mycobacterium avium*

subsp. *paratuberculosis* de origen ovino cultivadas en Middlebrook 7H11/OADC presentaron un tamaño que permitió su observación a simple vista y perdieron su dependencia a micobactina en primo cultivo.²

El bacilo de la paratuberculosis sobrevive por largos periodos de tiempo al exterior del animal. En heces de bovino esta bacteria permanece hasta once meses.²⁵ Se logra el cultivo de estas micobacterias después de su almacenamiento a -70°C por 15 semanas, sin embargo su viabilidad disminuye.^{102,103} La descontaminación de las muestras de tejido o heces para el cultivo de Map se lleva a cabo mediante cloruro de benzalconio, aunque los resultados han sido mejorados al emplear cloruro de hexadecil piridinio (HPC) al 0.75%.^{2,19,25,77,78}

F. IS900

Análisis genómicos del ácido desoxirribonucleico (ADN) han facilitado la detección y discriminación de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* con el descubrimiento de la secuencia de inserción considerada específica de Map, la IS900. Esta secuencia de inserción que se repite de 15 a 20 veces en su genoma, tiene un tamaño de 1451 pares de bases (pb). Se ha demostrado que la IS900 codifica una proteína, posible transposasa, denominada *p43*, de 399 aminoácidos. En la cadena opuesta, el gen denominado *bed* (host expression-dependent) codifica una proteína de aproximadamente 55kDa, de función hasta ahora desconocida.^{41,60}

La conservación de los sitios de inserción de la IS900, así como su exclusividad en *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, sugieren que las inserciones de la IS900 determinan el fenotipo de la bacteria. La presencia de este elemento puede influir en la expresión de genes adyacentes por la interrupción directa del marco de lectura o por la introducción de un promotor codificado por la IS900. La expresión diferenciada de los genes adyacentes debido a la presencia de IS900 puede tener un efecto en la determinación del fenotipo del microorganismo.¹⁷ Por lo tanto, la presencia de IS900 en Map posiblemente altera la patogenicidad del microorganismo.^{60,112} Inclusive, se ha sugerido que el gen de la IS900, o los productos que codifica, se encuentran involucrados en la dependencia a micobactina y posiblemente al lento crecimiento de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*.⁸⁴ Se ha iniciado ya el estudio detallado de los locus de inserción de IS900 así como de los genes adyacentes con la finalidad de investigar su relación con la virulencia y variabilidad de cepas.¹⁷

Por otro lado, la identificación de secuencias de inserción es una herramienta útil para diferenciar *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* de las otras subespecies de *Mycobacterium avium* así como para diferenciar cepas de Map.¹¹⁷ Secuencias de inserción relacionadas con la IS900 han sido descritas en micobacterias estrechamente relacionadas con Map. En *Mycobacterium avium* subsp. *avium* se han identificado a la IS901 e IS1245 y a IS902 en *Mycobacterium avium* subsp. *silvaticum*.^{32,43} Las secuencias de inserción se usan comúnmente como diagnóstico para la diferenciación de especies micobacterianas. Comparadas con otras secuencias blanco en el genoma, el uso de las secuencias de inserción es ventajoso debido a que la presencia de múltiples copias incrementan la sensibilidad del diagnóstico. En estudios, entre otros, con la técnica de RFLP, se ha empleado la IS900 como sonda para su hibridación con los fragmentos de ADN.⁹⁰

Recientemente se ha demostrado que *Mycobacterium* spp. contiene secuencias de ADN con una considerable homología con la secuencia IS900. Estas micobacterias han resultado positivas a IS900 mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) empleando iniciadores comúnmente utilizados para la identificación de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. El aislamiento así como estudios de RFLP basados en la IS900, probaron que estas micobacterias no corresponden a Map. Las características fenotípicas de estas micobacterias son diferentes ya que las colonias no son dependientes de micobactina, su velocidad de crecimiento y coloración son distintas. Al realizar RFLP se detectaron 1 a 6 copias de la IS900 en el genoma. Estas micobacterias no han sido plenamente identificadas, sin embargo se encuentran relacionadas con *Mycobacterium intracellulare*, *Mycobacterium scrofulaceum*, *Mycobacterium cookii* y *Mycobacterium* sp cepa IWGMT 90236. Para evitar resultados falsos positivos se recomienda el aislamiento de las micobacterias en medio sólido para verificar las características fenotípicas de las bacterias así como la secuenciación del producto de PCR.^{36,46,125}

G. Genoma

Los genomas de varias micobacterias se encuentran completamente secuenciados y publicados como el de *Mycobacterium tuberculosis* y de *Mycobacterium leprae*. La secuenciación de *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium smegmatis* y *Mycobacterium avium* subsp. *avium* está en proceso. En cuanto a Map, aproximadamente la mitad del genoma ha sido analizado

(<http://www.cbc.umn.edu/ResearchProjects/AGAC/Mptb/Mptbhome.html>). Los estudios comparativos de genomas micobacterianos muestran que *M.a.avium* y *M.a.paratuberculosis* presentan hasta un 98% de homología en algunas regiones.^{8,10,120} Varias técnicas han sido aprovechadas para determinar las posibles diferencias en el genoma de estas dos micobacterias. Su finalidad es establecer secuencias o antígenos específicos de Map como candidatos para su utilización en pruebas diagnósticas de mayor especificidad.^{10,71,120} Las diferencias en virulencia y huéspedes afectados entre *Mycobacterium avium* subsp. *avium* y *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* sugieren la presencia de factores genéticos que determinan estas diferencias. La identificación de genes exclusivos de *M.a.paratuberculosis* contribuiría a mejorar la comprensión de la patogenicidad de la enfermedad de Johne al revelar factores de virulencia de esta micobacteria.^{18,71,125} El elemento denominado GS de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* tiene un porcentaje de GC de 57.1, porcentaje significativamente menor al promedio (69.31) del genoma de esta bacteria. Además, este elemento de 9037 pb codifica 6 genes de elevada homología a genes de biosíntesis de lipopolisacáridos y presenta en sus extremos inversiones repetidas cortas. Estos descubrimientos sugieren la presencia de una isla de patogenicidad, es decir la presencia de una región particular de los patógenos que codifica grupos de genes cuyos productos contribuyen a la virulencia.^{18,125}

Actualmente es posible manipular el genoma micobacteriano introduciendo secuencias de ADN externo mediante el uso de micobacteriófagos y transposones.³⁰ Para el estudio del genoma de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* y el aislamiento de genes involucrados en la patogenicidad se han desarrollado técnicas para generar mutantes mediante la inserción de transposones.^{21,64} Asimismo, se han desarrollado técnicas de biología molecular para la producción de proteínas recombinantes. Las proteínas recombinantes de choque térmico Hsp65 y Hsp70 han sido producidas para la evaluación de la respuesta inmune.⁷² Las señales para la expresión de genes de Map han sido caracterizadas en 6 clonas. Una secuencia consenso, en la región promotora a 35 y 10 pares de bases corriente arriba del codón de inicio de transcripción ha sido definida.⁹

Se ha identificado la secuencia de inserción IS*Mav2* de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* de 1233 pb, posible transposasa. Esta secuencia de inserción no fue amplificada en 9 cepas *M. avium* y 9 especies diferentes de micobacterias. Este estudio apoya el uso potencial de una PCR basada en IS*Mav2* como prueba diagnóstica para Map.¹²⁰

H. Cepas diferentes

Desde hace varias décadas se sabe que existen al menos dos tipos de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. Esta diferencia se ha establecido con base en las características fenotípicas y genotípicas de las bacterias así como a la especie animal afectada. El cultivo de Map a partir de ovinos y bovinos con paratuberculosis ha demostrado diferencias en cuanto a crecimiento y pigmentación.^{6,29,118,134} El medio de cultivo más empleado para el aislamiento de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* proveniente de bovinos con paratuberculosis es el medio modificado de Herrold's con yema de huevo (HEYM).^{59,90,101,134} Sin embargo, el aislamiento de Map con HEYM a partir de heces o tejidos de ovinos no ha tenido buenos resultados. Un medio más adecuado para este último caso ha demostrado ser el Löwenstein-Jensen y más recientemente el Middlebrook 7H11/OADC.^{2,69}

Los estudios a nivel molecular, principalmente mediante RFLP han demostrado cierta heterogeneidad entre los aislamientos de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. Se han diferenciado dos grandes grupos de aislamientos definidos como cepas de bovinos y otras especies (C) y cepas de ovinos (S). A pesar de estas observaciones, aún no se tiene evidencia suficiente para establecer la presencia de dos cepas bovina y ovina bien definidas.^{31,117,118,134} Los diferentes patrones de ADN permiten estudiar la transmisión de esta micobacteria entre animales de la misma especie o de especie diferente y desarrollar estrategias de vigilancia epidemiológica.^{47,61,81,91,134,135,136}

2. Infección

A. Transmisión

Los animales se infectan con *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* principalmente por la vía oral. Las heces de animales infectados contaminan los alimentos, pastura, agua y glándula mamaria.^{7,29} En un estudio temporal basado en un pequeño número de ovejas sin signos clínicos de paratuberculosis, Whittington *et al.* (2000) determinaron un promedio de excreción en heces, por oveja de 8.36×10^{10} bacilos de Map viables por día. El autor estima que esta cantidad de micobacterias sería suficiente para infectar 80 millones de ovejas, al considerar una dosis infectante de 10^3 bacilos viables. Esta excreción se caracteriza en algunos animales

por ser intermitente. Aún así, se destaca la importancia de la excreción de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* en las heces en la dispersión de la enfermedad.

Se considera que aquellas vacas con una excreción de Map viables en heces de más de 1000 unidades formadoras de colonias (UFC)/g, también excretan las micobacterias en su leche aunque a una concentración menor (5 a 8 UFC/50ml de leche).^{55,114} Las micobacterias han sido también aisladas a partir de útero y placenta de vacas infectadas. La infección intrauterina del feto puede ocurrir.^{7,29}

B. Susceptibilidad

Los animales mayores pueden ser infectados, aunque los animales de menos de 30 días de edad son los más susceptibles a la infección. Por lo tanto, el establecimiento de la infección depende de la cantidad de micobacterias ingeridas así como de la edad del animal.^{7,29} Después de un largo periodo de incubación o etapa subclínica, de forma general las vacas presentan la enfermedad clínica hasta los 2 a 5 años de edad.^{7,29,83}

3. Signos clínicos

En los rumiantes los signos clínicos de la paratuberculosis son la pérdida progresiva de peso y edema submaxilar. Este proceso de adelgazamiento puede durar varias semanas o incluso meses con episodios transitorios de recuperación. Los animales no muestran una pérdida de apetito. En los casos más avanzados se llega a estados de caquexia y debilitamiento general de los animales con marcada emaciación y atrofia muscular. Se puede presentar pelo hirsuto con alopecia y ocasionalmente despigmentación, edema submandibular, postración y finalmente muerte. Acompañando a la pérdida de peso frecuentemente los bovinos enfermos suelen mostrar una profusa diarrea líquida no hemorrágica, no mucoide presente de forma continua o bien intermitente.^{25,29,96} En los pequeños rumiantes generalmente no se presenta diarrea, pero pueden encontrarse heces blandas.^{19,27,108} A lo largo de todo este proceso no se suele observar fiebre en los animales afectados.^{25,96}

4. Lesiones

A. Lesiones macroscópicas

Cuando se lleva cabo la necropsia de un rumiante en las fases avanzadas de paratuberculosis, se observa en el cadáver una marcada caquexia con atrofia de las masas musculares y una pérdida casi completa de los depósitos grasos. Este cuadro se puede acompañar de edema intermandibular así como de ascitis e hidropericardio. En la paratuberculosis, los mayores daños se localizan en el intestino y linfonodos mesentéricos. La lesión característica consiste en un evidente incremento en el grosor de la pared intestinal que se muestra edematosa y aumentada hasta 2 o 3 veces en su espesor normal. Además, es frecuente la formación de pliegues en la mucosa que no desaparecen cuando se estira el intestino. Estas lesiones aparecen en los tramos finales del intestino delgado, es decir en válvula ileocecal, ileon y porciones más caudales del yeyuno así como en el ciego. En la serosa intestinal se observan linfangiectasia, apareciendo los vasos linfáticos mesentéricos como cordones de aspecto traslucido, de recorrido tortuoso y prominentes sobre dicha serosa. Los linfonodos de la cadena mesentérica o yeyunal y los ileocecales pueden presentar una marcada tumefacción, mostrándose prominentes en el mesenterio.^{6,19,27,29,96,108} El grado de severidad de las lesiones digestivas es variable entre los animales y no guarda una relación estrecha con la gravedad de los signos clínicos.^{29,96,109}

B. Lesiones microscópicas

Las lesiones histológicas de la paratuberculosis ovina, tanto clínica como subclínica han sido descritas por Pérez *et al.* (1996). Estas lesiones han sido clasificadas de acuerdo a la intensidad y distribución de las lesiones, tipos celulares presentes en las lesiones, presencia y cantidad de bacterias en las lesiones.

La lesión tipo 1 se acompaña de pequeños granulomas localizados exclusivamente en los espacios interfoliculares de las placas de Peyer. En este tipo de lesión no se presentan lesiones macroscópicas, ni BAAR.

La lesión tipo 2 es más severa que el tipo 1. Se observan lesiones granulomatosas focales, localizadas tanto en placa de Peyer como en la mucosa relacionada con la misma. No se detectan micobacterias en los granulomas, ni lesiones macroscópicas.

Las lesiones granulomatosas del tipo 3 afectan tanto a las placas de Peyer y mucosa asociada como a la mucosa no asociada con tejido linfoide. Se distinguen tres subtipos.

Subtipo 3a: las lesiones se asemejan al tipo 2, aunque los granulomas se localizan en la mucosa no asociada a las placas de Peyer. En este caso se distinguen micobacterias dentro de los granulomas. En algunos animales se observa un discreto engrosamiento de los vasos linfáticos.

Subtipo 3b: Este tipo se caracteriza por una enteritis granulomatosa difusa conformada por abundantes macrófagos en la mucosa que provocan su alteración. Se detecta una abundante cantidad de micobacterias. La linfangitis y linfangiectasia se observan tanto a nivel microscópico como a nivel macroscópico. En todos los casos la pared intestinal aparece engrosada y corrugada, particularmente el ileon.

Subtipo 3c: En este caso también se presenta una enteritis granulomatosa difusa infiltrado con abundantes linfocitos y células gigantes. No se detectan micobacterias o bien en pequeñas cantidades. Las lesiones macroscópicas son similares al tipo 3b.

A diferencia del estudio anterior, Clarke CJ y Little D (1996) describen las lesiones macroscópicas e histológicas de ovinos, clínicamente enfermos. Observan dos tipos distintos de enteritis granulomatosa y demuestran una relación significativa entre el tipo celular y el grado de infección micobacteriana. La mayoría de los animales perteneció al grupo conocido como multibacilar caracterizado por un infiltrado extensivo y difuso de macrófagos en la mucosa y submucosa. Esta infiltración se correlacionó significativamente con la presencia de micobacterias. Los autores compararon este primer grupo al tipo 3b descrito por Pérez *et al.* (1996). El segundo grupo denominado paucibacilar mostró una marcada infiltración de linfocitos y algunas veces de células gigantes. En este grupo los macrófagos se presentaron como pequeños granulomas. Este grupo paucibacilar se asemeja al tipo 3c.

Corpa *et al.* (2000) clasifican las lesiones histológicas de la paratuberculosis caprina tanto clínica como subclínica. Las principales diferencias detectadas en las lesiones histológicas de caprinos son la presencia de focos necróticos así como la presencia de un tipo de lesión difuso mixto que posee características de las formas multibacilar y linfocítica. El autor concluye

que a pesar de existir diferencias, los parámetros de clasificación propuestos por Pérez *et al.* (1996) mostraron ser válidos para los caprinos.

5. Inmunología

A. Respuesta inmune

La hipótesis más aceptada actualmente es que una vez ingerida la micobacteria, hay una internación rápida en el intestino. La bacteria inicialmente penetra el domo y zonas interfoliculares del tejido linfoide de las placas de Peyer.^{109,110} Mediante una transportación transcelular o paracelular a través de las células M, la bacteria accede al compartimiento subepitelial de la pared intestinal hasta los macrófagos intra y subepiteliales.¹¹⁰ *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* expresa una proteína de adhesión a fibronectina que se encuentra involucrada en la internación de la bacteria a células epiteliales. Estudios de esta proteína sugieren que al unirse la micobacteria a la fibronectina, las integrinas de unión a fibronectina presentes en la superficie de las células M facilitarían la translocación de este bacilo.^{106,107} La destrucción del bacilo o la limitación de su multiplicación y desarrollo inicial dependerá del grado de activación de los macrófagos así como de los niveles de infección.^{11,51,113} Dentro de las células fagocíticas, la micobacteria tiene la habilidad de inhibir la fusión fagosoma-lisosoma. Aunque el mecanismo molecular mediante el cual se inhibe la maduración del fagosoma aun no se encuentra bien definido, se ha demostrado que la fagocitosis de Map provoca una expresión diferenciada de genes en el macrófago.^{48,126} Además, la enzima superóxido dismutasa secretada por Map, cataliza la dismutación de los radicales superóxido a peróxido de hidrógeno y oxígeno molecular, protegiendo así al bacilo del estrés oxidativo. De esta forma se ha demostrado que *M. avium* y Map pueden no ser degradadas por los macrófagos y permanecer intactos.^{11,16,75} Un mecanismo de defensa contra patógenos intracelulares es la apoptosis de las células infectadas, controlando de esta manera el crecimiento micobacteriano. La apoptosis ocurre *in vitro*, en monocitos bovinos y macrófagos murinos infectados con *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*.^{5,11}

De otra manera, los fagocitos procesan y presentan la bacteria a los linfocitos T. Durante las etapas subclínicas tempranas de la infección, el microorganismo estimula una

respuesta mediada por células caracterizada por fuertes reacciones de hipersensibilidad tipo IV. Se inicia el proceso inmune con la formación de un número limitado de pequeños granulomas en la zona interfolicular. Los linfocitos T son responsables de la atracción, multiplicación y activación de macrófagos. Dentro de esta población de linfocitos T, los $\gamma\delta$ juegan un papel importante como primera línea de defensa en contra de la invasión de patógenos en las respuestas inmunes tempranas en las enfermedades intestinales, incluyendo a la paratuberculosis. En el caso de los ovinos infectados por *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* se ha confirmado un incremento en la cantidad de linfocitos T $\gamma\delta$ en las placas de Peyer de yeyuno e íleon.^{15,23,51,113}

Conforme la enfermedad progresa de un estado subclínico a un estado clínico, la respuesta inmune mediada por células decrece y una fuerte respuesta humoral domina.^{6,72,95} Lamentablemente, los anticuerpos no protegen al animal contra la enfermedad ya que *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* es un microorganismo intracelular.^{25,113} En las fases finales de la enfermedad, la pérdida de la repuesta inmune mediada por células o inclusive la completa anergia permite la rápida diseminación de la infección.^{25,113}

B. Relación entre respuesta inmune y lesiones

Pérez *et al.* (1996) sugieren que las categorías histopatológicas están relacionadas con la respuesta inmune. Es probable que los animales adultos con lesiones de tipo 1 hayan sido infectados a una edad temprana, pero que la infección temprana haya sido frenada por una inmunidad celular efectiva. Los tipos 2 y 3a posiblemente representen la progresión de la enfermedad en la edad adulta debido a una falla en los mecanismos inmunológicos.^{93,95}

Las lesiones paucibacilares probablemente representen una forma tuberculoide en la que la respuesta es insuficiente para limitar la multiplicación del bacilo pero da una fuerte respuesta celular mediada por linfocitos T.⁹⁵ En tejido intestinal de la forma paucibacilar se ha detectado un incremento en la expresión de TNF- α . Esta citoquina producida principalmente por monocitos y macrófagos se encuentra implicada en la patogénesis de inflamación granulomatosa y caquexia.⁶ En cambio, las lesiones tipo 3b multibacilares representarían una forma lepromatosa. Estas lesiones diseminadas compuestas por células epitelioides que contienen gran cantidad de BAAR se asocian a una fuerte respuesta humoral y a una pobre

respuesta celular.^{19,93,94} La expresión de TNF- α , IL-1 β e IL-6 es elevada en tejido intestinal con lesiones multibacilares. Al igual que la TNF- α , la IL-1 se encuentra implicada en procesos de caquexia. Estas citoquinas también son responsables del reclutamiento de células de inflamación, incluyendo monocitos, así como de la inducción de proteínas de fase aguda. La IL-6 se asocia con el desarrollo de células B y plasmocitos, en lesiones multibacilares se correlaciona con la fuerte respuesta humoral.⁶

6. Diagnóstico

A. Lesiones macroscópicas e histopatología

La presencia de lesiones características macroscópicas así como microscópicas en el estudio histopatológico permiten establecer el diagnóstico de la enfermedad de Johne. Sin embargo, se han descrito lesiones macroscópicas y microscópicas mínimas, inclusive en animales con graves síntomas clínicos.^{54,109}

La detección en histopatología de los BAAR es considerada como una técnica sencilla de diagnóstico rápido. No obstante, en algunos casos la cantidad de bacilos es mínima y puede no encontrarse en la reducida muestra que se examina al microscopio.^{54,109}

B. Respuesta inmune celular

Las pruebas de diagnóstico inmunológico de paratuberculosis presentan una gran cantidad de falsos positivos debido a la cercana relación genética entre *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* y *M. avium* subsp. *avium*. Antígenos expresados abundantemente en Map y no en *M. avium*, como AhpC y AhpD, podrían ser utilizados en el diagnóstico de la paratuberculosis.⁸⁶

La intradermorreacción (IDR) se realiza inoculando intradérmicamente extractos proteicos obtenidos a partir de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* o bien de *M. avium*. La lectura se realiza de 48 a 72 h midiendo el grosor de la piel en el sitio de inoculación.^{23,54,83,97,109,116} La producción de un derivado proteico purificado (PPD) a partir de una cepa de Map representativa de los aislamientos de campo pretende incrementar la

detección de la respuesta inmune celular en animales infectados con esta micobacteria. Aun no ha sido evaluado su potencial diagnóstico en ganado.¹¹⁶

La prueba de interferón gama se basa en la liberación de IFN- γ que se produce tras la estimulación antigénica de los linfocitos T. Los linfocitos sanguíneos son estimulados por PPD, posteriormente, la cuantificación de IFN- γ se realiza mediante un inmuno ensayo enzimático (ELISA).^{54,95}

Estas pruebas diagnósticas basadas en la detección de una respuesta inmune mediada por linfocitos T, permiten una detección temprana de animales infectados.^{23,62,95} Sin embargo, aún no se han identificado antígenos específicos de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* y estas pruebas muestran poca especificidad y sensibilidad.^{7,23,54,109} En ovinos, se obtuvieron valores de sensibilidad y especificidad de 52.5 y 93.9% respectivamente para la prueba de IFN- γ y de 55.6 y 100% con IDR. Se detectó una cercana asociación entre las respuestas de tipo celular y tipo de lesión. Con estas pruebas se detectaron gran parte de ovinos con lesiones focales (sensibilidad de 87.5% con la prueba de IFN- γ y de 80% con IDR) mientras que en el caso de ovinos con lesiones multibacilares se obtuvieron resultados negativos.⁹⁵

C. Respuesta inmune humoral

Conforme la enfermedad persiste y progresa la infección, la respuesta inmune humoral se incrementa, por lo que se permite el uso de pruebas basadas en la detección de anticuerpos.^{7,19,110} La prueba de IDGA es una técnica rápida y barata que se ha generalizado en los últimos años. Su principal ventaja es que proporciona niveles de especificidad cercanos al 100%. En el caso de la sensibilidad, en un grupo de ovinos con lesiones de tipo multibacilar se registró un 100% de sensibilidad, mientras que en el grupo paucibacilar la sensibilidad fue de solamente 30%.^{6,27,28,54,62,108,130}

En bovinos, la técnica de ELISA muestra valores elevados de sensibilidad y especificidad. Esta especificidad se incrementa notoriamente con la preadsorción de los sueros problemáticos con *M. phlei*, eliminando así gran parte de las reacciones cruzadas.^{7,54} Para el diagnóstico de la paratuberculosis en ovinos infectados experimentalmente, se detectó una mayor especificidad y sensibilidad con IDGA que con ELISA.⁶² Este resultado probablemente se deba al empleo de una ELISA que detecta anticuerpos de bovinos y no de ovinos, así como

al punto de corte empleado. El antígeno más frecuentemente empleado en la prueba de ELISA es el antígeno protoplásmico PPA-3.^{94,130} La prueba de ELISA es capaz de detectar una respuesta inmune humoral temprana por su sensibilidad, pudiendo inclusive identificar caprinos infectados con *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* tres a seis meses antes que IDGA.¹³⁰

D. Detección del agente etiológico

La identificación microscópica en frotis teñidos mediante ZN es considerada una técnica sencilla de diagnóstico rápido. La micobacteria puede ser detectada a partir de muestras de heces, mucosa intestinal o linfonodos. Sin embargo, se pueden observar otros BAAR como pudieran ser micobacterias saprófitas.^{54,109}

El aislamiento de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* en medio de cultivo tanto a partir de heces como de tejido, es la prueba considerada de referencia ya que posee una especificidad absoluta. Como ya se ha mencionado, para evitar el desarrollo de microorganismos de crecimiento rápido, es imperativo realizar una descontaminación de las muestras.^{2,7,25,54,77,78}

Los medios de cultivo más habitualmente utilizados son medios a base de huevo como el Herrold o el Löwenstein-Jensen. Otros medios usados son el Dubos a base de suero o más sintéticos como las diferentes variantes del medio Middlebrook o el Watson-Reid.^{54,69,70} La incubación debe realizarse en condiciones tales que se aporten los nutrimentos necesarios así como la adición de micobactina durante periodos largos en que permanecen a 37°C.⁷⁰

El aislamiento de Map es un procedimiento largo y que requiere una gran inversión de tiempo. Actualmente, la identificación de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* puede ser realizada de una forma muy rápida, sensible y específica a través de la identificación de elementos genéticos. El descubrimiento de la IS900, ha proporcionado una excelente herramienta de identificación de esta especie.^{30,54}

La PCR es una técnica rápida que posee una alta especificidad y sensibilidad. Para la realización de esta prueba se emplea como secuencia blanco la IS900. La concentración de la micobacteria y la posterior extracción del ADN son pasos que deben ser optimizados al máximo para incrementar la sensibilidad de la técnica. El principal problema que limita el

rendimiento de la PCR es la presencia de inhibidores de la polimerasa en las muestras fecales y de leche.^{7,38,54,63,117}

Otras técnicas de biología molecular como son la electroforesis de campos pulsados (PFGE), amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPD), análisis convencionales de restricción por endonucleasas, PCR aunado al análisis con enzimas de restricción (PCR-REA), polimorfismos en la longitud de los fragmentos amplificados (AFLP) así como la detección de polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) son empleadas básicamente para la caracterización de las cepas aisladas.^{46,54,90,97,104,118,134}

7. Participación en zoonosis

La enfermedad de Crohn en humanos es un desorden sistémico cuya principal manifestación clinicopatológica es la inflamación crónica de intestino. Las regiones más frecuentemente afectadas son el ileon terminal y colon.⁶⁵ La hipótesis de que *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* pudiera estar involucrado como causa de la inflamación crónica de intestino de los pacientes con enfermedad de Crohn fue reportada por primera vez en 1913.^{45,65} Actualmente no se ha confirmado esta hipótesis debido a la dificultad para cultivar este microorganismo, especialmente en el caso de cepas humanas. Se han aislado micobacterias identificadas como *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* a partir de tejidos de algunos pacientes con enfermedad de Crohn.^{45,65,105} Con el desarrollo de técnicas moleculares se ha reportado la presencia de este microorganismo en una gran cantidad de personas con enfermedad de Crohn. Se han utilizado la PCR aplicada a cultivo, a muestras de resección de tejido intestinal y tejido incluido en parafina, así como la hibridación *in situ* de tejidos incluidos en parafina.^{45,105} Se han encontrado dificultades en el desarrollo de estas técnicas y la detección de este microorganismo, probablemente debido a que se presentan solamente formas paucibacilares de la enfermedad y a la complejidad de la pared celular de esta bacteria que limita la extracción de ADN.^{45,49,105} La presencia de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* fue confirmada en más de un 70% de muestras de tejidos de pacientes con enfermedad de Crohn con la técnica de hibridación *in situ* adaptada para micobacterias deficientes en pared celular. Ninguna de estas muestras de tejido teñidas con ZN revelaron la presencia de BAAR y todas las muestras fueron negativas a PCR basada en la IS900.¹⁰⁵ La presencia de esta micobacteria

también fue confirmada en dos muestras de tejido de un paciente con enfermedad de Crohn empleando una técnica de inmunofluorescencia indirecta y microscopía confocal de laser (CSLM).⁸⁵

La sarcoidosis es una enfermedad granulomatosa sistémica del humano que comparte características con las infecciones micobacterianas. Los resultados poco consistentes en el aislamiento de micobacterias o la presencia de BAAR en los granulomas, han llevado a proponer una asociación con *Propionibacterium acnes* y *Propionibacterium granulosum*.^{42,44} También se han obtenido resultados positivos a PCR e hibridación con la IS900, sugiriendo la presencia de Map en aislamientos, biopsias de piel y fluido cerebroespinal de pacientes con sarcoidosis.⁴⁴ Sin embargo, en un estudio de PCR de tiempo real (TaqMan) de muestras de biopsias de linfonodos de 108 pacientes con sarcoidosis no se detectó la IS900 de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*.⁴²

En varios estudios se ha demostrado contaminación con *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* de la cadena alimenticia de los humanos, principalmente carne de res y leche. Es posible que esta micobacteria sea transmitida de animales infectados a humanos por ingestión de agua, carne o productos de origen bovino contaminados.^{45,65} Las vacas lecheras infectadas secretan el bacilo de Johne en su leche, aunque la fuente mayor de micobacterias en leche proviene de la contaminación con heces de la glándula mamaria.^{55,56,65,114} Las técnicas de biología molecular también han sido aplicadas a muestras de leche para detectar *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. Diferentes grupos de trabajo se han esforzado por mejorar el nivel de detección de esta micobacteria. El uso de la separación inmunomagnética en conjunto con la PCR (IMS-PCR) así como la captura mediante un péptido de la bacteria aunado a la PCR han permitido mejorar la sensibilidad en la detección de Map en leche tanto cruda como pasteurizada. Mediante estas técnicas los autores han obtenido resultados positivos con 10 UFC en 50 ml de leche.^{56,119} En el Reino Unido, se obtuvo un 7.8% de prevalencia de esta micobacteria mediante IMS-PCR en 244 muestras leche de vaca en tanque.⁵⁹ En ese mismo país una de 90 muestras de leche cruda de cabra en tanque resultó positiva a IMS-PCR, mientras que en 14 muestras leche cruda de oveja en tanque no se detectó esta bacteria.⁵⁷ La prevalencia en Suiza de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* en 1384 muestras de leche cruda en tanque resultó ser de 19.7% mediante PCR.³⁵ Respecto a la persistencia de Map en quesos semimaduros y maduros, se ha observado que si bien existe una disminución en las

UFC de 2 logaritmos y de 4.3 logaritmos, respectivamente, la eliminación de esta micobacteria no llega a ser completa, pudiendo ser el queso que se elabora con leche cruda contaminada un factor de riesgo para los consumidores.¹¹¹

Algunos estudios han demostrado que *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* puede sobrevivir a las condiciones de pasteurización comercial, mientras que otros investigadores logran la destrucción de este microorganismo en sus laboratorios.^{58,65,92,114} En los diferentes estudios es necesario tener en cuenta las variables como infección natural de la leche *versus* inoculación artificial; cantidad de bacterias presentes o inoculadas en la leche; técnica y equipo de pasteurización (pasteurización rápida o lenta, en laboratorio o comercial, con o sin homogeneización de la leche); así como la técnica de detección de Map después de la pasteurización, como son el cultivo, PCR, IMS-PCR, entre otros. En establecimientos comerciales aprobados en Reino Unido se demostró la presencia de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* mediante IMS-PCR en el 11.8% de 567 muestras de leche de vaca pasteurizada. Esta micobacteria logró ser cultivada a partir de algunas muestras (1.8%) de leche pasteurizada de 72 a 75°C por 15 a 25 segundos.⁵⁹ En Canadá, de 710 muestras de leche en detallistas, 15% resultaron positivos a la IS900 mediante PCR. El cultivo de estas muestras fue negativo.⁵⁰ Estudios indican que Map no sobrevive a la pasteurización lenta, empleando una temperatura de 60 o 65°C por 30 minutos.^{50,115}

8. Estudios de polimorfismo

A. Metodología

Además de las observaciones fenotípicas y epidemiológicas ya mencionadas, existe una clara evidencia a nivel molecular de la heterogeneidad de los aislamientos de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*.¹³⁴ Varios estudios han demostrado que IS900 es una secuencia de inserción útil para el análisis de polimorfismo mediante RFLP. Al parecer, IS900 es un elemento de inserción estable que presenta múltiples copias en el genoma de Map.^{60,132} También se ha demostrado que RFLP es un método sensible que identifica cepas y ha demostrado diferencias en varios aislamientos de Map.^{89,132} Otros métodos como la electroforesis de campos pulsados (PFGE), análisis convencionales de restricción por

endonucleasas y amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPD), no han podido obtener resultados similares a la RFLP.^{47,97,104,117} Distintos aislamientos de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* han sido diferenciados mediante estudios de PCR y restricciones enzimáticas que demuestran polimorfismo en la IS1311.^{135,136} La estabilidad de la técnica de RFLP ha sido demostrada mediante la comparación de subcultivos de varias cepas en diferentes laboratorios. Todos los subcultivos fueron del mismo tipo de RFLP.⁹⁰

Sin embargo, diferentes metodologías, iniciadores y enzimas de restricción han sido utilizados en los estudios de RFLP. En cuanto a las endonucleasas de restricción, *AluI*, *XbaI*, *DraI* no lograron demostrar polimorfismo en los aislamientos de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. De las enzimas más comúnmente empleadas, *BstEII* identifica el mayor número de polimorfismo, seguido por *PvuII*, *PstI* y *BclI*. A pesar de no ser una enzima comúnmente empleada, *BamHI* identificó un número de polimorfismos similar al número de polimorfismos encontrados con *BstEII*, comprobando de esta manera la utilidad de *BamHI* en este tipo de estudios.^{37,89,90,132,134}

El uso de metodologías, sondas y enzimas de restricción diferentes dificulta la comparación y estudios sistemáticos del polimorfismo de las cepas de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. En 1999, Pavlik *et al.* proponen una estandarización para el análisis de Map mediante RFLP, poniendo énfasis en la preparación universal de sondas, el marcaje no radioactivo y el análisis del polimorfismo por computadora. Asimismo, estos autores almacenaron el protocolo detallado así como todas las imágenes de los diferentes patrones de RFLP obtenidos de sus investigaciones y de estudios previos en una base de datos disponible en Internet (<http://www.vri.cz/wwwrflptext.htm>).

B. Especificidad de huésped

Collins *et al.* (1990), mediante RFLP definieron dos grupos de aislamiento con diferente distribución de huésped. Un grupo designado C (“cattle”) incluyó aislamientos de bovinos así como algunos aislamientos de caprinos y ovinos. El segundo grupo designado S (“sheep”) fue aislado únicamente a partir de ovinos y una cabra. Actualmente se cuenta con datos de RFLP de cientos de aislamientos de diferentes regiones geográficas. En su mayoría, los aislamientos de ovinos han sido del grupo S. El grupo C ha agrupado aislamientos de bovinos, caprinos,

humanos, ciervo, alpacas, conejos y rumiantes salvajes, y un rinoceronte.^{14,24,26,37,61,89,91,124,134} Inclusive, en un estudio de Bauerfeind *et al.* (1996) el aislamiento de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* a partir de una vaca presentó un patrón diferente al de los 8 aislamientos obtenidos a partir de ovinos del mismo sitio. Este mismo autor encontró una concordancia entre los grupos C y S con colonias de crecimiento “rápido” y “lento”, respectivamente. En cambio, Pavlik *et al.* (1999), no encontraron relación alguna entre el tipo de RFLP y la tasa de crecimiento. Un grupo intermediario denominado I (“intermediate”) ha sido identificado en ovinos. Este grupo demostró asemejarse más al tipo S que al C.^{31,37,134}

Por otro lado, cepas del tipo ovino han sido ocasionalmente obtenidas a partir de cabras y bovinos. Asimismo, las micobacterias de tipo bovino han sido aisladas a partir de ovejas. Estos resultados muestran que ambos grupos de Map prefieren ciertas especies animales sin estar forzosamente restringidos por la especie del huésped.^{31,47,124,132,135}

Los grupos identificados e ingresados por Pavlik *et al.* (1999) a la base de datos disponible en Internet incluyen a los 18 grupos (A a R) obtenidos con la digestión de *Pst*I. La digestión con *Bst*EII ha generado tres grandes grupos C (1 a 32), S (1 a 3) e I (1 y 2).

C. Diferencias geográficas

Variantes de las cepas del grupo de bovinos (C) son responsables de una gran cantidad de casos de enfermedad de Johne a través del mundo.³¹ El tipo de RFLP C17 es el más comúnmente observado en bovinos de Argentina al igual que en Inglaterra, mientras que en Europa este tipo representa una minoría. La similitud entre los patrones de Inglaterra y Argentina es probablemente debida a las importaciones de ganado infectado desde Inglaterra durante el siglo 19. En cambio el tipo más común en otros países de Europa (C1) no se presentó en Argentina. Otros tres tipos observados en Argentina no concordaron con los tipos reportados en Europa.^{61,81}

En México, Chávez-Gris *et al.* (2004) realizaron un estudio polimórfico de cultivos de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* de caprinos del centro de México, empleando la IS900 y la endonucleasa de restricción *Bst*EII. Los resultados demostraron que el tipo de RFLP de Map de los caprinos de ese rebaño correspondía al C1. Con esta misma técnica, de 20 aislamientos provenientes de Estados Unidos, 15 correspondieron al tipo C1.⁹⁰

En Australia, el tipo más comúnmente reportado en bovinos es el C3, seguido por el tipo C1. Se establecieron importantes diferencias geográficas y de tipo de explotación puesto que el tipo C1 predominante en ganado de Victoria no se presentó en el ganado de Nueva Gales del Sur. En cambio, el tipo C3 no se presentó en ganado de carne de Victoria a pesar de ser el tipo más común en Nueva Gales del Sur.¹³⁴

En un estudio de Bauerfeind *et al.* (1996) empleando *PvuII* como enzima de restricción se encontró una correlación en ovinos entre el tipo de RFLP y un rebaño en particular o área geográfica de origen. Los dos tipos de aislamientos provenientes de dos rebaños de Marruecos fueron muy similares, observando en un patrón dos bandas más. En cambio, en el patrón de bandas del aislamiento proveniente de África del Sur se detectaron 3 bandas más así como la ausencia de una banda. Inclusive, todos los aislamientos de ovinos provenientes de un mismo rebaño, o de ovinos en contacto con ese rebaño presentaron el mismo patrón de RFLP. En cambio, los patrones de RFLP en rebaños sin contacto entre sí presentaron 2 o 3 bandas más y sugieren fuentes de infección diferentes.

D. Utilidad del estudio

La caracterización de dos grupos distintos de cepas de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, así como su distribución en diferentes huéspedes podría tener una importancia considerable en la medicina veterinaria, principalmente en regiones como Holanda, Nueva Zelanda, Australia y México en donde diferentes especies comparten las mismas praderas. El hecho que las cabras puedan ser infectadas por cualquiera de los dos grupos de cepas y que ocasionalmente los ovinos puedan ser infectados por el grupo C son factores que complican el establecimiento de estrategias de control de la enfermedad.^{31,83,135}

Una ventaja de la técnica de RFLP es que permite detectar la heterogeneidad de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. Estos estudios ofrecen la posibilidad de hacer un seguimiento de la fuente de infección y de la transmisión de Map entre varios individuos de un mismo hato, entre hatos así como entre diferentes especies animales.^{81,89,135} La detección de un mismo tipo de RFLP en un rebaño sugiere la infección por una sola cepa de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. Posiblemente la cepa haya sido introducida al rebaño por una sola fuente y posteriormente transmitida a las sucesivas generaciones.¹⁵ En cambio, la presencia de

patrones diferentes dentro de un mismo hato o rebaño sugiere la introducción de Map mediante animales adquiridos de otros rebaños, por animales salvajes o bien por factores ambientales como agua y alimento.⁸¹

La elucidación de posibles relaciones entre los tipos de RFLP con propiedades antigénicas, biológicas y bioquímicas podría incrementar la eficiencia de medidas preventivas y profilácticas en hatos infectados con paratuberculosis.⁸⁹

Objetivos

1. General

Analizar mediante RFLP el grado de heterogeneidad de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* obtenidos de intestinos de ovinos y caprinos de diferentes zonas geográficas de México.

2. Específicos

Estandarizar la concentración de las micobacterias a partir de las muestras de intestinos con lesiones granulomatosas de tipo multibacilar.

Extraer ADN de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* a partir del concentrado de micobacterias.

Establecer diferencias en los tipos de RFLP de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* procedentes de intestinos de caprinos y ovinos.

Establecer diferencias en los tipos de RFLP de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* procedentes de intestinos de caprinos y ovinos por zonas geográficas.

Material y Métodos

1. Origen de las muestras

Las muestras incluidas en este estudio fueron seleccionados de 19 localidades de 9 estados del país. Se incluyeron muestras de 24 rebaños diferentes de Jalisco, Michoacán, San Luis Potosí, Guanajuato, Querétaro, Distrito Federal, Estado de México, Tlaxcala y Veracruz.

2. Estudio serológico

A. Obtención de muestras de suero

Los sueros de 1043 animales (119 caprinos y 924 ovinos) fueron incluidos en este estudio. Para el estudio serológico de los animales seleccionados de los estados de San Luis Potosí, Guanajuato, Querétaro y Tlaxcala, se obtuvo una muestra de sangre mediante venopunción yugular empleando tubos estériles al vacío sin anticoagulante. Los sueros de los estados de Jalisco, Michoacán, Distrito Federal, Estado de México y Veracruz fueron remitidos al laboratorio por Médicos Veterinarios Zootecnistas interesados en el diagnóstico de la paratuberculosis en los rebaños. El suero de 318 caprinos y ovinos se separó y se realizó la prueba de IDGA. En los casos en que se permitió el muestreo de la totalidad de los animales, la prueba de ELISA fue utilizada para el diagnóstico del rebaño. En total se probaron 725 sueros de caprinos y ovinos con ELISA. Para las dos pruebas se utilizaron las técnicas descritas por Chávez (1993).

B. Inmuno Difusión en Gel de Agar

La preparación del gel de agarosa se llevó a cabo mediante el procedimiento descrito en el Anexo 1. Se perforaron las placas de Petri mediante un sacabocados que forma 6 rosetas con 6 pocillos periféricos y uno central de 3 mm de diámetro cada uno. En el pocillo central se depositaron 30 μ l de una solución de antígeno protoplásmico de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* PPA-3 (Allied, Mo, USA) a una concentración de 4 mg/ml en agua destilada. En los pocillos superior e inferior se agregaron los sueros controles positivo (30 μ l), mientras que

en los cuatro pocillos restantes se depositaron 30 μ l de los sueros problema. Las placas se mantuvieron en cámara húmeda y a temperatura ambiente (T.A.) hasta su lectura a las 48 h. Los resultados se consideraron positivos cuando se observó la aparición de una banda de identidad total entre el antígeno y el suero problema, que se continuaba con la del control positivo.

C. Inmuno Ensayo Enzimático

Los reactivos empleados en la realización de la técnica de ELISA se describen en el Anexo 2. Previamente a la realización de esta técnica se llevó a cabo la fijación del antígeno a los pocillos de la placa, depositando 100 μ l del antígeno protoplásmico de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* PPA-3 (Allied,Mo,USA) a una concentración de 0.04 mg/ml en buffer carbonato por cada pocillo. La placa se mantuvo a una temperatura de 4°C durante toda la noche. Los sueros problemas fueron adsorbidos con una suspensión de *Mycobacterium phlei* (Allied,Mo,USA) a la proporción de 1:1 y de igual forma fueron mantenidos a 4°C durante toda la noche.

Después de lavar las placas con PBS-TG, se depositaron 100 μ l del suero problema adsorbido en los pocillos con una dilución 1:100 de PBS-TG. En cada una de las placas se colocaron un suero control positivo y negativo, igualmente adsorbidos con *M. phlei*. Las placas se dejaron incubar en cámara húmeda a T.A. durante 2 h. Después de un lavado con PBS-TG tres veces, se agregó a cada uno de los pocillos 100 μ l de suero de conejo anti-IgG de cabra marcado con peroxidasa de rábano (Sigma,Mo,USA) a una dilución de 1:4500. Las placas fueron incubadas durante 2 h en cámara húmeda a T.A.. Al final de este periodo, las placas se lavaron 3 veces con PBS-TG y se añadió a cada pocillo 100 μ l del sustrato ABTS (Sigma,Mo,USA). Finalmente, después de una incubación de 15 a 20 min en oscuridad y agitación constante, se procedió inmediatamente a la lectura de las placas a través de un espectrofotómetro de 8 canales empleando un filtro de 450 nm (Elx 800, Bio-tek Instruments).

Para obtener los resultados se dividió el valor de la densidad óptica del suero sospechoso entre la densidad óptica del testigo positivo de cada placa. Se consideraron como positivos aquellos sueros cuyo cociente fue mayor a 800.

3. Estudio anatomopatológico

En el estudio anatomopatológico fueron incluidos 51 animales. Se realizó la necropsia de 44 animales que presentaron signos clínicos característicos de paratuberculosis y con resultados serológicos positivos. Los animales fueron sacrificados mediante una sobredosis de pentobarbital sódico (Pfizer, Edo Mex, Mex) por vía endovenosa o bien con pistola de émbolo oculto y desangrado inmediato por vena yugular. Durante la necropsia se tuvo especial cuidado en la revisión del intestino delgado. En el caso de 7 ovinos con sospecha de paratuberculosis, porciones de intestino delgado y linfonodos, fueron remitidos del estado de Querétaro por Médicos Veterinarios Zootecnistas.

Para la toma de muestras para el estudio histopatológico, se consideraron las porciones de intestino delgado con lesiones características de paratuberculosis así como secciones de la válvula ileocecal y linfonodos mesentéricos. Las muestras obtenidas se colocaron en frascos con formalina amortiguada al 10% durante 24 h, se incluyeron en parafina y se cortaron a 4 μ m de espesor. Posteriormente, se tiñeron con hematoxilina y eosina (H-E) así como con la tinción de ZN.

Con el fin de obtener abundantes micobacterias a partir del tejido intestinal, se seleccionaron las muestras de 22 animales que presentaron las lesiones de tipo multibacilar. Debido a la abundancia de BAAR en cada campo, no fue posible cuantificar de manera exacta las micobacterias presentes en los cortes histológicos de tejido intestinal teñidos con ZN. Sin embargo, se revisaron las laminillas en diversos campos y se clasificaron estas 22 muestras en tres categorías de acuerdo a la abundancia y distribución de los BAAR.

- Grupo 1: BAAR a nivel de la lámina propia en forma difusa.
- Grupo 2: BAAR en puntas y parte media de vellosidades en forma focal.
- Grupo 3: BAAR en puntas en forma dispersa.

De los 51 animales sacrificados se tomaron muestras de las porciones de intestino delgado con las lesiones más aparentes. Estas secciones fueron lavadas con agua y mantenidas a -20°C hasta su procesamiento para la concentración y cultivo de las micobacterias.

4. Concentración de las micobacterias

A partir de las muestras de tejido intestinal congelados de los 22 animales con lesiones de tipo multibacilar, se siguió el protocolo de concentración de micobacterias propuesto por Ratnamohan TN y Spencer TL (1986). El objetivo de esta técnica es obtener un concentrado de micobacterias, libre de detritus celulares. La finalidad de este estudio es, a partir de este concentrado de micobacterias, extraer ADN de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* en cantidad y calidad adecuadas para realizar el RFLP, sin depender del largo tiempo de cultivo de esta bacteria. De acuerdo con Pavlik *et al.* (1999), se requieren al menos 4.5 µg de ADN de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* para realizar estudios de RFLP.

Se descongelaron las muestras de intestino seleccionadas durante la necropsia y mantenidas a -20°C. Se abrió el intestino (porciones de 75 cm² aproximadamente) y enjuagó con agua. Enseguida cada porción de intestino fue lavada con una solución de ampicilina (Pisa,Hgo,Mex) a una concentración de 200 mg/ml en agua destilada. Se raspó la mucosa intestinal empleando una hoja de bisturí estéril y se homogenizó manualmente la mucosa intestinal raspada empleando un Ten Broeck. Se prepararon 150 ml de una solución de tripsina 0.5% (Gibco,Md,USA) en PBS (Anexo 1), ajustando el pH entre 7.5 y 8. La mucosa intestinal homogeneizada fue incubada 30 min a T.A. en la solución de tripsina. Se vertió la solución en 4 tubos tipo Falcon de 50 ml y se centrifugó a 3220 x g durante 20 min a T.A. El sobrenadante fue desechado y el sedimento transferido a un matraz con una solución de lisozima (ICN Biomedicals INC.,Ohio,USA) (20 mg/100 ml de PBS). La solución fue mantenida en agitación suave durante 1 h. Se centrifugó durante 20 min a 3220 x g y se desechó el sobrenadante. El sedimento fue resuspendido en 10 ml de agua destilada y la mezcla transferida a dos tubos tipo Falcon de 15 ml. Nuevamente se centrifugó a 3220 x g durante 20 min a T.A. La presencia de las micobacterias fue comprobada realizando un frotis para la observación de BAAR a través de la técnica de ZN. El concentrado de micobacterias obtenido fue mantenido a -20°C hasta su procesamiento para la extracción de ADN.

Se estandarizó esta técnica de concentración para obtener un concentrado de micobacterias libre de restos de tejidos y optimizar la calidad y la cantidad de ADN obtenido con la extracción. En un primer paso se determinó la cantidad de mucosa intestinal homogeneizada a incluir en la digestión enzimática con tripsina y lisozima. La técnica de

concentración fue probada incluyendo 2, 4, 8, 16 y 32 g de la mucosa intestinal previamente homogeneizada mediante Ten Broeck, en la solución de tripsina. Se procedió a extraer el ADN de cada uno de estos concentrados de micobacterias y se evaluó el resultado como se indica a continuación (ver punto 5). Una muestra con abundantes micobacterias y de la cual se disponía de una gran porción de intestino con lesiones características de Map fue empleada para este primer paso.

De acuerdo a los resultados obtenidos con esta primera muestra, se decidió procesar las muestras congeladas de la totalidad de los animales con lesiones de tipo multibacilar (22) agregando 8 g de mucosa intestinal homogeneizada a la solución de tripsina.

Se intentó la cuantificación, mediante diluciones, de los BAAR obtenidos en los concentrados. Sin embargo, no se obtuvieron resultados satisfactorios debido a la formación de agregados de micobacterias. La abundancia de micobacterias obtenidas en el concentrado final así como la presencia de tejido remanente fueron estimadas y se clasificaron las 22 muestras en tres categorías.

- Grupo 1: Abundantes BAAR distribuidos de manera difusa en todo el campo.
- Grupo 2: BAAR en grupos, presencia de detritus celulares.
- Grupo 3: Gran cantidad de detritus, no se aprecian claramente los BAAR.

5. Extracción de ADN genómico

La técnica de extracción de ADN de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* a partir del concentrado de micobacterias obtenido de las muestras de intestino, se basó en la técnica propuesta por Pavlik *et al.* (1999) para la extracción de ADN de Map a partir de cultivo. Las soluciones empleadas en este procedimiento se encuentran detalladas en el Anexo 3.

Antes de iniciar la extracción de ADN, 250 µl del concentrado de micobacterias obtenido fue lavado dos veces con el fin de eliminar los restos de tejido y de disgregar las micobacterias. Con este fin, se agregó 1 ml de PBS/Tween 80 (0.5g/l) al concentrado, se agitó con vortex al menos 1 min, teniendo cuidado de despegar las micobacterias adheridas al fondo del vial. Los viales fueron centrifugados 2 min a 12 000 x g y el sobrenadante desechado.

Se inició la extracción de ADN agregando a las micobacterias 400 µl de TE /Tween 20 y homogeneizando la solución mediante vortex. La solución fue calentada 20 min a 80°C para inactivar las bacterias. El vial fue mantenido a T.A. para enfriarlo. Se agregaron 50 µl de lisozima (100 mg/ml), se homogeneizó por medio de vortex e incubó toda la noche a 37°C, en agitación constante.

Con el fin de despegar las micobacterias adheridas a las paredes, los viales fueron homogeneizados mediante vortex. Se agregaron 75 µl de SDS al 10% y 20 µl de proteinasa K (20 mg/ml). Se agitaron brevemente con vortex las muestras e incubaron 20 min a 65°C, agitando los viales en el baño María aproximadamente cada 5 min. Se añadieron 100 µl de NaCl 5 M y agitaron brevemente. A cada vial fueron adicionados 100 µl de una solución de CTAB/NaCl precalentada 5 min a 65°C. Por medio de vortex cada muestra fue homogeneizada hasta observar en la solución un color blanquesino. Se incubó 15 min a 65°C y se dejó enfriar los viales a T.A. unos segundos. Se agregaron 800 µl de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1) y se agitaron los viales con vortex al menos durante 20 seg. Las muestras fueron centrifugadas a T.A. durante 15 min a 12 000 x g. Todo el sobrenadante líquido fue transferido a otro vial nuevo y estéril. El ADN fue extraído nuevamente añadiendo al sobrenadante 800 µl de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1). Nuevamente el sobrenadante líquido fue transferido a otro vial nuevo y estéril y se agregó cuidadosamente isopropanol frío en una proporción de 1:0.7 para precipitar el ácido nucleico. La solución fue mezclada invirtiendo los tubos cuidadosamente. El ADN fue incubado 2 h a -20°C. Los viales fueron centrifugados 20 min a T.A. en una microcentrifuga a 12 000 x g. Se observó el tamaño del precipitado y se estimó la cantidad de TE en el cual debería ser disuelto el ADN de acuerdo a las recomendaciones del protocolo de Pavlik *et al.* (1999). El sobrenadante fue eliminado y el ADN lavado con 1 ml de etanol al 70% frío. Se centrifugó 5 min a 12 000 x g a T.A. y se descartó el sobrenadante. El ADN fue mantenido a T.A. hasta eliminar cualquier remanente de etanol. Finalmente, se disolvió el ADN en la cantidad de TE estimada y se incubó 1 h a 65°C. La calidad y cantidad del ADN de cada una de las 22 muestras fue evaluada mediante electroforesis de 2 µl de ADN en un gel de agarosa (Gibco, NY, USA) al 0.8%, teñido con bromuro de etidio (Gibco, Fountain Drive, USA). Tras la visualización del ADN en la lámpara de luz ultravioleta, se clasificaron en tres categorías las 22 muestras de acuerdo a la intensidad de la banda de ADN.

- Grupo 1: Banda de ADN marcada.
- Grupo 2: Banda de ADN tenue.
- Grupo 3: No se observa banda de ADN.

La cantidad en microgramos de ADN se estimó con base en la cuantificación en gel y se seleccionaron las 12 muestras que mostraron una calidad y cantidad (4.5 µg) adecuadas de ADN en gel para la realización del RFLP. El ADN fue almacenado a 4°C hasta su utilización.

6. Reacción en Cadena de la Polimerasa

A partir del ADN obtenido de las 12 muestras, se realizó la detección del genoma de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* mediante la PCR. Se empleó y efectuó por la autora el sistema de PCR múltiple para diferenciación de especies de *Mycobacterium avium* desarrollado por Milan Bartos, en el laboratorio del Veterinary Research Institute de la República Checa. Con este ensayo se detectan los genes: *dnaJ*, IS900, IS1245 e IS901. En el Cuadro 1 se indica el resultado esperado mediante el uso de este sistema para cada una de las micobacterias del complejo *M. avium*.

Cuadro 1. Resultados esperados de la PCR múltiple.

Subespecies	<i>dnaJ</i>	IS900	IS1245	IS901
<i>paratuberculosis</i>	+	+	-	-
<i>avium</i>	+	-	+	+
" <i>hominissuis</i> "	+	-	+	-
<i>silvaticum</i>	+	-	+	+

Los iniciadores específicos correspondientes a cada secuencia son los siguientes:

dnaJ:

MultidnaJf: 5'- GAC TTC TAC AAG GAG CTG GG -3'

MultidnaJr: 5'- GAG ACC GCC TTG AAT CGT TC -3'

Tamaño del producto esperado: 140 pb.

IS900:

Multi900f: 5'- TGG TTG CTG TGT TGG ATG GC -3'

Multi900r: 5'- ACC ATG CAG TAA TGG TCG GC -3'

Tamaño del producto esperado: 215 pb.

IS1245:

Multi1245f: 5'- GAG TTG ACC GCG TTC ATC G -3'

Multi1245r: 5'- CGT CGA GGA AGA CAT ACG G -3'

Tamaño del producto esperado: 385 pb.

IS901:

Multi901f: 5'- GGA TTG CTA ACC ACG TGG TG -3'

Multi901r: 5'- GCG AGT TGC TTG ATG AGC G -3'

Tamaño del producto esperado: 577 pb.

Para la reacción de la PCR (40 µl) fueron incluidos: 4 µl de buffer PCR 1x (Finnzymes,Finlandia), 2.5 mM MgCl (Finnzymes,Finlandia), 187.5 µM de cada deoxinucleótido dATP, dTTP, dCTP y dGTP (Invitex,Alemania), 20 pmol de los iniciadores de *dnaJ*, 10 pmol de los iniciadores de IS900, IS1245, IS901, 2U de Taq polimerasa (Finnzymes,Finlandia), y 4 µl de ADN de cada muestra. La reacción de amplificación se inició con una desnaturalización a 96°C por 2 min, seguido por 35 ciclos que consistieron en una desnaturalización a 96°C por 10 seg, alineamiento a 58°C por 10 seg y una extensión a 72°C por 1 min. En el último paso para la extensión final se utilizó una temperatura de 72°C durante 2 min (PTC 200 thermocycler, MJ Research, USA). Como control positivo se amplificaron los fragmentos *dnaJ*, IS900, IS1245 e IS901 insertados en el vector pCR2.1 (Invitrogen). Para el análisis de los productos amplificados se utilizaron 10 µl del producto amplificado para la electroforesis en gel de agarosa (Amresco,USA) al 2%, teñido con bromuro de etidio (Amresco,USA) y visualizados en una lámpara de luz ultravioleta (Spectronics corporation,USA). El marcador de peso molecular empleado fue 100 bp (New England Biolabs).

7. Polimorfismo en la Longitud de los Fragmentos de Restricción

Se siguió el método estandarizado de RFLP de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* propuesto por Pavlik *et al.* (1999). Esta técnica de detección de polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción consta de varias etapas: digestión del ADN genómico con las endonucleasas de restricción *BstEII* y *PstI*, separación de fragmentos de ADN mediante electroforesis, transferencia del ADN a medio sólido (*Southern blotting*), preparación y marcaje de sondas para la hibridación y finalmente hibridación y detección. Cada una de estas etapas fue realizada por la autora en el laboratorio del Veterinary Research Institute de la República Checa y se describe detalladamente a continuación. Las soluciones empleadas para la realización del RFLP se encuentran detalladas en el Anexo 4.

A. Digestión del ADN genómico mediante *BstEII* y *PstI*

En cada reacción de digestión con las enzimas de restricción se incluyeron para un volumen final de 20 µl: agua, 2 µl de buffer de digestión (10X), 1 µl de enzima de restricción (10U/µl) y 4.5 µg de ADN de cada una de las 12 muestras seleccionadas. En las muestras con menor concentración de ADN por ml se realizó la digestión por duplicado, obteniendo así 40 µl de ADN digerido por muestra. Cada vial con la reacción se centrifugó brevemente y se incubó toda la noche. Las muestras a digerir con *BstEII* se incubaron a 65°C, mientras que con *PstI* la temperatura de incubación fue de 37°C. Con el fin de observar el resultado de la digestión, se agregaron a cada vial 5 µl de buffer de carga y en un gel de agarosa en TBE al 0.8% teñido con bromuro de etidio, se visualizaron 5 µl de la mezcla.

B. Separación de fragmentos de ADN mediante electroforesis

Se prepararon 180 ml de agarosa (Amresco,USA) al 0.8% para un gel de 15 x 25 cm. El gel fue preparado con TBE, sin añadir bromuro de etidio y fue incubado a T.A. al menos 1.5 h asegurándose de su completa solidificación. Después de colocar el gel en la cámara de electroforesis se añadió el buffer TBE hasta cubrirlo totalmente. En los carriles de los extremos se depositaron los marcadores de peso molecular: ADN del fago lambda digerido

con *Hind*III (λ /*Hind*III) y 1 kb (New England Biolabs) para los fragmentos obtenidos con *Bst*EII y *Pst*I, respectivamente. En los carriles centrales se depositaron la totalidad del ADN digerido de cada muestra. La electroforesis fue realizada siguiendo las mismas condiciones para las dos enzimas: 10 min a 100V, seguido de 16 h a 55V.

C. Transferencia del ADN a medio sólido (*Southern blotting*)

Al finalizar la electroforesis, el gel fue depositado en una bandeja con 500 ml de agua destilada para su lavado. El agua fue eliminada y se incubó el gel en 500 ml de HCl 0.25M por 10 min en agitación constante. Nuevamente se enjuagó el gel con agua destilada durante 1 min en agitación. Finalmente, el gel fue mantenido 20 min en agitación constante en 500 ml de una solución de NaOH 0.4M. La cámara de vacío (modelo 785, Bio-Rad) se preparó colocando en el centro dos hojas de papel filtro de 20 x 25 cm previamente sumergidas en SSC10 X. Encima y en el centro de estas dos hojas se colocó la membrana Hybond-N (Amersham) de Nylon de 15 x 25 cm. Después de poner la cinta de plástico y teniendo cuidado de cubrir los bordes de la membrana, se colocó cuidadosamente el gel encima de la membrana y la cinta de plástico. El gel fue cubierto con SSC 10 X, la tapa fue colocada y la cámara encendida. La transferencia se realizó durante 90 min a una presión de 5mmHg. Una vez transferido el ADN a la membrana de Nylon, se depositó la membrana de Nylon sobre un papel hasta su secado completo. Finalmente, la membrana fue fijada exponiendo durante 4 min ambos lados de la membrana a la luz ultravioleta de la lámpara, previamente limpiada. De esta forma la membrana puede ser almacenada en un sobre de plástico.

D. Preparación de la sonda

Para la preparación de la sonda se amplificaron dos fragmentos de la *IS900* insertados en el vector pCR2.1 (Invitrogen), facilitados por el laboratorio del Veterinary Research Institute de la República Checa. Para la amplificación de los fragmentos MORFEUS 1 y MORFEUS 2 se emplearon los siguientes iniciadores:

MORFEUS 1:

IS900 1/2F: 5'- GAA GGG TGT TCG GGG CCG TCG CTT AGG -3'

IS900 1/2R: 5'- GGC GTT GAG GTC GAT CGC CCA CGT GAC -3'

Tamaño del producto esperado: 412 pb.

MORFEUS 2:

IS900 2/2F: 5'- GAT GAT CGA GGA GCG ATT TC -3'

IS900 2/2R: 5'- TTT TCG GTC GTA GTA GGT GC -3'

Tamaño del producto esperado: 303 pb.

En el Anexo 5 se detalla la secuencia de nucleótidos de la IS900 así como la posición de los iniciadores empleados para la amplificación de los dos fragmentos utilizados. Para un volumen final de 40 μ l, las condiciones de amplificación para cada fragmento fueron las siguientes: 20 μ l de Master Mix (Qiagen), 15.8 μ l de agua, 0.1 μ l de cada iniciador (100 μ M) y 4 μ l de plásmido. El programa de amplificación se realizó en un termociclador PTC 200 (MJ Research, USA) y consistió en un ciclo de 94°C por 3 min, seguido de 33 ciclos a 94°C por 1 min, 55°C por 45 seg, 72°C por 2 min y una extensión final a 72°C por 5 min. Finalmente, la muestra se mantuvo a 4°C. Para el análisis de los productos amplificados se utilizaron 5 μ l de la reacción de amplificación para la electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, teñido con bromuro de etidio.

Los fragmentos de tamaño esperado fueron purificados a partir de la reacción de amplificación mediante el estuche comercial *QIAquick PCR Purification* (Qiagen). En un vial se adicionaron 5 volúmenes del buffer PE a un volumen de la muestra de PCR y se mezcló. Una columna *QIAquick* fue introducida en el tubo colector de 2 ml y la mezcla de ADN y buffer PE fueron añadidos a la columna. Para unir el ADN a la membrana de la columna se centrifugó durante 30-60 seg. El remanente del tubo colector fue eliminado. Se añadieron a la columna 0.75 ml de buffer PE, se centrifugó durante 1 min la columna y se eliminó el remanente. Esta centrifugación fue repetida hasta obtener un tubo colector totalmente seco. La columna fue introducida en un vial nuevo y estéril de 1.5 ml. Para recuperar el ADN purificado, se agregaron 50 μ l de buffer EB a la columna y se centrifugó durante 1 min. Los fragmentos esperados de la IS900 ya purificados fueron empleados como sonda para la hibridación.

E. Marcaje de la sonda para hibridación

Para el marcaje de la sonda así como para la hibridación y detección de la membrana se empleó el estuche comercial ECL (*direct nucleic acid labelling and detection system*, Amersham). En un vial se agregaron 20 μ l del fragmento MORFEUS 1 y 1 μ l del marcador de peso molecular. Este marcador fue el mismo que el empleado en el gel, el cual fue posteriormente transferido a la membrana. De igual forma 20 μ l de MORFEUS 2 fueron adicionados a un vial. Con la finalidad de desnaturalizar el ADN, estos dos viales fueron incubados en termoblock a 100°C durante 5 min e inmediatamente enfriados en hielo durante 5 min. Se centrifugaron brevemente los viales. A cada vial se añadieron primero 20 μ l del reactivo de marcaje del estuche comercial ECL (peroxidasa de rábano), seguido de 20 μ l de glutaraldehido. En ambos casos se mezcló la solución con la sonda con la pipeta. Los dos viales se centrifugaron nuevamente e incubaron 10 min a 37°C. La sonda preparada para el marcaje fue empleada inmediatamente para la hibridación de la membrana.

F. Hibridación de la membrana

La membrana de interés fue introducida en un tubo de hibridación y se añadieron al tubo 20 ml de buffer de hibridación incluido en el estuche comercial ECL. Para la prehibridación de la membrana, el tubo fue colocado en el horno de hibridación (Robbins Scientific Corporation, USA) a 42°C, 6 rpm de 15 min a 1 h. Una vez preparado el marcaje de la sonda, el buffer de hibridación fue vertido a su frasco original y en ese mismo frasco se añadió mediante una pipeta la sonda marcada incluida en los dos viales. La sonda fue mezclada manualmente y la solución introducida nuevamente dentro del tubo con la membrana. Se incubó la membrana dentro del horno de hibridación durante toda la noche a 42°C, 6 rpm. Una vez concluido este lapso de tiempo se desecharon el buffer de hibridación así como la sonda incluidos en el tubo y la temperatura del horno fue ajustada a 55°C. Para el lavado de la membrana se vertió en el tubo una solución de SDS 0.1/SSC 1 X precalentada a 55°C y se incubó en el horno de hibridación durante 10 min. Se desechó la solución y repitió el lavado con estos mismos tiempo, temperatura y solución amortiguadora. Otro lavado de la membrana fue realizado en 500 ml de SSC 2 X vertidos en una bandeja. Esta fue mantenida en agitación

constante a T.A. durante 5 min. Este lavado se repitió una vez más, quedando así la membrana lista para la detección y revelado de las bandas.

G. Detección de las bandas de la membrana y revelado

En una bandeja del tamaño de la membrana se mezclaron 20 ml de cada uno de los dos reactivos de detección del estuche comercial ECL. En esta solución fue sumergida la membrana y mantenida en agitación constante durante 1 min. Se eliminó el exceso de solución y se cubrió la membrana con una protección de plástico. La membrana fue introducida en el casete radiográfico (Amersham). Las burbujas y el exceso de solución fueron eliminados con un papel absorbente. Dentro de un cuarto oscuro, se colocó un papel fotográfico (Hyperfilm de Amersham) encima de la membrana con su protección de plástico y se cerró el casete. El papel y la membrana fueron mantenidos en contacto en el casete durante 4 min. Después de este lapso, se sacó el papel fotográfico e introdujo otro en el casete para obtener una segunda imagen. Aun dentro del cuarto oscuro se inició el revelado del papel fotográfico sumergiéndolo en la solución de revelado (Fomadon,Rep.Checa). Una vez que se observaron las bandas de manera satisfactoria, se enjuagó el hyperfilm con agua durante 1 min. Finalmente, se fijó la imagen sumergiendo el hyperfilm en la solución fijadora (Fomadon,Rep.Checa) durante 1 min. La imagen pudo ser evaluada detenidamente después de lavar con abundante agua el hyperfilm y dejarlo secar.

Los patrones de las bandas de las 12 muestras fueron comparados con las imágenes de los diferentes patrones de RFLP previamente reportados y almacenados en la base de datos del Veterinary Research Institute de la República Checa. Los tipos de RFLP de las muestras, que correspondieron a estos patrones previamente reportados (Pavlik *et. al.*, 1999), fueron designados de la misma manera.

8. Aislamiento bacteriológico

El medio de cultivo que se empleó es el de Löwenstein-Jensen (Difco,Detroit,USA) con y sin micobactina J (Allied,Mo,USA). La preparación y siembra de los medios se realizó siguiendo las recomendaciones de Adúriz JJ (1993).

El medio de cultivo de Löwenstein-Jensen fue preparado disolviendo 12 ml de glicerina (Sigma,Mo,USA) en 600 ml de agua destilada. Se añadieron a la solución 37.2 g de medio base LJ y se calentó en agitación constante hasta su ebullición. El medio fue esterilizado en autoclave a 121°C durante 15 min y se dejó enfriar. Aproximadamente 23 huevos fueron lavados y sumergidos en etanol al 70% durante 1 h para desinfectar el cascarón. En atmósfera estéril se adicionaron la vancomicina (Sigma,Mo,USA) (8 µg/ml) y el cloranfenicol (Labs Sophia,Jal,Mex) (0.1 g/l) así como 2 mg/l de micobactina J disueltos en 4 ml de etanol. Con unas tijeras se rompió el cascarón de los huevos y se vertió su contenido en un vaso de licuadora. Un litro de huevo batido se filtró a través de un embudo con gasa y se añadió al medio. En tubos estériles con tapón de rosca fueron depositados 10 ml del medio. Se coaguló el medio a 80°C con el tapón sin cerrar herméticamente y el tubo en posición inclinada. Los tubos fueron incubados a 37°C durante una noche y después se cerraron herméticamente. Se conservaron en refrigeración (2-8°C) hasta su utilización.

El aislamiento de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* en medio de cultivo fue realizado a partir de los concentrados de micobacterias obtenidos del tejido intestinal de los 22 animales con lesiones de tipo multibacilar. Cada una de las muestras fue descontaminada agregando en un tubo tipo Falcon 2 g de mucosa intestinal homogeneizada mediante Ten Broeck a 45 ml de una solución de 7.6 g de cloruro de hexadecil piridinio (HPC) (Sigma,Mo,USA) por litro de agua destilada. Se homogeneizó la muestra mediante vortex y se dejó en reposo durante 15 min para permitir su sedimentación. Con una pipeta de transferencia estéril se tomaron aproximadamente 3 ml del sobrenadante, comenzando encima de la interfase y con un movimiento ascendente de la pipeta. Las pipetas fueron colocadas en posición vertical durante 24 h. En atmósfera estéril se sembraron tres tubos con micobactina J y un tubo sin micobactina. En un primer paso se depositaron en cada tubo una sola gota, seguido de tres gotas más por tubo con la finalidad de igualar la cantidad de micobacterias sembradas. Los tubos fueron incubados a 37°C. Después de una semana se cerraron herméticamente los tubos sembrados y se mantuvieron en incubación durante al menos 34 semanas.

Resultados

1. Origen de las muestras

Para este estudio se obtuvieron muestras de suero, secciones de intestino o ambos, de 1052 animales. Estos animales provenientes de 24 rebaños diferentes; se encuentran distribuidos en 19 localidades, de 9 estados del País. En el Cuadro 2 se detalla el origen geográfico, especie y tipo de muestra.

Cuadro 2. Origen y resultados serológicos y anatomopatológicos.

ESTADO	LOCALIDAD	ESPECIE	SEROLOGIA		ANATOMOPATOLOGÍA	
			Positivos /IDGA	Positivos /ELISA	Necropsias	Multi-bacilares
Jalisco	Lagos de Moreno	Ovino	-	27/142	-	-
Michoacán	Tepalcatepec	Caprino	-	1/20	-	-
	Mich	Caprino	0/16	-	-	-
San Luis Potosí	SLPA	Caprino	9/9	-	4	3
	SLPB	Ovino	3/9	-	6	1
	SLPC	Ovino	4/4	-	-	-
	Mexquitic [■]	Caprino	-	1/2	-	-
		Ovino	-	2/3	-	-
	Villa de Arriaga [■]	Caprino	-	1/1	-	-
		Ovino	-	5/8	-	-
Guanajuato	San José del Torreón	Ovino	16/197	-	5	4
	Celaya	Caprino	3/21	-	1	1
		Ovino	0/2	-	-	-
	Juan Martín	Caprino	0/18	-	-	-
	San José Iturbide	Ovino	-	-	1*	1
Querétaro	Santillán	Caprino	0/3	-	-	-
		Ovino	0/5	-	-	-
	Corregidora	Ovino	-	-	6*	2
Distrito Federal	Topilejo	Caprino	1/1	-	3**	2
		Ovino	4/5	-	5	2
Edo de Méx.	Chalco	Caprino	3/3	-	3	2
Tlaxcala	TlaxA	Caprino	5/13	-	-	-
	TlaxB	Caprino	1/12	-	-	-
Veracruz	Martínez de la Torre	Ovino	-	51/549	17	4
TOTAL	19		49/318	88/725	51	22

■ Sueros colectados en 2 rebaños diferentes

■ Sueros colectados en 5 rebaños diferentes

SLP: San Luis Potosí, Edo de Méx: Estado de México, Tlax: Tlaxcala

* Secciones de intestino enviadas al laboratorio

** No se obtuvo suero de dos cabras

2. Estudio serológico

De los 1043 sueros obtenidos, 137 fueron positivos (13.14 %) mediante IDGA o ELISA. En 119 sueros de caprinos, se detectaron anticuerpos contra *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* en 25 sueros (21.01%). De los 924 sueros de ovino obtenidos de las distintas regiones del país, 112 (12.12%) resultaron positivos a las pruebas empleadas. En el Cuadro 2 se detallan el origen de los sueros así como la prueba serológica empleada y el resultado. En la Figura 1 se resume el resultado serológico de acuerdo al origen geográfico y especie animal.

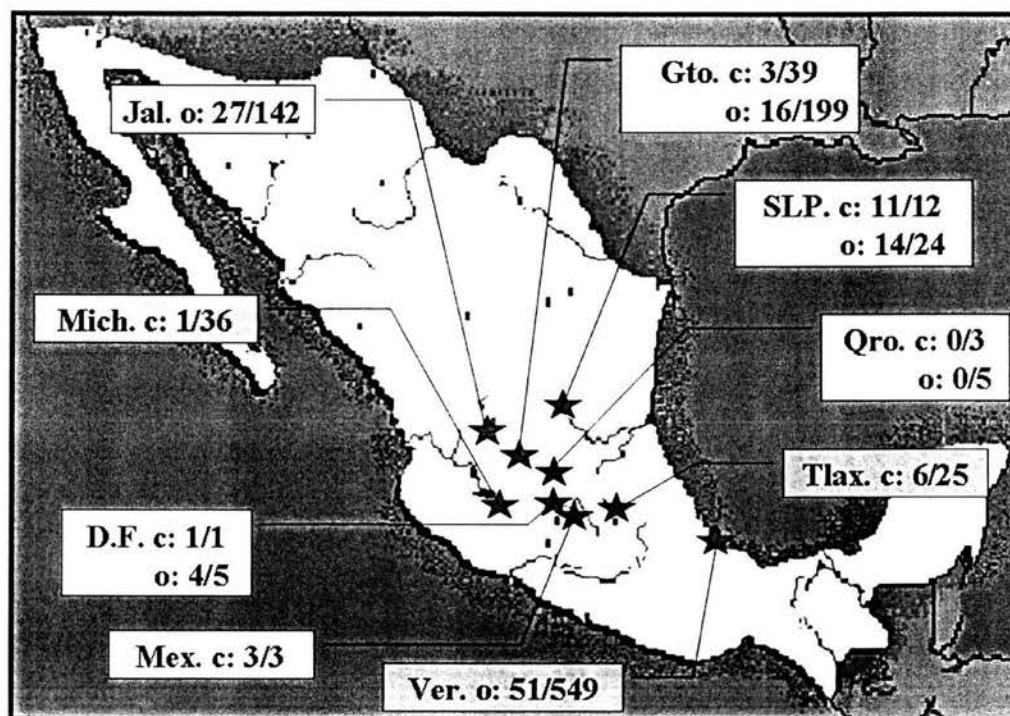


Fig. 1. Mapa de la República Mexicana que indica el origen geográfico y especie animal de los sueros de animales positivos a paratuberculosis mediante ELISA o IDGA en relación al número de animales muestreados. c: Caprino, o: Ovino, Positivos/Número de sueros. Jal.: Jalisco; Mich.: Michoacán; S.L.P.: San Luis Potosí; Gto.: Guanajuato; Qro.: Querétaro; D.F.: Distrito Federal; Mex.: Estado de México; Tlax.: Tlaxcala; Ver.: Veracruz.

3. Estudio anatomopatológico

A partir de 11 caprinos y 40 ovinos se obtuvieron secciones de intestino delgado y linfonodos mesentéricos. Estos animales procedentes de 6 estados del país presentaron signos clínicos característicos de paratuberculosis y resultados serológicos positivos. En todos los casos se observaron lesiones macroscópicas típicas de paratuberculosis, como son un

engrosamiento del intestino delgado y de la válvula ileocecal así como un aumento de tamaño de los linfonodos mesentéricos. En ningún caso se observó una coloración amarillenta de la mucosa intestinal.

En el estudio histopatológico de todos los casos se observaron lesiones típicas causadas por *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, es decir la presencia de granulomas, infiltrado linfocitario y linfangitis. Sin embargo, la severidad de las lesiones fueron muy variables entre los animales, teniendo 22 animales (43.14%) lesiones de tipo multibacilar y 29 animales lesiones paucibacilares (56.86%).

Para continuar el estudio se seleccionaron las muestras de 22 animales que presentaron las lesiones de tipo multibacilar. El **Cuadro 2** muestra el origen de los animales incluidos en el estudio anatomopatológico así como el origen de los animales con lesiones de tipo multibacilar. En estas secciones de intestino de 14 ovinos y 8 caprinos se observaron una abundante cantidad de BAAR en los cortes histológicos teñidos con ZN. Se clasificaron estas 22 muestras en tres categorías de acuerdo a la abundancia y distribución de los BAAR. En la **Figura 2(a)** se detallan los criterios de cada una de estas categorías.

4. Concentración de las micobacterias

En este estudio se estandarizó la técnica de concentración de micobacterias para la obtención de ADN de esta micobacteria a partir de intestino delgado de ovinos y caprinos. En un primer paso se concentraron las micobacterias a partir de 2, 4, 8, 16 y 32 g de mucosa intestinal homogeneizada. Al realizar la tinción de ZN de los concentrados de micobacterias de esta primera muestra se observaron abundantes BAAR distribuidos de manera difusa en todo el campo. El ADN extraído de estos concentrados de micobacterias fue evaluado y se determinó que el mejor resultado en cuanto a la cantidad y calidad de ADN se obtuvo al efectuar la extracción a partir de los concentrados de micobacterias, que corresponden a la adición de 8 y 16 g de mucosa intestinal al método de concentración.

Los resultados de la concentración de las micobacterias al añadir 8 g de mucosa intestinal homogeneizada fueron variables en las 22 muestras procesadas. En la **Figura 2(b)** se detallan los criterios de cada una de las tres categorías en que fueron clasificadas estas 22 muestras.

Al comparar la clasificación de las muestras de acuerdo a la abundancia y distribución de los BAAR en las secciones de intestino por un lado, y por otro, de acuerdo a la abundancia de micobacterias obtenidas en el concentrado final así como la presencia de tejido remanente fue posible establecer una relación entre la cantidad de micobacterias presentes en la mucosa intestinal y la cantidad de micobacterias obtenidas en el concentrado final. Es decir que, la concentración de micobacterias de las muestras con mayor cantidad de BAAR en las secciones de intestino (Grupo 1), resultó en abundantes BAAR distribuidos de manera difusa en todo el campo.

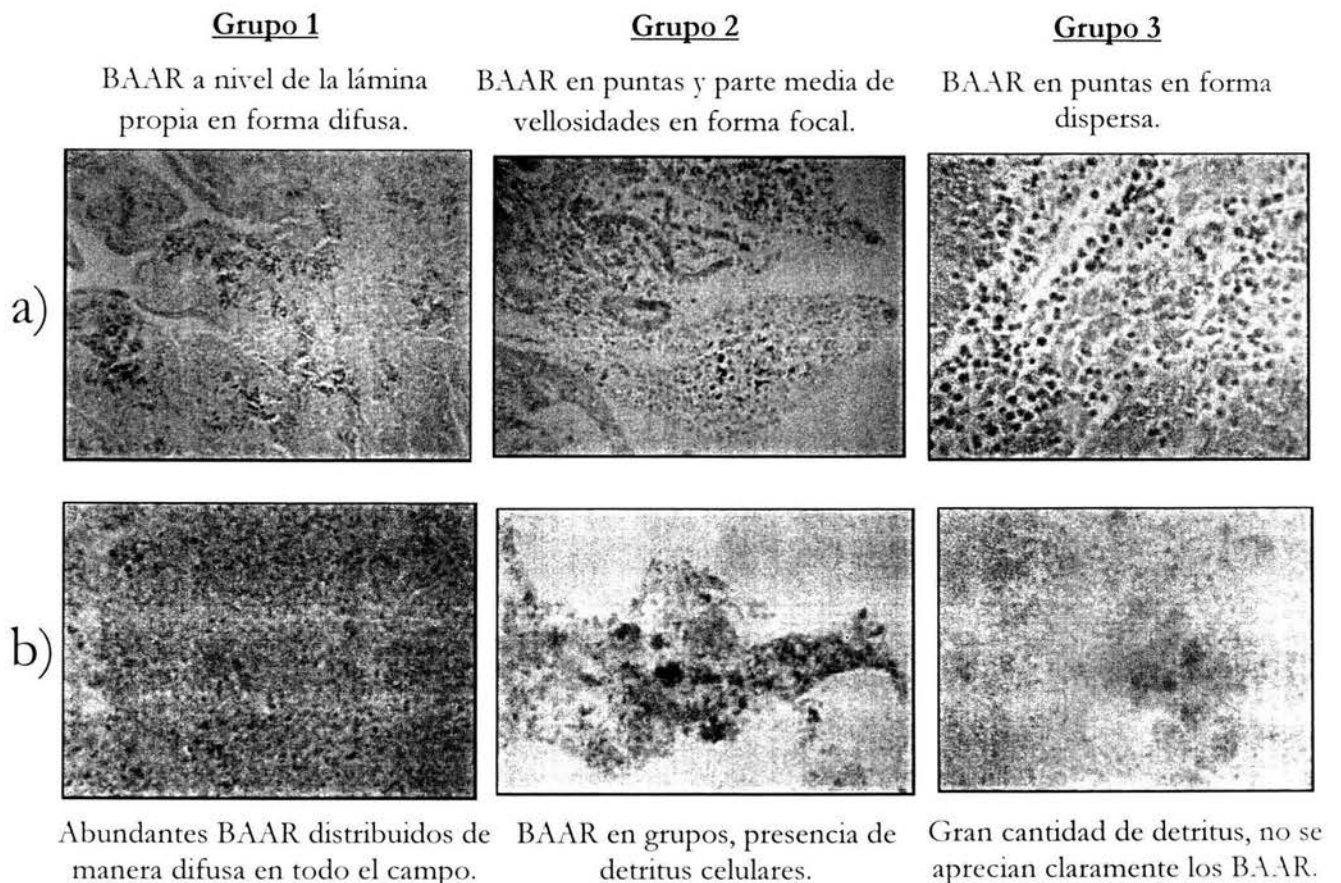


Fig. 2. Criterios de clasificación de las muestras: de intestino de acuerdo a la presencia de bacilos ácido alcohol resistentes (BAAR) (a) y a la abundancia de micobacterias en el concentrado (b). Grupo 1: muestra núm.3; Grupo 2: muestra núm.5; Grupo 3: muestra núm.15. a) Sección de intestino. Tinción ZN, 10 X, 10 X, 40 X. b) Concentrado de micobacterias. Tinción ZN, 100 X.

5. Extracción de ADN genómico

La adaptación de la técnica de extracción de ADN a partir de los concentrados de micobacterias tuvo como finalidad obtener ADN de micobacterias directamente a partir de las muestras de tejido. Es importante notar que después de la adición del fenol/cloroformo/alcohol isoamílico, se detectaron BAAR en la interfase al realizar la tinción de ZN. La cantidad de ADN obtenida al realizar la extracción a partir de los concentrados de micobacterias derivados de las muestras con lesiones de tipo multibacilar, fue inconstante. Mediante la cuantificación en gel de agarosa de estas 22 muestras, siguiendo el mismo protocolo, se observaron bandas de ADN de intensidad variable. La clasificación de las muestras de acuerdo a la intensidad de la banda de ADN se ejemplifica en la **Figura 3**.

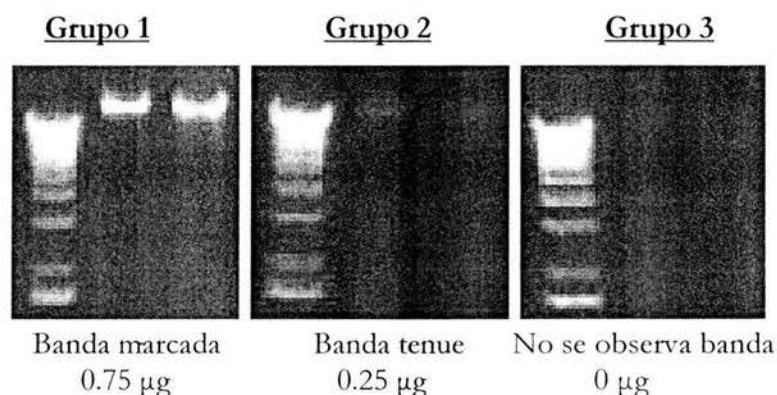


Fig. 3. Gel de agarosa en TAE al 0.8% teñido con bromuro de etidio. Grupo 1.- Carril 1: marcador de peso molecular λ /*Hind*III. Carril 2: 2 μ l de ADN de la muestra núm.1. Carril 3: 2 μ l de ADN de la muestra núm.3; Grupo 2.- Carril 1: marcador de peso molecular λ /*Hind*III. Carril 2: 2 μ l de ADN de la muestra núm.5. Carril 3: 2 μ l de ADN de la muestra núm.22. Grupo 3.- Carril 1: marcador de peso molecular λ /*Hind*III. Carril 2: 2 μ l de ADN de la muestra núm.13. Carril 3: 2 μ l de ADN de la muestra núm.15.

Comparando la clasificación de las muestras de acuerdo a los BAAR obtenidos con la concentración de micobacterias y resultado de extracción de ADN a partir del concentrado de micobacterias, se notó una relación entre la cantidad de micobacterias en los concentrados y la cantidad de ADN obtenida. Las muestras clasificadas en el Grupo 1 (abundantes BAAR distribuidos de manera difusa en todo el campo) se correspondieron con las muestras clasificadas en el Grupo 1 de acuerdo al ADN obtenido (banda de ADN marcada). Con la extracción de ADN a partir de las muestras clasificadas en el Grupo 3 de acuerdo a la abundancia de BAAR en el concentrado de micobacterias, no se logró observar una banda de ADN. De acuerdo a las recomendaciones de Pavlik *et al.* (1999), 12 muestras mostraron una

calidad y cantidad adecuadas de ADN en el gel para la realización del RFLP. En el **Cuadro 3** se detalla el origen de cada una de estas 12 muestras.

6. Reacción en Cadena de la Polimerasa

Los resultados obtenidos mediante la PCR, utilizando los iniciadores específicos para la amplificación de la IS901, IS900, IS1245 y *dnaJ*, se ilustran en la **Figura 4**. En las 12 muestras seleccionadas se observó un resultado positivo a IS900, se confirma de esta manera la presencia de ADN de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* en todos los concentrados de micobacterias. No se observaron las bandas correspondientes a la amplificación de la IS901 e IS1245, lo que significa que no se detectó el ADN de *M. avium* subsp. *avium*, “*M. avium* subsp. *hominissuis*” y *M. avium* subsp. *silvaticum*. En la amplificación de *dnaJ* se obtuvo el producto de amplificación esperado (140 pb) y de las muestras 2, 4, 5 y 9 no se apreciaron claramente las bandas.

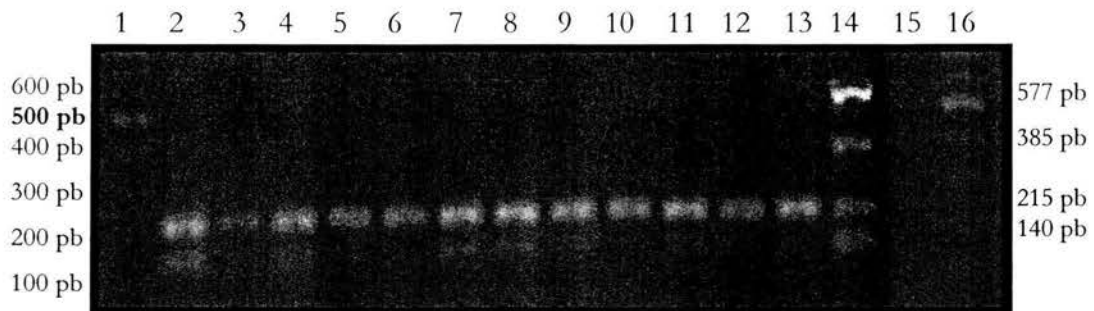


Fig. 4. Gel de agarosa en TBE al 2%, teñido con bromuro de etidio. Amplificación mediante PCR de los genes *dnaJ*, IS900, IS1245 e IS901, a partir del ADN extraído del concentrado de micobacterias. Carril 1 y 16: marcador de peso molecular 100 pb; carril 2 a 13: muestras 1 a 12; carril 14: control positivo; carril 15: control negativo.

7. Polimorfismo en la Longitud de los Fragmentos de Restricción

De los 22 animales con lesiones de tipo multibacilar, se obtuvo ADN de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* en cantidad suficiente para la realización del RFLP de 12 muestras. Las muestras fueron de 4 caprinos y 8 ovinos, provenientes de 9 localidades de 6 estados diferentes del país.

Al digerir el ADN de estas 12 muestras con *Bst*EII se identificaron 5 tipos de RFLP diferentes (C1, C33, I3, C1/I3, C18/I3). En el **Cuadro 3** se detallan el origen geográfico, la

especie, raza, crecimiento de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* y tipo de RFLP detectado de cada una de las muestras.

Cuadro 3: Origen de las muestras y tipo de RFLP al digerir con *BstEII*.

MUESTRA	LOCALIDAD	ESPECIE	RAZA	TIPO <i>BstEII</i>	CULTIVO
4	SLPA, S.L.P.	Caprino	Boer	C1	+
3	SLPB, S.L.P.	Ovino	Pelibuey	C1/I3	+
1	San José del Torreón, Gto.	Ovino [■]	Pelibuey	C1	+
2	San José del Torreón, Gto.	Ovino [■]	Pelibuey	C1	+
5	Celaya, Gto.	Caprino	Saanen	C1	+
11	San José Iturbide, Gto.	Ovino	Pelibuey	I3	+
12	Corregidora, Qro.	Ovino	Katadin	I3	+
6	Topilejo, D.F.	Caprino*	Alpino	C1	+
7	Topilejo, D.F.	Ovino*	Pelibuey	I3	+
8	Topilejo, D.F.	Ovino*	Pelibuey	C18/I3	+
9	Chalco. Edo de Mex	Caprino	Boer	C33	+
10	Martínez de la Torre, Ver	Ovino	Pelibuey	I3	+

■ Ovinos que pertenecen al mismo rebaño

* Animales que pertenecen al mismo rebaño

S.L.P.: San Luis Potosí; Gto.: Guanajuato; Qro.: Querétaro; D.F.: Distrito Federal; Edo de Mex.: Estado de México; Ver.: Veracruz

Dos de los 5 patrones obtenidos en este estudio, no han sido descritos en estudios previos y fueron designados con un nuevo número, respetando la seriación. Se sugiere que estos dos patrones son nuevas variables del tipo C e I y fueron nombrados C33 e I3, respectivamente. En la **Figura 5** se representa los patrones de los 5 tipos que se detectaron.

Se puede notar en el **Cuadro 3** que el ADN de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* originado de muestras de intestino de las 4 cabras se identificó con el tipo C. En el caso del ADN originado de muestras de ovinos se identificaron tipos C (2) e I3 (4), así como combinaciones de ambos en un mismo individuo (2). En la **Figura 6** se muestran los tipos de RFLP al digerir con *BstEII* de acuerdo a origen geográfico y especie animal. Los tipos más

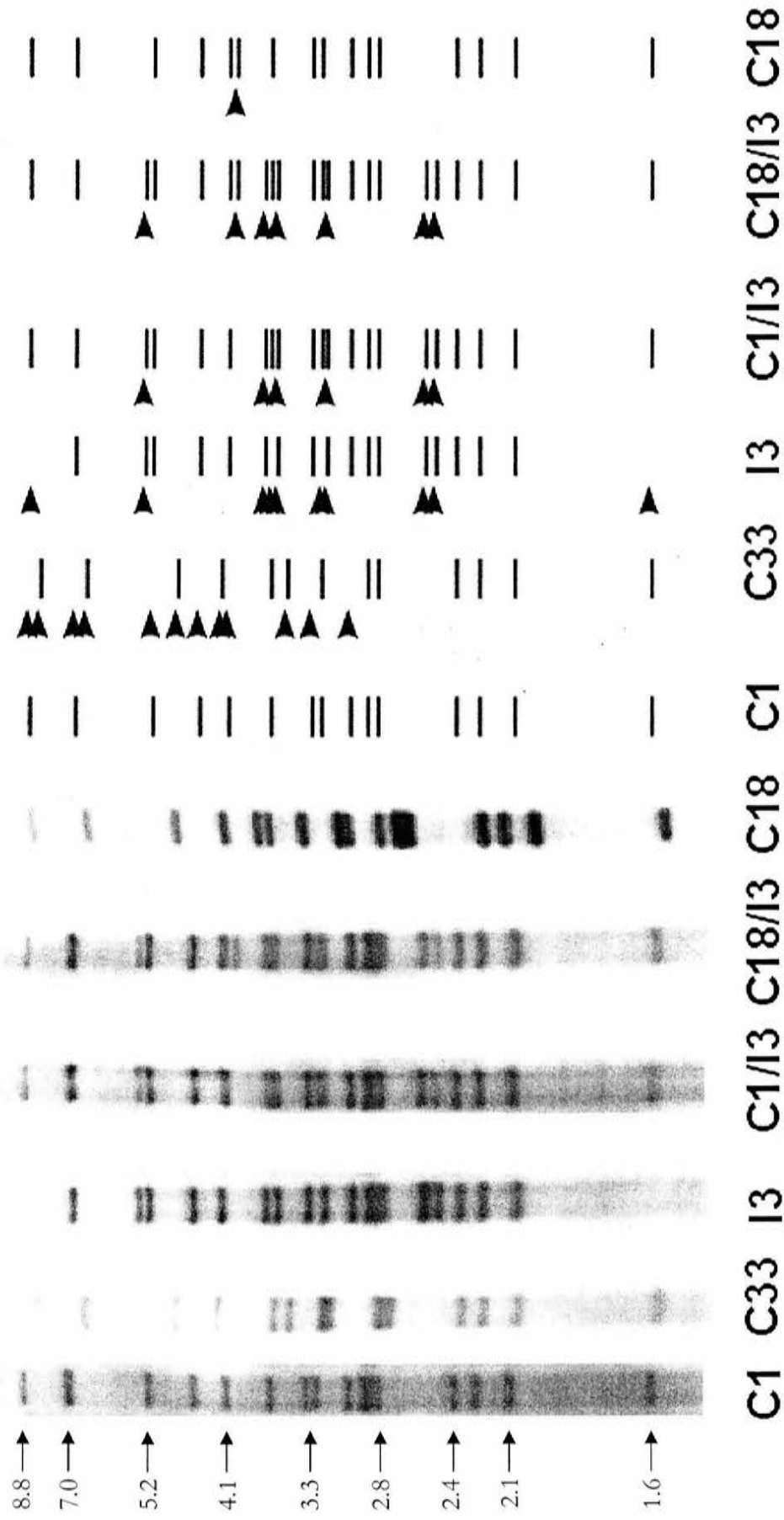


Fig. 5. Detección de bandas obtenidas mediante RFLP empleando como sonda la IS900 al digerir con *Bst*EII el ADN de Map extraído del concentrado de micobacterias. C1, C33, I3, C1/I3, C18/I3: tipos de bandas del tipo C18 fue obtenido de la base de datos de Pavlik *et al.* (1999). Las flechas indican las diferencias en las bandas de cada uno de los patrones de RFLP en relación al tipo C1.

comunes en las diferentes zonas geográficas del país fueron el C1 (5 muestras y un C1/I3) e I3 (4 muestras y un C1/I3 y C18/I3).

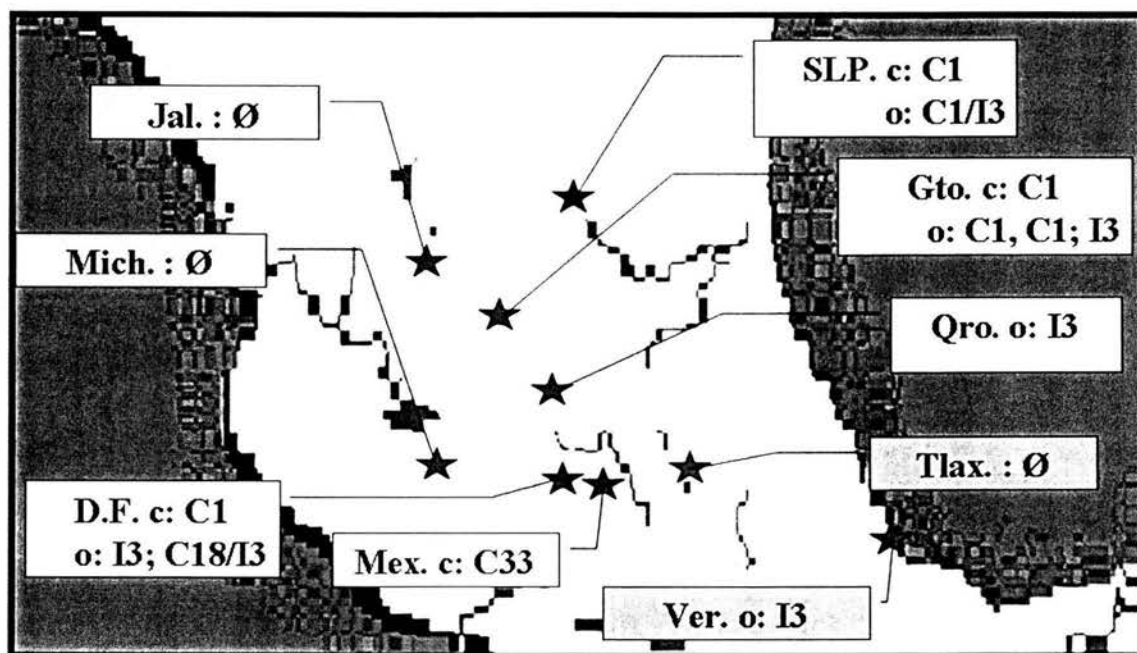


Fig. 6. Mapa de la República Mexicana que indica el origen geográfico y especie animal de los tipos de RFLP obtenidos al digerir con *BstEII*. c:Caprino; o:Ovino; Ø: No se obtuvieron muestras o el ADN fue insuficiente; C1, C33, I3, C1/I3, C18/I3: tipos de RFLP. Jal.: Jalisco; Mich.: Michoacán; S.L.P.: San Luis Potosí; Gto.: Guanajuato; Qro.: Querétaro; D.F.: Distrito Federal; Mex.: Estado de México; Tlax.: Tlaxcala; Ver.: Veracruz.

Mediante el estudio de polimorfismo del ADN obtenido a partir de 9 concentrados de micobacterias empleando la enzima de restricción *PstI*, se confirmó la clasificación de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* en 3 tipos de RFLP diferentes y combinaciones de tipos. En la **Figura 7** se representan los patrones de los 4 tipos que se detectaron con *PstI*. En las 3 muestras clasificadas mediante RFLP con *BstEII* como tipo C1 (1, 2, 4) se observó el mismo patrón de bandas. Este patrón fue diferente al patrón de bandas obtenido con las muestras 7, 10 y 11 clasificadas como tipo I3 con *BstEII*. En estas 3 últimas se identificó el mismo patrón de bandas. El resultado obtenido de la muestra 3 con *BstEII* (C1/I3) se confirmó con esta enzima ya que se detectaron en el patrón una combinación de bandas de las muestras 1 (C1) y 7 (I3). El patrón de bandas de la muestra 9 resultó diferente al de las otras 8. A diferencia de los resultados obtenidos con *BstEII* la muestra 8 (C18/I3) parece tener el mismo patrón que la 3 (C1/I3). Sin embargo, en el estudio de polimorfismo empleando

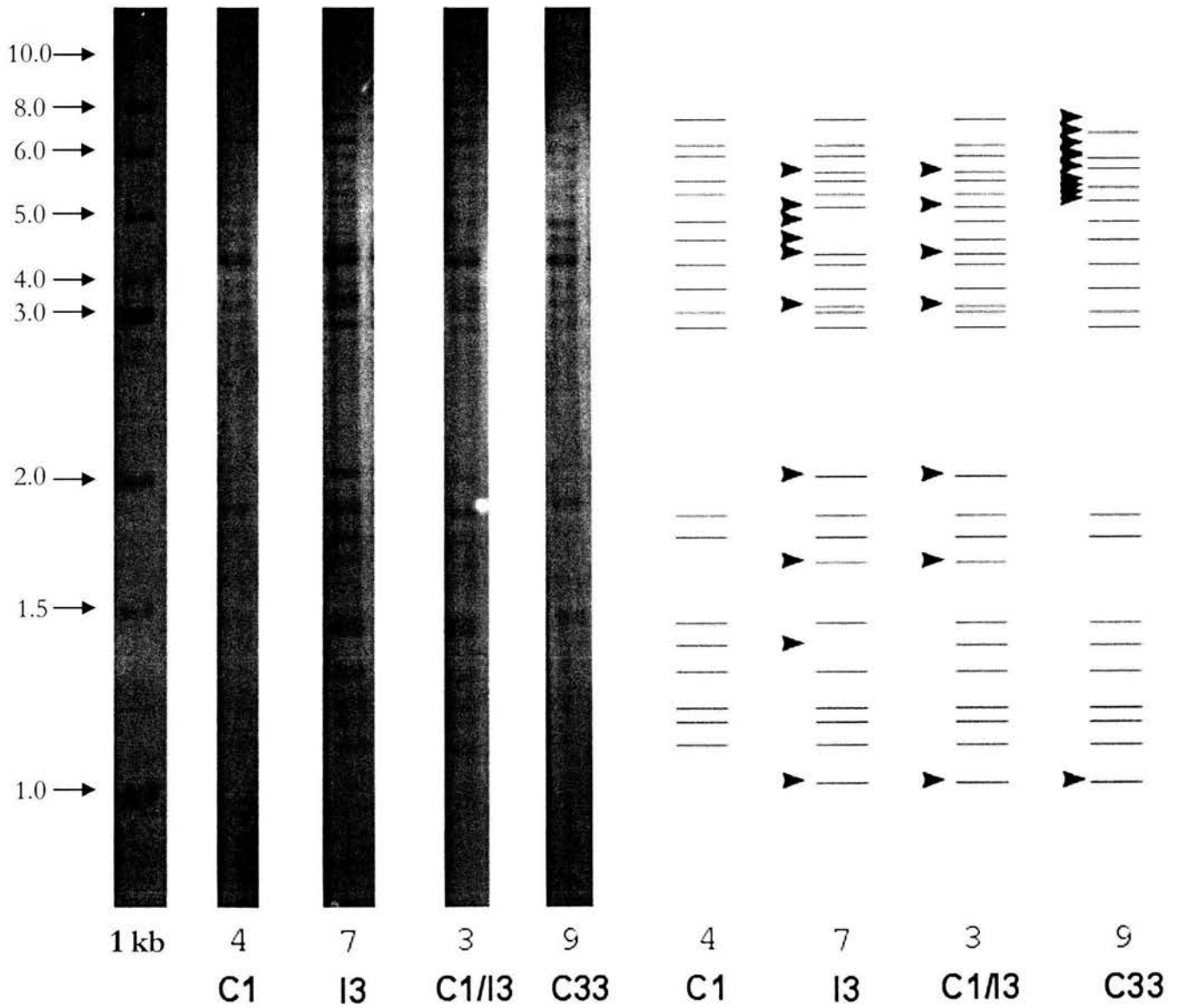


Fig. 7. Patrón de bandas obtenido mediante RFLP empleando como sonda la *IS900* y al digerir con *PstI* el ADN de Map extraído del concentrado de micobacterias. 4, 7, 3 y 9: muestras. C1, C33, I3, C1/I3, C18/I3: tipos de RFLP al digerir con *BstEII*. Las flechas indican las diferencias en las bandas de cada uno de los patrones de RFLP en relación a la muestra 4.

la enzima de restricción *Pst*I no fue posible comparar los patrones de estos 9 concentrados de micobacterias con los previamente reportados debido a que la imagen de las bandas no presentó la misma claridad y en algunas zonas no fue posible observar la presencia de las mismas. La digestión con *Pst*I no pudo ser realizada con la muestra 12 debido a que no se contó con ADN en cantidad suficiente. La digestión de las muestras 5 y 6 no fue adecuada, por lo que no se obtuvieron las bandas esperadas y no fue posible comparar los patrones. Para validar los resultados anteriormente descritos es necesario repetir la digestión enzimática del ADN micobacteriano. La cantidad de ADN obtenida no permitió realizar una nueva digestión.

8. Aislamiento bacteriológico

Los medios de cultivo se mantuvieron en incubación durante 40 semanas en el caso de las primeras muestras que fueron sembradas y 34 semanas en el caso del segundo grupo de muestras. Se logró el aislamiento en medio de cultivo adicionado con micobactina de *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* a partir de las 22 muestras de animales con lesiones de tipo multibacilar. En ninguno de los medios de cultivo provenientes de las muestras de los 14 ovinos y 8 caprinos se observó una coloración amarillenta de las colonias de Map. En los medios preparados sin micobactina, no se observaron colonias.

Discusión

Al revisar los estudios realizados en México se pudo observar que no se cuenta actualmente con información concerniente a la distribución de la enfermedad en el país. Tampoco se cuenta con estudios seroepidemiológicos de las áreas de mayor y menor seroprevalencia de paratuberculosis en bovinos, ovinos y caprinos.^{1,4,12,20,38,40,52,66,80,87,98,99,100,127-130}

En este estudio se obtuvieron resultados serológicos positivos a paratuberculosis en caprinos de Michoacán, San Luis Potosí, Guanajuato, D.F., Estado de México y Tlaxcala así como en ovinos de Jalisco, San Luis Potosí, Guanajuato, D.F. y Veracruz. Mediante histopatología se demostró la presencia de lesiones características de esta enfermedad en intestino delgado y linfonodos mesentéricos de caprinos provenientes de San Luis Potosí, Guanajuato, D.F. y Estado de México y ovinos provenientes de San Luis Potosí, Guanajuato, Querétaro, D.F. y Veracruz. Además se logró el aislamiento de *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* a partir de muestras de intestino de caprinos y ovinos de estos mismos estados. Estos resultados confirman por lo tanto, la presencia de la enfermedad en varios estados de la República Mexicana.

En 137 sueros (13.14%), fueron detectados anticuerpos contra *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis*. El porcentaje de sueros que resultaron positivos a paratuberculosis fue de 12.12% en el caso de los ovinos y 21.01 % en el caso de los caprinos. En este estudio el porcentaje de sueros positivos a esta enfermedad en caprinos es mayor que en el caso de los ovinos. Sin embargo, hay que recalcar que la prueba de ELISA fue empleada para el diagnóstico de paratuberculosis de rebaños. Es el caso de los 691 sueros de ovinos de los estados de Jalisco, Guanajuato y Veracruz. En cambio, los sueros de caprinos provinieron de animales con sospecha de paratuberculosis.

Si comparamos los resultados serológicos de este estudio con los trabajos de otros autores en México, se confirma que el porcentaje de animales positivos a paratuberculosis es en general superior en este estudio. Los porcentajes de sueros positivos de caprinos obtenidos son de 0% en San Luis Potosí, 10% en Querétaro (Ramírez *et al.*, 1982); 1.2 a 8.4 en cuatro rastros diferentes del Estado de México (Pradexis, 1985); 8.16 y 12.39% en un rebaño del D.F. (Vélez *et al.*, 1995); 6.73% mediante IDGA y 15.38% mediante ELISA en tres rebaños del

Estado de México y Distrito Federal (Vélez, 1998); 3.38% mediante IDGA y 10.83% mediante ELISA en un rebaño del D.F. (Domínguez, 2000). Ramírez *et al.* (1982) y De Lucas (1984) reportan un porcentaje de cabras positivas en Guanajuato de 47.2 y 44, respectivamente. No sabemos si el muestreo fue realizado en el mismo rebaño, sin embargo la elevada cantidad de cabras con resultado positivo puede ser debida a que, como lo menciona éste último autor, el muestreo se realizó en cabras sospechosas de paratuberculosis importadas de Estados Unidos en dónde existen antecedentes de la enfermedad. En cuanto a los estudios serológicos en ovinos, se han publicado porcentajes de animales positivos a Map en el Estado de México de 17.74% (Bustamante y Garibay, 1974); 0.8% y 4.4% en cuatro rastros diferentes (Pradexis, 1985); 7.4 y 13.2 (Ramírez *et al.*, 1987) y 9.28% (Oviedo y Hernández, 1991). En el estado de Quintana Roo, Ramírez *et al.* (1987) reportan un porcentaje de animales positivos de 1.6%. Nuevamente, el porcentaje de ovinos positivos en este estudio es superior a los anteriores, probablemente debido a que se seleccionaron animales y rebaños con sospecha de paratuberculosis.

La totalidad de los 51 animales sacrificados y de los cuales se obtuvieron muestras de intestino delgado y linfonodos mesentéricos, tuvieron lesiones típicas de paratuberculosis tanto macro como microscópicamente. Las muestras de tejido de ovinos ascendieron a 40, mientras que las muestras de tejido de únicamente 11 caprinos fueron incluidas en este estudio. Esta diferencia se debe a la mayor cantidad de muestras de ovinos incluidas en el estudio serológico.

Histológicamente, 22 muestras (43.14%) presentaron lesiones de tipo multibacilar, consideradas como tipo 3b. En estas secciones de intestino de 14 ovinos y 8 caprinos se observaron una abundante cantidad de BAAR en los cortes histológicos. El hallazgo de lesiones de tipo multibacilar es congruente con estudios de varios autores que señalan que conforme la enfermedad progresa de un estado subclínico a un estado clínico, la respuesta inmune mediada por células decrece y una fuerte respuesta humoral domina.^{6,72,95} Además, las lesiones multibacilares tipo 3b se asocian a una fuerte respuesta humoral.^{19,93,94} En este estudio los animales que fueron sacrificados presentaron signos clínicos característicos de la enfermedad de Johne y tuvieron una respuesta positiva a paratuberculosis con pruebas de inmunidad humoral, con excepción de 4 casos. Al clasificar la lesiones histopatológicas de animales con lesiones características de la enfermedad de Johne, otros autores reportan un

porcentaje de ovinos multibacilares de 28.05% (Pérez *et al.*, 1996), 69% (Clarke y Little, 1996), 57.89% (Burrells *et al.*, 1998) y 42.63% (Pérez *et al.*, 1999). En caprinos con lesiones de paratuberculosis, Corpa *et al.* (2000) encontraron un porcentaje de lesiones de tipo multibacilar de 50%. Los porcentajes de ovinos y caprinos con lesiones de tipo multibacilar reportados por estos autores, son en general semejantes al 43.14% indicado en este estudio.

En este trabajo, el porcentaje de cabras con lesiones de tipo multibacilar es mayor (72.73%) que en caso de los ovinos (35%). Hay que considerar que la diferencia en estos porcentajes se puede deber a que para el caso de las cabras se seleccionaron animales con signos clínicos y seropositividad a IDGA; para el caso de los ovinos se realizó el diagnóstico de rebaño en algunos casos y se empleó la prueba de ELISA. De estos 17 ovinos, solamente 4 (23.53%) presentaron lesiones de tipo multibacilar. Esto concuerda con lo descrito por Clarke *et al.* (1996), quienes demuestran una correlación entre la cantidad de BAAR e IDGA mayor que entre la cantidad de BAAR y ELISA, por su parte, Vélez (1998) también observó esta relación entre positividad a IDGA y presencia de lesiones multibacilares.

A partir del tejido intestinal, previamente congelado, de los 22 animales con lesiones de tipo multibacilar, se realizó la concentración de micobacterias. La obtención de un concentrado de micobacterias libre de detritus celulares tuvo como finalidad lograr una extracción de ADN de *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* de pureza y cantidad suficientes para la realización del RFLP. Esta técnica de concentración de micobacterias aunada a la extracción de ADN permite reducir el tiempo de diagnóstico de paratuberculosis o de otras técnicas como el RFLP. Los estudios de polimorfismo mediante RFLP, al extraer directamente ADN de Map a partir de tejido intestinal pueden ser finalizados en dos semanas. En cambio, no es posible obtener el resultado de polimorfismo al extraer ADN a partir de aislamientos de Map, en menos de 8 semanas. Esto se debe a que el cultivo de Map requiere de periodos prolongados de desarrollo y su cultivo a partir de ovinos con paratuberculosis es en algunos casos difícil.^{19,29,134}

Ratnamohan TN y Spencer TL (1986) proponen la técnica de concentración de micobacterias como herramienta para la producción de antígenos específicos de *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* de campo, a partir de casos clínicos de bovinos con paratuberculosis. En este estudio se estandarizó la técnica de concentración de micobacterias

para la obtención de ADN de esta micobacteria a partir de tejidos de intestino delgado de ovinos y caprinos. Esta técnica fue efectuada con la totalidad de las muestras con lesiones de tipo multibacilar, agregando 8 g de mucosa intestinal homogeneizada. Sin embargo, al teñir mediante ZN los concentrados de micobacterias obtenidos a partir de estas 22 muestras, los resultados fueron variables. Se notó que a partir de las muestras con mayor cantidad de BAAR en las secciones de intestino, se apreciaron abundantes BAAR distribuidos de manera difusa en el frotis realizado. En cambio, las muestras clasificadas en el grupo 3 de acuerdo a la abundancia de micobacterias en tejido intestinal, correspondieron a las muestras clasificadas en el grupo 3 de acuerdo a la concentración de micobacterias.

Es difícil comparar estos resultados con los de otros autores, debido a que en los estudios realizados no se ha comparado adecuadamente la cantidad de micobacterias presentes en tejido intestinal, con la cantidad de micobacterias obtenidas al finalizar su concentración. Ratnamohan TN y Spencer TL (1986) cuantifican las bacterias en los frotis intestinales de los bovinos así como del concentrado de micobacterias. Este autor obtiene entre 10^5 y 10^9 bacterias por g de mucosa intestinal. Sin embargo, menciona que la tendencia de Map a formar agregados produce dificultades en estimar el número de células. En 1990, Collins *et al.* logran realizar el RFLP mediante esta misma técnica de concentración, a partir de micobacterias obtenidas directamente del tejido intestinal con abundantes BAAR de cuatro ovinos. No obstante, no se especifica en la publicación la cantidad inicial de micobacterias en tejido intestinal y final en el concentrado de micobacterias. Challans *et al.* (1994) describen una técnica de concentración de micobacterias a partir de linfonodos, aunada a la detección de *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* mediante PCR e hibridación. La técnica se basa en la adición de xileno al tejido. Tampoco se especifican en este estudio las cantidades iniciales y finales de micobacterias. Por otro lado, no se requieren elevadas concentraciones de ADN para la PCR y su uso para RFLP no ha sido probado. Choy *et al.* (1998) comparan cuatro diferentes técnicas de concentración de micobacterias a partir de mucosa intestinal de cinco ovinos con enfermedad de Johne. Obtiene los mejores resultados con el uso de sacarosa y cloruro de potasio como medios de separación para la centrifugación por gradientes. Esta técnica resultó en un peso húmedo de BAAR mucho mayor que con una modificación del procedimiento de digestión enzimática de Ratnamohan TN y Spencer TL (1986). El autor menciona que la abundancia de BAAR en los raspados de mucosa intestinal varió entre estos cinco ovinos con

lesiones de tipo multibacilar y que la cantidad de Map concentrados dependió del número de organismos presentes en la mucosa intestinal. Además, Collins *et al.* (1990), Challans *et al.* (1994) y Choy *et al.* (1998), no especifican la presencia o no de detritus celulares. La cantidad de micobacterias fue suficiente en estas cinco muestras para el análisis de RFLP. Este resultado es confirmado por Whittington *et al.* (2000) ya que en 163 muestras de intestinos de ovinos de un total de 168 incluidas en el estudio, emplea esta técnica y logra el análisis de RFLP.

La extracción de ADN de *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* se llevó a cabo en este estudio a partir del concentrado de micobacterias obtenidas de tejido intestinal de animales multibacilares, a diferencia de otros grupos de trabajo que realizan la extracción de ADN de Map a partir de cultivo. A pesar de haber seguido el mismo procedimiento para las 22 muestras, la cantidad y pureza de ADN evaluado mediante electroforesis fueron muy variables. La clasificación de las muestras de acuerdo a la intensidad de la banda de ADN observada en el gel, pone en evidencia que existe una relación directa entre la cantidad de micobacterias presentes en tejido intestinal y la cantidad de ADN resultante. Las muestras incluidas en el Grupo 1 de acuerdo a la abundancia de micobacterias en tejido intestinal fueron incluidas en el estudio de RFLP. En cambio, de las muestras con BAAR en puntas en forma dispersa (Grupo 3 de acuerdo a la abundancia de micobacterias en secciones de intestino) no se obtuvo ADN en cantidad suficiente para realizar la digestión enzimática. Estos resultados sugieren que el ADN obtenido proviene de los BARR. Por otro lado, se puede concluir que el método de concentración de micobacterias, aunado al método de extracción de ADN empleados en este estudio permiten obtener ADN de *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* en cantidad suficiente para llevar a cabo la técnica de RFLP, en las muestras con mayor abundancia de micobacterias en tejido intestinal (clasificadas en el Grupo 1 en este estudio). La cantidad de ADN obtenida en las muestras del Grupo 2 no fue suficiente en algunos casos para realizar el estudio de polimorfismo. Este resultado probablemente se debe a que las muestras que fueron incluidas en el estudio histopatológico provenían de las porciones de intestino con lesiones de paratuberculosis más aparentes. Es posible que la cantidad de BAAR presentes en los cortes histopatológicos no siempre correspondieran a la cantidad de BAAR presentes en la totalidad de la sección intestinal empleada para la concentración de las micobacterias. Varios autores han demostrado que para estudios en que la extracción de ADN se lleva a cabo a partir de cultivo,

esta técnica es de gran utilidad para el RFLP (Pavlik *et al.* 1999; Moreira *et al.*, 1999; Chávez-Gris *et al.*, 2004). En este estudio se confirma que la técnica de extracción de ADN de *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* propuesta por Pavlik *et al.* (1999) es adecuada para la obtención de ADN de Map a partir del concentrado de micobacterias de las muestras intestinales clasificadas en el Grupo 1. Sin embargo, es importante resaltar que en muestras de los 3 grupos, después de la adición del fenol/cloroformo/alcohol isoamílico, se detectaron BAAR en la interfase al realizar la tinción de ZN. Las micobacterias permanecen intactas aún después de la adición de lisozima, SDS/proteínasa K y CTAB/NaCl, cuya finalidad es la ruptura de la pared celular de la bacteria y liberación del ADN. La efectividad de esta técnica es, por lo tanto, deficiente en las muestras con una menor cantidad de BAAR (Grupo 3) ya que no se logra obtener ADN de la totalidad de las micobacterias.

Es posible que la obtención de ADN pueda ser optimizada probando otros protocolos de extracción de ADN. Para estudios de RFLP la extracción de ADN de *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* se ha llevado a cabo por métodos enzimáticos, principalmente lisozima y proteínasa K. Varias técnicas han sido adaptadas y publicadas para lograr una extracción de ADN adecuada para RFLP, sin embargo no se ha comparado la eficiencia de cada una de ellas.^{14,26,89,90,124,132} A partir de BAAR concentrados directamente de tejido de ovinos, Choy *et al.* (1998) y Whittington *et al.* (2000) emplean lisozima, mutanolisina, proteínasa K, SDS y CTAB para la extracción del ADN. Estos autores digieren 2 µg del ADN obtenido de cada muestra y logran el análisis de RFLP. No se especifica en el estudio la cantidad de micobacterias presentes en las muestras de tejido, no obstante sería interesante comparar los resultados de la extracción de ADN a partir de tejido intestinal de las muestras clasificadas dentro del Grupo 3 al emplear el método propuesto por Choy *et al.* (1998) y Whittington *et al.* (2000) y el método empleado en este estudio.

Otros autores han empleado diferentes técnicas de extracción del ADN de *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis*: enzimáticas (lisozima, proteínasa K); físicas (frío/calor, perlas de circonio, microondas) y químicas (guanidina, Triton X-100) así como combinaciones de éstas. Challans *et al.* en 1994 combinan la concentración de micobacterias a partir de tejido mediante xileno, con la lisis de micobacterias mediante agitación de perlas de circonio y extracción del ADN con isotiocianato de guanidina. El ADN obtenido permite

realizar PCR, aunque, su empleo para RFLP no ha sido probado. Garrido *et al.* (2000), comparan diferentes técnicas de extracción de ADN de Map para su uso en la PCR de muestras fecales. Con el método de extracción enzimático (lisozima, proteinasa K), el autor demostró que la técnica no se obtuvo suficiente ADN para su detección. En este estudio se confirman los resultados reportados por Garrido *et al.* (2000), ya que la técnica empleada fue también enzimática. El método de extracción de Challans así como el que utiliza la combinación de frío/calor (nitrógeno líquido) con TE-Triton X-100, son capaces de obtener al menos 130 µg/ml de ADN. A pesar de obtener una cantidad menor de ADN con este segundo método, el número de resultados positivos mediante la PCR se incrementó. Sería, por lo tanto, recomendable intentar la extracción de ADN con esta técnica a partir de muestras con menor cantidad de micobacterias, como son aquellas descritas para los grupos 2 y 3 en este estudio, con el fin de evaluar su uso para estudios de polimorfismo mediante RFLP. Sin embargo, para la evaluación de estas técnicas de extracción de ADN es necesario recordar que los estudios de polimorfismo basados en la longitud de los fragmentos de restricción requieren de una gran cantidad de ADN cromosomal de alto peso molecular y otros métodos para el aislamiento de ADN causan fragmentación del ADN. Por ejemplo, estudios acerca del efecto de la lisis por calor en la integridad del ADN de *Mycobacterium tuberculosis* indican que el ADN es fragmentado en segmentos de aproximadamente 2 kb o menos (Zwadyk *et al.*, 1994).

Con el fin de verificar que el ADN de *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* se encuentra presente en las 12 muestras seleccionadas y determinar si el ADN de otras micobacterias se encuentra presente, se decidió llevar a cabo una PCR múltiple. En todos los casos se amplificó el fragmento esperado de la IS900, confirmando así que el ADN obtenido a partir del concentrado de micobacterias pertenece a Map. Otros autores han demostrado la existencia en micobacterias no relacionadas con Map de una secuencia de inserción muy similar a la IS900, que derivan en resultados falsos positivos mediante el empleo de esta técnica. No obstante, es posible diferenciar estas micobacterias de Map ya que en cultivo no son dependientes de micobactina y en algunos casos las colonias presentan una coloración amarillenta. Además, el número de copias de estas secuencias de inserción similares a la IS900, es variable en el genoma de las micobacterias y diferente al número de copias de la IS900 de Map (1 a 6 *versus* 15 a 20). Estos autores indican que resultados positivos a *Mycobacterium avium*

subsp *paratuberculosis* mediante PCR, empleando la IS900, pueden ser confirmados secuenciando el producto amplificado, mediante una PCR basada en la amplificación de otra secuencia de inserción específica de Map, o bien, comparando los patrones de RFLP.^{10,36,46,71,120,125} De acuerdo a los resultados de RFLP y aislamiento de este estudio, se confirma la presencia de *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* en los concentrados obtenidos a partir de tejido intestinal.

Por otro lado, mediante la PCR múltiple no se obtuvieron productos de amplificación de IS901 e IS1245. Estos resultados concuerdan con diversos estudios en que se comprueba que *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* no contiene en su genoma la IS901 e IS1245 (Kunze *et al.*, 1992; Collins *et al.*, 1997). La ventaja de una PCR múltiple es poder detectar en una sola prueba el genoma de diferentes organismos. En esta PCR se seleccionó la diferenciación de ADN de micobacterias del complejo *Mycobacterium avium*. Los resultados muestran que se detectó únicamente ADN de *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* en los concentrados de micobacterias obtenidos a partir de intestino de ovinos y caprinos con enfermedad de Johne. Ellingson *et al.* (2000) también desarrollaron una PCR múltiple empleando la IS900, IS901, IS1245 y 16s rRNA. Sus resultados muestran que se logra la diferenciación de *Mycobacterium avium* subsp *avium* de *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* y de otras micobacterias relacionadas. Los resultados de este autor así como los resultados obtenidos en este estudio demuestran que la PCR múltiple es una prueba sencilla, rápida y sensible para detectar y diferenciar *Mycobacterium avium* subsp *avium* de *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis*.

La PCR múltiple empleada en este estudio incluye la detección del gen *dnaJ*. Sin embargo, no se obtuvo de manera clara el producto de amplificación esperado en 4 de 12 muestras. Estos resultados no concuerdan con otros estudios que indican que el gen *dnaJ* es altamente conservado en los genomas bacterianos. Aunque Takewaki *et al.* (1994) demuestran que el gen *dnaJ* de *Mycobacterium avium* subsp *avium* y *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* son casi idénticos (99% de homología). Por otro lado, Victor *et al.* (1996) señalan una variación en el gen *dnaJ* de *Mycobacterium avium* subsp *avium*, por lo que no recomienda el empleo de una PCR específica de especie basada en el gen *dnaJ*. Los resultados de este estudio en la amplificación de *dnaJ*, posiblemente se deban a la variación de este gen en diferentes cepas de *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis*.

Fue posible realizar el estudio de polimorfismo genético mediante RFLP de *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* obtenido a partir de tejido intestinal de ovinos y caprinos con lesiones granulomatosas de tipo multibacilar. Estos resultados concuerdan con los de Collins *et al.* (1990), Choy *et al.* (1998) y Whittington *et al.* (2000) que lograron el estudio de polimorfismo de ADN de Map obtenido directamente de tejido intestinal de ovinos. Collins *et al.* (1990) confirmaron que el ADN obtenido de los BAAR preparados directamente a partir de tejido intestinal tuvieron el mismo patrón que el ADN obtenido del aislamiento de *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* cultivado a partir del tejido intestinal del mismo animal. Por otro lado, Choy *et al.* (1998) y Whittington *et al.* (2000) obtienen el mismo patrón de RFLP (S1) que el descrito por Collins *et al.* (1990). Los resultados de estos autores indican que el ADN genómico de Map no es afectado por el método de concentración y que los patrones de las bandas no se alteran.

Los resultados de RFLP mediante la digestión del ADN genómico de 12 muestras con *Bst*EII sugieren la presencia de dos nuevos patrones que fueron nombrados C33 e I3. El patrón de bandas obtenido con el RFLP de estos dos tipos no han sido reportados y no se encuentran descritos en estudios previos. Sin embargo, es importante señalar que el estudio del polimorfismo de *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* mediante RFLP ha sido realizado por pocos grupos de trabajo de ciertos países y principalmente con muestras obtenidas a partir de bovinos con paratuberculosis. Es por lo tanto de esperar la identificación de nuevos patrones de Map en ovinos y caprinos de México. Por otro lado, en este estudio al analizar los patrones de bandas de dos muestras se detectaron combinaciones de tipos en una misma muestra. Se obtuvieron en una misma muestra una combinación de C1 e I3 y en una segunda muestra la combinación C18 e I3. La presencia de combinaciones de los tipos de RFLP en una sola muestra sugieren por lo tanto una infección mixta en un mismo individuo. A diferencia de este estudio, Collins *et al.* (1990), Choy *et al.* (1998) y Whittington *et al.* (2000) al realizar el estudio de polimorfismo de ADN de Map obtenido directamente de tejido intestinal de ovinos, no encontraron combinaciones de patrones. No obstante, Pavlik *et al.* (1995) reportan en un ovino y en un bovino una infección mixta. Estos autores obtienen mediante un estudio de RFLP a partir de cultivo de *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* dos tipos diferentes de Map en intestino y linfonodo mesentérico de un mismo individuo. La presencia de los dos nuevos

tipos de *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* en México así como de combinaciones de patrones en un mismo individuo podrían ser confirmados en un futuro al realizar el RFLP a partir del ADN del Map aislado en medio de cultivo de estas muestras.

De las 12 muestras de ADN de Map estudiadas, 4 fueron obtenidas a partir de intestino de caprinos y las 4 mostraron ser del tipo C. De las 8 muestras obtenidas a partir de intestino de ovinos, 4 Map fueron del tipo I3, 2 del tipo C1 y 2 con combinación C e I. La mayoría de las muestras (8 de 12) se encuentran separadas en 2 grupos: C en muestras provenientes de caprinos e I de ovinos. Sin embargo, 4 ovinos presentaron infección con *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* del tipo C. Es por lo tanto posible que exista una adaptación de cepas a un determinado huésped, aunque esta adaptación no es absoluta y las cepas del tipo C pueden afectar a ovinos. Estos resultados concuerdan con otros estudios como el de Collins *et al.* (1990) en el cual se propone la clasificación de los patrones de bandas en los dos grupos C y S. En ese estudio, las 19 muestras de bovinos pertenecieron al grupo C, así como 8 de 9 muestras de caprinos y 6 de 15 muestras de ovinos. Una muestra de origen caprino y 9 de 15 muestras de origen ovino presentaron un patrón de bandas del tipo S. Este mismo autor describe en una oveja el tipo I, intermediario entre los grupos C y S, aunque con mayor similitud con el patrón de bandas del grupo S. Al igual que en este estudio, varios autores reportan que algunas muestras provenientes de ovinos mostraron tener el tipo C, lo cual sugiere la existencia de infecciones interespecie (Collins *et al.*, 1990; Whipple *et al.*, 1990; Pavlik *et al.*, 1995; Stevenson *et al.*, 2002).

El estudio de polimorfismo fue realizado a partir de 12 muestras de 9 rebaños de 6 estados diferentes del país. El tipo *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* más común en las diferentes zonas geográficas del país fue el C1. Estos resultados concuerdan con el estudio de Chávez-Gris *et al.* (2004) que identifican en México el tipo C1 de Map cultivado a partir de dos cabras. El tipo más comúnmente identificado en aislamientos de Map de Europa y Estados Unidos en bovinos y caprinos es el C1 (Collins *et al.*, 1990; Pavlik *et al.*, 1999). En cambio, en Australia predomina el tipo C3 tanto en bovinos como en caprinos (Cousins *et al.*, 2000 y Whittington *et al.*, 2000). En este estudio, se encontró el tipo C1 en tres ovinos, lo cual concuerda con otros estudios que reportan este mismo tipo en ovinos de Canadá y Estados Unidos (Collins *et al.*, 1990; Whipple *et al.*, 1990). Un ovino presentó una infección con el tipo C18. Este patrón ha sido descrito únicamente a partir de un aislamiento de bisonte y dos

aislamientos de vacas lecheras provenientes de Estados Unidos, un aislamiento proveniente de toros de República Checa así como de un aislamiento de origen desconocido de Holanda (Pavlik *et al.*, 1999). Es probable que en los tipos de RFLP de las muestras analizadas en México predomine el mismo tipo que en Europa y Estados Unidos debido a la importación de animales. La infección por el tipo I3 de *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* fue detectada en 6 ovinos de diferentes estados del país, de los cuales dos presentaron una infección combinada entre el tipo C y el I3. El predominio del tipo I no concuerda con otros estudios ya que en ovinos, el tipo de Map más frecuentemente reportado ha sido el S1 que predomina en Australia y Nueva Zelanda (Collins *et al.* 1990; Choy *et al.*, 1998; Cousins *et al.*, 2000; Whittington *et al.*, 2000). El tipo I ha sido únicamente reportado en aislamientos de *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* a partir de un ovino de Canadá así como de dos ovinos de Sudafrica (Collins *et al.*, 1990; Cousins *et al.*, 2000). Los ovinos incluidos en este estudio son de pelo para producción de carne, principalmente de la raza pelibuey. Posiblemente, a pesar de ser de distintas regiones geográficas estos 6 ovinos tengan un origen común ya que son animales que fueron importados a México. Esto explicaría la detección de este nuevo tipo, denominado I3, común en ovinos de diferentes rebaños. En los resultados obtenidos en otros países no se especifica la raza de los animales por lo que no es posible determinar la existencia de estudios previos en ovinos de pelo. Se debe resaltar que en los rebaños localizados en Topilejo, Chalco y Martínez de la Torre se identificaron patrones de *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* que corresponden a los tipos C1, I3, C18/I3 y C33. Estos rebaños tienen la característica de pertenecer a centros de enseñanza e investigación por lo que animales de distintas procedencias han estado en contacto. Como ya se mencionó, el tipo C1 que fue identificado en una cabra de Topilejo es el tipo predominante en países de Europa y Estados Unidos. El estudio de RFLP a partir de aislamientos de dos cabras con paratuberculosis en México, fue realizado en animales de este mismo rebaño. Los resultados de Chávez-Gris *et al.* (2004) concuerdan con este estudio al observar que el patrón de bandas corresponde al C1. El ovino de Topilejo que presentó la infección combinada de *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* (C18/I3) fue adquirido del rebaño ubicado en Martínez de la Torre, Ver. Estos datos sugieren que en el rebaño de caprinos de Topilejo prevalecía el tipo C1 y que el tipo I3 identificado en ovinos fue probablemente introducido al rebaño al introducir animales de Martínez de la Torre. En Chalco, Edo. de Méx., una cabra de raza Boer presentó una infección

con Map del tipo C33. La finalidad de esta raza es la producción de carne, a diferencia de las razas Alpina y Saanen seleccionadas para producción de leche. Las cabras Boer del rebaño de Chalco fueron importadas como embriones de Estados Unidos aunque esta raza es de origen Africano. Si bien, se ha comprobado una transmisión horizontal de esta micobacteriosis, no fue posible determinar si la infección pudiera estar presente en el embrión o la infección por este tipo de Map se llevó a cabo durante algún periodo de la vida de estos animales. Por lo tanto, no se descarta que el tipo C33 identificado en este estudio sea de origen Africano. Sin embargo, se han realizado pocos estudios tanto en África como en México para afirmar esta relación.^{14,23,37,90}

El estudio de polimorfismo empleando la enzima de restricción *Pst*I confirman los resultados obtenidos al digerir el ADN de *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* con *Bst*EII. Sin embargo, no fue posible comparar los patrones de las 9 muestras con los previamente reportados debido a que el ADN obtenido no permitió repetir una digestión de las muestras. Estos resultados concuerdan con los de otros autores que mencionan que debido a la gran cantidad de ADN que se requiere para realizar el estudio de RFLP, no es posible obtener resultados en muestras principalmente de ovinos. Es así que Whittington *et al.* (2000, 2001) desarrollan y emplean un estudio de polimorfismo de *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* basado en la amplificación de una secuencia de inserción (IS1311) combinada con un análisis de restricción para muestras con ADN insuficiente o degradado. No obstante, la desventaja de esta técnica es que la IS1311 no es específica de Map. Collins *et al.* (2002) distinguen aislamientos de *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* provenientes de bovinos y ovinos al amplificar mediante PCR un fragmento de ADN que en el tipo S es interrumpido por el sitio de inserción de la IS900. La desventaja de estas dos técnicas, en relación al RFLP, es que únicamente distinguen dos (Collins *et al.*, 2002) y tres (Whittington *et al.*, 2001) patrones diferentes. Esto contrasta con estudios de RFLP que han identificado hasta 32 patrones diferentes del tipo C, 3 patrones del tipo S y 2 del tipo I. Los resultados de este estudio, así como los de otros autores que han empleado la técnica de RFLP para el estudio del polimorfismo de *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis*, demuestran que esta técnica es una herramienta útil en epidemiología cuando se apoya en datos de procedencia y movilización de animales.

Se logró el aislamiento en medio de cultivo de *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* a partir de las 22 muestras. Además, en los medios de cultivo sin adición de micobactina no se observó crecimiento bacteriano. Estos resultados confirman la presencia específicamente de *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* en los concentrados de micobacterias obtenidos directamente de tejido intestinal de ovinos y caprinos con lesiones de tipo multibacilar. Por otro lado, es importante señalar que las muestras provenientes de los 14 ovinos pudieron ser aisladas y que en ninguno de los medios de cultivo se observó una coloración amarillenta de las colonias. Estos resultados contrastan con algunos estudios que mencionan que el cultivo de Map a partir de ovinos con paratuberculosis es difícil y que en ocasiones su cultivo presenta una coloración amarillenta (Choy *et al.*, 1998; Pavlik *et al.*, 1999; Whittington *et al.*, 2000; Stevenson *et al.*, 2002). Sin embargo, estos autores emplean para el aislamiento de Map el medio modificado de Herrold's con yema de huevo (HEYM) así como el medio Middlebrook 7H11/OADC. En este estudio, el medio de cultivo empleado fue el Löwenstein-Jensen, tal y como Juste *et al.* (1991) han recomendado su utilidad para el aislamiento de Map a partir de heces o tejidos de ovinos.

Abreviaturas y Siglas usadas

ADN: Acido Desoxirribonucleico

BAAR: Bacilos Acido Alcohol Resistentes

C: Cattle

ELISA: Inmuno Ensayo Enzimático

I: Intermediate

IDGA: Inmuno Difusión en Gel de Agar

IDR: Intradermorreacción

IMS-PCR: separación inmunomagnética en conjunto con la PCR

IS900: Secuencia de Inserción 900

Map: *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*

pb: pares de bases

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa

PPD: Derivado Proteico Purificado

rpm: revoluciones por minuto

RFLP: Polimorfismo en la Longitud de los Fragmentos de Restricción

S: Sheep

T.A.: temperatura ambiente

ZN: Ziehl Neelsen

Referencias

1. Aburto EM. Diagnóstico de paratuberculosis en toros lidiados en la plaza México durante los meses de octubre, noviembre y diciembre de 1987. Tesis de Licenciatura. México (México, D.F.): Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. 1989.
2. Adúriz JJ. Epidemiología, diagnóstico y control de la paratuberculosis ovina en la comunidad autónoma del país vasco. Tesis doctoral. España (Zaragoza): Facultad de Veterinaria. 1993.
3. Aduriz JJ, Juste RA, Cortabarría N. Lack of mycobactin dependence of mycobacteria isolated on Middlebrook 7H11 from clinical cases of ovine paratuberculosis. *Vet Microbiol.* 1995;45(2-3):211-217.
4. Alarcón A. Evaluación de la respuesta inmune y desarrollo de lesiones en cabritos inmunizados y no inmunizados, infectados experimentalmente con *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* de origen caprino y ovino. Tesis de Maestría en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal. México (México, D.F.): Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. 2002.
5. Allen S, Sotos J, Sylte MJ, Czuprynski CJ. Use of Hoechst 33342 staining to detect apoptotic changes in bovine mononuclear phagocytes infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2001;8(2):460-464.
6. Alzuherri HM, Woodall CJ, Clarke CJ. Increased intestinal TNF- α , IL-1 β and IL-6 expression in ovine paratuberculosis. *Vet Immunol Immunopathol.* 1996;49(4):331-345.
7. Bakker D, Willemsen PT, van Zijderveld FG. Paratuberculosis recognized as a problem at last: a review. *Vet Q.* 2000;22(4):200-204.
8. Banasure KD, Basagoudanavar SH, Chaudhury P, Tiwari V, Parihar NS, Goswami PP. Identification and characterization of a gene encoding a 35-kDa protein from *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *FEMS Microbiol Lett.* 2001;196(2):195-199.
9. Bannantine JP, Barletta RG, Thoen CO, Andrews RE Jr. Identification of *Mycobacterium paratuberculosis* gene expression signals. *Microbiology.* 1997;143:921-928.
10. Bannantine JP, Baechler E, Zhang Q, Li L, Kapur V. Genome scale comparison of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* with *Mycobacterium avium* subsp. *avium* reveals potential diagnostic sequences. *J Clin Microbiol.* 2002;40(4):1303-1310.
11. Bannantine JP, Stabel JR. Killing of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* within macrophages. *BMC Microbiol.* 2002;2(2):1-7.

12. Barajas JA, Bermúdez RM, Riemann H, Monge F, Gutierrez J, Gomez RA, Arriola J. Seroepidemiología de la paratuberculosis en ganado de lidia en el Estado de Tlaxcala. Memorias XIII Congreso Nacional de Buiatria; Agosto 1987; D.F., México 341-347.
13. Barclay R, Ratledge C. Iron-binding compounds of *Mycobacterium avium*, *M. intracellulare*, *M. scrofulaceum*, and mycobactin-dependent *M. paratuberculosis* and *M. avium*. Journal of Bacteriology. 1983;153(3):1138-1146.
14. Bauerfeind R, Benazzi S, Weiss R, Schliesser T, Willems H, Baljer G. Molecular characterization of *Mycobacterium paratuberculosis* isolates from sheep, goats, and cattle by hybridization with a DNA probe to insertion element IS900. J Clin Microbiol. 1996;34(7):1617-1621.
15. Beard PM, Rhind SM, Sinclair MC, Wildblood LA, Stevenson K, McKendrick IJ, Sharp JM, Jones DG. Modulation of $\gamma\delta$ T cells and CD1 in *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection. Vet Immunol Immunopathol. 2000;77(3-4):311-319.
16. Bendixen PH, Bloch B, Jorgensen JB. Lack of intracellular degradation of *Mycobacterium paratuberculosis* by bovine macrophages infected *in vitro* and *in vivo*: light microscopic and electron microscopic observations. Am J Vet Res. 1981;42(1):109-113.
17. Bull T, Hermon-Taylor J, Pavlik I, El-Zaatari F, Tizard M. Characterization of IS900 loci in *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and development of multiplex PCR typing. Microbiology-Reading. 2000;146(9):2185-2197.
18. Bull TJ, Sheridan JM, Martin H, Sumar N, Tizard M, Hermon-Taylor J. Further studies on the GS element. A novel mycobacterial insertion sequence (IS1612), inserted into an acetylase gene (*mpa*) in *Mycobacterium avium* subsp. *silvaticum* but not in *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. Vet Microbiol. 2000;77(3-4):453-463.
19. Burrells C, Clarke CJ, Colston A, Kay JM, Porter J, Little D, Sharp JM. A study of immunological responses of sheep clinically-affected with paratuberculosis (Johne's disease). The relationship of blood, mesenteric lymph node and intestinal lymphocyte responses to gross and microscopic pathology. Vet Immunol Immunopathol. 1998;66(3-4):343-358.
20. Bustamante J. Detección de anticuerpos a *Mycobacterium paratuberculosis* por medio de la prueba de fijación de complemento. Tesis de Licenciatura. México (México, D.F.): Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. 1974.
21. Cavaignac SM, White SJ, de Lisle GW, Collins DM. Construction and screening of *Mycobacterium paratuberculosis* insertional mutant libraries. Arch Microbiol. 2000;173(3):229-231.
22. Challans JA, Stevenson K, Reid HW, Sharp JM. A rapid method for the extraction and detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* from clinical specimens. Vet Rec. 1994;134(4):95-96.
23. Chávez G. Estudio comparativo de la respuesta de *M. avium* y *M. paratuberculosis* en corderos infectados experimentalmente. Tesis doctoral. España (Zaragoza): Facultad de Veterinaria. 1993.

24. Chávez G, Trigo FJ, Svastova P, Pavlik I. Identificación del polimorfismo genético de aislamientos de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* de caprinos del centro de México. *Veterinaria México*. 2004;35(1):75-82.
25. Chiodini RJ, Van Kruiningen HJ, Merkal RS. Ruminant paratuberculosis (Johne's disease): the current status and future prospects. *Cornell Vet*. 1984;74(3):218-262.
26. Choy E, Whittington RJ, Marsh I, Marshall J, Campbell MT. A method for purification and characterisation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from the intestinal mucosa of sheep with Johne's disease. *Vet. Microbiol*. 1998;64:51-60.
27. Clarke CJ, Little D. The pathology of ovine paratuberculosis: gross and histological changes in the intestine and other tissues. *J Comp Pathol*. 1996;114(4):419-437.
28. Clarke C, Patterson I, Armstrong K, Low J. Comparison of the absorbed ELISA and agar gel immunodiffusion test with clinicopathological findings in ovine clinical paratuberculosis. *Vet Rec*. 1996;139(25):618-621.
29. Clarke CJ. The pathology and pathogenesis of paratuberculosis in ruminants and other species. *J Comp Pathol*. 1997;116(3):217-261.
30. Clarke CJ. Paratuberculosis and molecular biology. *Vet J*. 1997;153(3):245-247.
31. Collins DM, Gabric DM, de Lisle GW. Identification of two groups of *Mycobacterium paratuberculosis* strains by restriction endonuclease analysis and DNA hybridization. *J Clin Microbiol*. 1990;28(7):1591-1596.
32. Collins DM, Cavaignac S, de Lisle GW. Use of four DNA insertion sequences to characterize strains of the *Mycobacterium avium* complex isolated from animals. *Mol Cell Probes*. 1997;11(5):373-380.
33. Collins DM, De Zoete M, Cavaignac SM. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* strains from cattle and sheep can be distinguished by a PCR test based on a novel DNA sequence difference. *J Clin Microbiol*. 2002;40(12):4760-4762.
34. Corpa JM, Garrido J, Garcia Marin JF, Pérez V. Classification of lesions observed in natural cases of paratuberculosis in goats. *J Comp Pathol*. 2000;122(4):255-265.
35. Corti S, Stephan R. Detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* specific IS900 insertion sequences in bulk-tank milk samples obtained from different regions throughout Switzerland. *BMC Microbiol*. 2002;2(15):1-7.
36. Cousins DV, Whittington R, Marsh I, Masters A, Evans RJ, Kluver P. Mycobacteria distinct from *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolated from the faeces of ruminants possess IS900-like sequences detectable by IS900 polymerase chain reaction: implications for diagnosis. *Mol Cell Probes*. 1999;14:431-442.
37. Cousins DV, Williams SN, Hope A, Eamens GJ. DNA fingerprinting of Australian isolates of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* using IS900 RFLP. *Aust Vet J*. 2000;78(3):184-190.

38. De Lucas J. Comparación de cuatro formas de diagnóstico de la paratuberculosis en caprinos. Tesis de Licenciatura. (Cuautitlán Izcalli, Estado de México): Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. 1984.
39. Dimareli-Malli Z, Sarris K. Comparison of DNA probe test and cultivation methods for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in caprine and ovine faeces. *Aust Vet J.* 2001;79(1):47-50.
40. Domínguez MC. Características anatomopatológicas, hallazgos bacteriológicos y respuesta inmune posteriores a un año de la inmunización de un rebaño caprino con antecedentes de paratuberculosis. Tesis de Maestría en Ciencias Veterinarias. México (México, D.F.): Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. 2000.
41. Doran T, Tizard M, Millar D, Ford J, Sumar N, Loughlin M, Hermon-Taylor J. IS900 targets translation initiation signals in *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* to facilitate expression of its *hcd* gene. *Microbiology Reading.* 1997;143(2):547-552.
42. Eishi Y, Suga M, Ishige I, Kobayashi D, Yamada T, Takemura T, Takizawa T, Koike M, Kudoh S, Costabel U, Guzman J, Rizzato G, Gambacorta M, du Bois R, Nicholson AG, Sharma OP, Ando M. Quantitative analysis of mycobacterial and propionibacterial DNA in lymph nodes of Japanese and European patients with sarcoidosis. *J Clin Microbiol.* 2002;40(1):198-204.
43. Ellingson JL, Stabel JR, Bishai WR, Frothingham R, Miller JM. Evaluation of the accuracy and reproducibility of a practical PCR panel assay for rapid detection and differentiation of *Mycobacterium avium* subspecies. *Mol Cell Probes.* 2000;14(3):153-161.
44. El-Zaatari FA, Naser SA, Markesich DC, Kalter DC, Engstand L, Graham DY. Identification of *Mycobacterium avium* complex in sarcoidosis. *J Clin Microbiol.* 1996;34(9):2240-2245.
45. El-Zaatari FA, Osato MS, Graham DY. Etiology of Crohn's disease: the role of *Mycobacterium avium paratuberculosis*. *Trends Mol Med.* 2001;7(6):247-252.
46. Englund S, Bolske G, Johansson KE. An IS900-like sequence found in a *Mycobacterium* sp. other than *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *FEMS Microbiol Lett.* 2002;209(2):267-271.
47. Feizabadi MM, Robertson ID, Hope A, Cousins DV, Hampson DJ. Differentiation of Australian isolates of *Mycobacterium paratuberculosis* using pulsed-field gel electrophoresis. *Aust Vet J.* 1997;75(12):887-889.
48. Frehel C, de Chastellier C, Lang T, Rastogi N. Evidence for inhibition of fusion of lysosomal and prelysosomal compartments with phagosomes in macrophages infected with pathogenic *Mycobacterium avium*. *Infection and immunity.* 1986;52(1):252-262.
49. Fujita H, Eishi Y, Ishige I, Saitoh K, Takizawa T, Arima T, Koike M. Quantitative analysis of bacterial DNA from *Mycobacteria* spp., *Bacteroides vulgatus*, and *Escherichia coli* in tissue samples from patients with inflammatory bowel diseases. *J Gastroenterol.* 2002;37(7):509-516.

50. Gao A, Mutharia L, Chen S, Rahn K, Odumeru J. Effect of pasteurization on survival of *Mycobacterium paratuberculosis* in milk. *J Dairy Sci.* 2002;85(12):3198-3205.
51. García JF, Pérez V, González J. La interacción bovino-bacteria y los mecanismos de enfermedad. *Bovis.* 2000;93:29-38.
52. Garibay ME. Prueba doble comparativa intradérmica a la tuberculina aviaria y mamífera para la identificación de reactores a *Mycobacterium paratuberculosis* en un hato de ovinos. Tesis de Licenciatura. México (México, D.F.): Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. 1974.
53. Garrido JM, Cortabarría N, Oguiza JA, Aduriz G, Juste RA. Use of a PCR method on fecal samples for diagnosis of sheep paratuberculosis. *Vet Microbiol.* 2000;77(3-4):379-386.
54. Garrido GM, Aduriz G, Juste A, Geijo MV. Los métodos de diagnóstico de la paratuberculosis en el ganado vacuno. *Bovis.* 2000;93:49-61.
55. Giese SB, Ahrens P. Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk from clinically affected cows by PCR and culture. *Vet Microbiol.* 2000;77(3-4):291-297.
56. Grant IR, Pope CM, O'Riordan LM, Ball HJ, Rowe MT. Improved detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk by immunomagnetic PCR. *Vet Microbiol.* 2000;77(3-4):369-378.
57. Grant IR, O'Riordan LM, Ball HJ, Rowe MT. Incidence of *Mycobacterium paratuberculosis* in raw sheep and goats' milk in England, Wales and Northern Ireland. *Vet Microbiol.* 2001;79(2):123-131.
58. Grant IR, Hitchings EI, McCartney A, Ferguson F, Rowe MT. Effect of commercial-scale high-temperature, short-time pasteurization on the viability of *Mycobacterium paratuberculosis* in naturally infected cows' milk. *Appl Environ Microbiol.* 2002;68(2):602-607.
59. Grant IR, Ball HJ, Rowe MT. Incidence of *Mycobacterium paratuberculosis* in bulk raw and commercially pasteurized cows' milk from approved dairy processing establishments in the United Kingdom. *Appl Environ Microbiol.* 2002;68(5):2428-2435.
60. Green E, Tizard M, Moss M, Thompson J, Winterbourne D, McFadden J, Hermon-Taylor J. Sequence and characteristics of IS900, an insertion element identified in a human Crohn's disease isolate of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Nucleic Acids Res.* 1989;17(22):9063-9073.
61. Greig A, Stevenson K, Henderson D, Pérez V, Hughes V, Pavlik I, Hines ME, McKendrick I, Sharp JM. Epidemiological study of paratuberculosis in wild rabbits in Scotland. *J Clin Microbiol.* 1999;37(6):1746-1751.
62. Gwozdz JM, Thompson KG, Murray A, Reichel MP, Manktelow BW, West DM. Comparison of three serological tests and an interferon- γ assay for the diagnosis of paratuberculosis in experimentally infected sheep. *Aust Vet J.* 2000;78(11):779-783.

63. Halldorsdottir S, Englund S, Nilsen SF, Olsaker I. Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* by buoyant density centrifugation, sequence capture PCR and dot blot hybridisation. *Vet Microbiol.* 2002;87(4):327-340.
64. Harris NB, Feng Z, Liu X, Cirillo SL, Cirillo JD, Barletta RG. Development of a transposon mutagenesis system for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *FEMS Microbiol Lett.* 1999;175(1):21-26.
65. Hermon-Taylor J, Bull T. Crohn's disease caused by *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*: a public health tragedy whose resolution is long overdue. *J Med Microbiol.* 2002;51(1):3-6.
66. Hernández VC. Ensayo de la inmunización subcutánea con una bacterina oleosa de *Mycobacterium paratuberculosis* en un rebaño ovino infectado naturalmente. Tesis de Maestría en Producción Animal. México (Cuautilán Izcalli, Estado de México): Facultad de Estudios Superiores Cuautilán. 1991.
67. Hulten K, Karttunen TJ, El-Zimaity HM, Naser SA, Almashhrawi A, Graham DY, El-Zaatari FA. *In situ* hybridization method for studies of cell wall deficient *M.paratuberculosis* in tissue samples. *Vet Microbiol.* 2000;77(3-4):513-518.
68. Hulten K, Karttunen TJ, El-Zimaity HM, Naser SA, Collins MT, Graham DY, El-Zaatari FA. Identification of cell wall deficient forms of *M. avium* subsp. *paratuberculosis* in paraffin embedded tissues from animals with Johne's disease by *in situ* hybridization. *J Microbiol Methods.* 2000;42(2):185-195.
69. Juste RA, Marco JC, Saez de Ocariz C, Aduriz JJ. Comparison of different media for the isolation of small ruminant strains of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Vet Microbiol.* 1991;28(4):385-390.
70. Juste RA, Garrido JM, Aduriz G. El agente causal de la paratuberculosis y su situación taxonómica. *Bovis.* 2000;93:13-28.
71. Klitgaard Nielsen K, Ahrens P. Putative *in vitro* expressed gene fragments unique to *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *FEMS Microbiol Lett.* 2002;214(2):199-203.
72. Koets AP, Rutten VP, de Boer M, Bakker D, Valentin-Weigand P, van Eden W. Differential changes in heat shock protein-, lipoarabinomannan-, and purified protein derivative-specific immunoglobulin G1 and G2 isotype responses during bovine *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection. *Infect Immun.* 2001;69(3):1492-1498.
73. Kunze ZM, Portaels F, McFadden JJ. Biologically distinct subtypes of *Mycobacterium avium* differ in possession of insertion sequence IS901. *J Clin Microbiol.* 1992;30(9):2366-2372.
74. Lane SJ; Marshall PS, Upton RJ, Ratledge C. Isolation and characterization of carboxymycobactins as the second extracellular siderophores in *Mycobacterium smegmatis*. *Biometals.* 1998;11(1):13-20.

75. Liu X, Feng Z, Harris N, Cirillo J, Bercovier H, Barletta R. Identification of a secreted superoxide dismutase in *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*. FEMS-Microbiology-Letters. 2001; 202(2):233-238.
76. Martínez EG. Hallazgos anatomopatológicos y su relación con los valores de densidad óptica de la prueba de ELISA en ovinos seropositivos a paratuberculosis en Martínez de la Torre, Veracruz. Tesis de Licenciatura. México (México, D.F.): Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. 2002.
77. Merkal RS, Curran BJ. Growth and metabolic characteristics of *Mycobacterium paratuberculosis*. Appl Microbiol. 1974;28(2):276-279.
78. Merkal RS, McCullough WG. A new mycobactin, mycobactin J, from *Mycobacterium paratuberculosis*. Current-Microbiology. 1982;7(6):333-335.
79. Mijns W, de Haas P, Rossau R, Van der Laan T, Rigouts L, Portaels F, van Soolingen D. Molecular evidence to support a proposal to reserve the designation *Mycobacterium avium* subsp. *avium* for bird-type isolates and '*M. avium* subsp. *hominissuis*' for the human/porcine type of *M. avium*. Int J Syst Evol Microbiol. 2002;52(Pt 5):1505-1518.
80. Morales H. Frecuencia de paratuberculosis en ganado de lidia en Tlaxcala. Tesis de Licenciatura. México (México, D.F.): Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. 1994.
81. Moreira AR, Paolicchi F, Morsella C, Zumarraga M, Cataldi A, Fabiana B, Alicia A, Piet O, van Soolingen D, Isabel RM. Distribution of IS900 restriction fragment length polymorphism types among animal *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolates from Argentina and Europe. Vet Microbiol. 1999;70(3-4):251-259.
82. Moss MT, Green EP, Tizard ML, Malik ZP, Hermon-Taylor J. Specific detection of *Mycobacterium paratuberculosis* by DNA hybridisation with a fragment of the insertion element IS900. Gut. 1991;32(4):395-398.
83. Muskens J, Bakker D, de Boer J, van Keulen L. Paratuberculosis in sheep: its possible role in the epidemiology of paratuberculosis in cattle. Vet Microbiol. 2001;78(2):101-109.
84. Naser S, Gillespie R, Naser N, El-Zaatari F. Effect of IS900 gene of *Mycobacterium paratuberculosis* on *Mycobacterium smegmatis*. Current-Microbiology. 1998;37(6):373-379.
85. Naser SA, Shafran I, Schwartz D, El-Zaatari F, Biggerstaff J. *In situ* identification of mycobacteria in Crohn's disease patient tissue using confocal scanning laser microscopy. Mol Cell Probes. 2002;16(1):41-48.
86. Olsen I, Reitan LJ, Holstad G, Wiker HG. Alkyl hydroperoxide reductases C and D are major antigens constitutively expressed by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. Infect Immun. 2000;68(2):801-808.
87. Oviedo GT. Ensayo de una bacterina oral de *Mycobacterium paratuberculosis* en un rebaño ovino infectado naturalmente. Tesis de Maestría en Producción Animal. México (Cuautitlán Izcalli, Estado de México): Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. 1991.

88. Paul TR, Beveridge TJ. Reevaluation of envelope profiles and cytoplasmic ultrastructure of mycobacteria processed by conventional embedding and freeze-substitution protocols. *Journal of bacteriology*. 1992;174(20):6508-6517.
89. Pavlik I, Bejckova L, Pavlas M, Rozsypalova Z, Koskova S. Characterization by restriction endonuclease analysis and DNA hybridization using IS900 of bovine, ovine, caprine and human dependent strains of *Mycobacterium paratuberculosis* isolated in various localities. *Vet Microbiol*. 1995;45(4):311-318.
90. Pavlik I, Horvathova A, Dvorska L, Bartl J, Svastova P, du Maine R, Rychlik I. Standardisation of restriction fragment length polymorphism analysis for *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *J Microbiol Methods*. 1999;38(1-2):155-167.
91. Pavlik I, Bartl J, Dvorska L, Svastova P, du Maine R, Machackova M, Yayo Ayele W, Horvathova A. Epidemiology of paratuberculosis in wild ruminants studied by restriction fragment length polymorphism in the Czech Republic during the period 1995-1998. *Vet Microbiol*. 2000;77(3-4):231-251.
92. Pearce LE, Truong HT, Crawford RA, Yates GF, Cavaignac S, de Lisle GW. Effect of turbulent-flow pasteurization on survival of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* added to raw milk. *Appl Environ Microbiol*. 2001;67(9):3964-3969.
93. Pérez V, Garcia-Marin JF, Badiola JJ. Description and classification of different types of lesion associated with natural paratuberculosis infection in sheep. *J Comp Pathol*. 1996;114(2):107-122.
94. Pérez V, Tellechea J, Badiola JJ, Gutierrez M, Garcia Marin JF. Relation between serologic response and pathologic findings in sheep with naturally acquired paratuberculosis. *Am J Vet Res*. 1997;58(8):799-803.
95. Pérez V, Tellechea J, Corpa JM, Gutierrez M, Garcia Marin JF. Relation between pathologic findings and cellular immune responses in sheep with naturally acquired paratuberculosis. *Am J Vet Res*. 1999;60(1):123-127.
96. Pérez V, Corpa JM, García Marín JF. El cuadro clínico y lesional de la paratuberculosis bovina. *Bovis*. 2000;93:39-47.
97. Pillai SR, Jayarao BM, Gummo JD, Hue EC, Tiwari D, Stabel JR, Whitlock RH. Identification and sub-typing of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and *Mycobacterium avium* subsp. *avium* by randomly amplified polymorphic DNA. *Vet Microbiol*. 2001;79(3):275-284.
98. Pradexis J. Determinación de la prevalencia de paratuberculosis en caprinos y ovinos sacrificados en cuatro rastros periféricos al D.F.. Tesis de Licenciatura. (Cuautitlán Izcalli, Estado de México): Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. 1985.
99. Ramírez C, Trigo E, Suárez F, Merkal R. Aislamiento e identificación de *Mycobacterium paratuberculosis* en México. *Técnica Pecuaria México*. 1979;36:74-75.
100. Ramírez C, Tenorio V, Valero G, Ramírez C, Trigo E, Merkal R. Presencia de anticuerpos contra *Mycobacterium paratuberculosis* en ovinos y caprinos. Reunión de Investigación Pecuaria en México. 1982.

101. Ratnamohan TN, Spencer TL. A technique for the purification of *Mycobacterium paratuberculosis* from the ileal mucosa of infected cattle. *Aust Vet J.* 1986;63(6):185-187.
102. Richards WD, Thoen CO. Effect of freezing on the viability of *Mycobacterium paratuberculosis* in bovine feces. *J Clin Microbiol.* 1977;6(4):392-395.
103. Richards WD. Effects of physical and chemical factors on the viability of *Mycobacterium paratuberculosis*. *J Clin Microbiol.* 1981;14(5):587-588.
104. Scheibl P, Gerlach GF. Differentiation of *Mycobacterium paratuberculosis* isolates by rDNA-spacer analysis and random amplified polymorphic DNA patterns. *Vet Microbiol.* 1997;51(2-3):151-158.
105. Sechi LA, Mura M, Tanda F, Lissia A, Solinas A, Fadda G, Zanetti S, Manuela M, Francesco T, Amelia L, Antonello S, Giovanni F, Stefania Z. Identification of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in biopsy specimens from patients with Crohn's disease identified by *in situ* hybridization. *J Clin Microbiol.* 2001;39(12):4514-4517.
106. Secott TE, Lin TL, Wu CC. Fibronectin attachment protein homologue mediates fibronectin binding by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Infect Immun.* 2001;69(4):2075-2082.
107. Secott TE, Lin TL, Wu CC. Fibronectin attachment protein is necessary for efficient attachment and invasion of epithelial cells by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Infect Immun.* 2002;70(5):2670-2675.
108. Shulaw W, Bech-Nielsen S, Rings D, Getzy D, Woodruff T. Serodiagnosis of paratuberculosis in sheep by use of agar gel immunodiffusion. *Am J Vet Res.* 1993;54(1):13-19.
109. Sigurdardottir OG, Press CM, Saxegaard F, Evensen O. Bacterial isolation, immunological response, and histopathological lesions during the early subclinical phase of experimental infection of goat kids with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Vet Pathol.* 1999;36(6):542-550.
110. Sigurdardottir OG, Press CM, Evensen O. Uptake of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* through the distal small intestinal mucosa in goats: an ultrastructural study. *Vet Pathol.* 2001;38(2):184-189.
111. Spahr U, Schafroth K. Fate of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Swiss hard and semihard cheese manufactured from raw milk. *Appl Environ Microbiol.* 2001;67(9):4199-4205.
112. Sritharan M. Iron as a candidate in virulence and pathogenesis in mycobacteria and other microorganisms. *World J of Microbiology & Biotechnology.* 2000;16:769-780.
113. Stabel JR. Transitions in immune responses to *Mycobacterium paratuberculosis*. *Vet Microbiol.* 2000;77(3-4):465-473.
114. Stabel JR. Johne's disease and milk: do consumers need to worry? *J Dairy Sci.* 2000;83(7):1659-1663.

115. Stabel JR. On-farm batch pasteurization destroys *Mycobacterium paratuberculosis* in waste milk. *J Dairy Sci.* 2001;84(2):524-527.
116. Steadham EM, Martin BM, Thoen CO. Production of a *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* purified protein derivative (PPD) and evaluation of potency in guinea pigs. *Biologicals.* 2002;30(2):93-95.
117. Stevenson K, Sharp JM. The contribution of molecular biology to *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* research. *Vet J.* 1997;153(3):269-286.
118. Stevenson K, Hughes VM, de Juan L, Inglis NF, Wright F, Sharp JM. Molecular characterization of pigmented and nonpigmented isolates of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *J Clin Microbiol.* 2002;40(5):1798-1804.
119. Stratmann J, Strommenger B, Stevenson K, Gerlach GF. Development of a peptide-mediated capture PCR for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk. *J Clin Microbiol.* 2002;40(11):4244-4250.
120. Strommenger B, Stevenson K, Gerlach GF. Isolation and diagnostic potential of IS*Mav2*, a novel insertion sequence-like element from *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *FEMS Microbiol Lett.* 2001;196(1):31-37.
121. Takewaki S, Okuzumi K, Manabe I, Tanimura M, Miyamura K, Nakahara K, Yazaki Y, Ohkubo A, Nagai R. Nucleotide sequence comparison of the mycobacterial *dnaJ* gene and PCR-restriction fragment length polymorphism analysis for identification of mycobacterial species. *Int J Syst Bacteriol.* 1994;44(1):159-166.
122. Thorel MF. Review of the occurrence of mycobactin dependence among mycobacteria species. *Ann Rech Vet.* 1984;15(3):405-409.
123. Thorel MF, Krichevsky M, Levy-Frebault VV. Numerical taxonomy of mycobactin-dependent mycobacteria, emended description of *Mycobacterium avium*, and description of *Mycobacterium avium* subsp. *avium* subsp. nov., *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* subsp. nov., and *Mycobacterium avium* subsp. *silvaticum* subsp. nov. *Int J Syst Bacteriol.* 1990;40(3):254-260.
124. Thoresen OF, Olsaker I. Distribution and hybridization patterns of the insertion element IS900 in clinical isolates of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Vet Microbiol.* 1994;40(3-4):293-303.
125. Tizard M, Bull T, Millar D, Doran T, Martin H, Sumar N, Ford J, Hermon-Taylor J. A low G+C content genetic island in *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and *M. avium* subsp. *silvaticum* with homologous genes in *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiology.* 1998;144:3413-3423.
126. Tooker BC, Burton JL, Coussens PM. Survival tactics of *M. paratuberculosis* in bovine macrophage cells. *Vet Immunol Immunopathol.* 2002;87(3-4):429-437.
127. Torres E. Hallazgos anatomopatológicos tempranos en cabritos inoculados experimentalmente por vía oral con *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. Tesis de Licenciatura. México (México, D.F.): Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. 2001.

128. Unzueta J. Contribución al estudio de la enteritis paratuberculosa bovina en México. Tesis licenciatura. México (México, D.F.): Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. 1936.
129. Vélez M, Chávez G, Suárez F, Collins MT. Modification of a commercial ELISA kit for diagnosis of paratuberculosis in goats. Proceedings of the 5th International Colloquium on Paratuberculosis. Madison, WS, USA. 1995: 296-298.
130. Vélez ME. Comparación de diferentes técnicas de diagnóstico en paratuberculosis caprina (*Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*). Tesis de Maestría en Ciencias Veterinarias. México (México, D.F.): Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. 1998.
131. Victor TC, Jordaan AM, Van Schalkwyk EJ, Coetzee GJ, Van Helden PD. Strain-specific variation in the *dnaJ* gene of mycobacteria. J Med Microbiol. 1996;44(5):332-339.
132. Whipple D, Kapke P, Vary C. Identification of restriction fragment length polymorphisms in DNA from *Mycobacterium paratuberculosis*. J Clin Microbiol. 1990;28(11):2561-2564.
133. Whittington RJ, Reddacliff LA, Marsh I, McAllister S, Saunders V. Temporal patterns and quantification of excretion of *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* in sheep with Johne's disease. Aust Vet J. 2000;78(1):34-37.
134. Whittington RJ, Hope AF, Marshall DJ, Taragel CA, Marsh I. 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. J Clin Microbiol. 2000;38(9):3240-3248.
135. Whittington RJ, Taragel CA, Ottaway S, Marsh I, Seaman J, Fridriksdottir V. Molecular epidemiological confirmation and circumstances of occurrence of sheep (S) strains of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in cases of paratuberculosis in cattle in Australia and sheep and cattle in Iceland. Vet Microbiol. 2001;79(4):311-322.
136. Whittington RJ, Marsh IB, Whitlock RH. Typing of IS1311 polymorphisms confirms that bison (*Bison bison*) with paratuberculosis in Montana are infected with a strain of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* distinct from that occurring in cattle and other domesticated livestock. Mol Cell Probes. 2001;15(3):139-145.
137. Zwadyk P Jr, Down JA, Myers N, Dey MS. Rendering of mycobacteria safe for molecular diagnostic studies and development of a lysis method for strand displacement amplification and PCR. J Clin Microbiol. 1994;32(9):2140-2146.

Anexos

Anexo 1: Preparación del gel para IDGA

REACTIVOS	CANTIDADES
• PBS	
NaCl (Sigma,Mo,USA)	8 g
KCl (Sigma,Mo,USA)	0.2 g
Fosfato dibásico de sodio (Na_2HPO_4) (Baker,Edo Mex,Mex)	1.44 g
Fosfato monobásico de potasio (KH_2PO_4) (Baker,Edo Mex,Mex)	0.24 g
Agua destilada	c.b.p. 1 litro
Ajustar el pH a 7.4	
• Agarosa (Gibco,NY,USA)	10 g
• Antígeno protoplásmico	4 mg/ml
TÉCNICA	
Añadir al PBS la agarosa para preparar una solución de agarosa 1% y calentar hasta su perfecta dilución. Verter 10-12 ml de la solución en placas de petri de 10 cm de diámetro evitando la formación de burbujas de aire. Dejar solidificar la agarosa a T.A.	

Anexo 2: Reactivos empleados en la realización de la técnica de ELISA

REACTIVOS	CANTIDADES
• Buffer Carbonato	
Bicarbonato sódico (Na_2CO_3) (Baker, Edo Mex, Mex)	5.3 g
Agua destilada	1000 ml
Ajustar el pH a 9.6	
• Suspensión de <i>M. phlei</i>	
<i>M. phlei</i>	5 g
Solución salina (NaCl al 8.5%)	1000 ml
• Buffer citrato 0.05 M	
Solución A:	
Acido cítrico monohidratado ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$) (Baker, Edo Mex, Mex)	22.97 g
Agua destilada	1000 ml
Solución B	
Citrato sódico tribásico ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (Baker, Edo Mex, Mex)	29.41 g
Agua destilada	1000 ml
Mezclar 600 ml de la solución A + 479 ml de la solución B, agregando agua destilada cbp 2 l.	
Ajustar el pH a 4	
• Antígeno	
Antígeno PPA-3	0.04 mg
Buffer carbonato	1 ml
• PBS-TG (Phosphate Buffered Saline-Tween Gelatine)	
PBS (ver Anexo 1)	1000 ml
Ajustar el pH a 7.4	
Tween 80 (Hycel, Jal, Mex)	0.5 ml
Esterilizar en autoclave a 121°C durante 25 mn	
Gelatina	1 g
• Sustrato ABTS	
ABTS (Sigma, Mo, USA)	5.48 g
Buffer citrato	50 ml
Añadir 19 μl de solución 1/25 de H_2O_2 (10 μl de H_2O_2 de 30% v/v en 120 μl de agua destilada)	

Anexo 3: Soluciones para la extracción del ADN.

- **PBS/Tween 80 (0.5 g/l)**

0.100 g de Tween 80 (Hycel,Jal,Mex) en 190 ml de PBS (ver Anexo 1). Calentar la solución para disolver el Tween y aforar a 200 ml.

- **Buffer TE 10x**

100 mM Tris(Gibco,NY,USA)/HCl (Fermont,NL,USA), pH 8.0

10 mM EDTA (Sigma,Mo,USA)

Disolver en agua destilada. Esterilizar y almacenar a T.A. por no más de un año.

- **Buffer TE 1x**

Agregar 1 volumen de buffer TE 10x a 9 volúmenes de agua destilada. Esterilizar y almacenar a T.A. ambiente por menos de un año.

- **TE 1x/Tween 20 (0.5%)**

500 µl de Tween 20 (Sigma,Mo,USA) en 100 ml de TE 1x. Calentar la solución para disolver el Tween.

- **Solución de lisozima**

100 mg de lisozima (Sigma,Mo,USA)/ml de agua destilada.

Almacenar en pequeñas alíquotas a -20°C por no más de un año.

- **SDS al 10%**

10 g de SDS (Sigma,Mo,USA)/100 ml de agua destilada.

Disolver calentando a 65°C por 20 min. No esterilizar. Almacenar a T.A. por no más de un mes.

- **Proteínasa K**

20 mg de proteínasa K (Roche,Mannheim,Germany)/ml de agua destilada.

Almacenar en pequeñas alíquotas a -20°C por no más de un año.

- **NaCl 5 M**

29.2 g de NaCl (Sigma,Mo,USA)/100 ml de agua destilada.

Esterilizar y almacenar a T.A. por menos de un año.

- **Solución CTAB/NaCl**

Disolver 4.1 g de NaCl (Sigma,Mo,USA) en 80 ml de agua destilada. Al mismo tiempo que se mezcla, agregar 10 g de CTAB (USB,Ohio,USA). Si es necesario calentar la solución a 65°C. Ajustar el volumen a 100 ml con agua destilada. Almacenar a T.A. por no más de 6 meses.

- **24:1 cloroformo/alcohol isoamílico**

Mezclar 24 volúmenes de cloroformo (Sigma,Mo,USA) con un volumen de alcohol isoamílico (Sigma,Mo,USA). Almacenar a T.A. por no más de un año.

- **25:24:1 fenol/cloroformo/alcohol isoamílico**

Mezclar 1 volumen de fenol (Sigma,Mo,USA) con un volumen de 24:1 cloroformo/alcohol isoamílico. Almacenar a T.A. por no más de un año.

- **Isopropanol** (Sigma,Mo,USA)

Almacenar a T.A. por no más de un año.

- **Etanol al 70%** (Merck,Edo Mex,Mex)

Almacenar a T.A. por no más de un año.

- **Buffer de carga** (concentración final)

0.25% de azul de bromofenol

0.25% xileno cianol

30% glicerol en agua

1mM de EDTA

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

Anexo 4: Soluciones para el RFLP.

- **Buffer TBE 10x**

Tris	60.5g
Acido Bórico	30.85g
EDTA-Na ₄ 2H ₂ O	4.16g

Disolver en agua destilada y aforar a 1 litro.

- **Buffer TBE 1x**

Agregar 1 volumen de buffer TBE 10x a 9 volúmenes de agua destilada.

- **0.5M EDTA**

EDTA (MW 416.2)	10.41g
-----------------	--------

Disolver en agua destilada y aforar a 500 ml.

- **0.25 M HCL**

Diluir 11 ml de HCL concentrado (35%) en 489 ml de agua destilada.

- **0.4 M NaOH**

Disolver 9.99 g de NaOH en agua destilada y aforar a 500 ml.

- **Buffer SSC 20x (3M NaCl y 0.3M Citrato de Na)**

NaCl	175.3g
Citrato de Na	88.2g

Disolver en agua destilada y aforar a 1 litro.

- **SDS 0.1%/1x SSC**

SSC 10x	75 ml
SDS 10%	7.5 ml

Aforar a 750 ml de agua destilada.

Anexo 5: Posición de los iniciadores en la IS900.

1 tccttacctt tcttgaaggg tgttcggggc cgtcggcctt aggcttcgaa ttgccaggg
61 acgtcgggta tggtttcat gtggttgctg tgttgatgg ccgaaggaga ttggccgcc
121 gggtccccgc gacgactcga ccgctaattg agagatgcga ttggatcgct gtgtaaggac
181 acgtcggcgt ggtcgtctgc tgggttgatc tggacaatga cggttacgga ggtggttg
241 gcacaacctg tctggggcggg cgtggacgcc ggtaaggccg accattactg catggttatt
301 aacgacgacg cgcagcgatt gctctcgcag cgggtggcca acgacgagge cgcgctgctg
361 gagttgattg cggcggtgac gacgttgccc gatggaggcg aggtcacgtg ggcgatcgac
421 ctcaacgccg gcggcgccgc gttgctgacg gccttgetca tcgctgcccg gcagcggctg
481 ctttatattc ccgggcgcac ggtccatcac gccgcgggta gttaccgccc cgaaggcaag
541 accgacgccg aagacgctgc gatcatcgcc gatcaggccc ggatgcgccg cacttgacg
601 cctctgcgcg ccggcgatga catcgcagtc gagctgcgca tcctgaccag ccgacgttcc
661 gatctggtgg ctgatcggac ccgggcgacg gaaccgaatg cgcgccagc tgctggaata
721 ctttcggcgc tggaacgcgc cttcgactac aacaagagcc gtgccgctg gatcctgctt
781 actggctacc aaactcccga cgcgctgcgc agcgcgggtg gcgctcgagt agccgcgttc
841 ttgcgtaaac gcaaggcccg caacgccgat accgtcgcag ccaccgctg gcaggccgct
901 aacgcccaac acagcatcgt gcccggccaa caactggcgg cactgtggtt gcccgcctg
961 gccaaaggag tgatggccct cgacaccgaa atcggcgaca ccgacgcgat gatcgaggag
1021 cgatttcgcc gccaccgcca cgcgaaatc atcctgagca tgcccggatt cggcgtcatc
1081 ctgggcgctg agttcctcgc cgcaccgccc ggggacatgg ccgattcgc ctccgccgac
1141 cgctcgcccg gcgtcgcccg cctggcgcgg gtaccacgag attccggccc catcagcgga
1201 aacctcaaac gccccgacg ctacgaccgg cgctgctgc gcgctgcta cctgtcggcc
1261 ttggtcagca tccgcaccga ccctcctcgc cgcacctact acgaccgaaa acgcaccgaa
1321 ggaaaacgcc acaccaagc cgtcctcgcg ctggcccgcc gccgctcaa cgtcctgtgg
1381 gccatgctgc gcgaccagc tgtctaccac cccgcaacca ctaccgcccg ggttgacaa
1441 cgtcattgag aat

MORFEUS 1:

IS900 1/2F (15-41): 5'- GAA GGG TGT TCG GGG CCG TCG CTT AGG -3'

IS900 1/2R (401-427): 5'- GGC GTT GAG GTC GAT CGC CCA CGT GAC -3'

Tamaño del producto esperado: 412 pb

MORFEUS 2:

IS900 2/2F (1006-1025): 5'- GAT GAT CGA GGA GCG ATT TC -3'

IS900 2/2R (1290-1309): 5'- TTT TCG GTC GTA GTA GGT GC -3'

Tamaño del producto esperado: 303 pb.