



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

MAESTRIA EN CIENCIAS DE LA DE LA PRODUCCIÓN  
Y DE LA SALUD ANIMAL

Detección de *Mycobacterium avium paratuberculosis* en leche de  
vacas y cabras seropositivas del centro de México

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRA EN CIENCIAS  
P R E S E N T A:

Lucía del Carmen Favila Humara

Tutor: Gilberto Chávez Gris

Comité tutorial: Clara Espitia Pinzón  
Antonio Verdugo Rodríguez



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.

## **Dedicatoria**

Con todo mi amor a mis padres, Lucía Edith Humara y José Rafael Favila Ángeles, por quererme como lo hacen, por animarme a cumplir siempre mis objetivos y por muchas otras cosas que no se pueden resumir en tres líneas. Porque espero que se sientan orgullosos de mí todos los días.

A mi hermano y mejor amigo Rafael Favila Humara por escucharme, enseñarme la verdadera importancia de este trabajo y por si fuera poco por alegrarme la vida con su mera presencia. Por incrementar aún más mi dicha y familia incorporando a Patricia Alvarado y a la pequeñita Ethiel.

A mis tíos José Luis Favila y Alma Humara, por hacerme sentir una hija más y por estar siempre para mí, qué más les puedo decir saben que los adoro.

A mis amigos y amigas...

## **Agradecimientos**

Al Dr. Rigoberto Hernández Castro por su invaluable guía y ayuda durante el desarrollo de todo el proyecto, por exhortarme siempre a ser mejor profesionalista y por enseñarme con el ejemplo. Gracias al maestro y amigo.

Al Departamento de Microbiología e Inmunología, particularmente a los Doctores Francisco Suárez Güemes y José Ángel Gutiérrez Pabello, responsables del Laboratorio de Tuberculosis y Brucelosis, quienes no sólo me abrieron las puertas de su Laboratorio y me facilitaron el equipo indispensable para el desarrollo de mi estudio, sino que prácticamente me adoptaron en su equipo de trabajo.

A Uziel Castillo Velázquez y Karla Yuliett Méndez González por acompañarme y prácticamente socorrerme durante los muestreos y el trabajo diario. De verdad, sin ellos todavía estaría correteando vacas o encerrada en bioseguridad. A Erika M. Carrillo Casas porque además de asesorarme en la estandarización de las pruebas hasta fungió de correctora de estilo para este escrito. Gracias por impulsarme y enseñarme que lo puedo hacer mejor. A Rosalía Ávalos Téllez, Irasema Yela Miranda, Alma González Rodríguez, Víctor Manuel Campuzano Ocampo, Carlos Julio Jaramillo Arango, Elihú Aranday Cortés y Pablo Vera Sánchez, porque siempre se dieron un tiempo para ayudarme y alegraron mi estancia. Fue un privilegio trabajar con todos ustedes, ojalá que se repita.

Al Departamento de Patología por permitirme realizar las pruebas serológicas dentro de sus instalaciones. En especial agradezco al Técnico Miguel Ángel Martínez Ramírez y al fotógrafo Jaime Eugenio Córdoba por su colaboración y amistad.

Al comité tutorial y a los miembros del jurado, por su tiempo y sus valiosas aportaciones para el mejoramiento de este escrito.

Al Dr. Javier Gutiérrez Molotla por su apoyo para el muestreo de la Granja “Y”.

A los proyectos PAPIIT IN208203-1 y IN208203-2, así como al proyecto TAMU que financiaron este estudio, así como al CONACYT que me apoyó con una beca durante el desarrollo de mi maestría.

# ÍNDICE

## 1 RESUMEN

### 1.1 ABSTRACT

## 2 INTRODUCCIÓN

### 2.1 PRODUCCIÓN LÁCTEA NACIONAL

2.1.1 *Producción de leche de vaca en México*

2.1.2 *Producción de leche de cabra en México*

### 2.2 LA LECHE COMO FUENTE DE INFECCIÓN

2.2.1 *Consumo de leche no pasteurizada*

2.2.2 *Resistencia de Mycobacterium avium paratuberculosis a la pasteurización*

### 2.3 PARATUBERCULOSIS

2.3.1 *Definición*

2.3.2 *Etiología de la paratuberculosis*

2.3.3 *Epizootiología*

2.3.4 *Panorama de la paratuberculosis en México*

2.3.5 *Especies susceptibles*

2.3.6 *Transmisión*

2.3.7 *Infección prenatal*

2.3.8 *Infección postnatal*

2.3.9 *Lesiones*

2.3.10 *Signos clínicos*

2.3.11 *Diagnóstico*

2.3.12 *Impacto económico de la Paratuberculosis*

### 2.4 ENFERMEDAD DE CROHN

2.4.1 *Definición*

2.4.2 *Etiología de la Enfermedad de Crohn*

2.4.3 *Epidemiología*

2.4.4 *Enfermedad de Crohn en México*

2.4.5 *Posible vía de transmisión a los humanos*

## 3 OBJETIVOS

### 3.1 OBJETIVO GENERAL

### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

## 4 HIPÓTESIS

## 5 MATERIAL Y MÉTODOS

### 5.1 ORIGEN Y CARACTERÍSTICAS DE LAS MUESTRAS

### 5.2 DESCRIPCIÓN DEL ORIGEN DE LAS MUESTRAS BOVINAS

5.2.1 *Complejo Agropecuario Industrial de Tizayuca, Hidalgo (CAIT)*

5.2.2 *Centro de Enseñanza, Práctica e Investigación en Producción y Salud Animal (CEPIPSA).*

5.2.3 *Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Animal en Altiplano (CEIEPAA)*

### 5.3 DESCRIPCIÓN DEL ORIGEN DE LAS MUESTRAS CAPRINAS

5.3.1 *Granja "Y"*

5.3.2 *Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Animal en Altiplano (CEIEPAA)*

5.3.3 *Centro de Enseñanza, Práctica e Investigación en Producción y Salud Animal (CEPIPSA).*

### 5.4 PROCEDIMIENTO PARA LA COLECCIÓN Y TRANSPORTE DE LA TOTALIDAD DE LAS MUESTRAS

### 5.5 ELISA

### 5.6 AISLAMIENTO BACTERIANO A PARTIR DE HECES DE VACAS Y CABRAS

### 5.7 AISLAMIENTO BACTERIANO A PARTIR DE LECHE DE VACAS Y CABRAS

### 5.8 IDENTIFICACIÓN DE MAP

### 5.9 EXTRACCIÓN DE ADN MICOBACTERIANO

### 5.10 SEPARACIÓN INMUNOMAGNÉTICA

5.10.1 *Producción de anticuerpos policlonales anti-Map en conejo*

5.10.2 *Recubrimiento de las perlas inmunomagnéticas*

- 5.10.3 *Separación inmunomagnética (IMS):*
- 5.11 EXTRACCIÓN DE ADN MICOBACTERIANO POST IMS
- 5.12 DETERMINACIÓN DE LA SENSIBILIDAD DE LA PRUEBA DE PCR IS900 Y PCR TIPO ESPECÍFICO
- 5.13 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)
- 5.14 PCR TIPO ESPECÍFICO

## **6 RESULTADOS**

- 6.1 SENSIBILIDAD DE LA PRUEBA DE PCR IS900 Y PCR TIPO ESPECÍFICO
- 6.2 PCR IS900
  - 6.2.1 *PCR a partir de extracciones de ADN de leche de vaca*
  - 6.2.2 *PCR a partir de extracciones de ADN de leche de cabra*
  - 6.2.3 *PCR a partir de extracciones de ADN de leche de los tanques y botes de almacenamiento de leche no pasteurizada*
- 6.3 PCR-IMS
- 6.4 PCR TIPO ESPECÍFICO
  - 6.4.1 *PCR tipo específico a partir de extracciones de ADN de leche de vaca*
  - 6.4.2 *PCR a partir de extracciones de ADN de leche de cabra*
  - 6.4.3 *PCR tipo específico a partir de extracciones de ADN de leche de los tanques y botes de almacenamiento de leche no pasteurizada*
- 6.5 FRECUENCIA DE TIPOS DE *MAP* IDENTIFICADOS
- 6.6 PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS POLICLONALES ANTI*MAP* EN CONEJO
- 6.7 AISLAMIENTO BACTERIANO A PARTIR DE LECHE Y HECES BOVINAS
- 6.8 AISLAMIENTO BACTERIANO A PARTIR DE LECHE Y HECES CAPRINAS
- 6.9 CONTAMINACIÓN DE LOS CULTIVOS
- 6.10 AISLAMIENTO BACTERIANO A PARTIR DE LECHE DE LOS TANQUES DE ALMACENAMIENTO DEL CAIT

## **7 DISCUSIÓN**

## **8 CONCLUSIONES**

## **9 ABREVIATURAS Y SIGLAS EMPLEADAS**

## **10 ANEXOS**

- 10.1 ANEXO 1. REACTIVOS REQUERIDOS PARA EL DESARROLLO DE LA PRUEBA DE ELISA
- 10.2 ANEXO 2. PREPARACIÓN DEL MEDIO DE YEMA DE HUEVO DE HERROLD CON MICOBACTINA
- 10.3 ANEXO 3. PREPARACIÓN DEL MEDIO DE YEMA DE HUEVO DE HERROLD SIN MICOBACTINA
- 10.4 ANEXO 5. PREPARACIÓN DEL MEDIO LÖWENSTEIN JENSEN CON Y SIN MICOBACTINA
- 10.5 ANEXO 6. TINCIÓN DE ZIEHL NEELSEN

## **11 REFERENCIAS**

## ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS

Cuadro 1. Correspondencia de la nomenclatura usada en las diferentes técnicas moleculares para la caracterización de las cepas *Map*

Cuadro 2. Situación de la paratuberculosis en los diferentes sectores pecuarios de los principales países importadores de ganado a México

Cuadro 3. Tamaño de muestra y origen de las muestras analizadas

Cuadro 4. Proporción de animales positivos en cada prueba.

Figura 1. Comportamiento de la producción de leche bovina.

Figura 2. Porcentaje de aportación al sector lechero bovino nacional, durante 2006.

Figura 3. Comportamiento de la producción de leche caprina en años recientes.

Figura 4. Porcentaje de aportación al sector lechero caprino nacional, durante 2006.

Figura 5. Focos y casos de paratuberculosis reportados oficialmente.

Figura 6. Sensibilidad de la prueba de PCR IS900.

Figura 7. Sensibilidad de la prueba de PCR tipo específico.

Figura 8. Producto de la amplificación del PCR a partir de extracciones de ADN de leche de vaca.

Figura 9. Producto de la amplificación del PCR a partir de extracciones de ADN de leche de vaca.

Figura 10. Producto de la amplificación del PCR a partir de extracciones de ADN de leche de vaca.

Figura 11. Producto de la amplificación del PCR a partir de extracciones de ADN de leche de cabra.

Figura 12. Producto de la amplificación del PCR a partir de extracciones de ADN de leche de cabra.

Figura 13. Producto de la amplificación del PCR a partir de extracciones de ADN de leche de los tanques de almacenamiento de leche de vaca.

Figura 14. Producto de la amplificación del PCR a partir de extracciones de ADN de leche de los botes de almacenamiento de leche de cabra y vaca.

Figura 15. PCR-IMS a partir de muestras de leche individuales.

Figura 16. Producto de la amplificación del PCR tipo específico a partir de extracciones de ADN de leche de vaca..

Figura 17. Producto de la amplificación del PCR tipo específico a partir de extracciones de ADN de leche de vaca.

Figura 18. Producto de la amplificación del PCR tipo específico a partir de extracciones de ADN de leche de cabra.

Figura 19. Producto de la amplificación del PCR tipo específico a partir de extracciones de ADN de leche de los tanques de almacenamiento de leche no pasteurizada.

Figura 20. Producto de la amplificación del PCR tipo específico a partir de extracciones de ADN de leche de los tanques de almacenamiento de leche no pasteurizada.

Figura 21. Proporción de tipos de *Map* identificados en muestras individuales de leche de vaca

Figura 22. Proporción de tipos de *Map* identificados en muestras colectivas de leche bovina

Figura 23. Proporción de tipos de *Map* identificados en muestras individuales de leche de cabra

Figura 24. Proporción de tipos de *Map* identificados en muestras colectivas de leche caprina

Figura 27. Aislamiento de *Map*, medio HEYM con micobactina, 10 meses de incubación.

Figura 28. Tubos de medio de cultivo HEYM con y sin micobactina contaminados.

## RESUMEN

La paratuberculosis o enfermedad de Johne, es una enfermedad infecciosa de curso crónico causada por *Mycobacterium avium paratuberculosis* (*Map*) que afecta principalmente a los rumiantes domésticos generando importantes pérdidas económicas a la industria lechera mundial. Por otra parte, se sugiere que esta micobacteria podría estar relacionada con la enfermedad de Crohn en humanos, por lo cual otros países han impulsado la creación de programas de control voluntarios de la enfermedad e incluso han promulgado leyes que prohíben el ingreso al mercado la leche de los hatos infectados. A pesar de ser una enfermedad endémica de México, se desconoce su prevalencia y hasta el momento no existen programas para su control. En este estudio, por medio de PCR IS900 se detectó la presencia de *Map* en el 100% de las muestras de leche de vacas (10/10) y cabras (8/8) previamente identificadas como seropositivas por medio de ELISA indirecta. Asimismo, por medio de PCR se demostró la presencia de esta micobacteria en el 100% de las muestras de leche de los tanques y botes de almacenamiento de leche no pasteurizada, de los cuales 14 contenían leche de vaca y 3 leche de cabra. Por medio de PCR tipo específico se detectó que el 56.25% de las muestras de leche de vaca incluían cepas de los tipos “C” y “S”, mientras que el 43.75% restante presentaban cepas del tipo “C”. En el caso de las muestras de leche de cabra el 63.63% incluía cepas del tipo “C” y 36.36% de los tipos “C” y “S”. El límite mínimo de detección del PCR IS900 se estableció en  $1 \times 10^2$  ufc/10 ml de leche, mientras que el del PCR tipo específico se estimó en  $1 \times 10^0$  ufc/10 ml de leche. El protocolo de separación inmunomagnética y PCR sólo permitió la detección del 55.5% de las muestras PCR positivas, esta disminución en la sensibilidad del protocolo se atribuye al proceso de extracción del ADN. Los resultados permiten recomendar el empleo del protocolo de PCR sin IMS con el fin de reducir el tiempo de procesamiento de las muestras así como el costo. En este estudio no se logró el aislamiento bacteriológico de *Map* a partir de las muestras de leche de vacas y cabras, mientras que tan sólo 30% 3/10 de los cultivos provenientes de heces de vaca fueron positivos. La baja proporción de aislamientos puede explicarse en parte por la contaminación observada en los tubos. En el caso de las muestras de leche de vaca de los tanques de almacenamiento, se logró la identificación de colonias de *Map* en el 83.33% de las muestras analizadas (10/12) cuando se sustituyó la mezcla de antibióticos en el medio de cultivo. A pesar del pequeño número de animales muestreados y de tratarse de un estudio dirigido, la alta frecuencia de paratuberculosis identificada en la leche de vacas y cabras permite sugerir que el consumo de leche no pasteurizada constituye un riesgo potencial de infección con este microorganismo.

Palabras clave: *Mycobacterium*, paratuberculosis, PCR, IS900.

## ABSTRACT

Paratuberculosis or Johne's disease is a chronic infectious disease caused by *Mycobacterium avium paratuberculosis* (*Map*), affecting mainly domestic and wild ruminants and generating important economic losses to the dairy industry worldwide. Moreover, this mycobacteria might be implicated in Crohn's disease in humans, reason why other countries have created voluntary disease control programs and even promoted laws to ensure that milk from herds with paratuberculosis cannot enter the human food chain. In Mexico, it is an enzootic disease but at the moment its prevalence is unknown and no control programs have been applied. In this study, *Map* has been detected by PCR IS900 in 10/10 (100%) of the cow's milk samples as well as in the milk of 8/8 (100%) goats, all previously detected as seropositives by indirect ELISA. Furthermore, *Map* genome was detected by PCR in 100% of the raw tank milk samples from 14 bovine and 3 caprine herds. A PCR type specific confirm those findings and also revealed that 56.25% of the cow's milk samples contained strains from the "C" and "S" types, while the remaining 43.75% showed only "C" type strains. While 63.63% of the goat's milk samples included both "C" and "S" type strains and 36.36% only type "C" strains. The minimum detection limit of the PCR IS900 was established in  $1 \times 10^2$  cfu/10 ml of milk while the minimum, detection limit of PCR type specific was  $1 \times 10^0$  cfu/10 ml of milk. Immunomagnetic separation followed by PCR IS900 only was able to detect the 55.55% of the PCR positive samples, the low sensitivity of this protocol can be explained by the DNA extraction protocol. We recommend the employ of PCR without immunomagnetic separation in order to reduce sample's processing time as well as economic costs. Bacterial isolation from cow's and goat's milk samples was unsuccessful and only 30% (3/10) of the isolations from cow's faecal samples were positive. The low proportion of isolation was attributed to bacterial overgrowth. When the antibiotic mix in the culture media was replaced, the bacterial isolation was positive in 83.33% (10/12) of the bovine raw tank milk samples. The high frequency of paratuberculosis detected in cow's and goat's milk lead us to suggest that raw milk ingestion is an important potential risk for *Map* infection.

Key words: *Mycobacterium*, paratuberculosis, PCR, IS900.

## INTRODUCCIÓN

### Producción láctea nacional

#### Producción de leche de vaca en México

De acuerdo con el Sistema de Información y Estadística Agroalimentaria y Pesquera (SIAP), en el año 2005 la producción de leche de vaca a nivel nacional fue de 9,854.8 millones de litros y se ha estimado que para el 2007 alcanzará los 10,109.4 millones de litros (Figura 1).

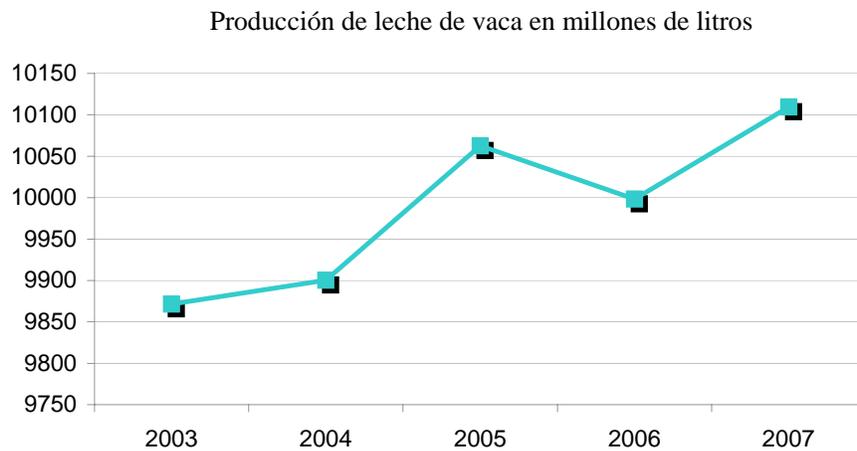


Figura 1. Comportamiento de la producción de leche bovina. Nota: En el caso de la producción del 2006 y 2007, los datos con que se cuenta hasta el momento son las predicciones que realizó el SIAP, SAGARPA para estos años. Fuente: SIAP, SAGARPA.

Como se observa en la gráfica anterior, la producción de leche de vaca se ha incrementado de manera sostenida durante los últimos años. El estudio de la situación y perspectiva de la producción nacional de leche de vaca en 2004, permite determinar que la producción nacional en ese año representó el 2.4% de la producción mundial; sin embargo la disponibilidad *per cápita* de leche de vaca fue tan solo de 17.9 litros/año (SIAP, SAGARPA), de manera que esta producción no es suficiente para cubrir la demanda de la población lo cual conlleva a que nuestro país, junto con la Federación Rusa, ocupe el primer lugar en importación de este producto (Gallardo, 2005).

Los Estados de la República en los que se concentra la mayor producción de leche de vaca son: Jalisco, Coahuila, Durango, Chihuahua, Veracruz y Guanajuato (Figura 2).

### Principales Estados productores de leche de vaca

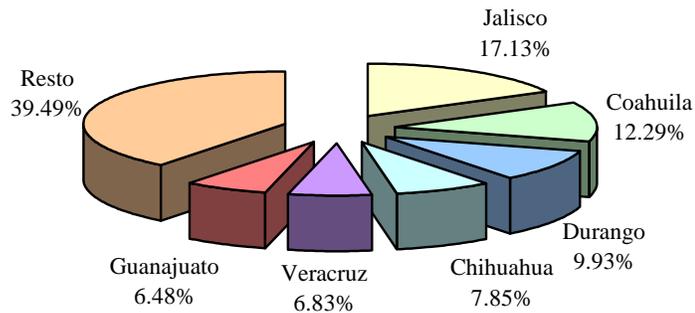


Figura 2. Porcentaje de aportación al sector lechero bovino nacional, durante 2006. Fuente: SIAP, SAGARPA.

### Producción de leche de cabra en México

La producción de leche de cabra representa apenas el 1.62% de la producción láctea nacional. De manera tradicional se realiza principalmente en unidades de producción extensiva; sin embargo, en los últimos años se ha promovido la mejora genética y sanitaria de los rebaños, así como la tecnificación de los mismos. En el 2005, la producción de leche de cabra en México alcanzó los 161 millones de litros; el SIAP estima que este producto rebasará los 166.8 millones de litros durante el 2007. Asimismo, se pronostica que la tendencia de crecimiento se mantenga debido al crecimiento del mercado de los subproductos, principalmente el queso de cabra (Programa Nacional Pecuario 2005). En nuestro país, la producción de leche de cabra se destina casi en su totalidad a la elaboración de quesos, dulces y cajeta (Figura 3).

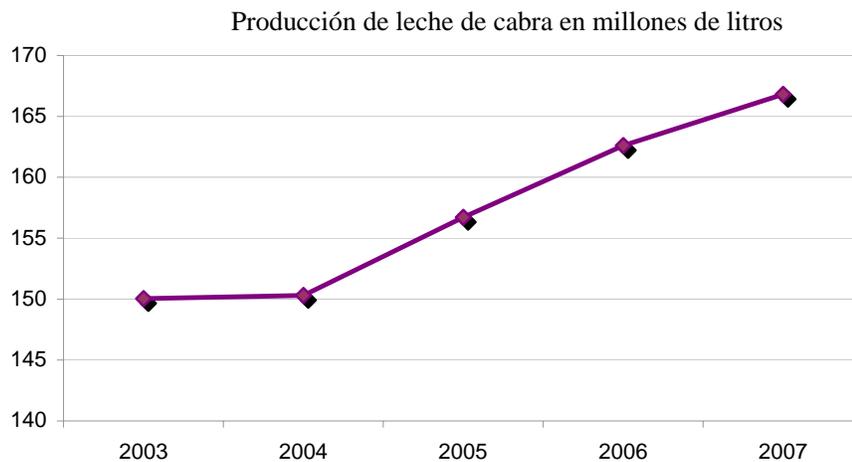


Figura 3. Comportamiento de la producción de leche caprina en años recientes. Nota: En el caso de la producción del 2006 y 2007, los datos con que se cuenta hasta el momento son las predicciones que realizó el SIAP, SAGARPA para esos años. Fuente: SIAP, SAGARPA.

Los Estados con mayor aportación al sector son Coahuila, Durango, Guanajuato, Chihuahua, Jalisco y Zacatecas. De manera que tan sólo Coahuila y Durango contribuyen con el 57.21% de la producción nacional de leche de cabra (Figura 4). Hasta el momento, en nuestro país no se ha registrado importación o exportación de este producto.

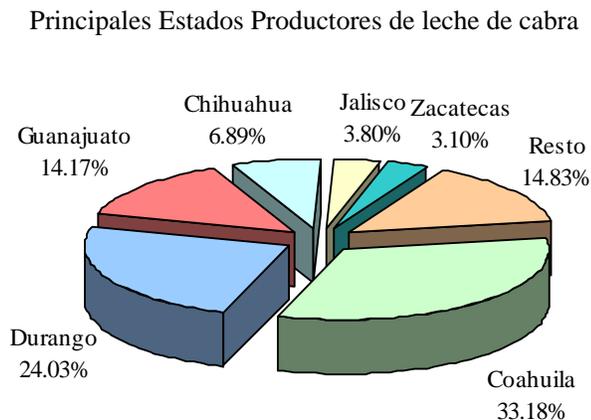


Figura 4. Porcentaje de aportación al sector lechero caprino nacional, durante 2006. Fuente: SIAP, SAGARPA

### La leche como fuente de infección

De manera natural, la leche contiene microorganismos, algunos de los cuales son parte de la microbiota de la ubre y otros proceden de procesos infecciosos ya sea localizados en la glándula mamaria o bien, sistémicos. Adicionalmente, la leche puede contaminarse durante el proceso de ordeño con heces o alimento adheridos a la superficie externa de la ubre, así como por deficiencias en la limpieza del personal encargado del ordeño y del equipo de lechería. El consumo de leche cruda ha sido asociado a brotes de infecciones bacterianas entre las que se incluyen: brucelosis, tuberculosis, colibacilosis, listeriosis, fiebre Q, salmonelosis y campilobacteriosis. Asimismo se han notificado brotes de enfermedades virales en humanos por hepatitis A, poliomielitis, encefalitis y gastroenteritis asociadas al consumo de leche cruda contaminada por parte del ordeñador (Mossel *et al*, 2003).

Desde finales del siglo XIX, se generalizó el uso de la pasteurización para evitar la sobrevivencia de agentes patógenos en la leche, sin alterar sus propiedades nutricionales y organolépticas, y además prolongar la vida de anaquel del producto. Sin embargo, aún el consumo de leche pasteurizada se ha asociado a brotes de enfermedades como campilobacteriosis, salmonelosis, yersiniosis, listeriosis y colibacilosis, los cuales pueden

atribuirse a pasteurización inadecuada, contaminación post-pasteurización o incremento de la temperatura indicada para el transporte y almacenaje (Mossel *et al*, 2003).

#### Consumo de leche no pasteurizada

De acuerdo con Jayarao *et al*, en Estados Unidos los productores de leche, así como sus empleados, familiares y vecinos acostumbran consumir leche sin pasteurizar (Jayarao *et al*, 2006). Adicionalmente, la elaboración de quesos a partir de leche cruda permite que este producto sea consumido por un amplio segmento de la población. Se menciona que la tercera parte del queso que se vende en los Estados Unidos se elabora a partir de leche no pasteurizada (McDowell y McElvaine, 1997); mientras que en México la Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural en la modificación a la Norma Oficial Mexicana NOM-031-ZOO-1995 admite que solamente el 50% de la producción láctea nacional se somete al proceso de pasteurización de manera que el resto de la leche se consume cruda o se destina a la elaboración de subproductos lácteos. Por lo cual, se puede asumir que la población mexicana está expuesta a un alto riesgo de infección con las bacterias y virus anteriormente señalados.

#### Resistencia de *Mycobacterium avium paratuberculosis* a la pasteurización

Los parámetros de la pasteurización se establecieron para asegurar que la leche fuera libre de patógenos como *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, *Coxiella burnetti* y *Mycobacterium bovis*. Sin embargo, se menciona que *Mycobacterium avium paratuberculosis* (*Map*) es más resistente al calor que las bacterias antes mencionadas y por lo tanto, es capaz de resistir el proceso de pasteurización a bajas y altas temperaturas, mostrando del 5 al 9% y del 24.8 al 31.4% de supervivencia respectivamente (Sung y Collins, 2000). En los últimos años diversos trabajos de investigación han señalado que *Map* es capaz de sobrevivir a las condiciones comerciales de pasteurización de la leche (Ellingson *et al*, 2005; Ayele *et al*, 2005; Grant *et al*, 2002).

En el Reino Unido, donde se emplea el mismo sistema de pasteurización que en México, se ha aislado *Map* a partir del 1.8% muestras de leche pasteurizada comercialmente y envasada para su venta. En todos los casos se aseguró que la pasteurización se había llevado a cabo sin problemas y de acuerdo a los lineamientos oficiales para la pasteurización HTST (Grant *et al*, 2002). Por medio de PCR inmunomagnética se ha detectado la presencia de *Map* al amplificar la

IS900 en el 7.3% de las muestras de leche cruda y en el 11.8% de las muestras de leche pasteurizada comercialmente en la República Checa (Ayele *et al*, 2005)

## **Paratuberculosis**

### Definición

La paratuberculosis es una enfermedad infecciosa de curso crónico que afecta el tracto intestinal de una gran variedad de especies animales, siendo los rumiantes domésticos y silvestres los principales hospedadores (Juste *et al*, 1984).

Esta afección también se conoce con el nombre de enfermedad de Johne, en honor de Johne HA y Frothingham L quienes en 1895 realizaron la primera descripción detallada de las lesiones macroscópicas y microscópicas de un caso clínico de esta enfermedad. Generalmente se emplean indistintamente los dos términos; sin embargo, Whitlock (1991) sugiere que debe designarse “paratuberculosis” a la infección por *Map* y “enfermedad de Johne” a la manifestación clínica de la infección por este agente.

La Organización Mundial de Salud Animal (OIE) clasifica esta enfermedad dentro de la lista B de enfermedades transmisibles que incluye aquellas de importancia socioeconómica y con repercusión en salud pública; asimismo la considera una enfermedad relevante para el comercio de animales y sus productos (OIE, 2001).

### Etiología de la paratuberculosis

*Map* es el agente causal de esta enfermedad. Es una bacteria intracelular, anaerobia facultativa, tiene forma de bacilo ligeramente curvo y mide de 0.5  $\mu\text{m}$  a 1.5  $\mu\text{m}$  de largo. Se considera Gram positivo aunque se tiñe mal con esta técnica. En frotis, los bacilos suelen observarse en cúmulos. La pared micobacteriana consta de cuatro capas con 60% de lípidos entre los que se encuentran ceras, lipoarabinomano y ácidos micólicos; esta pared dificulta la penetración y eliminación de colorantes y es la que les confiere la propiedad de ácido alcohol resistencia (Harris *et al*, 1999).

### Formas deficientes de pared celular

Generalmente se define a *Map* como un bacilo ácido alcohol resistente; sin embargo, en casos de enfermedad de Johne paucimicrobial, así como en los casos de enfermedad de Crohn en humanos en los que ha sido posible aislar esta micobacteria, se ha demostrado que el aislamiento primario consiste en formas deficientes de pared celular las cuales no pueden ser detectadas por ninguna tinción, incluyendo por supuesto aquellas diseñadas para bacterias ácido alcohol resistentes (Chiodini *et al*, 1986, Hirsh, 1999). Por microscopia electrónica se ha observado que estas formas deficientes de pared celular, también conocidas como esferoplastos, son más grandes y más redondas que las micobacterias con pared celular competente. Se estima que el cultivo habitual de *Map* contiene menos de un 5% de esferoplastos (Hines y Styer, 2003).

#### Taxonomía

De acuerdo con estudios de hibridación ADN-ADN, en 1990 se decidió clasificar al bacilo de la enfermedad de Johne como una subespecie de *Mycobacterium avium*. De esta manera, *Map* pertenece al complejo *Mycobacterium avium*, el cual incluye además a *M. avium avium*, *M. avium silvaticum* y de manera tradicional a *Mycobacterium intracellulare*, los miembros de este complejo presentan más de 90% de homología en su secuencia de ADN; sin embargo difieren en su fenotipo, patogenicidad y afinidad de hospedador (Thorel *et al*, 1990).

El género *Mycobacterium* pertenece al superreino *Bacteria* división *Firmacutes*, clase *Actinobacteria*, subclase *Actinobacteridae*, orden *Actinomycetales*, suborden *Corynebacterinae* y a la familia *Mycobacteriaceae*. El superreino *Bacteria* contiene a las bacterias verdaderas, la división *Firmacutes* incluye a las bacterias Gram positivas, la clase *Actinobacteria* alberga bacterias con un elevado contenido de guanina y citosina en su ADN (mayor al 50%) (Juste *et al*, 2000). La familia *Mycobacteriaceae* incluye tanto a las especies de rápido como a las de lento crecimiento. Entre las especies de lento crecimiento se incluyen *Mycobacterium tuberculosis*, *M.bovis*, *Mycobacterium. leprae* y *Map*, todas importantes agentes patógenos para los animales y el hombre. La lentitud del crecimiento de las micobacterias se atribuye en parte a la restricción en la captación de nutrientes a través de la pared celular y en el caso de *Map* a su incapacidad para producir micobactina (Dominique y Woody, 1997).

#### Resistencia al ambiente

*Map* es una bacteria incapaz de reproducirse en el ambiente; sin embargo, puede persistir en la tierra y agua contaminada con heces de animales infectados. Se ha demostrado que esta micobacteria es capaz de sobrevivir en las heces de bovinos durante 152 a 246 días, el periodo de supervivencia de *Map* depende de condiciones ambientales como congelación,

sequía, exposición a la luz solar, cambios en la temperatura ambiental y lluvia. Se ha observado que factores como falta de humedad, exposición a la luz del sol, pH superior a 7.0 y bajo contenido de hierro en el suelo pueden disminuir la supervivencia de esta micobacteria en la tierra (Collins *et al*, 1984). La literatura describe también que *Map* es capaz de sobrevivir hasta 280 días en charcos, la resistencia de la bacteria disminuye cuando se expone a la luz solar, a la que únicamente es moderadamente resistente (Larsen *et al*, 1956). De manera que es una bacteria que puede permanecer viable en el ambiente por varios meses lo que sin duda es un factor determinante para la distribución de la infección.

#### Características de cultivo

Los medios de cultivo sólidos más empleados para el aislamiento de *Map* son el Löwenstein-Jensen (LJ), Middlebrook 7H11 enriquecido con ácido oleico, albúmina, dextrosa y catalasa (OADC) y el medio de yema de huevo de Herrold (HEYM por *Herrold Egg Yolk Medium*) todos estos adicionados con micobactina También se emplean regularmente caldos de cultivo como el Dubos y el Middlebrook 7H9, ambos con micobactina (Juste *et al*, 1991).

En cultivo, *Map* se caracteriza por ser de crecimiento lento y requerir al menos de 8 a 12 semanas de incubación a 37° C para el desarrollo de colonias visibles (Lambrecht *et al*, 1988). De acuerdo con de Juan L *et al*, es recomendable utilizar todos los medios de cultivo sólidos antes mencionados y prolongar el periodo de incubación por 6 meses (de Juan *et al*, 2006).

El tamaño, color y textura de las colonias de *Map* varía dependiendo del medio de cultivo que se emplee. En los medios a base de huevo, las colonias primarias son pequeñas (1-2 mm de diámetro), convexas, de transparentes a blanquecinas, exhiben márgenes redondeados y lisos, así como apariencia húmeda. Conforme incrementa el tiempo de cultivo, las colonias se vuelven más opacas y rugosas, además de aumentar de tamaño (hasta 4 mm de diámetro). En el medio agar de Middlebrook las colonias presentan apariencia rugosa; cuando a este medio se le adiciona el detergente Tween 80 las colonias exhiben apariencia lisa (Payer *et al*, 1992). Ocasionalmente es posible identificar colonias pigmentadas principalmente cuando el aislamiento proviene de ovinos (Juste *et al*, 1991).

#### Dependencia a micobactina

*Map* necesita una fuente orgánica de hierro; en la mayoría de las especies de micobacterias el hierro es quelado extracelularmente por exoquelinas y después integrado a la bacteria por lípidos complejos asociados a la membrana del microorganismo que se conocen como

micobactinas. Para el aislamiento de colonias primarias de *Map* se requiere suplementar cualquier medio de cultivo con micobactina J a razón de 2 mg/l de medio, ya que éstas muestran estricta dependencia a este sideróforo (Juste *et al*, 1991). Ocasionalmente, esta dependencia se pierde en el subcultivo cuando pequeñas cantidades de micobactina se traspasan del medio de cultivo primario (Lambrecht y Collins, 1992).

La identificación de *Map* en el cultivo se realiza en función de su lento crecimiento, la morfología de las colonias, su dependencia a micobactina y morfología bacilar. Aunque cabe señalar que la dependencia a la micobactina no es exclusiva de *Map* sino que puede presentarse también en cultivos primarios de algunas cepas de *M. avium* y *M. avium silvaticum* (Thorel *et al*, 1990).

Recientemente (hace 3 años), se ha informado que un sideróforo de *Streptomyces pilosus* conocido como deferrioxamina, puede suplir el empleo de micobactina para el aislamiento bacteriológico de *Map* a un menor costo (Gardner *et al*, 2004).

#### Secuencias de inserción en *Map*

La IS900 fue la primera secuencia de inserción que se descubrió en una micobacteria, se considera exclusiva de *Map* aunque se han encontrado secuencias con una gran similitud en otras especies micobacterianas como *M. cookii* y *M. scrofulaceoum* (Englund *et al*, 2002, Cousins 1999). La IS900 se repite de 15 a 20 veces en el genoma de *Map* y tiene un tamaño de 1451 pares de bases (Bull *et al*, 2000). Se ha demostrado que esta secuencia de inserción codifica para una proteína denominada *p43* que consta de 399 aminoácidos y posiblemente sea una transposasa. En la cadena opuesta el gen denominado *hed* (host *expresión* dependent) codifica una proteína de aproximadamente 55 kDa, cuya función se desconoce hasta ahora.

Como se mencionó anteriormente, se ha demostrado que algunas especies micobacterianas contienen secuencias de ADN con una notable homología con la secuencia de IS900. Se han generado resultados falsos positivos cuando se analizan estas micobacterias mediante PCR empleando iniciadores comúnmente utilizados para la identificación de la IS900 de *Map*. El aislamiento bacteriológico ha permitido valorar las características fenotípicas de estas micobacterias, y demostrar que no son dependientes de micobactina, además de que su velocidad de crecimiento y coloración son distintas a *Map*. Los estudios de RFLP basados en la IS900, indican que *M. cookii* contiene de una a seis copias de la secuencia semejante a IS900 (IS900-like) en su genoma (Englund *et al*, 2002)

Recientemente, el análisis del genoma de *Map* ha permitido descubrir dos nuevas secuencias específicas de esta micobacteria a las que se ha designado como IS-MAP02 e ISMAP04 con seis y cuatro copias, respectivamente (Li *et al* 2005). Asimismo se ha detectado la secuencia IS*Mav*2 con al menos tres copias (Strommenger 2001).

#### Polimorfismo genético

Aislamientos de *Map* a partir de ovinos y bovinos han demostrado diferencias en cuanto a velocidad de crecimiento y pigmentación de las colonias. Al estudiar la secuencia de inserción IS900 por medio de análisis del polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP por sus siglas en inglés) se ha demostrado cierta heterogeneidad entre los aislamientos de *Map* observando que las cepas se pueden clasificar en 2 grupos principales: cepas de lento crecimiento de origen ovino denominadas “S” (*sheep*) y cepas con una gama más amplia de hospedadores que incluyen los aislamientos a partir de bovinos, fauna silvestre y humanos, denominadas “C” (*cattle*). Sin embargo, no existe plena correlación entre el tipo de cepa y el hospedador, de manera que cepas tipo “C” pueden aislarse a partir de ovinos con paratuberculosis y cepas tipo “S” pueden infectar a bovinos (Stevenson *et al*, 2002). Adicionalmente, se ha identificado un tercer tipo intermedio al que se denomina “I”.

Cuando el polimorfismo de esta micobacteria se evidencia por otras técnicas moleculares o bien empleando como blanco distintas secuencias de inserción, las cepas se clasifican en tipos I, II y III. La correspondencia entre las diferentes nomenclaturas para designar la diversidad de tipos de cepas se resume en el cuadro 1.

Cuadro 1. Correspondencia de la nomenclatura usada en las diferentes técnicas moleculares para la caracterización de las cepas *Map*

<b>Polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción IS900</b>	<b>Electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE)</b>	<b>IS1311 PCR-Análisis de restricción enzimática (PCR-REA)</b>	<b>PCR tipo específico</b>	<b>PCR Análisis de la diferencia representacional (RDA-PCR)</b>
“C”	Tipo II	Bovino, bisonte	“C”	Tipo II
“S”	Tipo I	Ovinos	“S”	Tipo I
“I”	Tipo III			

Pavlik *et al*, 1999; Stevenson *et al*, 2002; de Juan *et al*, 2005 ; Whittington *et al*, 2001; Collins *et al*, 2002 ; Dohmann *et al*, 2003

## Epizootiología

La paratuberculosis se encuentra ampliamente distribuida en el mundo. De acuerdo con estudios del Sistema Nacional de Monitoreo de la Salud Animal (*NAHMS*) de Estados Unidos en 1996, 21.6% de las explotaciones con ganado bovino productor de leche tienen al menos 10% de animales con enfermedad de Johne. El estudio del *NAHMS* en 2002, revela que es posible identificar *Map* a partir de muestras fecales del 70.4% de los establos analizados.

Existe muy poca información disponible para conocer la verdadera prevalencia de la enfermedad en los hatos y rebaños bovinos, ovinos y caprinos del mundo. A continuación se muestra una tabla con la información oficial disponible acerca de la situación de la paratuberculosis en los principales países importadores de ganado a nuestro país, asimismo en caso de contar con información se mencionan las medidas de control que se aplican en cada uno de estos países (Cuadro 2). La información zoonosanitaria oficial de la situación de esta enfermedad en el mundo se encuentra disponible en la siguiente dirección electrónica: [http://www.oie.int/hs2/sit\\_mald\\_cont.asp?c\\_mald=27&c\\_cont=6&annee=2004](http://www.oie.int/hs2/sit_mald_cont.asp?c_mald=27&c_cont=6&annee=2004)

Cuadro 2. Situación de la paratuberculosis en los diferentes sectores pecuarios de los principales países importadores de ganado a México

País	Presencia de paratuberculosis	Especie	Número de			Medidas de control
			focos	casos	muertos	
Argentina	+	bov	...	...	...	* Pf Vp
		ovi	...	...	...	* Pf Vp
Australia	+()	bov	...	...	...	* Te Pf Cm M Z
		cap	...	...	...	* Pf Cm Vp Z
		ovi	...	...	...	* Te Vi Pf Cm M V Z
Brasil	(2003)	bov				Vi
Estados Unidos de América	+()	bov	...	...	...	* Te Cm V
		ovi	...	...	...	* Cm
Nueva Zelanda	+	bov	...	...	...	V
		cap	...	...	...	V
		ovi	...	...	...	V
		o/c	32	762	0	* Te Pf Cm

Información oficial del 2004 publicada en el HandiSTATUS, OIE. Donde ?= Se sospecha de la presencia de la enfermedad, += Se ha notificado o se sabe que está presente, +?= Se ha detectado por serología o aislamiento pero no se han detectado casos clínicos; (año)= Fecha del último informe de la enfermedad, ()= Presencia de la enfermedad en zonas delimitadas del país.

Medidas de control:

M= Monitoreo, Pf= Precauciones en la frontera. Cm= Control de movilización dentro del territorio, D= Desecho, Dm= Desecho modificado, Vi=Vigilancia, Te= Tamizado, V= Vacunación, Vp= Vacunación prohibida, z= Zonificación, \*= Enfermedad de notificación obligatoria

## Panorama de la paratuberculosis en México

En 1994, la Secretaría de Agricultura Ganadería y Desarrollo Rural publicó un acuerdo mediante el cual se enlistan las enfermedades y plagas exóticas y enzoóticas de notificación obligatoria, en este acuerdo se clasificó a la paratuberculosis dentro de la lista de enfermedades del grupo 3, este grupo está constituido por aquellas enfermedades enzoóticas que representan un menor riesgo desde el punto de vista epidemiológico, económico, de salud pública y de comercio nacional e internacional, señalando además la obligatoriedad de la notificación mensual a las dependencias oficiales de sanidad animal del país (SAGARPA).

Sin embargo, al revisar los informes de la situación sanitaria del país publicados en los Cuestionarios FAO/OIE/OMS México se puede observar que entre el año 2002 y el 2004 tan sólo se notificaron 163 casos en bovinos, 23 en caprinos y 13 casos en ovinos, para un total de 199 casos de paratuberculosis (Figura 5). Estas cifras no deben interpretarse como un reflejo de la situación real de la enfermedad en nuestro país sino de la grave deficiencia de diagnóstico así como de notificación por parte de los Médicos Veterinarios tanto a nivel de granja como de centros de diagnóstico.

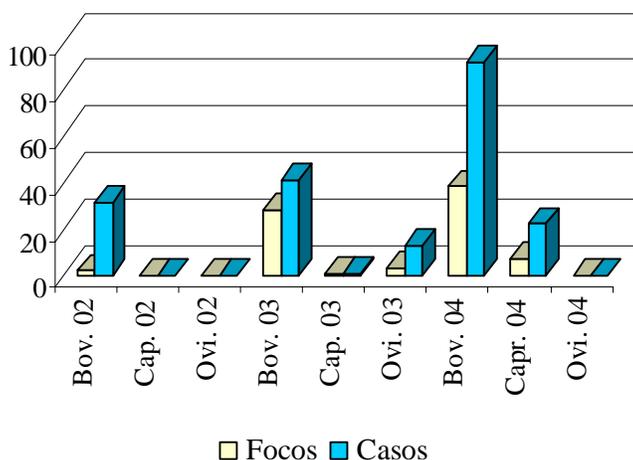


Figura 5. Focos y casos de paratuberculosis reportados oficialmente. Cuestionarios FAO/OIE/OMS. HandiSTATUS II.

Por lo tanto, se carece de información oficial confiable para determinar la magnitud de la situación de la paratuberculosis en ningún sector pecuario; sin embargo es importante señalar que existen algunos estudios que nos permiten vislumbrar el panorama de la paratuberculosis en México.

#### En bovinos

El primer informe de esta enfermedad en nuestro país data de 1936 cuando Unzueta RJ detectó la presencia de la enfermedad por medio de la prueba de intradermorreacción conocida como Johnina y la visualización de bacilos ácido alcohol resistentes en frotis de heces de bovinos (Unzueta, 1936). Sin embargo, el primer aislamiento e identificación del bacilo de la enfermedad de Johne en nuestro país se realizó hasta 1979 (Ramírez *et al*, 1979). En 2004, se publicó un estudio de seroprevalencia en el Estado de Guanajuato en el que se menciona que el 28.7% de los establos incluidos en la muestra contienen animales seropositivos a paratuberculosis en un porcentaje directamente proporcional al número de cabezas en el hato (Santillán *et al*, 2004). En el Complejo Agropecuario e Industrial de Tizayuca, Hidalgo se encontró que 96.55% (28/29) de los hatos incluidos en la muestra contienen animales sepositivos a paratuberculosis, siendo el intervalo de seroprevalencia del 1.82 al 24.07% y de 8.97% la seroprevalencia promedio en la cuenca (Miranda *et al*, 2005).

#### En caprinos

El primer diagnóstico de la presencia de esta enfermedad en caprinos de nuestro país data de 1983, cuando por IDGA, patología y bacteriología se detectó *Map* en cabras clínicamente enfermas provenientes de Querétaro y Guanajuato (Ramírez *et al*, 1983). Chávez y colaboradores publicaron los resultados de un estudio en el que determinaron por inmunodifusión en gel agar (IDGA) una seroprevalencia aparente de 6.66% (8/120) en un rebaño caprino localizado en los alrededores de la Ciudad de México. Asimismo, realizaron la necropsia de 27 animales de desecho y mortalidad, encontrando lesiones macro y microscópicas compatibles con paratuberculosis en 15 animales y logrando el diagnóstico definitivo por medio de aislamiento bacteriológico en medio Löwenstein Jensen con micobactina J a partir de 12 muestras (Chávez *et al*, 2004). Por otra parte, esta enfermedad ha sido identificada por serología, aislamiento y PCR en caprinos de San Luis Potosí, Guanajuato, Querétaro, Distrito Federal, Estado de México y Veracruz (Estévez *et al*, 2006).

## En ovinos

En un estudio realizado en Culiacán Sinaloa en 1993, se observó que 80.64% (25/31) de los ovinos clínicamente enfermos incluidos en el estudio presentaban lesiones macroscópicas y microscópicas compatibles con paratuberculosis, por lo cual consideran que esta enfermedad es una de las más importantes en el ganado ovino adulto (Juárez *et al* 1993). Por otra parte, mediante serología, aislamiento y PCR se ha detectado la presencia de paratuberculosis en ovinos de San Luis Potosí, Guanajuato, Querétaro, Distrito Federal, Estado de México y Veracruz (Estévez *et al*, 2006).

## Especies susceptibles

*Map* es capaz de infectar a una amplia gama de rumiantes, entre los que se incluyen: bovinos, caprinos, ovinos, venados, ciervos, alces, antílopes, bisontes, camellos, llamas y alpacas. Aunque con menor frecuencia, también es posible identificar esta micobacteria en una gran variedad de especies no rumiantes como son: équidos, suinos, pollos, conejos, primates no humanos y humanos (Yayo *et al*, 2001).

Se han publicado varios estudios que sugieren que la fauna silvestre puede tener un papel muy importante en la transmisión y diseminación de la paratuberculosis, esta hipótesis se fundamenta en el hecho de que es posible aislar *Map* a partir de intestino y linfonodos mesentéricos de una gran variedad de especies animales incluyendo a zorros, armiños, comadrejas, ratas, ratones de campo, liebres, musarañas, tejones, mapaches, armadillos, gatos domésticos y salvajes, coyotes, cerdos salvajes y osos; además de algunas especies de aves como cuervo, grajo y chova. Es importante señalar que no sólo se ha logrado identificar esta micobacteria, sino que también se han observado lesiones histológicas sugestivas de infección con *Map* en zorro, armiño, comadreja, cuervo y ratón de campo (Beard *et al*, 2001; Corn *et al*, 2005; Palmer *et al*, 2005; Anderson *et al*, 2007). Incluso se ha logrado aislar esta micobacteria del tracto intestinal de insectos y lombrices, de manera que en la actualidad se sigue una línea de investigación que intenta dilucidar si estos invertebrados actúan como vectores de diseminación de la enfermedad (Fisher *et al*, 2004 y 2005).

## Transmisión

Los animales infectados con paratuberculosis eliminan de manera intermitente un gran número de bacterias a través de sus heces. Las vacas con una carga micobacteriana alta pueden eliminar aproximadamente  $10 \times 10^8$  unidades formadoras de colonia (ufc) por gramo de heces (Yayo *et al*, 2001). Asimismo, se menciona que las vacas con eliminación alta de *Map* en heces

también pueden eliminar la micobacteria a través de su leche a una concentración de 1-2 ufc/10ml de leche. *Map* también ha sido aislado a partir de endometrio, cotiledones y fetos provenientes de vacas infectadas, por esta razón se sugiere que los productos del parto pueden contribuir a la contaminación del ambiente con *Map* (Yayo *et al*, 2001).

Se sugiere que la infección de huéspedes atípicos contribuye a la contaminación del ambiente por lo que podrían tener un papel importante en la diseminación de la paratuberculosis y por lo tanto, ser un factor a tomar en cuenta para cualquier programa de control de la enfermedad (Judge, 2005).

#### Infección prenatal

Aunque se ha considerado de menor importancia, se postula que la infección de los animales con *Map* puede ocurrir *in utero*. Es posible aislar *Map* a partir de cotiledones, fetos y mucosa uterina de vacas con paratuberculosis e incluso a partir de endometrio y fetos de vacas con enfermedad subclínica (Yayo W *et al*, 2001). Se ha estimado que cuando la madre presenta signos clínicos de enfermedad de Johne, el riesgo de infección fetal con esta micobacteria es de 0.26 (Seitz *et al*, 1989); el riesgo disminuye cuando la madre se encuentra en estadio subclínico y se ha estimado que es de 0.086 (Sweeney *et al*, 1992). Los fetos infectados suelen provenir de vacas que presentan alta eliminación micobacteriana en heces. Sin embargo, los estudios de transmisión intrauterina no se limitan únicamente al ganado bovino, recientemente por medio de aislamiento bacteriano se identificó esta micobacteria en 9 fetos de ciervo rojo provenientes de igual número de madres con enfermedad de Johne por lo cual se sugiere que el riesgo de infección intrauterina con *Map* es un factor a tomar en cuenta para establecer programas de control de la enfermedad (van Kooten *et al*, 2006). Se especula que los animales infectados de manera congénita podrían progresar al estadio clínico de la enfermedad a una edad más temprana que los infectados después del nacimiento (Sweeney, 1996). *Map* se ha aislado a partir de los órganos reproductivos de toros y se ha observado que esta micobacteria en el semen resiste tanto la adición de quimioterapéuticos como el congelamiento, de manera que el semen de animales con eliminación activa, así como semen contaminado durante la recolección puede ser la fuente de infección para las hembras. En un estudio en que experimentalmente se inoculó de manera intrauterina a las vacas se observó que *Map* es capaz de provocar una respuesta inflamatoria en la mucosa uterina que podría explicar el decremento en la fertilidad observado (Yayo *et al*, 2001).

#### Infección postnatal

La vía fecal oral se considera la principal vía de transmisión de la paratuberculosis. Los becerros menores de 4 meses de edad son altamente susceptibles a la infección; sin embargo los signos clínicos se manifiestan en animales mayores de 2 años de edad (Yayo *et al*, 2001). De esta manera, las crías de los animales con paratuberculosis se pueden infectar siendo muy jóvenes por medio de la ingestión de calostro y leche de vacas con eliminación activa y contaminación fecal de la ubre, mientras que las crías de madres libres de paratuberculosis pueden infectarse al ingerir calostro congelado, leche, alimento o agua contaminados con *Map*. Hasta el momento se desconoce la dosis infectante en becerros; sin embargo, Begg *et al* (2005) lograron crear un modelo de infección experimental en corderos de 3 meses empleando tan solo 4 dosis de  $5 \times 10^8$  ufc. Cuando los animales se infectan por primera vez con *Map* siendo adultos, es poco probable que desarrollen signos clínicos de paratuberculosis a menos que estén expuestos a altas dosis de microorganismos, por ejemplo en un hato con alta prevalencia de la enfermedad, y permanezcan en el hato durante el periodo de incubación de la micobacteria (Whitlock *et al*, 1996). Se sugiere que los bovinos a partir de 1 año de edad son tan resistentes a la infección como los adultos (Larsen *et al*, 1975).

Recientemente, se ha postulado que la transmisión de la paratuberculosis podría ocurrir por medio de aerosoles que penetren el tracto respiratorio; como es el caso de la tuberculosis. Se requiere profundizar en la investigación del tema para descartar o acreditar esta última hipótesis (Corner y Abbott, 2003).

Lesiones

Lesiones macroscópicas

Las lesiones macroscópicas de la paratuberculosis se observan principalmente en la parte distal del íleon, vasos linfáticos del borde antimesentérico y linfonodos mesentéricos e ileocecales. En estadios avanzados de la enfermedad, las lesiones pueden abarcar desde el duodeno hasta el recto (Yayo *et al*, 2001). Estas lesiones consisten en engrosamiento segmental de la pared intestinal hasta tres o cuatro veces de su grosor normal, mucosa corrugada de apariencia granular, sufusiones en la mucosa intestinal, engrosamiento de los vasos linfáticos de la subserosa (linfangitis); linfonodos 3 a 5 veces aumentados de tamaño y edematosos con poca diferenciación corticomedular (infoadenomegalia) (Whitlock *et al*, 1996).

En cuanto a lesiones extraintestinales, ocasionalmente puede observarse arteriosclerosis en aorta, así como microgranulomas en el hígado y linfonodos hepáticos. Además de atrofia del

músculo esquelético, así como atrofia serosa de la grasa pericárdica y perirrenal (Clarke *et al*, 1997).

#### Lesiones microscópicas

Las lesiones intestinales anteriormente descritas, corresponden a enteritis granulomatosa que se caracteriza por la acumulación de linfocitos, macrófagos, células epitelioides y células gigantes tipo Langhans. No se aprecia necrosis ni proliferación de tejido fibroso en la periferia de los granulomas. El infiltrado inflamatorio que predomina es mononuclear y se observa principalmente en la mucosa y submucosa intestinal, se puede apreciar fusión de las puntas de las vellosidades intestinales lo que provoca disminución en la superficie de absorción.

Los linfonodos mesentéricos pueden presentar infiltrado inflamatorio compuesto por células epitelioides y células gigantes (Whitlock RH *et al*, 1996). La tinción de Ziehl-Neelsen (ZN) permite identificar variable cantidad de bacilos intracelulares ácido alcohol resistentes (BAAR) en macrófagos, células epitelioides y células gigantes tanto en intestino como en linfonodos regionales (Whitlock RH *et al*, 1996).

Las lesiones asociadas a paratuberculosis en ovinos se clasifican de acuerdo a la presencia, localización, distribución e intensidad de las lesiones granulomatosas, así como los tipos celulares presentes en el infiltrado y la cantidad de bacilos ácido alcohol resistentes (Pérez *et al*, 1996). Corpa JM *et al*, estudiaron los tipos de lesiones de la paratuberculosis en cabras y concluyeron que la clasificación propuesta por Pérez *et al* es válida también para los caprinos.

La lesión tipo 1, se caracteriza por la presencia de pequeños granulomas localizados exclusivamente en los espacios interfoliculares de las placas de Peyer. Cuando las lesiones granulomatosas focales se extienden a la mucosa relacionada las lesiones se clasifican dentro del tipo 2. Cabe señalar que en ambos, no se observan lesiones macroscópicas aparentes ni se detectan bacilos ácido alcohol resistentes en el estudio histológico. Las lesiones tipo 3 afectan tanto a las placas de Peyer, como a la mucosa asociada y no asociada al tejido linfoide y 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: Se caracteriza por enteritis granulomatosa difusa conformada por abundantes macrófagos en la mucosa. 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 la mucosa se aprecia corrugada, particularmente a nivel del íleon. Este subtipo también se conoce como forma lepromatosa.

- Subtipo 3c: Se observa enteritis granulomatosa difusa con infiltrado inflamatorio compuesto principalmente por abundante cantidad de linfocitos y células gigantes. No se detectan micobacterias o bien se observan escasos bacilos ácido alcohol resistentes. Las lesiones macroscópicas son similares al tipo 3b. Este subtipo se considera la forma tuberculosa de la enfermedad.

Se ha propuesto clasificar las lesiones histopatológicas de los bovinos con paratuberculosis de acuerdo a la localización de las mismas, evaluando su intensidad, tipo de células inflamatorias involucradas y cantidad de micobacterias observadas (González *et al* 2005). La clasificación sugerida es la siguiente:

- Lesiones focales: Consisten en pequeños granulomas en linfonodos de yeyuno e íleon, así como en el tejido linfoide de la válvula ileocecal. Se aprecian células gigantes tipo Langhans tanto en el granuloma como esparcidas en el tejido.

- Lesiones multifocales: Se aprecian pequeños granulomas o células gigantes no sólo en linfonodos y tejido linfoide intestinal sino también en la lámina propia de las vellosidades intestinales, generalmente afectando tan sólo la punta de éstas y sin modificar la arquitectura normal del intestino.

- Lesiones multibacilares difusas: El infiltrado inflamatorio se distribuye de manera difusa en la pared intestinal causando engrosamiento y fusión de las vellosidades intestinales. Las lesiones involucran tanto a la mucosa como a la submucosa intestinal, se puede apreciar criptitis necrótica, edema y arteritis granulomatosa. Las secciones intestinales afectadas pueden incluir el yeyuno, íleon y ciego. En linfonodos adyacentes se aprecia linfadenitis granulomatosa grave con macrófagos y células gigantes en corteza y paracorteza. Se distingue abundante cantidad de bacilos ácido alcohol resistentes.

- Lesiones paucibacilares difusas: Las lesiones consisten en enteritis granulomatosa difusa pero el tipo celular que predomina son los linfocitos. Se aprecia ligera o escasa cantidad de bacilos ácido alcohol resistentes.

- Lesiones difusas intermedias: El infiltrado inflamatorio observado incluye linfocitos, células plasmáticas, macrófagos y células gigantes esparcidas o bien formando pequeños granulomas. El tipo celular predominante varía en diferentes muestras del mismo animal. El número de bacilos ácido alcohol resistentes que se aprecian está en función del número de macrófagos del infiltrado.

Se menciona que las lesiones focales y multifocales se observan principalmente durante las fases iniciales de la infección, sin embargo conforme progresa la enfermedad las lesiones granulomatosas suelen coalescer y dar lugar a enteritis granulomatosa difusa. El patrón histopatológico no sólo corresponde al estadio de la enfermedad sino a la respuesta inmunológica del hospedador, de manera que las lesiones paucibacilares a la “forma tuberculoide” en la que predomina la respuesta inmune celular y puede corresponder a fases iniciales o latentes de la infección y las lesiones multibacilares se corresponden a la “forma lepromatosa” de la enfermedad en la que predomina la respuesta inmune humoral (González *et al*, 2005).

Corpa *et al*, sugieren que las lesiones focales representan lesiones latentes y persistentes que se originaron cuando el animal era joven, pero que fueron exitosamente limitadas por la respuesta inmunológica.

### Signos clínicos

Como se mencionó anteriormente, en ganado bovino los signos clínicos se manifiestan principalmente en animales mayores de 2 años de edad. Se menciona que factores como deficiencias nutricionales, enfermedades parasitarias, virales o bacterianas; alta exigencia productiva y en general cualquier condición que genere estrés en los animales puede favorecer la presentación de signos clínicos (Yayo *et al*, 2001). Los signos iniciales incluyen pérdida progresiva de peso sin decremento del apetito, esta pérdida de peso es consecuencia de las lesiones a nivel intestinal que provocan mala absorción de proteínas, así como al incremento de los niveles de factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ). De manera conjunta suele presentarse incremento de la fluidez de las heces, la diarrea no es hemorrágica, ni mucoide y suele ser intermitente. Generalmente en 3 ó 4 semanas la condición de los animales progresa desfavorablemente hacia un estadio de enfermedad avanzada que se caracteriza por diarrea

profusa, debilidad, letargia, emaciación y edema submaxilar (Whitlock *et al*, 1996). Otros signos clínicos que pueden observarse incluyen ascitis y pérdida de color del manto del pelo (Clarke *et al*, 1997).

En ovinos y caprinos, las manifestaciones clínicas se pueden observar en animales menores de 2 años, el principal signo de enfermedad es la pérdida progresiva de peso (Yayo *et al*, 2001). Se menciona que sólo el 10-20% de estos animales presentan diarrea durante la fase final de la enfermedad (Stehman *et al*, 1996).

#### Diagnóstico

#### Inmunológico

El diagnóstico de la infección con *Map* es difícil debido al lento patrón de crecimiento del microorganismo así como al tipo de respuesta inmune que induce. En la fase inicial de la infección predomina la respuesta inmune celular, la cual mantiene la infección confinada a la pared intestinal; por lo tanto no es posible identificar anticuerpos en el suero de los animales durante la fase temprana de la infección. Conforme progresa la infección hacia el estadio de enfermedad clínica, la respuesta inmune celular comienza a decaer y predomina la respuesta inmune humoral. La respuesta inmune humoral emerge de 10 a 17 meses después de la infección.

Las pruebas más utilizadas para la identificación de la respuesta inmune celular son: intradermorreacción (IDR) e identificación de interferón gamma (IFN $\gamma$ ). Se menciona que la sensibilidad de la prueba de IDR o Johnina es de 68% en cabras con lesiones multibacilares y de 88.8% cuando se aplica a cabras con lesiones paucibacilares (Tripathi *et al*, 2006). Las pruebas para la detección de la respuesta inmune humoral que se utilizan con mayor frecuencia son: inmunodifusión en gel agar (IDGA), inmunoensayo enzimático (ELISA) y fijación del complemento (Yayo *et al*, 2001). De acuerdo con Tripathi y colaboradores, la sensibilidad de la prueba de IDGA en cabras con lesiones multibacilares es de 96.2 mientras que en animales con lesiones paucibacilares es de 50% (Tripathi *et al*, 2006), por lo que esta la IDGA se emplea principalmente como prueba confirmatoria en casos de paratuberculosis clínica (Ferreira *et al*, 2002).

Probablemente la prueba más ampliamente utilizada es la de ELISA, las ventajas de esta prueba incluyen su bajo precio, la rapidez y facilidad con la que se realiza y el hecho de que su diseño permite trabajar con múltiples muestras a la vez, además de que posee una alta

especificidad y mediana sensibilidad que depende del estadio de desarrollo de la enfermedad que presenten los animales, así como del punto de corte que se utilice (Robbe-Austerman *et al*, 2006). De acuerdo con Hope y colaboradores, la especificidad de la prueba de ELISA es de 98.2-99.5%, mientras que su sensibilidad es de 35-54% (Hope *et al*, 2000). Se menciona que la sensibilidad de la prueba de ELISA en cabras con lesiones multibacilares y paucibacilares es de 100 y 70% respectivamente (Tripathi *et al*, 2006).

### Patológico

De manera práctica, el diagnóstico de la paratuberculosis puede realizarse al integrar la historia clínica con la identificación de las lesiones macroscópicas y microscópicas anteriormente descritas. Aunque no existen lesiones patognomónicas, la observación de bacilos ácido alcohol resistentes en lesiones granulomatosas del intestino de rumiantes son altamente sugerentes de esta enfermedad. Se menciona que el estudio patológico es el diagnóstico más sensible para la detección de paratuberculosis, además entre sus ventajas se incluye el bajo costo y la rapidez con la que puede efectuarse (Dimareli MZ y Sarris K, 2001). Entre sus desventajas principales se menciona la cuestionable especificidad (que depende en gran parte de la experiencia y habilidad del patólogo) y el hecho de que se realiza principalmente en animales muertos; sin embargo en animales de alto valor genético y animales de zoológico que hayan sido positivos a alguna de las otras pruebas de diagnóstico se puede realizar laparoscopia para la obtención de una biopsia de íleon terminal y linfonodo mesentérico para confirmar el diagnóstico (Buergelt y Ginn, 1999).

### Bacteriológico

El cultivo es la prueba diagnóstica definitiva ya que se considera que posee una especificidad absoluta. El aislamiento de *Map* puede realizarse a partir de heces, íleon terminal, válvula ileocecal y linfonodo mesentérico, así como a partir de leche y sangre periférica. La sensibilidad del cultivo a partir de heces es afectada por la eliminación intermitente de la micobacteria, así como la eliminación de cantidades muy bajas de micobacterias que no pueden ser identificadas a través del cultivo. La sensibilidad de esta prueba en ganado bovino previamente identificado con paratuberculosis oscila entre el 35 y el 50% (NAHMS, 2002), mientras que en cabras es de 40 y 84.6% dependiendo del tipo de lesión, siendo más sensible cuando se realiza a partir de heces de animales con lesiones multibacilares. Para incrementar la sensibilidad, se recomienda que el cultivo de heces se realice a partir de muestras seriales (Tripathi, 2006).

El cultivo a partir de muestras de leche se ha utilizado recientemente dado el creciente interés de los investigadores en demostrar si la leche es un vehículo potencial para la diseminación de la infección tanto entre animales como a la población humana. Dada la baja concentración de micobacterias que se estima pueden estar presentes en la leche, generalmente se recurre a centrifugar la muestra para precipitar estas micobacterias en la pastilla resultante. De acuerdo con Grant *et al* (2000), el 69.4% de las micobacterias se localiza en la pastilla que resulta de centrifugar 10 ml de leche a 2500 g por 15 min, mientras que 13 y 17.6% de los microorganismos se encuentra en las fracciones de crema y suero, respectivamente. Contrariamente a esta observación, Gao *et al* (2004) mencionan que es posible aislar un mayor número de micobacterias cuando se recuperan juntas la pastilla y la fracción cremosa de la leche centrifugada a 3100 g por 30 min.

Para la identificación de *Map* se requiere demostrar la dependencia del cultivo a la micobactina, así como verificar la morfología de las colonias, la afinidad tintorial y la morfología de los microorganismos.

#### Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Es una técnica rápida, su especificidad depende en parte de los iniciadores que se empleen, ya que se han identificado iniciadores dentro de la secuencia de inserción IS900 que podrían originar falsos positivos, debido a que *Mycobacterium scrofulaceum* y *M. cookii* contienen en su genoma secuencias parecidas a IS900 (IS900-like) (Englund *et al*, 2002, Cousins 1999). Sin embargo, cuando esta prueba se realiza a partir de muestras clínicas su sensibilidad tiende a disminuir debido a la presencia de sustancias que reducen e incluso bloquean la capacidad de amplificación de la prueba, así como al bajo número de bacterias y al ADN inespecífico. Tradicionalmente, las muestras de leche se consideran muestras clínicas difíciles de analizar por medio de esta técnica dada la presencia de proteinasas, así como de una alta concentración de calcio y grasa que actúan como inhibidores de la PCR (Radström *et al*, 2004). De acuerdo con Bickley, la inhibición de la PCR ocurre en muestras de leche sin tratamiento previo y en presencia de 5% o más de leche sin importar si se trata de leche entera, semidescremada o libre de grasas, por lo que este autor refiere que la inhibición no se atribuye al contenido de grasa de la leche, sino principalmente a los iones de calcio cuya acción se revierte incrementando la concentración de magnesio (Bickley *et al*, 1996).

## Separación inmunomagnética

La separación inmunomagnética (IMS por las siglas en inglés de *immunomagnetic bead separation*) se utiliza para aislar una especie bacteriana de una mezcla de microorganismos en suspensión, utilizando para ello partículas inmunomagnéticas sensibilizadas con anticuerpos específicos. La reacción de las partículas con los microorganismos se produce cuando éstas son mezcladas con una suspensión bacteriana, las bacterias se adhieren a los anticuerpos específicos de la superficie de las partículas por una reacción antígeno-anticuerpo. Posteriormente, las partículas son extraídas del medio líquido mediante la aplicación de un campo magnético. Las bacterias adheridas a las mismas son arrastradas en este proceso. Esta técnica permite concentrar las bacterias suspendidas en la muestra y, por lo tanto, incrementa la sensibilidad del cultivo y de la PCR (Grant *et al* 2000).

Grant *et al*, mencionan que la técnica de IMS reduce el límite mínimo de ufc necesarios para la detección de la prueba de PCR en leche entre 10 y 100 veces (Grant *et al* 2000). Esta afirmación coincide con lo descrito por Djonne B *et al*, destacando que la máxima sensibilidad de la prueba se obtiene cuando el producto de PCR se visualiza por medio de dot blot (Djonne B 2003).

## Impacto económico de la Paratuberculosis

En varios países del mundo la paratuberculosis ha venido cobrando relevancia debido a las pérdidas económicas que ocasiona. En los últimos años se han publicado algunos estudios que cuantifican el impacto económico asociado a esta enfermedad en los hatos bovinos productores de leche, las pérdidas económicas son generadas principalmente por la disminución en la producción láctea, el desecho prematuro de los animales, enfermedades secundarias y los costos asociados al tratamiento. En los Estados Unidos de Norteamérica, el Sistema Nacional de Monitoreo de la Salud Animal (por sus siglas en inglés NAHM) menciona que los hatos seropositivos experimenta una pérdida anual de entre \$ 100 y 200 USD por animal dependiendo del grado de infección del hato (Ott *et al*, 1999). En nuestro país, Miranda evaluó recientemente el impacto económico de esta enfermedad en el Complejo Agropecuario Industrial de Tizayuca, Hidalgo (CAIT) y concluyó que representa pérdidas anuales de \$10,174 por animal infectado, en este estudio se menciona que la principal causa de pérdidas económicas se debe al 22.8% de disminución de la producción láctea atribuible a la paratuberculosis (Miranda, 2005).

## Enfermedad de Crohn

### Definición

En 1932 Crohn, Ginsberg y Oppenheimer describieron por primera vez la signología clínica y las lesiones de 14 pacientes con una entidad a la que denominaron “ileitis regional”, ésta consistía en inflamación subaguda o crónica del íleon, con presencia de úlceras, estenosis, fístulas y granulomas (Crohn *et al*, 1932). A partir de 1950 se decidió englobar los distintos diagnósticos descriptivos que incluían términos como granuloma inespecífico, ileitis regional, enteritis regional, enterocolitis regional y enteritis cicatrizante, los cuales se utilizaban indistintamente para designar al mismo proceso y denominarlo “enfermedad de Crohn”. La enfermedad de Crohn (EC) se define como el proceso inflamatorio crónico que puede afectar transmural y segmentalmente el tracto gastrointestinal humano, siendo el íleon y el colon las regiones intestinales afectadas con mayor frecuencia (Armitage *et al*, 1950).

### Etiología de la Enfermedad de Crohn

Hasta el momento, no ha sido posible determinar la etiología de la EC. Actualmente una de las hipótesis más aceptadas sugiere que la EC es en realidad un síndrome y que, como tal, engloba varios padecimientos con causas diversas. Entre las hipótesis acerca de la etiología de la EC se postulan diferentes causas genéticas que finalmente se manifiestan como una falla en los mecanismos de regulación de la respuesta inmune, así como causas de origen infeccioso siendo *Map* el más aceptado.

En 1984 Chiodini *et al*, anunciaron el primer aislamiento de *Map* a partir de 3 muestras intestinales de pacientes con EC y en ninguno de los controles que incluían pacientes con colitis ulcerosa y otras enfermedades intestinales; a partir de ese momento se abrió una línea de investigación para determinar si esta micobacteria es el agente etiológico de la EC o es sólo un agente oportunista. La evidencia que apoya esta asociación incluye el aislamiento bacteriológico de esta micobacteria a partir de secciones intestinales, sangre y leche de pacientes con EC, detección de anticuerpos específicos contra *Map*, eficacia del tratamiento con drogas antimicobacteriales e identificación de la secuencia específica IS900 por PCR e hibridación *in situ* (Bull *et al*, 2003; Schwartz *et al*, 2000; Cheng *et al* 2000, Hulten *et al*, 2001; Naser *et al* 20004 y 2002). De acuerdo con Chamberlin la teoría micobacteriana y la autoinmune son complementarias; de manera que la primera involucra la etiología del padecimiento y la segunda su patogénesis (Chamberlin *et al*, 2001).

## Epidemiología

La enfermedad de Crohn se encuentra ampliamente distribuida en el mundo. Un estudio realizado en Olmsted, Minnesota entre 1940 y 2000 notificó una incidencia de 7.9 por 100,000 habitantes, así como una prevalencia de 174 por 100,000 habitantes en 2001. Este estudio señala además que la prevalencia de casos de EC se incrementó 31% de 1990 al 2000 (Loftus *et al*, 2007). En Francia se menciona que la incidencia de la enfermedad en la población pediátrica entre 1988 y 1999 fue de 2.3 por 100,000 de habitantes, asimismo se destaca que la incidencia de esta enfermedad en la población en general se incrementó significativamente un 23% durante el periodo de estudio (Auvin *et al*, 2005).

Algunos autores mencionan que la EC es más común en los países del norte u oeste, que en los países del este y sur. De manera que se considera una enfermedad poco frecuente en países de Asia, África y Sudamérica (Andres *et al*, 1999; Mishina *et al*, 1996). Sin embargo, publicaciones recientes ponen de manifiesto que la enfermedad de Crohn es frecuente en países de América latina. En Puerto Rico la prevalencia estimada en 1996 fue de 41.4/100,000 habitantes (Torres, 2003), además se menciona que entre 1996 y el 2000 la frecuencia de casos de EC aumentó 4 veces (Appleyard, 2004). En Brasil, un estudio realizado entre 1980 y 1999 menciona que la incidencia de la EC se ha incrementado en los últimos 20 años de 17 a 31 casos por cada 10,000 ingresos al Hospital Universitario de Brasil (Souza *et al* 2002). Estas observaciones en América latina son consistentes con los estudios acerca de la incidencia de la EC que revelan un incremento global en la presentación de casos (Mishina *et al*, 1996; Auvin *et al*, 2005; Karlinger *et al*, 2000; Loftus *et al*, 2007;). El incremento en la incidencia de casos puede atribuirse al menos parcialmente, al mejor reconocimiento del padecimiento por parte de los médicos y al uso de la laparoscopia como herramienta de diagnóstico

Los estudios epidemiológicos de la EC alrededor del mundo consistentemente indican que existe una mayor incidencia de esta enfermedad en mujeres que en hombres en una proporción de 1.1-1.8:1 (Mishina *et al*, 1996).

### Enfermedad de Crohn en México

En México se han descrito pocos casos clínicos de la enfermedad de Crohn y existe la impresión de que es una enfermedad poco frecuente en la población. Uno de los estudios acerca de esta enfermedad en nuestro país se llevó a cabo en el Hospital General de México entre 1980 y 1989, en él se menciona que la frecuencia de pacientes con EC en el servicio de gastroenterología fue de 8 de cada 10,000 ingresos en el transcurso del estudio (Pérez *et*

al,1992). No existen datos concluyentes acerca de la incidencia de la EC en México pero se calcula que ésta oscila entre el 0.0008 y el 1.11% de la población (Rodríguez-Leal *et al*, 2004).

#### Posible vía de transmisión a los humanos

A pesar de que hasta el momento no se reconoce a la paratuberculosis como una enfermedad zoonótica, se acepta que *Map* es capaz de generar infección en pacientes inmunocomprometidos, razón por la cual múltiples trabajos de investigación han puesto especial énfasis en determinar el potencial infectivo de la leche, la carne y el agua tomando en consideración que éstos pueden contaminarse con *Map* y actuar como fuente de infección para la población humana. La contaminación de la leche puede ocurrir directamente en el interior de la glándula mamaria, por contaminación externa de la misma y de manera muy importante durante el ordeño y el almacenaje de la leche. Algunos trabajos de investigación señalan que *Map* es capaz de eliminarse de manera natural a través de la leche a concentraciones muy bajas de 1-2 ufc/ml. La leche de vaca y cabra, al igual que la leche de cualquier otro mamífero, contiene leucocitos; *Map* es una bacteria intracelular que coloniza y se multiplica en macrófagos; de manera que la leche de los animales con paratuberculosis contiene macrófagos que pueden estar infectados con micobacterias. Adicionalmente, se menciona que los animales con carga micobacteriana alta pueden eliminar 1,000 millones de micobacterias por gramo de heces, de manera que si las heces del animal ensucian la ubre pueden contaminar la leche (Chiodini *et al*, 1984).

Se menciona que 35% del ganado bovino lechero con paratuberculosis clínica y 11.6% de los portadores asintomáticos eliminan la micobacteria a través de la leche (Chiodini y Hermon-Taylor, 1993). Hasta el momento no se ha logrado el aislamiento bacteriológico de esta micobacteria a partir de leche de cabra u oveja, sin embargo se ha detectado la presencia de *Map* en la leche de estas especies a través de PCR empleando la secuencia de inserción IS900 (Muehlherr *et al*, 2003).

#### Contaminación del agua

Recientemente, se han publicado algunos trabajos de investigación en los que se ha analizado el agua de ríos y lagos, los cuales potencialmente se contaminan con *Map* por el acarreo de materia orgánica de pastizales y granjas en donde la paratuberculosis es endémica. En un estudio, se analizó semanalmente el agua de Tywi en el sur de Gales por medio de PCR, encontrando que el 68.8% de las muestras eran positivas a *Map*, asimismo fue posible detectar esta micobacteria en el tanque de almacenamiento de agua de una casa por lo que se intuye que

la contaminación de las fuentes de abastecimiento de agua es un factor de riesgo para la infección de la población humana con esta micobacteria (Pickup *et al*, 2006).

#### Contaminación de la carne

Los estudios de prevalencia de la paratuberculosis generalmente coinciden en que esta enfermedad es menos prevalente en ganado productor de carne; sin embargo al igual que en el sector lechero constituye un grave problema de salud animal. Asimismo, las vacas especializadas en la producción de leche eventualmente también se incorporan al mercado de carne en todo el mundo. En algunas ocasiones, los productores envían al rastro a los animales con signología clásica de paratuberculosis, los cuales probablemente presentan infección diseminada en sangre, linfonodos e incluso músculo esquelético (Rossiter 2001). Además, la carne puede contaminarse con heces al momento del eviscerado de la canal, por lo que se considera que no puede descartarse la carne como una potencial fuente de infección para el humano. Sin embargo, hasta el momento existe muy poca información acerca de la supervivencia de esta micobacteria en la carne.

## **Objetivos**

### **Objetivo General**

Determinar la presencia de *Map* en la leche de vacas y cabras seropositivas a paratuberculosis, a través de aislamiento bacteriano y de la amplificación de la IS900 por medio de PCR.

### **Objetivos Específicos**

- Determinar la sensibilidad del cultivo de *Map* a partir de leche con respecto al cultivo a partir de heces.
- Comparar la sensibilidad de las pruebas de PCR IS900, PCR tipo específico e IMS-PCR.
- Determinar la frecuencia de los tipos de *Map* presentes en las muestras de leche.

### **Hipótesis**

Será posible aislar e identificar genéticamente a *Map* a partir de leche de vacas y cabras seropositivas, así como detectar su presencia en la leche de hatos con antecedentes de esta enfermedad.

### **Justificación**

Se sugiere que la leche contaminada con *Map* podría ser una fuente de infección para la población humana y, por lo tanto, un factor de riesgo para el desarrollo de enfermedad de Crohn. Por lo que se considera importante valorar la presencia de esta micobacteria en la leche de vacas, cabras y hatos con antecedentes de paratuberculosis.

## Material y Métodos

### Origen y características de las muestras

En el cuadro 3 se resume el número y tipo de muestras incluidas en el estudio, especificando el sitio de donde provienen las mismas.

Cuadro 3. Tamaño de muestra y origen de las muestras analizadas

Sitio	Descripción de las muestras		n
CAIT	Vacas seropositivas a ptb.	Leche y heces	10
	Tanques de almacenamiento de leche de vaca	Leche	12
Granja "Y"	Cabras seropositivas a ptb.	Leche y heces	9
CEIEPAA	Vacas seronegativas a ptb. y positivas a IDR Vs. Tb.	Leche	6
	Bote de almacenamiento de leche de vaca	Leche	1
	Bote de almacenamiento de leche de cabra	Leche	1
CEIPSA	Bote de almacenamiento de leche de vaca	Leche	1
	Bote de almacenamiento de leche de cabra	Leche	1

### Descripción del origen de las muestras bovinas

#### Complejo Agropecuario Industrial de Tizayuca, Hidalgo (CAIT)

El CAIT es una de las cuencas lecheras más importantes del país. Actualmente cuenta con 116 establos en funcionamiento, los cuales agrupan aproximadamente a 28,000 vacas lecheras en producción en sistema intensivo. Existe evidencia clínica, patológica y bacteriológica de la presencia de paratuberculosis en esta cuenca lechera. De acuerdo con Miranda BMV, la seroprevalencia de esta enfermedad en los diferentes hatos del CAIT oscila entre 1.82 y 24.07%,

siendo la seroprevalencia promedio de 8.87% en esta cuenca. En el presente estudio se dirigió la toma de muestras de leche y heces a 10 vacas identificados previamente como seropositivas y pertenecientes a los 2 establos con mayor prevalencia de paratuberculosis en los 2 últimos años. Las muestras provienen de vacas de raza Holstein. Al momento de realizar el muestreo de la leche de estas vacas, sólo una presentó signología compatible con paratuberculosis (vaca 488); sin embargo durante los 2 meses posteriores al muestreo, cuatro vacas mas (vacas 634, 811, 923 y 1824) desarrollaron diarrea abundante y pérdida progresiva de peso; cabe señalar que el diagnóstico de paratuberculosis no fue confirmado ya que fueron desechadas. Adicionalmente, se recolectaron muestras de leche de los tanques de almacenamiento de leche cruda de los 12 establos con mayor prevalencia determinada anteriormente. Los establos seleccionados presentaban una seroprevalencia real promedio de 10.15% (IC 95% 5.37-14.93%) (Miranda, 2006).

#### Centro de Enseñanza, Práctica e Investigación en Producción y Salud Animal (CEPIPSA)

Este Centro se encuentra ubicado en San Miguel Topilejo, Delegación Tlalpan en México, D.F. En este lugar se realiza la explotación intensiva de bovinos especializados en la producción lechera de la raza Holstein. La prevalencia de paratuberculosis bovina en este centro no ha sido estimada anteriormente. Para este estudio, se tomó una muestra de 50 ml de leche sin pasteurizar directamente del bote de almacenamiento.

#### Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Animal en Altiplano (CEIEPAA)

Este Centro se dedica a la producción de leche bajo pastoreo intensivo y está localizado en Tequisquiapan, Querétaro. Anteriormente se ha estimado que la seroprevalencia de paratuberculosis en la población bovina de este hato es de 10.52% (información no publicada). Se remitieron al Departamento de Microbiología varias muestras de suero, leche y exudado nasal de vacas de raza Jersey, las cuales habían resultado positivas a la prueba de intradermorreacción conocida como “doble comparativa” que se emplea para el diagnóstico de tuberculosis; sin embargo es importante señalar que tanto las muestras de exudado nasal como las muestras de leche resultaron negativas a tuberculosis por medio de PCR. Se decidió someter los sueros de estos animales a la prueba de ELISA indirecta contra paratuberculosis y en todos los casos, se encontró que los animales eran seronegativos a esta enfermedad. Se decidió extraer ADN de estas muestras de leche y realizar la prueba de PCR para paratuberculosis, estas muestras fueron remitidas al Laboratorio sin evidencia clínica de paratuberculosis. Posteriormente, se tomó una muestra de leche del tanque de almacenamiento del CEIEPAA.

## **Descripción del origen de las muestras caprinas**

### Granja “Y”

En este estudio se obtuvieron muestras de leche de cabras raza Alpino Francesa de una granja particular localizada en Yautepec, Morelos. Esta es una granja especializada en la producción de leche de cabra bajo un sistema de explotación intensivo, en la cual anteriormente se ha detectado evidencia clínica y patológica de la presencia de paratuberculosis. Con el fin de determinar la prevalencia de la enfermedad, por medio de venopunción yugular se tomó una muestra de todos los animales en producción (n=93) y se determinó por medio de ELISA una seroprevalencia aparente de 9.67%. De esta manera se identificaron 8 cabras seropositivas; a partir de las cuales se obtuvieron 50 ml totales de leche de ambos pezones, previa limpieza y desinfección de la ubre de acuerdo al procedimiento habitual del ordeñador. Al momento de los 2 muestreos, pudo observarse que la totalidad del hato presentaba condición corporal regular y bajos parámetros de producción láctea atribuibles a la deficiente formulación de la dieta que se estaba administrando en la explotación.

### Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Animal en Altiplano (CEIEPAA)

En este centro se mantiene un rebaño de cabras de raza Alpino Francesa especializadas en la producción láctea bajo un sistema de producción intensivo. Se desconoce la prevalencia de la paratuberculosis en el hato caprino de esta explotación. En este centro no se obtuvieron muestras de leche de cabras individuales, sino tan sólo del tanque de almacenamiento de leche no pasteurizada.

### Centro de Enseñanza, Práctica e Investigación en Producción y Salud Animal (CEPIPSA)

En este Centro se realiza la crianza bajo sistema de producción intensiva de cabras de las razas Alpina Francesa, Saanen, Toggenburg y Boer. La prevalencia de paratuberculosis caprina ha sido cuantificada en 8.29% (Vélez *et al*, 1998). Para este estudio, se tomó una muestra de 50 ml de leche sin pasteurizar del bote de almacenamiento de leche no pasteurizada.

## **Procedimiento para la colección y transporte de la totalidad de las muestras**

En el caso de las muestras de leche individuales, se obtuvieron manualmente aproximadamente 50 ml de leche de ambos pezones de 8 cabras, así como 50 ml de leche de los cuatro cuartos de 10 vacas, empleando tubos nuevos y estériles tipo Falcon de 50 ml. Cabe

señalar que la toma de muestra de leche se realizó durante el ordeño programado en cada establo de manera que fue realizado por el ordeñador tras el procedimiento de limpieza y desinfección de la ubre que rutinariamente se realiza en cada explotación.

Las muestras de heces se obtuvieron utilizando un guante de palpación nuevo para cada animal, estas muestras consistieron en aproximadamente 10 g de heces que fueron recolectados directamente del recto de cada vaca y cabra.

Asimismo, se recolectaron 50-100 ml de leche no pasteurizada directamente de la toma a la pipa localizada en la parte inferior de los tanques de almacenamiento de 12 hatos del CAIT en los que previamente se había identificado evidencia serológica y clínica de la presencia de paratuberculosis, así como 50-100 ml de leche no pasteurizada directamente de los botes de almacenamiento de leche de vaca y cabra provenientes del CEPIPSA y CEIEPAA.

Todas las muestras fueron transportadas bajo temperaturas de refrigeración y se procesaron en la Unidad de Bioseguridad del Departamento de Microbiología e Inmunología de la FMVZ, UNAM; durante las primeras 24 horas después de ser obtenidas.

## **ELISA**

Se utilizó la prueba de ELISA indirecta para la detección de las vacas y cabras seropositivas empleando el antígeno protoplasmático de paratuberculosis conocido como PPA3 (Allied, Mo.). En el anexo 1 se describe la preparación de todos los reactivos necesarios para el desarrollo de esta prueba. Para la adsorción del antígeno en las placas de ELISA se depositaron 100 µl del antígeno a una concentración de 40 µg/ml con tampón carbonato, se mantuvieron a 4° C durante toda la noche para después realizar 3 lavados con solución salina con Tween; las placas secas se mantuvieron a -20° C hasta el momento de su utilización. Con el fin de incrementar la especificidad de la prueba, los sueros problema y los controles se preadsorbieron con una solución de *Mycobacterium phlei* al 5%, en una proporción de 1:1 durante toda la noche. Al día siguiente se centrifugaron los sueros a 6,000 g por 10 minutos. En cada pocillo se depositaron 99 µl de solución amortiguada de fosfatos Tween gelatina (PBS-TG) y se añadió 1 µl de suero de manera pareada. Las placas se incubaron a temperatura ambiente dentro de una cámara húmeda durante 2 horas, posteriormente se realizaron 3 lavados con PBS-TG y se depositaron 100 µl de anti-IgG ovina marcada con peroxidasa de rábano (HRP) (Sigma Aldrich, St. Louis Mo.) a una dilución de 1:4500 con PBS-TG y se incubaron en cámara húmeda a TA, al término de 2 horas se realizaron 3 lavados con PBS-TG. Inmediatamente se añadieron 100 µl

de ABTS (Sigma Aldrich) recién preparado el cual se dejó actuar en oscuridad sobre un agitador orbital durante 20 minutos. La lectura se realizó en un espectrofotómetro de 8 canales (Elx 800, Bio-tek Instruments) empleando un filtro de 405 nm.

Para determinar la positividad de los sueros problema, el promedio de la densidad óptica de cada suero se dividió entre el promedio de la densidad óptica del control positivo, cuando el cociente resultante era mayor o igual a 0.80 se consideró seropositiva la muestra. Es importante destacar que este protocolo de ELISA ha sido descrito anteriormente y presenta una especificidad y sensibilidad de 75% y 64%, respectivamente (García MJF *et al*, 1991).

### **Aislamiento bacteriano a partir de heces de vacas y cabras**

Se añadieron 2 g de cada muestra de heces a 35 ml de agua destilada estéril, sin importar la especie animal de la que provenían, se mezclaron y se mantuvieron a temperatura ambiente (TA) durante 30 min. Posteriormente, se removió el sobrenadante y se vertió en tubos estériles de 50 ml. Las muestras se centrifugaron a 1700 g durante 20 min, el sobrenadante se decantó y la pastilla se resuspendió en 30 ml de solución de hexadecilpiridinio (HPC) al 0.75%. La descontaminación se realizó durante toda la noche a TA, las muestras se mantuvieron en posición vertical. Al día siguiente, con una pipeta de transferencia estéril se tomó el material de la interfase y se inocularon tres tubos de medio Herrold con 2 mg/l de micobactina J y un tubo sin este sideróforo (Ver Anexos 2 y 3).

Los tubos se mantuvieron en posición horizontal durante una semana con los tapones sin apretar para permitir la absorción y evaporación de la humedad en la superficie del medio; posteriormente se cerraron firmemente los tubos y se mantuvieron en posición vertical durante 50 semanas. El crecimiento bacteriano se verificó al menos cada 4 semanas.

### **Aislamiento bacteriano a partir de leche de vacas y cabras**

De cada muestra de leche se tomaron 10 ml y se centrifugaron a 3100 X g por 30 min, se retiró el suero del sobrenadante y la pastilla junto con la fracción cremosa de la leche se resuspendieron en 10 ml de HPC al 0.75%, se mantuvieron a temperatura ambiente (TA) durante toda la noche y se centrifugaron nuevamente a 1,000 g durante 15 min. La pastilla se disolvió en 0.5 ml de PBS.

Posteriormente, se sembraron 0.2 ml de cada muestra en tres tubos con medio de yema de huevo de Herrold (HEYM) con micobactina y uno sin micobactina; todos los tubos se mantuvieron a 37°C durante 50 semanas. El crecimiento de colonias se verificó cada 2 semanas. Las muestras de leche bovina de los tanques de almacenamiento adicionalmente se sembraron en tres tubos de medio Löwentein-Jensen con micobactina y uno sin micobactina (Anexo 5).

### **Identificación de *Map***

Para la identificación de *Map* se verificó la morfología y características de crecimiento de las colonias, la dependencia a micobactina, así como la morfología y afinidad tintorial de los bacilos por medio de la tinción de Ziehl-Neelsen (Anexo 6).

### **Extracción de ADN micobacteriano**

Cada muestra de 10 ml de leche, se centrifugó a 3,100 g por 30 min, se descartó el suero para posteriormente resuspender la pastilla y la fracción cremosa resultante en 400 µl de PBST. Las muestras se introdujeron en un baño María a temperatura de ebullición durante 10 min. La extracción de ADN se realizó de acuerdo a las instrucciones del protocolo del estuche comercial QIAmp DNA Mini Kit (Qiagen) para la extracción de ADN a partir de sangre y otros fluidos corporales con algunas modificaciones que se describen a continuación. Se depositaron 40 µl de proteasa en tubos de 1.5 ml, se agregaron 400 µl de cada muestra y 400 µl de solución de lisis, los tubos se agitaron por medio de vórtex durante 15 s y se colocaron en un baño María a 56 °C durante 10 minutos, se centrifugaron brevemente y se agregaron 400 µl de etanol absoluto y se mezclaron por medio de vórtex durante 15s. Cada solución resultante se transfirió a una columna y éstas se centrifugaron a 5,000 g/2 min, se añadieron 500 µl de la solución de lavado AW1 y las columnas se centrifugaron a 5,000 g /2 min, después se añadieron 500 µl de la solución AW2 y las columnas se centrifugaron a 9,000 g/3 min y nuevamente a 9,000 g/1 min. Finalmente se agregaron 100 µl del tampón de elusión y se dejaron reposar durante al menos 5 minutos, para después centrifugar a 3,500 g/1 min. Cabe señalar que después de cada ciclo de centrifugado el tubo colector de la columna fue reemplazado por uno nuevo. El ADN resultante se conservó a temperatura de refrigeración.

### **Separación inmunomagnética**

Producción de anticuerpos policlonales anti-*Map* en conejo

Se emplearon colonias de *Map* crecidas en medio de Löwenstein-Jensen con micobactina las cuales fueron suspendidas en solución amortiguada de fosfatos (PBS). Posteriormente esta solución se centrifugó y lavó 5 veces con PBS para posteriormente inactivar las colonias por medio de calor en un baño maría a 56 °C, durante 60 minutos. Se mezclaron 0.5 ml de esta suspensión con adyuvante incompleto de Freund y se utilizaron para inocular de manera subcutánea y en múltiples sitios a 4 conejos Nueva Zelanda de 2 meses de edad, previa desinfección del sitio de aplicación. Este procedimiento de inoculación se repitió 5 veces con un intervalo entre aplicación de entre 10 y 15 días. Posteriormente se aplicaron de manera subcutánea 2 dosis de 1 ml de vacuna contra paratuberculosis (Gudair) con 15 días de separación entre cada aplicación.

Por medio de IDGA (Ver anexo 4) y ELISA empleando el antígeno PPA-3 y anti IgG de conejo marcada con HRP (Sigma Aldrich), se verificó que todos los conejos eran seropositivos y se procedió a sangrarlos en blanco por medio de punción cardíaca. Los conejos fueron sacrificados humanitariamente por medio de dislocación cervical.

Los tubos vacutainer empleados fueron mantenidos a 4 °C hasta la completa formación del coágulo y el suero se vertió asepticamente en tubos de 2 ml para ser conservado a -70 °C.

#### Recubrimiento de las perlas inmunomagnéticas

El suero de conejo sensibilizado se empleó para recubrir perlas inmunomagnéticas borrego anti-IgG de conejo tipo M-280 de Dynabeads (Dyna), este proceso se realiza añadiendo 1 ml de suero a 1 ml de perlas previamente resuspendidas en PBS-BSA y dejando incubar a 4° C, en agitación constante durante 24 h. Al día siguiente, las perlas se colocaron en el concentrador de partículas magnéticas (MPC) durante 2 minutos y el líquido sobrenadante se aspiró para ser desechado, se realizaron 4 lavados con PBS-Albúmina sérica bovina (BSA) y las perlas se conservaron en 1 ml de PBS-BSA a 4° C hasta su utilización.

#### Separación inmunomagnética (IMS):

Cada muestra de leche se homogeneizó mediante vórtex y se obtuvieron 10 ml. Cada nueva muestra fue sometida a centrifugación a 3100 X g durante 30 min y la pastilla junto con la fracción cremosa de la leche se resuspendió en 1 ml de PBS-T antes de la IMS.

Se añadieron 10 µl de perlas inmunomagnéticas previamente cubiertas con anticuerpos policlonales anti-*Map* a cada 1 ml de muestra de leche centrifugada y resuspendida en PBS y se incubaron 30 min a TA con agitación constante. Después de la incubación, las perlas inmunomagnéticas se separaron con un concentrador de partículas magnéticas (Dynal) durante 10 min. El líquido residual se aspiró para ser removido y cada muestra se sometió a 3 lavados con PBS-T durante los cuales el concentrador de partículas se separó de la pared del tubo por 2 min. Finalmente, las partículas inmunomagnéticas se resuspendieron en 100 µl de agua estéril.

### **Extracción de ADN micobacteriano post IMS**

Para liberar el ADN de las micobacterias unidas a las perlas inmunomagnéticas, la suspensión se calentó a 100° C durante 20 minutos en el baño maría, posteriormente los tubos se centrifugaron a 300 X g por 2 min para sedimentar las perlas.

### **PCR**

Iniciadores utilizados para la prueba de PCR basado en la secuencia IS900

Al inicio del estudio, se emplearon los iniciadores IS900P3N (5'-GGG TGT GGC GTT TTC CTT CG-3') y IS900P4N (5'-TCC TGG GCG CTG AGT TCC TC-3') diseñados por Ayele y colaboradores en 2005. Sin embargo, siguiendo el protocolo propuesto se observaron varias bandas de amplificación inespecífica. Al analizar la secuencia de estos iniciadores por medio del programa Vector NT (Infomax, USA) se determinó que el primer P4N formaba una orquilla por lo que se decidió diseñar un nuevo primer en sustitución de éste, al que se designó P5N (5'-ATTTGCGCCGCCACCGCCACG-3').

### **Determinación de la sensibilidad de la prueba de PCR IS900 y PCR tipo específico**

Con el fin de determinar la sensibilidad de las pruebas se inoculó experimentalmente leche entera ultrapasteurizada con una cepa previamente identificada como tipo "C" crecida en medio LJ. Cabe señalar que antes de su inoculación se verificó por PCR IS900 y PCR tipo específico que la leche fuera libre de paratuberculosis. Para la preparación del inóculo, se hizo un raspado del cultivo y se resuspendieron estas colonias en PBST, posteriormente se llevaron a cabo 5 lavados con PBST. La cuantificación del inóculo se realizó por espectrofotometría tomando en consideración que a una longitud de onda de 550 nm una densidad óptica de 0.25 equivale aproximadamente a  $1 \times 10^8$  ufc/ml. Se realizaron diluciones décuples seriales para obtener concentraciones desde  $1 \times 10^6$  ufc/ml hasta  $1 \times 10^0$  ufc/ml en un volumen total de 10 ml de

leche. La extracción del ADN se realizó siguiendo las instrucciones del estuche comercial QIAmp (QIAGEN). Se aplicó la prueba de PCR correspondiente siguiendo el protocolo que se describirá posteriormente; una alícuota de 10  $\mu$ l del producto de cada reacción se sometió a electroforesis en geles de agarosa al 2% en TAE teñidos con bromuro de etidio y se visualizaron en un fotodocumentador Gel Logic 200 (Kodak). Este procedimiento se realizó por duplicado.

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

Se utilizaron los iniciadores IS900P3N e IS900P5N, descritos anteriormente. El protocolo del termociclador consistió en un ciclo inicial de desnaturalización a 94° C por 5 min, 35 ciclos de desnaturalización a 94°C por 40 s, alineamiento a 67° C por 40 s, extensión a 72° C por 40 s y finalmente un ciclo de 72° C por 5 min. Posteriormente, una alícuota de 10  $\mu$ l de cada producto de amplificación se separó por medio de electroforesis en gel de agarosa al 2% con solución de tris, ácido acético y EDTA (TAE) y 5  $\mu$ l de bromuro de etidio; el producto de la reacción fue visualizado utilizando un fotodocumentador Gel Logic 200 (Kodak). El producto esperado tiene un peso molecular de 314 pares de bases (pb), para determinar el tamaño de los segmentos amplificados se empleó el marcador de peso molecular 50 pb (Invitrogen; La Joya, California).

### **PCR tipo específico**

Todas las muestras de ADN fueron sometidas a una nueva PCR para identificar el tipo de cepa de *Map* al que corresponden. Se utilizaron los iniciadores: DMC529, DMC531 y DMC533. Cada reacción consistió en 12.5  $\mu$ l de premezcla para PCR (Sigma Aldrich, EUA), 1  $\mu$ l de cada iniciador, 9  $\mu$ l de ADN y 0.5  $\mu$ l de Taq polimerasa platinum (Invitrogen). El protocolo consistió en un ciclo inicial de desnaturalización a 95° C por 3 min, 35 ciclos a 94° C por 30s, 60° C por 30 s, 72° C durante 30s y un ciclo final de extensión a 72° C por 5 min. Posteriormente, 10  $\mu$ l de cada producto de amplificación se separaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 2% en TAE con 5  $\mu$ l de bromuro de etidio. Los productos se visualizaron utilizando el fotodocumentador Gel Logic 200 (Kodak). En las cepas del tipo “C” el producto esperado es de 310 pb, mientras que en el tipo “S” e “I” el producto es de 162 pb. Se utilizó el marcador de peso molecular 50 pb (Invitrogen) para determinar el tamaño de los segmentos amplificados.

## Resultados

### Sensibilidad de la prueba de PCR IS900 y PCR tipo específico

Se determinó que la sensibilidad del protocolo de PCR IS900 aplicado es de  $1 \times 10^2$  ufc/10 ml de leche (Figura 6), mientras que el límite mínimo de detección del protocolo de PCR tipo específico es de  $1 \times 10^0$  ufc/10 ml (Figura 7).

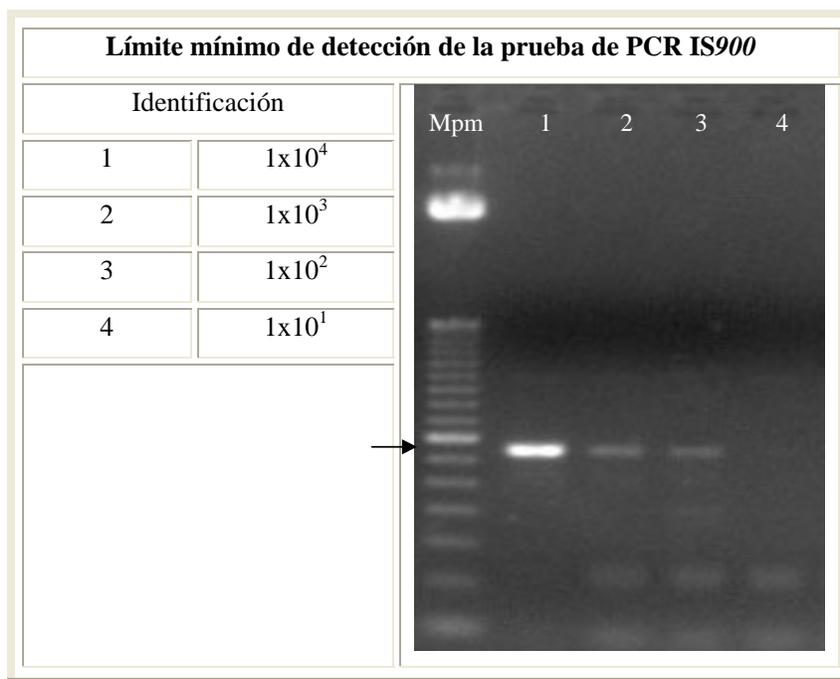


Figura 6. Sensibilidad de la prueba de PCR IS900. Gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio, en el que se observa en el primer carril el marcador de peso molecular 50 pb, carriles identificados 1 al 4 producto de la amplificación del PCR a partir de leche inoculada experimentalmente con distintas concentraciones de *Map*. La flecha indica el peso del producto esperado (314 pb).

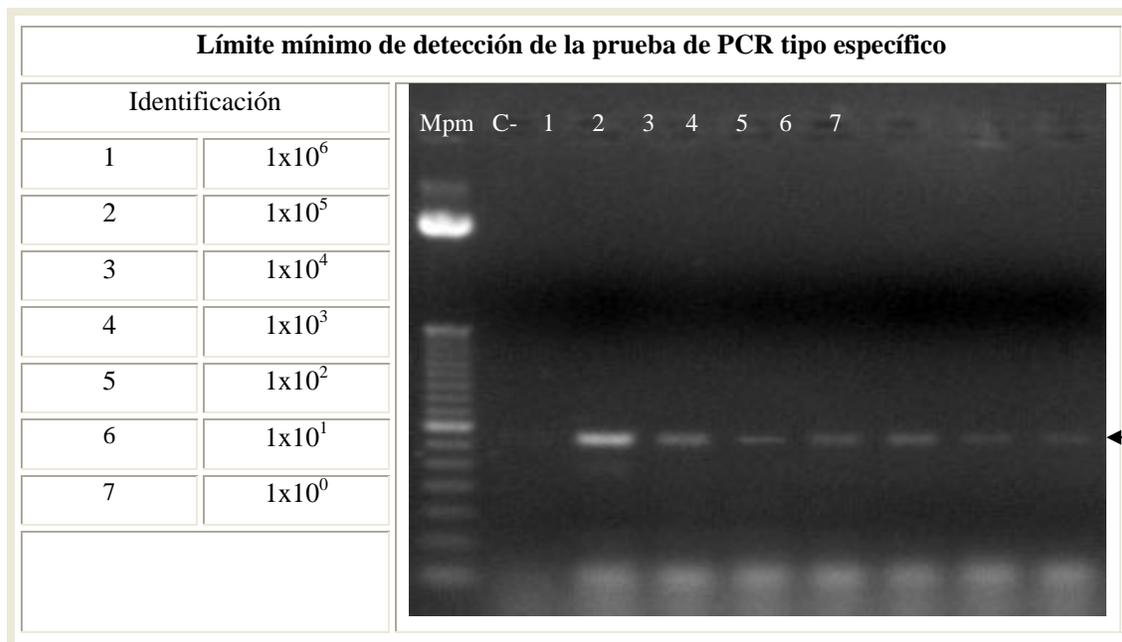


Figura 7. Sensibilidad de la prueba de PCR tipo específico. Gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio, en el que se observa en el primer carril el marcador de peso molecular 50 pb, carriles identificados 1 al 7 producto de la amplificación del PCR a partir de leche inoculada experimentalmente con distintas concentraciones de *Map*. La flecha indica el peso del producto esperado (310 pb).

### PCR IS900

PCR a partir de extracciones de ADN de leche de vaca

Al utilizar los iniciadores específicos de la secuencia IS900, la prueba de PCR permitió identificar el genoma de *Map* en 12/12 (100%) de las muestras de leche del mismo número de vacas seropositivas a paratuberculosis (Figuras 8 y 9).

Asimismo, fue posible identificar la presencia de esta micobacteria en 5/6 (83.33%) de las muestras de leche de vacas seronegativas a paratuberculosis pero positivas a la prueba doble comparativa para el diagnóstico de tuberculosis bovina (Figura 10).

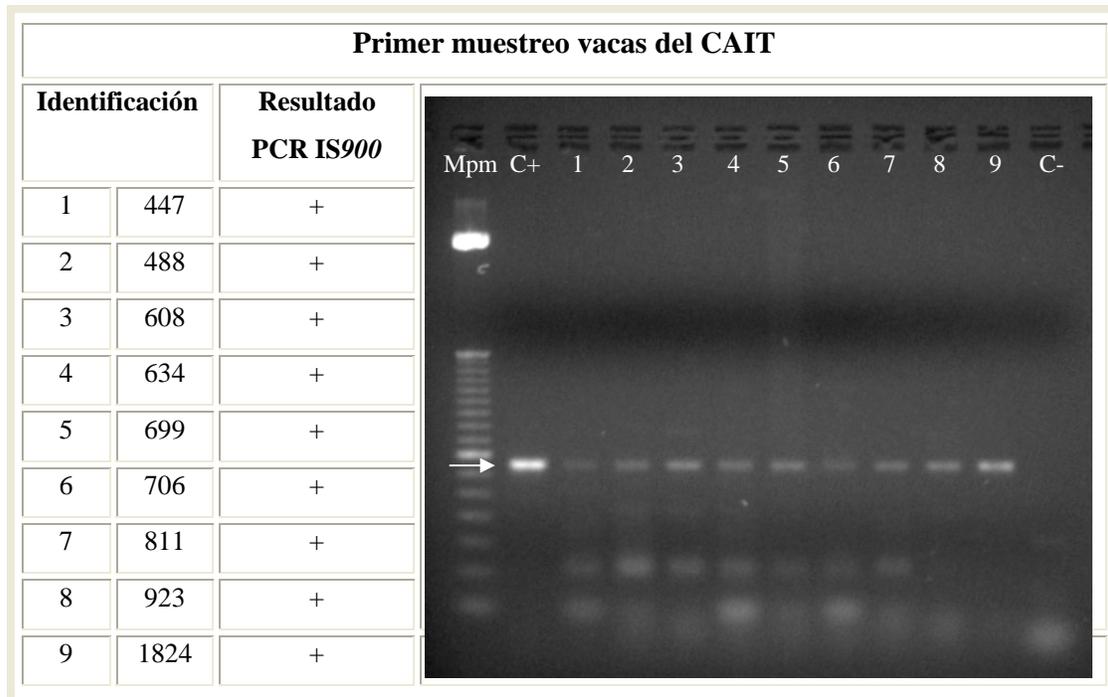


Figura 8. Producto de la amplificación del PCR a partir de extracciones de ADN de leche de vaca. Gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio, en el que se observa en el primer carril el marcador de peso molecular 50 pb, carriles identificados 1 al 9 producto de la amplificación del PCR. La flecha indica el peso del producto esperado (314 pb).

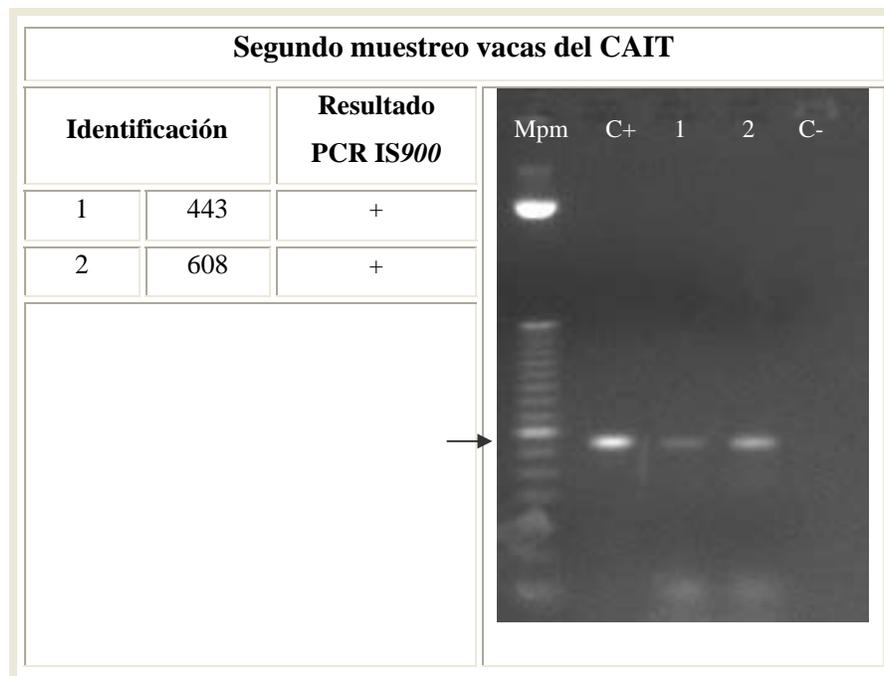


Figura 9. Producto de la amplificación del PCR a partir de extracciones de ADN de leche de vaca.

Gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio, en el que se observa en el primer carril el marcador de peso molecular 50 pb, carriles identificados 1 al 2 producto de la amplificación del PCR. La flecha indica el peso del producto esperado (314 pb).

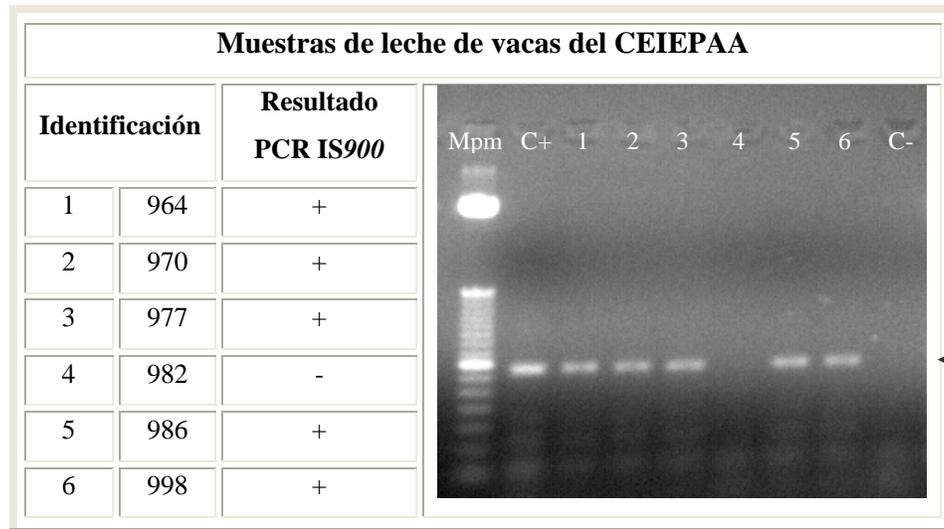


Figura 10. Producto de la amplificación del PCR a partir de extracciones de ADN de leche de vaca. Gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio, en el que se observa en el primer carril el marcador de peso molecular 50 pb, carriles identificados 1 al 2 producto de la amplificación del PCR. La flecha indica el peso del producto esperado (314 pb).

#### PCR a partir de extracciones de ADN de leche de cabra

Al analizar 15 muestras de leche de 8 cabras previamente identificadas como seropositivas a paratuberculosis, se detectó la presencia de *Map* en el 100%(15/15) de las muestras (Figuras 11 y 12).

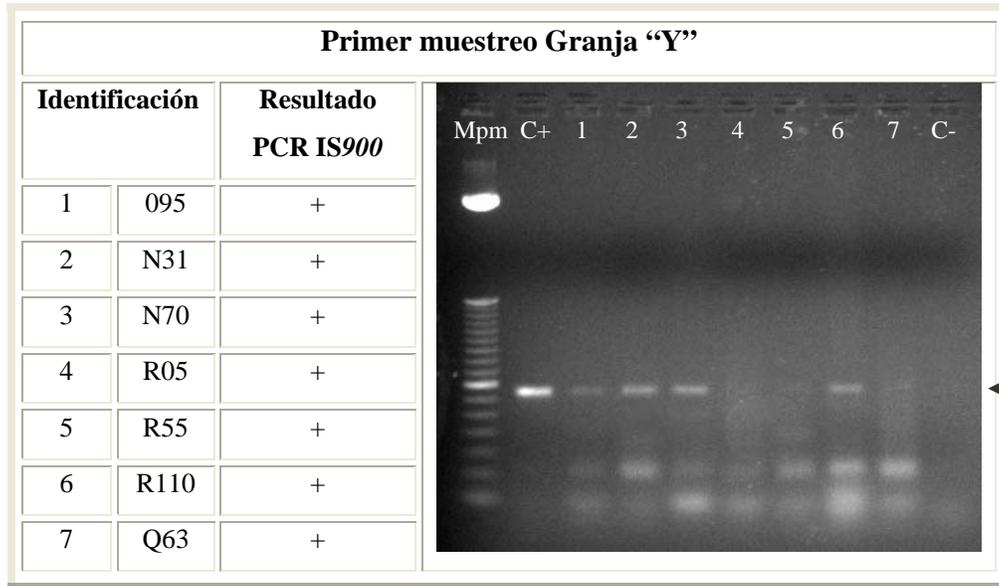


Figura 11. Producto de la amplificación del PCR a partir de extracciones de ADN de leche de cabra. Gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio, en el que se observa en el primer carril el marcador de peso molecular 50 pb, carriles identificados 1 al 7 producto de la amplificación del PCR. La flecha indica el peso del producto esperado (314 pb).

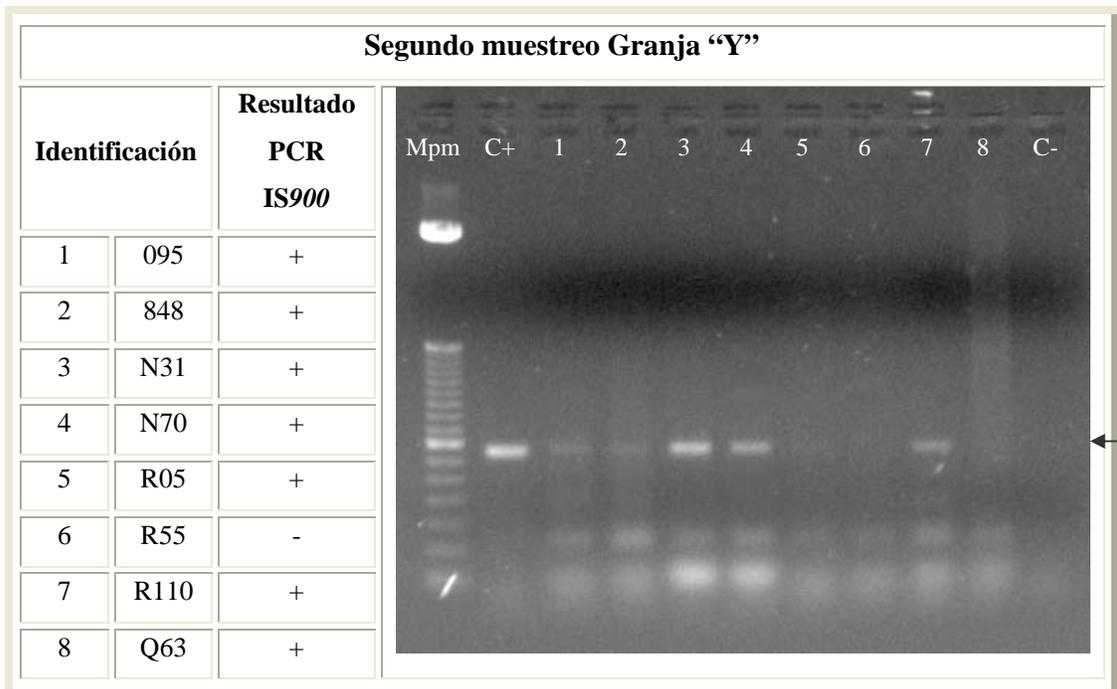


Figura 12. Producto de la amplificación del PCR a partir de extracciones de ADN de leche de cabra. Gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio, en el que se observa en el primer carril el marcador de peso molecular 50 pb, carriles identificados 1 al 8 producto de la amplificación del PCR. La flecha indica el peso del producto esperado (314 pb).

PCR a partir de extracciones de ADN de leche de los tanques y botes de almacenamiento de leche no pasteurizada

El desarrollo de esta prueba permitió la identificación del genoma de *Map* en 12/12 (100%) de las muestras de leche de vaca de los tanques de almacenamiento de leche no pasteurizada del CAIT (Figura 13), así como en las muestras de leche de los botes de almacenamiento provenientes del CEPIPSA y CEIEPAA (Figura 14). Asimismo, por medio de la PCR se detectó la presencia de *Map* en 3/3 (100%) de los botes de almacenamiento de leche de cabra estudiados provenientes de Granja Y, CEPIPSA y CEIEPAA (Figura 14).

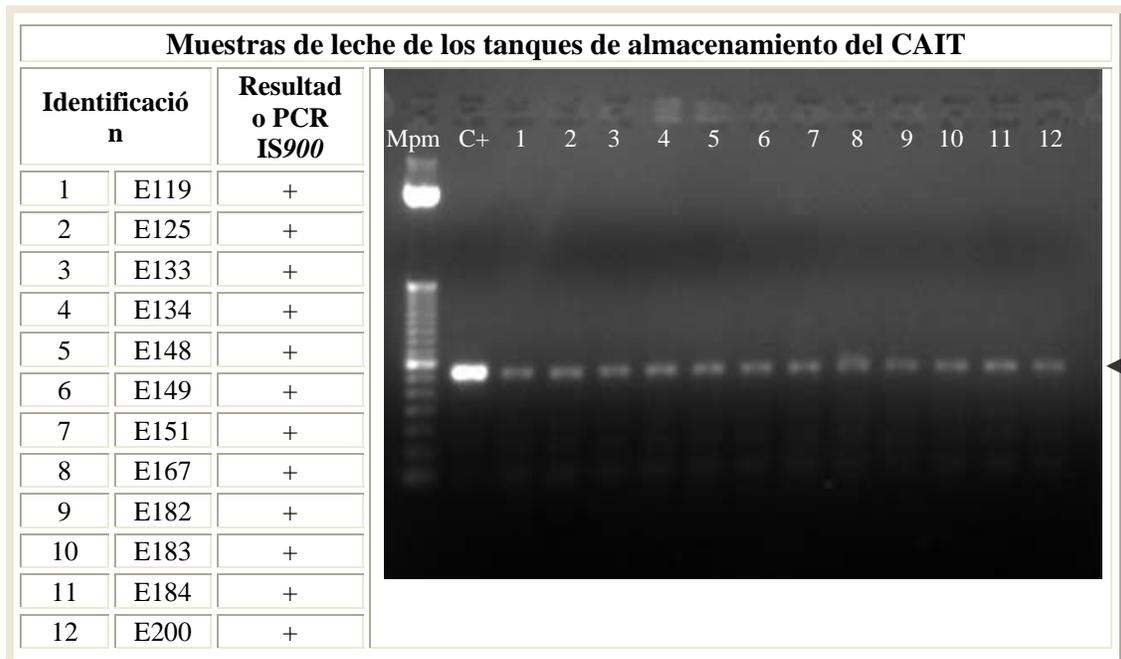


Figura 13. Producto de la amplificación del PCR a partir de extracciones de ADN de leche de los tanques de almacenamiento de leche de vaca. Gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio, en el que se observa en el primer carril el marcador de peso molecular 50 pb, carriles identificados 1 al 12 producto de la amplificación del PCR. La flecha indica el peso del producto esperado (314 pb).

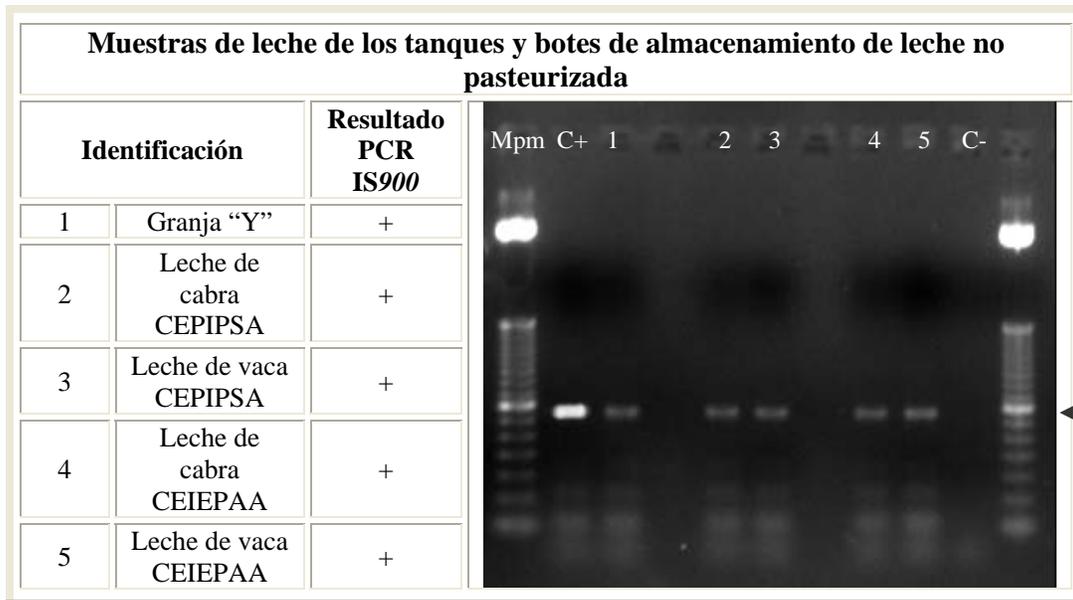


Figura 14. Producto de la amplificación del PCR a partir de extracciones de ADN de leche de los botes de almacenamiento de leche de cabra y vaca. Gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio, en el que se observa en el primer carril el marcador de peso molecular 50 pb, carriles identificados 1 al 5 producto de la amplificación del PCR, carriles intermedios sin identificación en blanco. La flecha indica el peso del producto esperado (314 pb).

## PCR-IMS

Cuando previamente se realizó separación inmunomagnética, se identificó la banda de amplificación esperada en 5/10 (50%) de las muestras de leche de vaca, así como en 5/8 (62.5%) de las muestras de leche de cabra. En total esta prueba identificó tan solo al 55.5% de las muestras, las cuales resultaron positivas por medio de PCR (Figura 15).

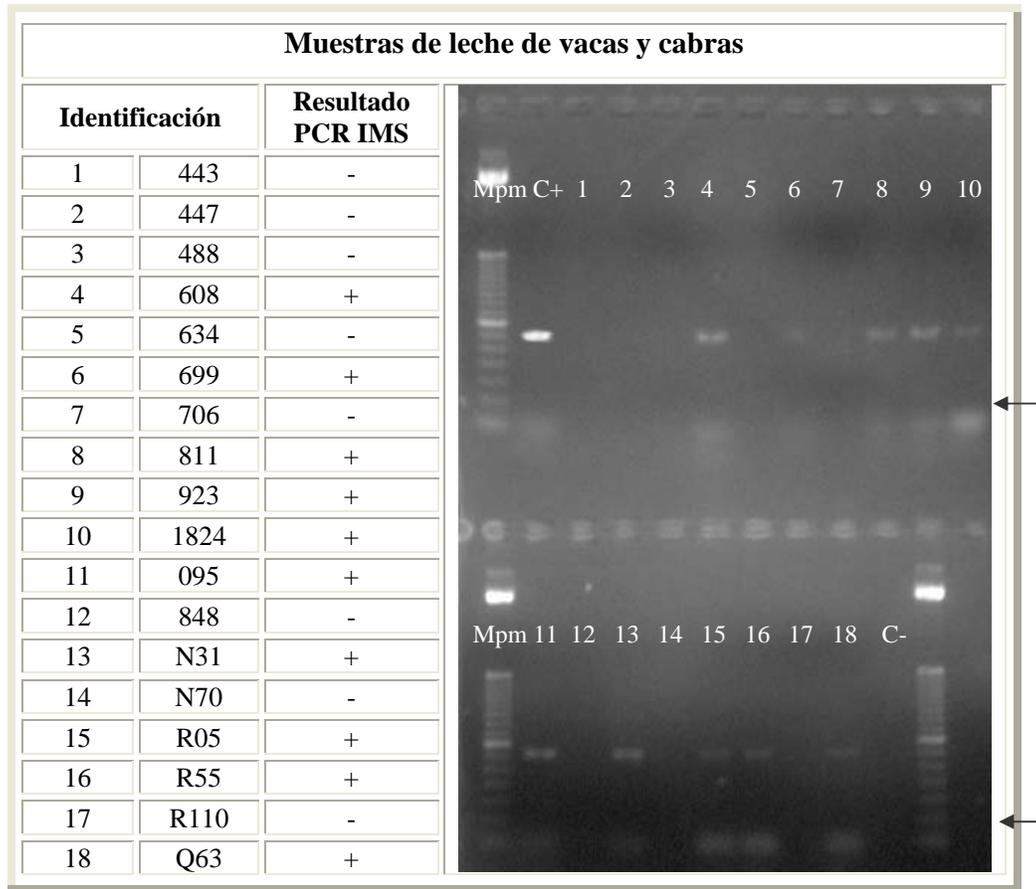


Figura 15. PCR-IMS a partir de muestras de leche individuales. Gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio, en el que se observa en el primer carril el marcador de peso molecular 50 pb, carriles identificados 1 al 5 producto de la amplificación del PCR. Las flechas indican el peso del producto esperado (314 pb).

## PCR tipo específico

PCR tipo específico a partir de extracciones de ADN de leche de vaca

Al utilizar los iniciadores diseñados por Collins, la prueba de PCR permitió identificar el genoma de *Map* en 10/10 (100%) de las muestras de leche del mismo número de vacas seropositivas a paratuberculosis procedentes del CAIT. Asimismo, esta prueba nos permite

determinar que 7/10 (70%) de las muestras contienen cepas de Map del tipo “C” o cattle, mientras que en 3/10 (30%) de los casos la leche muestra evidencia de infección mixta por cepas tipo “C” y “S” (Figura 16). Al analizar las muestras de leche de las vacas provenientes del CEIEPAA, se encontró que 6/6 (100%) de las muestras contienen cepas de los tipos “C/S” (Figura 17).

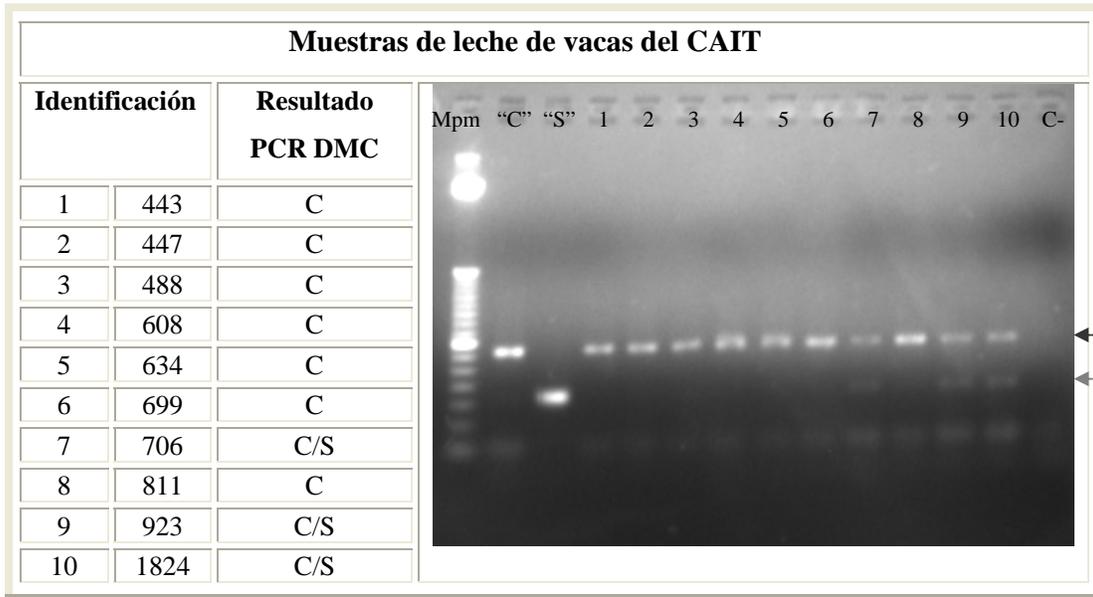


Figura 16. Producto de la amplificación del PCR tipo específico a partir de extracciones de ADN de leche de vaca. Gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio, en el que se observa en el primer carril el marcador de peso molecular 50 pb, carriles identificados 1-10 producto de la amplificación del PCR. La flecha negra indica el peso del producto tipo “C” (310 pb), la punteada el peso del producto tipo “S” (162 pb).

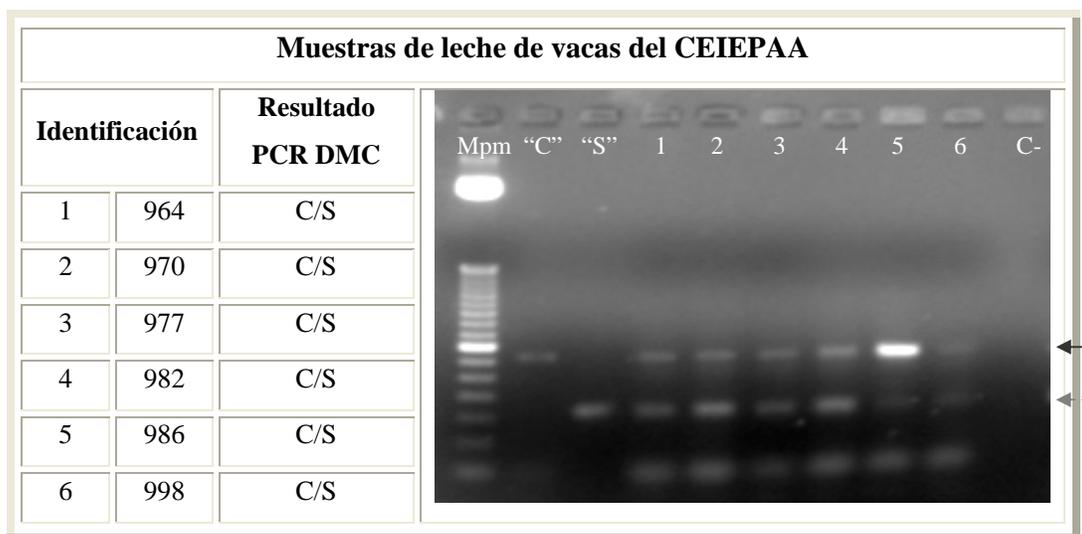


Figura 17. Producto de la amplificación del PCR tipo específico a partir de extracciones de ADN de leche de vaca. Gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio, en el que se observa en el primer carril el

marcador de peso molecular 50 pb, carriles identificados 1 a 6 producto de la amplificación del PCR. La flecha negra indica el peso del producto tipo “C” (310 pb), la flecha punteada el peso del producto tipo “S” (162 pb).

#### PCR a partir de extracciones de ADN de leche de cabra

La prueba permitió identificar esta micobacteria a partir del ADN extraído de las muestras de leche pertenecientes a 8 cabras identificadas previamente como seropositivas a paratuberculosis y determinar que 4/8 (50%) de las muestras presentaban cepas de *Map* del tipo “C” y 3/8 (37.5%) cepas tanto del tipo “C” como “S” (Figura 18).

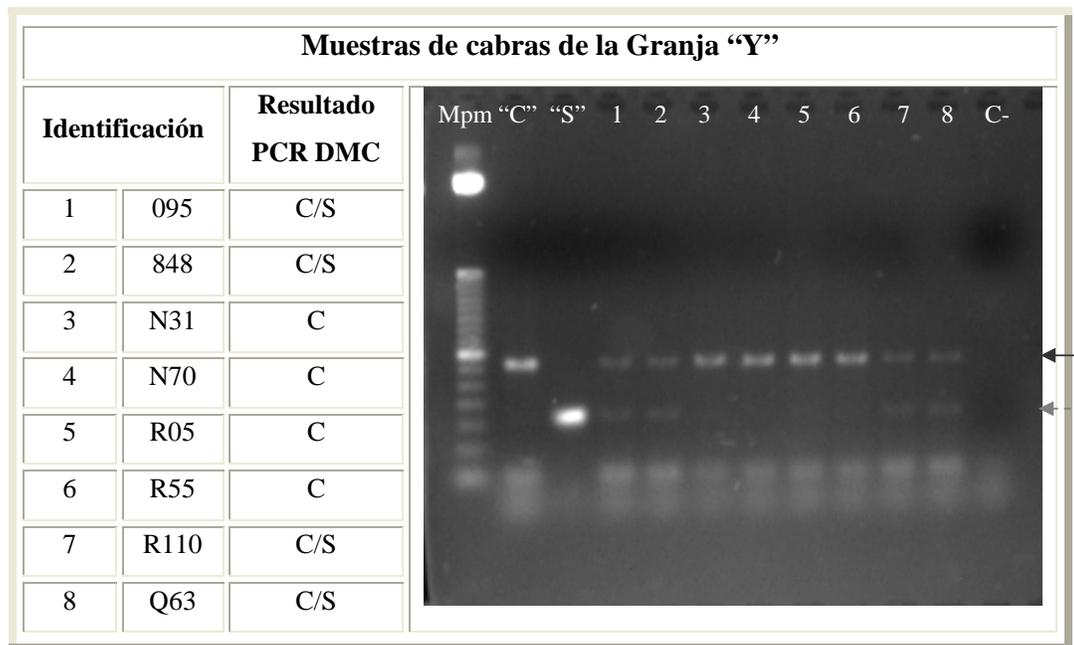


Figura 18. Producto de la amplificación del PCR tipo específico a partir de extracciones de ADN de leche de cabra. Gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio, en el que se observa en el primer carril el marcador de peso molecular 50 pb, carriles identificados 1 a 8 producto de la amplificación del PCR. La flecha negra indica el peso del producto tipo “C” (310 pb), la flecha punteada el peso del producto tipo “S” (162 pb).

#### PCR tipo específico a partir de extracciones de ADN de leche de los tanques y botes de almacenamiento de leche no pasteurizada

Al analizar las extracciones de ADN provenientes de las muestras de leche de los tanques de almacenamiento del CAIT, se determinó que 58.33% de éstas presentaban cepas del tipo “C”, mientras que en 41.67% se aprecia el producto de amplificación esperado para cepas tanto del tipo “C” como “S” (Figura 19).

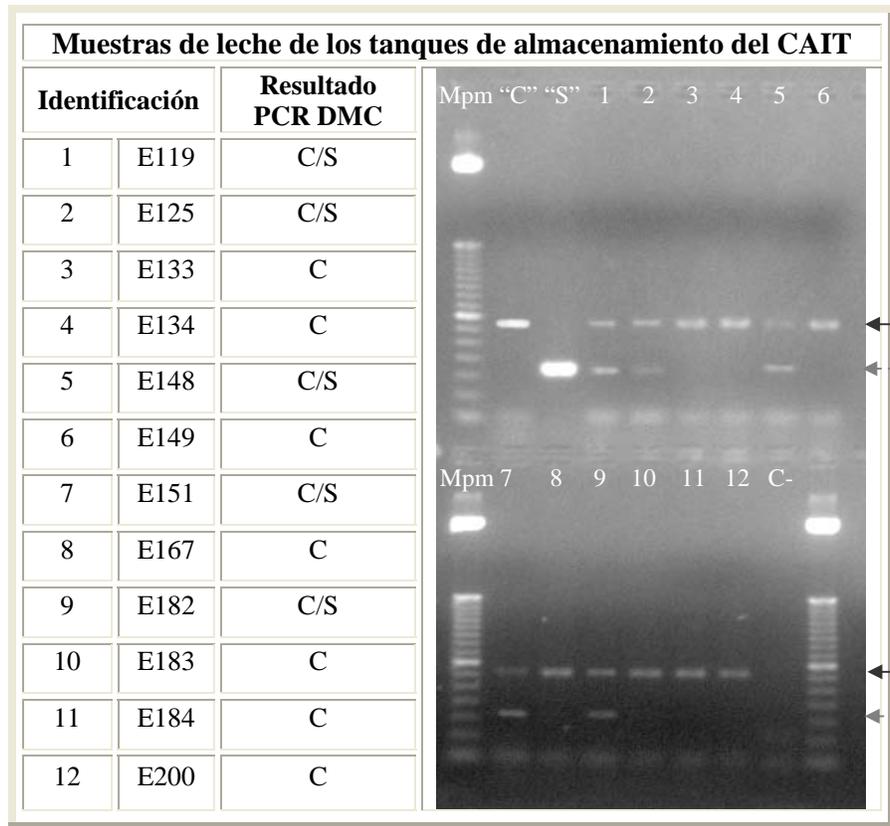


Figura 19. Producto de la amplificación del PCR tipo específico a partir de extracciones de ADN de leche de los tanques de almacenamiento de leche no pasteurizada. Gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio, en el que se observa en el primer carril el marcador de peso molecular 50 pb, carriles identificados 1 al 12 producto de la amplificación del PCR. La flecha negra indica el peso del producto tipo “C” (310 pb), la flecha punteada el peso del producto tipo “S” (162 pb).

Por medio de esta prueba se determinó que el 100% de las muestras de los botes y tanques de almacenamiento de leche tanto de cabra como de vaca provenientes del CEIPSA y CEIEPAA presentan cepas de los tipos “C” y “S” (Figura 19). Asimismo, se identificaron ambos tipos de cepas en la muestra de leche del bote de almacenamiento de la granja “Y” (Figura 20).

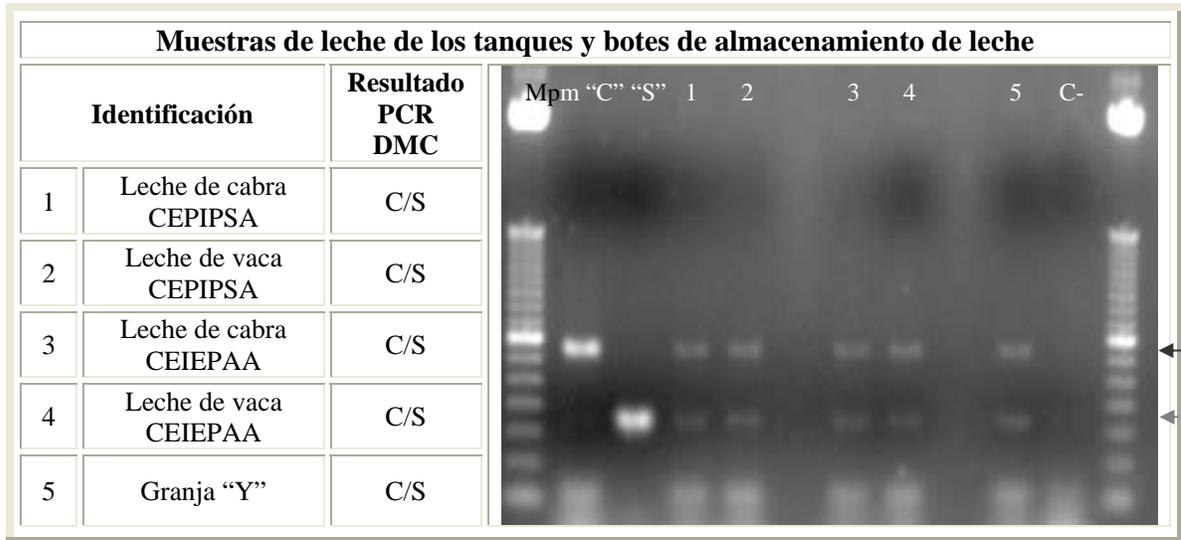


Figura 20. Producto de la amplificación del PCR tipo específico a partir de extracciones de ADN de leche de los tanques de almacenamiento de leche no pasteurizada. Gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio, en el que se observa en el primer carril el marcador de peso molecular 50 pb, carriles identificados 1 al 5 producto de la amplificación del PCR. Carriles sin identificación en blanco. La flecha negra indica el peso del producto tipo "C" (310 pb), la flecha punteada el peso del producto tipo "S" (162 pb).

### Frecuencia de tipos de *Map* identificados

En la figura 21 se muestra la frecuencia de tipos de *Map* identificados en las muestras individuales de leche de vaca que incluyen las muestras tanto de vacas del CAIT como del CEIEPAA. En la figura 22, se representa la frecuencia de tipos de *Map* presentes en la leche de los tanques de almacenamiento del CAIT, CEIPSA y CEIEPAA.

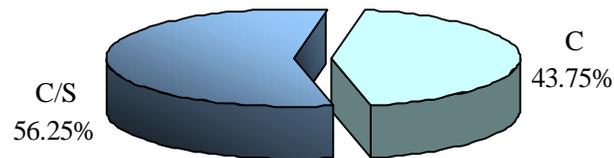


Figura 21. Proporción de tipos de *Map* identificados en muestras individuales de leche de vaca

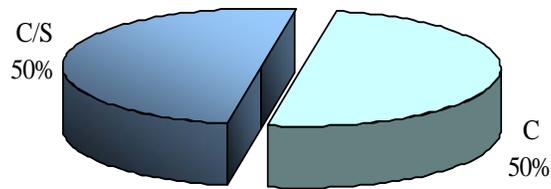


Figura 22. Proporción de tipos de *Map* identificados en muestras colectivas de leche bovina

En la figura 23 se representa la frecuencia de tipos de *Map* en las muestras de leche de cabras de la granja “Y”, mientras que la figura 23 muestra la frecuencia de identificación de patrones mixtos en las muestras de leche de cabra de los tanques de almacenamiento de la Granja “Y”, CEPIPSA y CEIEPAA

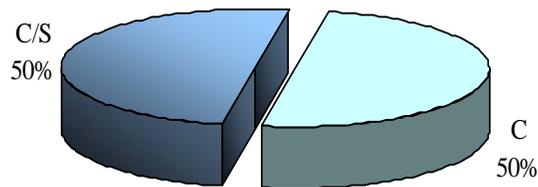


Figura 23. Proporción de tipos de *Map* identificados en muestras individuales de leche de cabra

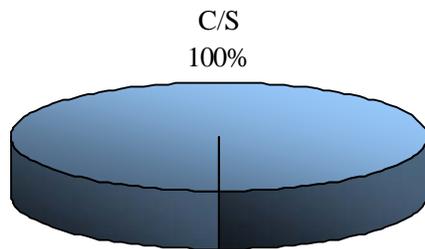


Figura 24. Proporción de tipos de *Map* identificados en muestras colectivas de leche caprina

### **Producción de anticuerpos policlonales anti*Map* en conejo:**

Al final del protocolo de inmunización, todos los conejos fueron seropositivos tanto por IDGA como por ELISA indirecta. Después de la primera aplicación subcutánea de la vacuna contra la paratuberculosis ovina en los conejos se intensificó la apariencia de lesiones granulomatosas en todos los sitios de inoculación, llegando incluso a debridar algunos de ellos. Se realizó la necropsia de cada uno de los conejos y en ningún caso se observaron lesiones macroscópicas significativas salvo a nivel subcutáneo donde se apreciaron múltiples nódulos e hiperemia, al corte de estos nódulos se apreció abundante cantidad de exudado blanco

amarillento. El estudio histopatológico de estas lesiones reveló la presencia de paniculitis granulomatosa multifocal grave como se evidencia en las figuras 25 y 26.

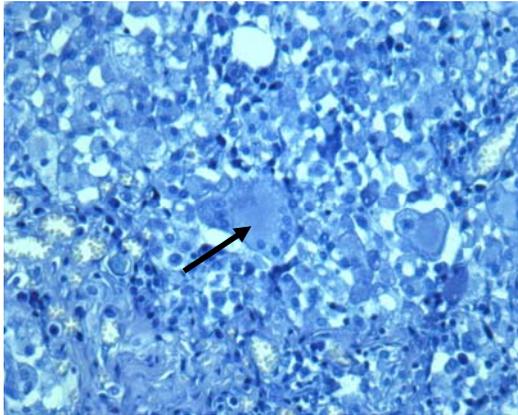


Figura 25. Tejido subcutáneo. Lesión granulomatosa, la flecha señala una célula gigante tipo Langhans. No se aprecian BAAR. ZN, 40x.

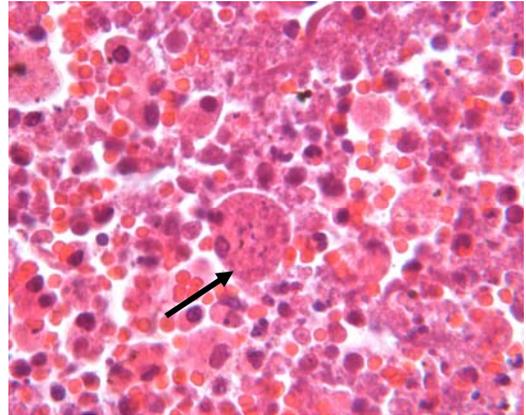


Figura 26. Tejido subcutáneo. Macrófago fagocitando adyuvante, HE, 40x.

### **Aislamiento bacteriano a partir de leche y heces bovinas**

Se detectó la presencia de colonias visibles compatibles con *Map* en los tubos inoculados con (4/10) 40% de las muestras de leche bovina. Se realizaron frotis y se tiñeron con la técnica de Ziehl Neelsen, la prueba de PCR IS900 permite aseverar que estos aislamientos no corresponden a *Map*. En contraste, se logró el aislamiento bacteriológico de *Map* a partir de 3/10 (30%) muestras de heces bovinas (Figura 27). Se realizaron frotis y se tiñeron con la técnica de Ziehl Neelsen, en todos los casos se observaron bacilos ácido alcohol resistentes compatibles con *Map* y por medio de PCR se confirmó su identidad.



Figura 27. Aislamiento de *Map*, medio HEYM con micobactina, 10 meses de incubación.

### **Aislamiento bacteriano a partir de leche y heces caprinas**

En este estudio, después de 10 meses de incubación no se logró el aislamiento bacteriológico de *Map* a partir de ninguna muestra de leche y heces caprinas.

### **Contaminación de los cultivos**

Durante el transcurso de los 10 meses de incubación se detectó la proliferación de hongos y bacterias no ácido alcohol resistentes en varios tubos de cultivo del medio HEYM con y sin micobactina J. El índice de contaminación que se detectó en este estudio fue de 38.3% a los 5 meses y 51.61% a los 10 meses de incubación (Figura 28).



Figura 28. Tubos de medio de cultivo HEYM con y sin micobactina contaminados.

### **Aislamiento bacteriano a partir de leche de los tanques de almacenamiento del CAIT**

Se detectó el desarrollo de colonias visibles compatibles con *Map* a partir del cuarto mes de incubación, en los tubos de HEYM y LJ de 10/12 (83.33%) muestras de leche no pasteurizada de los tanques de almacenamiento de los establos del CAIT analizados. Se realizaron frotis y tinción de ZN para confirmar la presencia de bacilos ácido alcohol resistentes. Posteriormente, se realizó la prueba de PCR tipo específico a estos aislamientos para verificar la identificación de *Map*. Observando 80% de correlación con los resultados obtenidos al aplicar la prueba de PCR tipo específico directamente a partir de la leche, ya que en 2 casos no se detectaron colonias del tipo “S o I” en los cultivos bacterianos.

## Resumen de resultados

En el cuadro 4 se sintetizan los resultados de las muestras analizadas en el presente estudio.

Cuadro 4. Proporción de animales positivos en cada prueba.

	<b>Resultado</b> No. de positivos/Total de muestras	<b>Porcentaje de positividad</b>
<b>ELISA</b>		
ELISA a partir de sueros de vaca	10/16	62.5%
ELISA a partir de sueros de cabra	9/93	9.67%
<b>PCR IS900</b>		
Leche de vaca	15/16	93.75%
Leche de cabra	8/8	100%
Leche bovina de los tanques de almacenamiento	14/14	100%
Leche caprina de los tanques de almacenamiento	3/3	100%
<b>PCR tipo específico</b>		
Leche de vaca	16/16	100%
Leche de cabra	8/8	100%
Leche bovina de los tanques de almacenamiento	14/14	100%
Leche caprina de los tanques de almacenamiento	3/3	100%
<b>PCR-IMS</b>		
Leche de vaca y cabra	10/18	55%
<b>Aislamiento bacteriano</b>		
Heces de vaca	3/10	30%
Leche de vaca	0/10	0%
Heces de cabra	0/8	0%
Leche de cabra	0/8	0%
Leche bovina de los tanques de almacenamiento	10/12	83.33%
Leche caprina de los tanques de almacenamiento	0/3	0%

## Discusión

En este estudio, por medio de la prueba de ELISA empleando el antígeno PPA-3 se obtuvieron resultados serológicos positivos a paratuberculosis en bovinos del CAIT en Tizayuca, Hidalgo así como en caprinos de una granja particular en Yautepec, Morelos. Estos resultados fueron confirmados posteriormente por PCR. Por otro lado, se identificó molecularmente a *Map* en leche de hatos bovinos y caprinos en Topilejo, Estado de México y Tequisquiapan, Querétaro. Los resultados obtenidos describen por primera vez la presencia de esta enfermedad en caprinos del Estado de Morelos y concuerdan con Estévez *et al* quienes afirman que la paratuberculosis es una enfermedad endémica en varios estados de la República Mexicana (Estévez *et al*, 2006).

Actualmente, en países como Estados Unidos, Canadá, Australia, Holanda y la República Checa se aplican programas voluntarios para el control de la paratuberculosis. Estos programas recomiendan el monitoreo de la presencia de *Map* en la leche de los hatos lecheros, tanto bovinos como caprinos (McKenna *et al*, 2006, Stratman *et al*, 2002, Ayele *et al*, 2005). Recientemente se ha popularizado el empleo de la prueba de ELISA para la detección de anticuerpos contra paratuberculosis en leche (Lombard *et al*, 2006, Salgado *et al*, 2005). Sin embargo, por medio de esta prueba no es posible identificar a los animales o hatos con excreción activa de esta micobacteria, lo que hace imprescindible el uso de una prueba de detección directa de este microorganismo (Paolicchi *et al*, 2003).

La técnica de PCR es considerada la prueba de elección para el diagnóstico de bacterias de crecimiento lento o fastidioso como es el caso de *Map*. El límite mínimo de detección de la técnica de PCR varía considerablemente en función de la concentración del microorganismo en la muestra, el proceso de extracción de ADN, así como al protocolo mismo de PCR empleado (Gao *et al*, 2007). En el presente estudio el límite mínimo de detección de la PCR IS900 a partir de muestras de leche fue de  $1 \times 10^2$  ufc/10 ml de leche. Estudios previos reportan límites de detección que varían de 200-300 ufc/ml utilizando los iniciadores P90 y P91 (Millar *et al*, 1996), hasta 1,000 ufc/ml empleando los iniciadores número 11 y 36 (Giese SB y Ahrens, 2000). La alta sensibilidad de la prueba de PCR aplicada puede atribuirse al hecho de haber concentrado tanto la pastilla como la fracción cremosa de las muestras de leche, al método de extracción bioquímica del ADN (QIAmp QIAGEN, USA) así como al volumen de template empleado en la reacción de PCR; ya que durante la estandarización del protocolo éste se incrementó hasta 9  $\mu$ l en contraste con Milan *et al* quienes, siguiendo el mismo protocolo de procesamiento de la muestra, utilizan 4  $\mu$ l del ADN extraído (Comunicación personal) . Es

importante señalar que si en nuestro estudio se hubiera manejado ese volumen de templete, tan sólo dos de las muestras (vaca 488 y 1824) hubieran resultado positivas. Asimismo, estos resultados nos permiten recomendar la utilización del iniciador denominado P5N en sustitución del P4N propuesto por Ayele (Ayele *et al*, 2005).

El protocolo original de IMS-PCR tal y como se aplicó en el presente estudio consistía en someter la muestra a ebullición durante 10 minutos para liberar el ADN y aplicar la prueba de PCR, siguiendo este protocolo se reporta que la sensibilidad es de  $1 \times 10^3$  ufc/50 ml y de acuerdo con los mismos autores cuando después de la IMS se realiza extracción química de ADN el límite mínimo de detección es de 1 ufc/50 ml de leche (Grant *et al*, 2000). La baja sensibilidad del protocolo de PCR-IMS obtenida en este estudio puede atribuirse al menos parcialmente a que el protocolo de extracción de ADN pudo favorecer la persistencia de leche en la mezcla de PCR y de esta manera inhibir la reacción (Bickley *et al*, 1996). El empleo de separación inmunomagnética incrementa el costo y el tiempo de procesamiento de la muestra, de manera que añadir un proceso de extracción química no es redituable. La máxima sensibilidad de cualquier protocolo de PCR descrito se obtiene al visualizar el producto de PCR por medio de la técnica de *dot blot*, la cual incrementa 100 veces el límite mínimo de detección de la PCR en comparación con la electroforesis en geles teñidos con bromuro de etidio; siguiendo este protocolo se ha identificado positivamente leche inoculada con 0.1 ufc/ml (Djonne *et al*, 2005).

Por medio de la prueba de PCR para la amplificación del segmento comprendido entre 1024-1330 pb de la IS900, se detectó el genoma de *Map* en el 100%(10/10) de las muestras de leche de vacas previamente identificadas como seropositivas a paratuberculosis. De la misma forma, 83.33% (5/6) de las muestras de leche de vacas seronegativas fueron positivas por PCR. Cabe destacar que estas muestras provienen de vacas rectoras positivas a la prueba doble comparativa y negativas a tuberculosis por medio de PCR a partir de leche y exudado nasal. Del total de muestras de leche PCR positivas, el 93.75% (15/16) corresponden a vacas aparentemente sanas, en contraste con estudios previos que señalan que la identificación de esta micobacteria en la leche de vacas corresponde generalmente a las muestras provenientes de animales clínicamente enfermos (Millar *et al*, 1996).

Se menciona que el estatus serológico, determinado tanto por ELISA como por IDGA, no es útil para predecir el riesgo de infección diseminada a glándula mamaria en vacas con paratuberculosis. Previamente se ha estimado que la probabilidad de excreción directa a través de leche en animales con infección subclínica es de 0.116 (Sweeney *et al*, 1992). Cabe precisar que estos autores determinaron la presencia de esta micobacteria en leche por medio de

aislamiento bacteriológico, el cual presenta menor sensibilidad que la técnica de PCR (Metzger-Boddien *et al*, 2006). En contraste, la detección molecular de esta micobacteria en la leche de la totalidad de los animales seropositivos y aparentemente sanos sugiere que el riesgo de eliminación a través de leche podría ser mayor al referido anteriormente. El pequeño número de animales muestreado, no permite establecer correlación entre la seropositividad y la excreción de *Map* en leche; sin embargo, anteriormente se ha descrito que por medio de PCR a partir de leche es posible identificar más animales subclínicamente enfermos en comparación con la prueba serológica de ELISA (Burgelt y Williams, 2004).

Existen pocos estudios acerca de la presencia de esta micobacteria en la leche de cabras. Se ha notificado la detección molecular de *Map* en 7.1% de las muestras de leche de cabras en Noruega, así como en 23% de las muestras de leche de tanques de almacenamiento en Suiza. Sin embargo, el 100% obtenido en este estudio sugiere que la diferencia en la proporción de muestras de leche positivas a paratuberculosis por medio de PCR puede deberse a la diferencia en la prevalencia de la enfermedad en los diferentes países y al tamaño del número de muestra. Así como al diseño del presente estudio que ha sido dirigido exclusivamente a animales y hatos seropositivos. En estudios previos se ha mencionado que la leche de cabras y ovejas con paratuberculosis no representa un vehículo significativo para la transmisión de esta enfermedad (Grant *et al*, 2001). En contraste, la identificación molecular de *Map* en la totalidad de las muestras de leche de cabra analizadas permite sugerir que no debe subestimarse la probabilidad de infección por consumo de leche de cabra y sus subproductos.

Se llevó a cabo la determinación del número de mesofílicos y enterobacterias en leche de cabras para descartar la contaminación fecal de las muestras, el número de mesofílicos totales determinado sobrepasó ligeramente el límite de 30,000 ufc/ml establecido en la NOM 091 SSA1 1994. Asimismo, el número de enterobacterias totales fue superior al establecido en la misma norma en 20 ufc/ml. No existen estudios que refieran la correlación de la presencia de *Map* y enterobacterias en leche de cabra. No obstante, nuestro resultado concuerda con la única literatura disponible sobre la presencia de enterobacterias en leche de vaca, las enterobacterias son tan frecuentes en la leche de animales negativos como positivos a paratuberculosis diagnosticados por PCR (Corti y Stephan, 2002).

El desarrollo de la prueba de PCR a partir de muestras de leche bovina de tanques de almacenamiento permitió identificar el genoma de *Map* en el 100% (12/12) de las muestras analizadas. Asimismo, la muestras de leche del bote de almacenamiento de leche de vaca del CEIEPAA, donde se estima que la seroprevalencia de la enfermedad en los bovinos es de aproximadamente 10.52% (información no publicada), resultó positiva a paratuberculosis por

esta misma técnica, al igual que la muestra del CEPIPSA en donde se carece de información epidemiológica. Esta alta frecuencia de *Map* en la leche de establos contrasta con los resultados observados en Alemania donde a través de PCR de captura mediada por péptidos se identificó esta micobacteria en tan sólo el 5.43% de las muestras de leche (Stratmann J *et al*, 2006), así como con los resultados obtenidos en el Reino Unido donde se detectó *Map* en el 7.8% en las muestras de leche (Grant *et al*, 2001) y en Suiza, donde por medio de PCR se detectó una prevalencia aparente de 19.7% de *Map* en las muestras de leche de tanque analizadas (Corti y Stephan, 2002). Esta proporción de hatos positivos a paratuberculosis se puede atribuir en parte a diferencias en el protocolo de PCR que se analizarán más adelante, así como a la evidente diferencia en la prevalencia de la enfermedad en los diferentes países; ya que tan sólo el 1% de los establos lecheros de Inglaterra ha reportado la presencia de paratuberculosis en su ganado e incluso se menciona que únicamente el 2% de los animales presentan signos clínicos de la enfermedad (C,etinkaya *et al*, 1997). De la misma forma, en Suiza la prevalencia de esta enfermedad en bovinos se ha estimado en 4.99% (Meylan *et al*, 1995), mientras que la prevalencia a nivel de hatos se calcula en 8.09% (Stärk *et al*, 1997) en comparación con la alta prevalencia de 96.55% en los hatos del CAIT, donde esta enfermedad es endémica con un promedio de 8.97% de los bovinos seropositivos.

Por otra parte, se logró la identificación de esta micobacteria en las muestras de leche de los botes de almacenamiento de leche de cabra provenientes de la granja en Yautepec, el CEPIPSA y el CEIEPAA. Es decir, en el 100% del escaso número de muestras de leche colectiva de los hatos caprinos analizados, siendo todos estos rebaños con alta prevalencia de paratuberculosis.

Se espera que la concentración de *Map* en los tanques de almacenamiento sea escasa debido a que la cantidad de micobacterias naturalmente excretadas por glándula mamaria ha sido cuantificada en 4-20 ufc/50ml de leche (Sweeney *et al*, 1992); adicionalmente es importante considerar que en el tanque de almacenamiento, la carga de micobacterias se ve bruscamente diluida en la leche de los animales no infectados y los que se encuentran en fase no excretora. La concentración antes referida depende de que la leche esté libre de contaminación fecal. En caso contrario, la carga micobacteriana puede ascender hasta  $1 \times 10^4$  ufc/ml (Grant *et al*, 1996). A pesar de ser una prueba cualitativa, al conocer el límite de detección de nuestro protocolo de PCR ( $1 \times 10^2$  ufc/ 10ml de leche) se intuye que la concentración de *Map* en las muestras de leche de los tanques y botes de almacenamiento de leche tanto de vaca como de cabra exceden la carga micobacteriana esperada. Los resultados permiten inferir la contaminación fecal de estas muestras. Es por ello que se enfatiza la importancia de las buenas prácticas de ordeño que incluyen la limpieza de las manos del ordeñador, la limpieza y

desinfección de la ubre antes de la ordeña, así como la limpieza y desinfección de las pezoneras, mangueras y tanques de almacenamiento de la máquina ordeñadora.

Por otra parte, hasta el momento no existen publicaciones que refieran el empleo de la prueba de PCR tipo específico a extracciones de ADN provenientes de muestras de leche. Los resultados de este estudio, en los que la sensibilidad de esta prueba se estableció en  $1 \times 10^0$  ufc/10 ml, nos permiten recomendar ampliamente su utilización. Esta técnica permite diferenciar entre cepas del tipo “C” y tipo “S”, cabe señalar que no es capaz de diferenciar entre cepas del tipo “S” e “I”. No obstante, ésta es una prueba útil para diferenciar de manera rápida entre los tipos de cepas de *Map* y puede ser aplicada a partir del extracto de ADN proveniente de diversas muestras clínicas, como la leche, sin necesidad de realizar previamente el aislamiento bacteriológico. La prueba de PCR tipo específico puede aplicarse a muestras en las que la cantidad de ADN es escasa o se encuentra degradada, a diferencia de la prueba del RFLP que requiere una mayor cantidad y calidad de extracto de ADN (Whittington *et al*, 2000); por lo que en el caso de las muestras de leche para realizar RFLP se requeriría que previamente se realizara cultivo bacteriológico de estas muestras lo que implica una importante inversión de dinero y tiempo. Sin embargo, cuando se desea conocer el tipo específico de cepa para estudios de trazabilidad de infección la prueba de elección debe seguir siendo el RFLP IS900, ya que esta prueba permite distinguir hasta 33 patrones del tipo C, 3 patrones del tipo S y 2 del tipo I.

Por medio de PCR tipo específico se identificaron cepas de *Map* del tipo “C”, ya sea aisladas o conjuntamente con cepas del tipo “S”. Existen pocos estudios de polimorfismo de las cepas provenientes de caprinos; dos de estos estudios fueron realizados en nuestro país y describen la presencia de cepas de los tipos C1 y C33, siendo el tipo C1 el identificado con mayor frecuencia (Chávez *et al*, 2005; Estévez *et al*, 2006). Recientemente se ha descrito que el tipo C1 es también el tipo más común en bovinos y caprinos de Noruega (Djonne *et al*, 2005) y cepas de este tipo han sido descritas en aislamientos a partir de caprinos en Australia (Whittington *et al*, 2000). En el presente estudio fue posible identificar 3 cabras con infección mixta con cepas de los tipos “C” y “S”. La presencia de patrones mixtos se ha identificado previamente en ovinos y bovinos (Estévez *et al*, 2006; Pavlík *et al*, 1995).

Al aplicar la prueba de PCR tipo específico se pudo determinar que en la mayoría de las muestras de leche de vaca (56.25%) que incluían muestras del CAIT y el CEIEPAA se encontraban cepas de los tipos “C” y “S”. Al analizar las muestras de leche de los tanques de almacenamiento del CAIT se encontró que la mayoría presentaba ambos tipos de cepas del. Mientras que las muestras de leche de los botes de almacenamiento del CEIPSA y CEIEPAA presentaban patrones mixtos, la presencia de patrones mixtos en estos Centros podría ser un

reflejo del hecho de que en ambos se exploten varias especies animales. Asimismo, la presencia de patrones mixtos dentro de un mismo hato es indicativa de varias fuentes de infección (Bauerfeind *et al*, 1996).

Hasta el momento no existen estudios del polimorfismo genético de *Map* en ganado bovino de nuestro país, en el centro de enseñanza CEIPSA en Topilejo, D.F.; donde se crían ovinos, caprinos y bovinos, con anterioridad se ha detectado la presencia del tipo C1 en cabras, así como los tipos C18/I3 y C33 en ovinos (Estévez *et al*, 2006). En el presente estudio se identificó la presencia de un tipo mixto “C/S” en la leche de vaca, lo cual indica que los bovinos de este centro se encuentran infectados con diversos tipos de cepas pertenecientes a ambos grupos. Las muestras de leche de los tanques de almacenamiento de leche caprina y bovina provenientes del CEIEPAA en Tequisquiapan, Querétaro develaron la presencia de infección mixta en ambas especies animales. Es significativo señalar que el CEIEPAA es un Centro recientemente inaugurado y que parte de su población animal proviene del CEIPSA.

En todos los casos, en cada corrida de PCR se incluyó un testigo negativo el cual incluía todos los componentes de la reacción a excepción de ADN, por lo cual se descarta que el alto número de resultados positivos pueda atribuirse a contaminación de las muestras durante la realización de la prueba. Asimismo, los resultados de la prueba de PCR tipo específico confirman los resultados anteriores y evidencian la presencia de diferentes tipos de cepas en las muestras. La prueba de PCR a partir de muestras de leche de los establos es útil para la detección de los hatos positivos a paratuberculosis tal y como ha sido descrito por Grant *et al*, 2002; Muehlherr *et al*, 2003 y Metzger-Boddien *et al*, 2006, estos resultados contrastan con Jayarao *et al* quienes mencionan que la sensibilidad, especificidad y valor predictivo de la prueba de PCR aplicada a muestras de leche de tanques de almacenamiento es considerablemente menor que cuando la prueba se aplica a la leche de vacas individuales (Jayarao *et al*, 2004).

En cuanto al aislamiento bacteriológico, después de 5 meses de incubación se puede afirmar que no fue posible la recuperación de esta micobacteria a partir de las muestras de leche de vacas seropositivas a paratuberculosis. El porcentaje de recuperación de esta micobacteria ha sido estimado previamente entre 16.6% y 28.7%, aún cuando la muestra consistía en leche inoculada experimentalmente con  $1 \times 10^6$  ufc/ml, una concentración micobacteriana mucho mayor a la esperada en muestras clínicas (Gao A *et al*, 2005 ; Dundee *et al*, 2001). El fracaso en el aislamiento bacteriológico en el presente estudio, se atribuye al menos parcialmente al altísimo porcentaje de contaminación de los tubos, ya que después de 5 meses de incubación más del 50% de los tubos de cultivo presentaron desarrollo de hongos y bacterias

contaminantes, en comparación con los resultados de Ayele que señalan que 16% de los tubos de HEYM inoculados con leche mostraron contaminación por sobrecrecimiento de hongos y bacterias no ácido alcohol resistentes durante los 3 meses de incubación (Ayele *et al*, 2005).

Por otra parte, la falta de cultivos positivos en la leche de las vacas seropositivas nos obliga a analizar otras posibles deficiencias de nuestro protocolo de aislamiento bacteriológico. En estudios previos, se menciona que el bajo porcentaje de recuperación de esta micobacteria se atribuye en parte al tiempo de conservación de la muestra de leche, la centrifugación de la misma; el método de descontaminación que incluye tipo de detergente y tiempo de exposición, así como al medio de cultivo seleccionado, condiciones de incubación aplicadas e incluso al tipo de cepa (Gao A *et al*, 2005). En el presente estudio se consideró importante procesar todas las muestras dentro de las primeras 24 hrs. después de ser recolectadas y asegurar la cadena fría hasta su arribo al laboratorio. Asimismo, se decidió resuspender tanto la pastilla como la fracción cremosa de la leche con el fin de concentrar el mayor número posible de micobacterias, tal y como lo recomiendan Gao A *et al* (Gao *et al* 2005). En lo que respecta al protocolo de descontaminación de las muestras, la literatura refiere diversos protocolos que incluyen el uso de hexadecilpiridinio (HPC) a distintas concentraciones, durante lapsos desde 15 minutos hasta 24 horas (Wizniewska A, 2004; Gao A *et al*, 2005). Recientemente se ha propuesto el empleo del detergente carboxipropilbetaína conocido como CB-18 (Ruzante *et al*, 2006); sin embargo el HPC al 0.75%, seleccionado en este estudio, sigue siendo el detergente utilizado con mayor frecuencia. Durante el desarrollo de este trabajo se decidió utilizar un protocolo de descontaminación de las muestras de leche que consiste en resuspender la pastilla de leche con hexadecilpiridinio (HPC) al 0.75% y mantener en esta solución durante 5 horas (Dundee *et al*, 2001; Gao A *et al*, 2005). No obstante, siguiendo el protocolo antes mencionado, se observó un alto número de tubos con desarrollo de colonias de rápido crecimiento las cuales imposibilitaban la detección de *Map* en los primeros ensayos de aislamiento. En el laboratorio se contaba con experiencia positiva en aislamientos a partir de tejidos y heces empleando un protocolo de descontaminación con este detergente durante toda la noche, por lo que se decidió incrementar el tiempo de exposición (Estévez *et al*, 2006). Esta modificación del procedimiento no logró reducir la contaminación de los tubos; de hecho, probablemente el mayor tiempo de incubación con HPC podría selectivamente haber favorecido el crecimiento de organismos resistentes al HPC (Gao *et al*, 2005). Se recomienda que después de la inmersión en HPC al 0.75%, la leche centrifugada debe resuspenderse en 0.5-1.0 ml de caldo Middlebrook 7H9 con micobactina J, OADC, antibióticos y antimicóticos para posteriormente inocular esta solución en los tubos de medio HEYM (Gao *et al*, 2005). Cabe señalar que este procedimiento se omitió en nuestro estudio y podría ser un factor importante a considerar en próximos cultivos con el fin

de disminuir el número de cultivos contaminados y de esta manera incrementar la sensibilidad del aislamiento bacteriológico.

El medio de cultivo seleccionado en un principio fue el HEYM con piruvato de sodio y micobactina J por ser el medio de cultivo aprobado por el NAHMS para el diagnóstico de paratuberculosis y porque se menciona que este medio de cultivo presenta un menor grado de contaminación que el medio LJ, además de que permite el desarrollo de colonias visibles más rápido que el medio HEYM (Neelsen *et al*, 2000).

Los resultados del cultivo de *Map* a partir de leche cruda de vacas seropositivas a paratuberculosis, contrastan con lo descrito por Ayele *et al* quienes mencionan que en promedio 18.4% de las muestras de leche de vacas con excreción detectable en heces presentaron micobacterias viables en leche, así como con los resultados de Pillai y colaboradores quienes detectaron 4% de muestras de leche positivas al cultivo de *Map*, ambos empleando el medio de cultivo HEYM (Ayele *et al*, 2005; Pillai *et al*, 2002). La sensibilidad del aislamiento bacteriológico a partir de leche se ha estimado en 10-100 ufc/ml de leche (Pillai *et al*, 2002). Cabe señalar además que el aislamiento de esta micobacteria a partir de leche y calostro de vacas clínicamente sanas ha sido descrito previamente por Sweeney *et al*, 1992 y Streeter *et al*, 1995. La dificultad de *Map* para crecer en medio de cultivo así como a la necesidad de la descontaminación de las muestras durante su procesamiento para minimizar el sobrecrecimiento de otros microorganismos, provocan que la tasa de detección de *Map* en leche sea una subestimación de su verdadera frecuencia (Grant *et al*, 2002; Ayele *et al*, 2005).

En el presente estudio, al no observar aislamientos exitosos a partir de las muestras de leche de vacas y cabras individuales, se decidió emplear simultáneamente medio de LJ y HEYM, ambos con micobactina para los aislamientos provenientes de leche de los tanques de almacenamiento de leche de vaca. Después de 5 meses de incubación fue posible la detección de aislamientos exitosos en 83.33% de las muestras, estos resultados fueron verificados por PCR IS900 y PCR tipo específico. Sin embargo, es relevante señalar que el éxito del aislamiento bacteriológico en este estudio no puede atribuirse al medio de cultivo sino al reemplazo de la mezcla de antibióticos de vancomicina, ácido nalidíxico y anfotericina B por penicilina, cloranfenicol y anfotericina B. Los resultados nos permiten recomendar el empleo de esta última mezcla de antibióticos durante la preparación del medio sólido para el aislamiento de *Map*. Nuestros resultados contrastan con estudios previos, que mencionan que entre 5% y 20.6% de las muestras de leche cruda de los tanques de almacenamiento mostraron desarrollo de colonias viables de esta micobacteria (Pillai y Jayarao, 2002; Jayarao *et al*, 2004), cabe destacar que ambos fueron estudios ciegos en los que se desconocía la situación de la enfermedad en los

establos, a diferencia del presente estudio en el que se seleccionaron establos con alta prevalencia de la enfermedad.

Durante el presente estudio no se logró el aislamiento de *Map* a partir de las muestras de leche de cabras seropositivas en concordancia con estudios descritos anteriormente (Djonne *et al*, 2005; Grant *et al*, 2001). En uno de estos estudios no se realizó ningún protocolo de descontaminación de las muestras de leche previo a su cultivo y se empleo medio Dubos con micobactina (2 µg/ml) y piruvato de sodio (4 mg/ml) adicionado con carbenicilina, polimixina, trimetoprim y anfotericina B; el tiempo de incubación fue 16 semanas. Destaca el hecho de que no se detectó ninguna muestra contaminada con otra bacteria u hongo (Djonne *et al*, 2005). En otro estudio, empleando cultivo radiométrico en medio Bactec 12B enriquecido con emulsión de yema de huevo, micobactina y antibióticos; el tiempo de incubación aplicado en este caso fue de 18 semanas (Grant *et al* 2001). En ambos casos, se considera que el tiempo de incubación fue muy corto para tratarse de aislamientos a partir de muestras clínicas. La ausencia de cultivos positivos, se puede atribuir a la escasa cantidad de micobacterias en leche así como a su incapacidad para crecer en medio de cultivo (Djonne *et al*, 2005). En un estudio previo, se menciona que el aislamiento micobacteriano a partir de muestras de leche de cabra es más complicado que el aislamiento a partir de muestras de leche de vaca y señalan que el hecho de que la cuenta de células somáticas de leche de cabra sea mucho mayor podría perjudicar la viabilidad de las micobacterias (Djonne *et al*, 2003). Sin embargo, de acuerdo con Corti y Stephan no existe correlación entre la cuenta de células somáticas totales y la presencia o ausencia de *Map* en la leche de vacas; de manera que la dificultad para recuperar bacilos de *Map* viables se atribuye principalmente al tipo de cepa así como al protocolo de descontaminación y cultivo (Corti y Stephan, 2002).

Hasta el momento no ha sido posible establecer asociación causal definitiva entre *Map* y la EC, durante años se han publicado múltiples estudios tanto a favor como en contra de la etiología micobacteriana de esta enfermedad, de manera que *Map* no ha sido descartado como un potencial agente zoonótico. La importancia de la detección de esta micobacteria en leche radica en el hecho de que ésta se considera una de las principales fuentes de infección de este microorganismo ya que el consumo de leche y subproductos de leche sin pasteurizar sigue siendo una práctica común en México y en otros países. Adicionalmente, algunos estudios han demostrado que esta micobacteria es capaz de resistir el proceso de pasteurización a altas temperaturas por tiempos cortos (HTST) tanto en condiciones de laboratorio como a nivel industrial, demostrando la viabilidad de bacilos de *Map* en 1.6% y 2.8% de las muestras de leche pasteurizada comercialmente (Ellingson *et al*, 2005; Ayele *et al*, 2005). Mientras que en Irlanda, O'Reilly *et al* detectaron por medio de PCR la secuencia de inserción IS900 en 9.8% de

las muestras de leche pasteurizada examinadas; sin embargo al intentar el aislamiento bacteriano no detectaron micobacterias viables concluyendo que el protocolo de pasteurización aplicado (75° C durante 25 s) es efectivo en la eliminación de *Map*. Esta conclusión podría no ser adecuada, considerando que después de la pasteurización la leche fue sometida a un proceso de descontaminación con HPC durante 5 horas y fue centrifugada, para posteriormente resuspender tan sólo la pastilla resultante; ya que de acuerdo con Grant *et al* la descontaminación de las muestras de leche sometidas a tratamiento térmico disminuye el porcentaje de micobacterias viables, por lo que podría producir falsos negativos (Grant y Rowe, 2004). Por lo tanto, se considera importante establecer si el protocolo de pasteurización que se emplea en todo el mundo, efectivamente asegura la inocuidad de este producto pecuario, así como continuar investigando la viabilidad de esta micobacteria durante el proceso de elaboración de subproductos lácteos como el queso (Spahr y Schafroth, 2001).

En algunos países, la evaluación de las pérdidas económicas relacionadas con la paratuberculosis ha fomentado la creación de programas voluntarios de control de esta enfermedad (McKenna *et al*, 2006, Stratman *et al*, 2002, Ayele *et al*, 2005). Actualmente por ley en la República Checa la leche y sus subproductos provenientes de establos infectados con paratuberculosis se consideran no aptos para el consumo humano sin importar si fueron o no sometidos a pasteurización (Ley No. 166/1999 del Ministerio de Agricultura, República Checa). Asimismo, se menciona que en caso de establecerse relación definitiva entre la paratuberculosis y la enfermedad de Crohn, los programas de control de esta enfermedad tenderán obligatoriamente a ser de índole gubernamental (Shawn *et al*, 2006). Hasta el momento en nuestro país no existen restricciones para la movilización internacional de ganado infectado con paratuberculosis. Es importante señalar que para la implementación de cualquier programa de control es imprescindible contar antes con información acerca de la prevalencia y distribución de la enfermedad; sin embargo en la actualidad existe escasa información acerca de la situación de esta enfermedad en los hatos tanto bovinos como caprinos y ovinos del país. Durante el desarrollo de este estudio, al visitar las diversas explotaciones, así como al consultar la información oficial acerca de la prevalencia de esta enfermedad, se detectó un evidente problema de diagnóstico y notificación de la misma. Lo que a nuestro parecer hace aún más evidente la necesidad de una prueba diagnóstica altamente específica, sensible y costeable, así como de la capacitación de personal especializado y el fomento de nuevos laboratorios de diagnóstico, haciendo hincapié en la obligatoriedad de la notificación de las enfermedades.

## CONCLUSIONES

- La técnica de PCR permite la identificación de *Map* en muestras individuales de leche de vacas y cabras, así como en muestras de los tanques de almacenamiento, por lo que es una herramienta útil para la detección de animales excretadores y el diagnóstico de situación de los hatos y rebaños.
- La detección de esta micobacteria en muestras de leche bovina y caprina, resaltan la importancia de las buenas prácticas de ordeño y de la implementación de programas de control de la enfermedad.

## ABREVIATURAS Y SIGLAS EMPLEADAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
BAAR	Bacilos ácido alcohol resistentes
C+	Control positivo
C-	Control negativo
ELISA	Inmunoensayo enzimático
IDGA	Inmunodifusión en gel de agar
IDR	Intradermorreacción
IMS	Separación inmunomagnética
IS900	Secuencia de inserción 900
EJ	Enfermedad de Johne
EC	Enfermedad de Crohn
LJ	Löwenstein Jensen
HE	Hematoxilina y eosina
HEYM	Medio de yema de huevo de Herrold
HRP	Peroxidasa de rábano
<i>Map</i>	<i>Mycobacterium avium paratuberculosis</i>
Mpm	Marcador de peso molecular
OADC	Ácido oleico, albúmina, dextrosa y catalasa
PBS	Solución amortiguada de fosfatos
PBS-TG	PBS, Tween, Gelatina
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pb	Pares de bases
RFLP	Polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción
TA	Temperatura ambiente
ZN	Ziehl Neelsen

## ANEXOS

### Anexo 1. Reactivos requeridos para el desarrollo de la prueba de ELISA

- Suspensión de *Mycobacterium phlei*

5 g de *M. phlei*

Solución salina al 8.5% (NaCl 8.5%) c.b.p. 1 l

- Buffer Carbonato

5.3 g de Bicarbonato de sodio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ )

Agua destilada c.b.p. 1 l

Ajustar el pH a 9.6

- Antígeno

0.04 mg de antígeno PPA3 (Allied Monitor, USA)

1 ml de buffer carbonato

- PBS-TG (Solución salina amortiguada tween gelatina)

8 g de Cloruro de sodio (NaCl)

0.2 g de cloruro de potasio (KCL)

1.44 g de fosfato dibásico de sodio ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )

0.24 g de fosfato monobásico de potasio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )

Agua destilada c.b.p. 1 l

Ajustar el pH a 7.4

Esterilizar en autoclave a 121 °C, 15 minutos.

Agregar 1 g de gelatina bacteriológica y 500 µl de Tween 80, el cual preferentemente debe esterilizarse por medio de filtración.

- Conjugado

Diluir 1:4500 el anticuerpo antiIgG marcado con HRP en PBS-TG

- Tampón citrato 0.05 M

- Solución de ácido cítrico monohidratado

22 g de ácido cítrico monohidratado ( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_3$ )

Agua destilada c.b.p. 1 l

- Solución de citrato sódico  
22.49 g de citrato de sodio ( $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ )  
Agua destilada c.b.p. 1 l

Mezclar 660 ml de solución de ácido cítrico con 470 ml solución de citrato sódico, aforar a 2 l con agua destilada. Ajustar el pH a 4.0. No almacenar esta solución por más de 2 semanas.

- Cromógeno  
50 ml Tampón citrato pH 4  
5.48 mg de ABTS  
19  $\mu\text{l}$  de solución madre (10  $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  + 120  $\mu\text{l}$  de agua destilada)  
Preparar al momento de utilizarlo en un recipiente protegido de la luz del sol

## **Anexo 2. Preparación del medio de yema de huevo de Herrold con micobactina**

Ingredientes para 1020 ml de medio

Peptona	9 g
Cloruro de sodio (NaCl)	4.5 g
Agar noble	15 g
Extracto de carne	2.7 g
Glicerina	25 ml
Agua destilada	870 ml
Hidróxido de sodio (NaOH)	Aprox. 4.1 ml
Piruvato de sodio	4 g
Micobactina	2 mg

Yemas de huevo	6 (100 ml)
Verde de malaquita al 2% estéril	5.1 ml

#### Mezcla de antibióticos

Anfotericina B	50 mg
Ácido nalidíxico	50 mg
Vancomicina	50 mg

#### Mezcla de antibióticos en sustitución de la anterior

Anfotericina B	50 mg
Cloranfenicol	50 mg
Penicilina	200,000 UI

#### Preparación de la micobactina:

Agregar 4 ml de etanol absoluto a un frasco de micobactina. Mezclar hasta que se disuelva.

#### Preparación del huevo:

Lavar los huevos en agua caliente con detergente, enjuagar con agua limpia sin jabón y dejar secar los huevos al aire sobre una toalla estéril. Sumergir los huevos en etanol al 75% durante 30 minutos. Secar los huevos entre capas de toallas estériles. Romper los huevos en la parte superior de un vaso de precipitado estéril, vaciar las yemas en un frasco de licuadora estéril y mezclar. Filtrar a través de dos capas de gasa en un embudo estéril.

Preparación del medio:

Colocar las cantidades indicadas de los primeros 5 ingredientes dentro de una botella de 2 l. Colocar una barra magnética y mezclar los ingredientes en un agitador magnético calentando la solución a 100° C. Sin dejar de agitar permitir que la solución se enfríe a 56° C y entonces ajustar el pH a 7.0 con la cantidad necesaria de NaOH al 4% (aproximadamente 4.1 ml). Esterilizar el medio en la autoclave a 121 °C durante 15 min. Dejar enfriar el medio a 56 °C y agregar asépticamente la micobactina previamente disuelta en etanol con una pipeta procurando que no tenga contacto con la superficie de la botella sino que se vierta directamente sobre el medio, la solución de verde de malaquita estéril y los antibióticos. Posteriormente incorporar asépticamente las 6 yemas de huevo estériles y filtradas. Mezclar gentilmente y verter de 9 a 10 ml por tubo de ensaye de 20 x 125 mm con tapón de rosca. Dejar solidificar el medio en posición inclinada y confirmar su esterilidad incubándolo a 37 °C durante 48 hrs.

### **Anexo 3. Preparación del medio de yema de huevo de Herrold sin micobactina**

Se sigue el procedimiento descrito en el punto 7.1 pero se omite la adición de micobactina. Cabe señalar que la micobactina no altera las características físicas del medio por lo que es importante identificar los tubos de cultivo que carecen de este sideróforo.

### **Anexo 4. Preparación del gel para IDGA**

- PBS (Solución salina amortiguada)

8 g de Cloruro de sodio (NaCl)

0.2 g de cloruro de potasio (KCL)

1.44 g de fosfato dibásico de sodio ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )

0.24 g de fosfato monobásico de potasio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )

Agua destilada c.b.p. 1 l

Ajustar el pH a 7.4

- Solución de agarosa al 1%

0.12 g de agarosa

12 ml de PBS

Preparar la solución de agarosa al 1% y calentar hasta su perfecta disolución. Verter 10-12 ml de la solución en placas de petri evitando la formación de burbujas de aire. Dejar solidificar a TA.

#### **Anexo 5. Preparación del medio Löwenstein Jensen con y sin micobactina**

##### Ingredientes

Medio Base	37.3 g
Glicerina	12 ml
Agua destilada	600 ml
Huevo	1 l
Anfotericina B	50 mg
Cloranfenicol	500 mg
Penicilina	1,000,000 UI

Micobactina	2 mg
-------------	------

##### Preparación del huevo:

Lavar los huevos en agua caliente con detergente, enjuagar con agua limpia sin jabón y dejar secar los huevos al aire sobre una toalla estéril. Sumergir los huevos en etanol al 75% durante 30 minutos. Secar los huevos entre capas de toallas estériles. Romper los huevos en la parte superior de un vaso de precipitado estéril y vaciarlos en un frasco de licuadora estéril y mezclar. Filtrar a través de dos capas de gasa en un embudo estéril.

Disolver el medio base en el agua destilada, agregar la glicerina. Calentar la solución mientras se agita continuamente hasta que hierva. Esterilizar en autoclave (15 min a 121° C). Cuando esta solución se enfríe aproximadamente a 50° C, añadir asepticamente 1 l de huevo,

antibióticos y en caso pertinente, la micobactina previamente disuelta en 4 ml de etanol. Mezclar gentilmente y verter de 9 a 10 ml por tubo de ensaye de 20 x 125 mm con tapón de rosca. Dejar solidificar el medio en posición inclinada dentro de un baño María a 80° C durante al menos 30 minutos. Confirmar la esterilidad del medio incubándolo a 37 °C durante 48 hrs.

#### **Anexo 6. Tinción de Ziehl Neelsen**

A cada frotis se le sobrepone un pedazo de papel filtro o papel absorbente de menor tamaño que la laminilla, se empapa este papel con fucsina fenicada y se coloca la laminilla sobre una platina caliente, cuando se comienza a observar el desprendimiento de vapores se cuentan 5 minutos durante los cuales se debe tener cuidado de que no se seque el colorante. Se dejan enfriar las laminillas y se desprende el papel, posteriormente se enjuagan con agua corriente. Se agrega alcohol ácido y se deja actuar durante 2-3 minutos. Se enjuagan las laminillas con agua corriente y se añade azul de metileno, se deja actuar 1 minuto. Se enjuagan las laminillas y se dejan secar. Se observan en el microscopio con el objetivo 100x.

## REFERENCIAS

- Armitage G, Wilson M. Crohn's disease: A survey of the literature and a report of 34 cases. *Br J Surg* 1950; 38:182-193.
- Anderson JL, Meece JK, Koziczkowski JJ, Clark DL Jr, Radcliff RP, Nolden CA, Samuel MD, Ellingson JL. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Scavenging Mammals in Wisconsin. *J Wildl Dis.* 2007; 43(2):302-308.
- Andres PG and Lawrence SF. Epidemiology and the natural course of inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Clin North Am* 1999; 28(2):255-278.
- Appleyard CB, Hernandez G, Rios-Bedoya CF. Basic epidemiology of inflammatory bowel disease in Puerto Rico. *Inflamm Bowel Dis.* 2004 Mar; (2):106-111.
- Auvin S, Molinie F, Gower-Rousseau C, Brazier F, Merle V, Grandbastien B, *et al.* Incidence, clinical presentation and location at diagnosis of pediatric inflammatory bowel disease: a prospective population-based study in northern France (1988-1999). *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2005; 41(1):49-55.
- Ayele WY, Svastova P, Roubal P, Milan B, Pavlík I. *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* cultured from locally and commercially pasteurized cow's milk in the Czech Republic. *Appl Environ Microbiol.* 2005;71(3):1210-1214.
- Beard PM, Daniels MJ, Henderson D, Pirie A, Rudge K, Buxton D *et al.* Paratuberculosis infection of nonruminant wildlife in Scotland. *Journal of Clinical Microbiology.* 2001; 39(4):1517-1521.
- Begg DJ, O'Brien R, Mackintosh CG and Griffin JFT. Experimental infection model for Johne's disease in sheep. *Infection and Immunity* 2005; 73(9): 5603-5611.
- Buergelt CD and Ginn PE. The histopathological diagnosis of early Johne's disease. Proceedings of the 6th international colloquium on paratuberculosis; 1999 febrero14-18; Melbourne, Australia : International Association for Paratuberculosis and other intestinal mycobacterioses, 1999 : 400-406.
- 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.
- Bull TJ, McMinn EJ, Sidi-Boumedine K, Skull A, Dirkin D, Neild P *et al.* Detection and verification of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in fresh ileocolonic mucosal biopsy specimens from individuals with and without Crohn's disease. *J of Clin Microbiol* 2003;41(7):2915-2923.

- Clarke CJ. The pathology and pathogenesis of paratuberculosis in ruminants and other species. *J Comp Path.* 1997; 116:217-261.
- Chamberlin W, Graham DY, Hulten K, El-Zimaity HMT, Schwartz MR, Naser S and El-Zaatari FAK. Review Article: *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* as one cause of Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther*, 2001, 15
- Chávez GG, Trigo TJF, Svastova P, Pavlik I. Identificación del polimorfismo genético de aislamientos de de caprinos del centro de México. *Vet Méx* 2004; 35(1):75-82.
- Cheng J, Bull T, Sumar N, Sheridan J, Dalton P, Finlayson C, Hermon-Taylor J. Detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in surgical pathology blocks from patients with Crohn's disease in China. *World J Gastroenterol* 2000; 6(3):10.
- Chiodini RJ, Van Kruiningen HJ, Merkal RS. Ruminant Paratuberculosis (Johne's disease): The current status and future prospects. *Cornell Veterinarian* 1984, 74(3):218-262.
- Chiodini RJ, Van Kruiningen HJ, Thayer WR, Merkal RS, Coutu JA. Possible role of mycobacteria in inflammatory bowel disease. I. An unclassified *Mycobacterium* species isolated from patients with Crohn's disease. *Dig Dis Sci.* 1984; 29(12):1073-1079.
- Chiodini RJ, Van Kruiningen HJ, Thayer WR, Coutu JA. Spheroplastic phase of mycobacteria isolated from patients with Crohn's disease. *Clin Microbiol.* 1986;24(3):357-363.
- Chiodini RJ, Hermon-Taylor J, The thermal resistance of *Mycobacterium paratuberculosis* in raw milk under conditions simulating pasteurization. *Journal Veterinarian Diagnostic Investigation* 1993, 5; 629-631.
- Collins CH, Grange JM and Yates MD. Mycobacteria in water. *J Appl Bacteriol* 1984; 57:193-211.
- 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.
- Coordinación General de Ganadería, SAGARPA. Estimación de la disponibilidad *per cápita*. Disponible en: <http://www.sagarpa.gob.mx/Dgg/DMhue.htm>
- Coordinación General de Ganadería, SAGARPA. Programa Nacional Pecuario 2005. Disponible en: <http://www.sagarpa.gob.mx/Dgg/cifra/progpec05a.pdf>
- Corner LAL and Abbott PKA. Unanswered questions about the transmission of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Vet J* 2003; 165:182-183.

- Corn JL, Manning EJ, Sreevatsan S, Fischer JR. Isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from free-ranging birds and mammals on livestock premises. *Appl Environ Microbiol.* 2005 Nov; 71(11):6963-7.
- Corpa JM, Garrido J, García Marín JF and Pérez V. Classification of lesions observed in natural cases of paratuberculosis in goats. *J Comp Pathol* 2000; 122:255-265.
- 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.
- Crohn B, Ginzburg L, Oppenheimer G. Regional ileitis. A pathological and clinical entity. *JAMA* 1932; 99:1323-1329.
- 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.
- de Juan L, Alvarez J, Romero B, Bezos J, Castellanos E, Aranaz A, Mateos A, Dominguez L. Comparison of four different culture media for isolation and growth of type II and type I/III *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* strains isolated from cattle and goats. *Appl Environ Microbiol* 2006;72(9):5927-5932.
- Dimareli MZ and Sarris K. Comparison of DNA probe test and cultivation methods for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in caprine and ovine feces. *Aust Vet J* 2001; 79(1): 47-50.
- Djonne B, Jensen MR, Grant IR, Holstad G. Detection by immunomagnetic PCR of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk from dairy goats in Norway. *Vet Microbiol* 2003; 92(1-2):135-143.
- Dohmann K, Strommenger B, Stevenson K, de Juan L, Stratmann J, Kapur V, *et al.* Characterization of genetic differences between *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* type I and type II isolates. *J Clin Microbiol.* 2003; 41(11):5215-5223.
- Dominique GJ and Woody HB. Bacterial persistence and expression of disease. *Clin Microbiol Rev.* 1997; 10: 320-344.
- Donaldson RM. Enfermedad de Crohn. En: Slesinger F. Enfermedades gastrointestinales y del hígado. Madrid: Panamericana. 1998:1332-1345.
- Dundee L, Grant IR, Ball HJ and Rowe MT. Comparative evaluation of four decontamination protocols for the isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from milk. *Lett Appl Microbiol.* 2001; 33(3):173-7.

- Ellingson JL, Anderson JL, Koziczkowski JJ, Radcliff RP, Sloan SJ, Allen SE, *et al.* Detection of viable *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in retail pasteurized whole milk by two culture methods and PCR. J Food Prot. 2005;68(5):966-972.
- 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.
- Estévez DI, Hernández CR, Trujillo GAM, Chávez GG. Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in goat and sheep flocks in Mexico. Small Rumin Res 2006, doi:10.1016/j.smallrumres.2006.10.017
- Ferreira R, Fonseca LS, Lilenbaum W. Agar gel immunodiffusion test (AGID) evaluation for detection of bovine paratuberculosis in Rio de Janeiro, Brazil. Lett Appl Microbiol. 2002; 35(3):173-175.
- Fischer OA, Matlova L, Dvorska L, Svastova P, Bartos M, Weston RT, *et al.* Potential risk of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* spread by syrphid flies in infected cattle farms. Med Vet Entomol. 2005; 19(4):360-366.
- Fischer OA, Matlova L, Dvorska L, Svastova P, Peral DL, Weston RT, *et al.* Beetles as possible vectors of infections caused by *Mycobacterium avium* species. Vet Microbiol. 2004;102(3-4):247-255.
- Gallardo NJL. Situación actual y perspectiva de la producción de leche de bovino en Mexico 2005. Coordinación General de Ganadería, SAGARPA. 20 de abril de 2005. Disponible en: <http://www.sagarpa.gob.mx/Dgg/estudio/sitlech05.pdf>
- Gardner RA, Ghobrial G, Naser SA, Phanstiel O 4th. Synthesis and biological evaluation of new acinetoferrin homologues for use as iron transport probes in mycobacteria. J Med Chem. 2004; 47(20):4933-40.
- Gao A, Odumeru J, Raymond M, Mutharia L. Development of improved method for isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from bulk tank milk: effect of age of milk, centrifugation, and decontamination. Can J Vet Res. 2005; 69(2):81-87.
- Gao A, Mutharia L, Raymond M, Odumeru J. Improved template DNA preparation procedure for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk by PCR. J Microbiol Methods 2007; 69(2):417-20. Epub 2007 Jan 9.
- 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.
- González J, Geijo MV, García-Pariente C, Verna A, Corpa JM, Reyes LE *et al.* Histopathological classification of lesions associated with natural paratuberculosis infection in cattle. J Comp Pathol 2005; 133:184-196.

- Grant IR, Ball HJ, Rowe MT. Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from milk by immunomagnetic separation. *Appl Environ Microbiol* 1998; 64(9):3153-8.
- Grant IR, Pope CM, O’Riordan RM, Ball HJ, Rowe MT. Improved detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* In milk by immunomagnetic PCR. *Vet Microbiol.* 2000;77(3-4):369-78
- Grant IR, Ball H, 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.
- HandiSTATUS. World 2004 Paratuberculosis, Animal Health Status. OIE. Disponible en: [http://www.oie.int/hs2/sit\\_mald\\_cont.asp?c\\_mald=27&c\\_cont=6](http://www.oie.int/hs2/sit_mald_cont.asp?c_mald=27&c_cont=6).
- HandiSTATUS II. México/Paratuberculosis. Situación zoonosaria plurianual. Disponible en: [http://www.oie.int/hs2/sit\\_pays\\_mald\\_pl.asp?c\\_pays=120&c\\_mald=27](http://www.oie.int/hs2/sit_pays_mald_pl.asp?c_pays=120&c_mald=27)
- Harris NB, Barletta RG. Map in veterinary medicine. *Clin Microbiol Rev* 2001;14(3): 389-512. Hirsh DC. *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (*Mycobacterium paratuberculosis*) in: Hirsh DC, Zee YC. *Veterinary Microbiology*. Blackwell science Inc, U.S.A. 1999.
- Hines ME, Styer EL. Preliminary characterization of chemically generated *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* cell wall deficient forms (spheroplasts). *Vet Microbiol* 2003; 95:247-258.
- Hope AF, Kluver PF, Jones SL, Condrón RJ. Sensitivity and specificity of two serological tests for the detection of ovine paratuberculosis. *Aust Vet J.* 2000 Dec;78(12):850-6.
- Hultén K, El-Zimaity HM, Karttunen TJ, Almashrawi MR, Schwartz D, Graham Dy, *et al.* Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Crohn’s diseased tissues by *in situ* hybridization. *Am J Gastroenterol* 2001;96: 1529-1535.
- Jayarao BM, Pillai SR, Wolfgang DR, Griswold DR, Rossiter CA, Tewari D, *et al.* Evaluation of IS900-PCR assay for detection of *Mycobacterium avium* subspecies Paratuberculosis infection in cattle using quarter milk and bulk tank milk samples. *Foodborne Pathog Dis* 2004; 1(1):17-26.
- Jayarao BM, Donaldson Sc, Straley BA, Sawant AA, Hegde NV, Brown JL. A survey of foodborne pathogens in bulk tank milk and raw milk consumption among farm families in Pennsylvania. *J Dairy Sci* 2006; 89:2451-2458.
- Juárez BF, Almeida VL, Aviles MJ, Mendoza B. Incidencia de paratuberculosis ovina en dos rebaños del Estado de Sinaloa. XVIII Congreso Nacional de Buiatría. Asociación De Médicos Veterinarios Especialistas en Bovinos, A.C. Noviembre 1993, México D.F.

- Judge J, Kyriazakis I, Greig A, Hutchings MR. Routes of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* transmission in rabbits.
- Juste RA. Paratuberculosis: Una revisión. Med Vet. 1984; 1(4)
- 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.
- Juste RA, Garrido JM, Aduriz G. El agente causal de la paratuberculosis y su situación taxonómica. 2000; 93:13-28.
- Karlinger K, Gyorke T, Mako E, Master A and Tarjan Z. The epidemiology and the pathogenesis of inflammatory bowel disease. Eur J Radiol 2000; 35(3):154-167.
- Kopečna M, Lamka J, Trčka I, Moravkova M, Horvathova A, *et al.* Atypical hosts and vectors of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*.
- Lambrecht RS, Carriere JF and Collins MT. A model for analyzing growth kinetics of a slowly growing *Mycobacterium* sp. Appl Environ Microbiol 1988; 54:910-916.
- Lambrecht RS, Collins MT. *Mycobacterium paratuberculosis*. Factors that influence mycobactin. Diagn Microbiol Infect Dis. 1992; 15(3):239-46.
- Larsen AB, Merkal RS and Vardaman TH. Survival times of *Mycobacterium paratuberculosis*. Am J Vet Res 1956: 549-551.
- Larsen AB, Merkal RS, Cutlip RC. Age of cattle as related to resistance to infection with *Mycobacterium paratuberculosis*. Am J Vet Res 1975; 36: 255-257.
- Li L, Bannantine JP, Zhang Q, Amonsin A, May BJ, Alt D, *et al.* The complete genome sequence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* . Proc Natl Acad Sci USA. 2005; 102: 12344-12349.
- Loftus CG, Loftus EV Jr, Harmsen WS, Zinsmeister AR, Tremaine WJ, Melton LJ 3rd, Sandborn WJ. Update on the incidence and prevalence of Crohn's disease and ulcerative colitis in Olmsted County, Minnesota, 1940-2000. Inflamm Bowel Dis. 2007; 13(3):254-61.
- Lombard JE, Byrem TM, Wagner BA, McCluskey BJ. Comparison of milk and serum enzyme-linked immunosorbent assays for diagnosis of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection in dairy cattle. J Vet Diagn Invest 2006; 18(5):448-458.
- Matthews PRJ, McDiarmid A, Collins P and Brown A. The dependence of some strains of *Mycobacterium avium* on mycobactin for initial and subsequent growth. J Med Microbiol 1977; 11:53-57.
- McDowell RM, McElvaine MD. Long term sequelae to foodborne disease. Rev Sci Tech 1997;16(2):337-341.

- McKenna SL, Keefe GP, Tiwari A, VanLeeuwen J, Barkema HW. Johne's disease in Canada part II: disease impacts, risk factors, and control programs for dairy producers. *Can Vet J* 2006; 47(11):1089-1099.
- Merkal RS, Curran BJ. Growth and metabolic characteristics of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Appl Microbiol* 1974; 28(2):276-279.
- Merkal RS. Paratuberculosis: advances in cultural, serologic, and vaccination methods. *J Am vet Med Assoc* 1984; 184(8):939-943.
- Metzger-Boddien C, Khaschabi D, Schonbauer M, Boddien S, Schleder T, Kehle J. Automated high-throughput immunomagnetic separation-PCR for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in bovine milk. *Int J Food Microbiol* 2006; 110(3):201-8.
- Millar D, Ford J, Sanderson J, Withey S, Tizard M, Doran T, Hermon-Taylor J. IS900 PCR to detect *Mycobacterium paratuberculosis* in retail supplies of whole pasteurized cows' milk in England and Wales. *Appl Environ Microbiol* 1996; 62(9):3446-3452.
- Mishina D, Katsel P, Brown ST, Gilberts ECAM and Greenstein RJ. On the etiology of Crohn disease. *Proc Natl Acad Sci. USA*, Septiembre 1996, 93:9816-9820
- Modificación a la Norma Oficial Mexicana NOM-031-ZOO-1995, Campaña Nacional contra la Tuberculosis Bovina (*Mycobacterium bovis*). Disponible en: <http://www.economia.gob.mx/work/normas/noms/1996/031-zoo.pdf>
- Mossel DAA, Moreno B, Struijk CB. *Microbiología de los Alimentos*, 2ª ed. Editorial Acribia. Zaragoza, España. 2003.
- Muehlherr JE, Zweifel C, Corti S, Blanco JE and Stephan R. Microbiological quality of raw goat's and ewe's bulk-tank milk in Switzerland. *J Dairy Sci.* 2003; 86(12):3849-3856.
- NAHMS (National Animal Health Monitoring System). Johne's disease on U.S. dairy operations. USDA. Disponible en: <http://www.aphis.usda.gov/vs/ceah/ncahs/nahms/dairy/dairy96/DR96john.pdf>
- Naser SA, Schwartz D, Shafran I. Isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from breast milk of Crohn's disease patients. *Am J Gastro* 2002; 6:1-6.
- Naser SA, Ghobrial G and Valentine JF. Culture of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from the blood of patients with Crohn's disease. *Lancet* 2004, 364: 1039-1044.
- Norma Oficial Mexicana NOM-091-SSA1-1994. Bienes y servicios. Leche pasteurizada de vaca. Disposiciones y especificaciones sanitarias.

- Norma Oficial Mexicana NOM-110-SSA1-1994. Bienes y servicios. Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico.
- Norma Oficial Mexicana NOM-113-SSA1-1994. Bienes y servicios. Método para la cuenta de microorganismos coliformes totales en placa.
- Office International des Epizooties 2001, International Animal Health Code. Paris: Office International des Epizooties.
- Ott SL, Wells SJ, Wagner BA. Herd-level economic losses associated with Johne's disease on US dairy operations. *Prev Vet Med* 1999; 40(3-4):179-192
- Palmer MV, Stoffregen WC, Carpenter JG, Stabel JR. Isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (Map) from feral cats on a dairy farm with Map-infected cattle. *J Wildl Dis.* 2005; 41(3):629-635.
- Paolicchi F.A., Zumarraga M.J., Gioffre A., Zamorano P., Morsella C., Verna A., *et al.* Application of different methods for the diagnosis of paratuberculosis in dairy cattle herds in Argentina. *J Vet Med* 2003; 50: 20-26.
- Payer JB, Jarnagin JL, Marquardt JG, Schaper LA, Martin BM. Métodos de laboratorio en Micobacteriología Veterinaria para el aislamiento e identificación de micobacterias. Laboratorio Nacional de Servicios Veterinarios AMEX, Iowa. 1992.
- Pérez E., Sobrino S., García VAM, Abdo M, Murguía D, Bernal F. Enfermedad de Crohn. Experiencia médico-quirúrgica. Estudio retrospectivo de 10 años. *Revista Gastroenterología México* 1992; 57(1): 21-26.
- Pickup RW, Rhodes G, Bull TJ, Arnott S, Sidi-Boumedine K, Hurley M, *et al.* *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in lake catchments, in river water abstracted for domestic use, and in effluent from domestic sewage treatment works: diverse opportunities for environmental cycling and human exposure. *Appl Environ Microbiol.* 2006;72(6):4067-4077.
- Pillai SR, Jayarao BM. Application of IS900 PCR for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* directly from raw milk. *J Dairy Sci.* 2002; 85(5):1052-1057.
- Ramírez C, Trigo E, Suárez F y Merkal R. Aislamiento e identificación de *Mycobacterium paratuberculosis* en México. *Téc Pec Méx* 1979; 36:74-76
- Ramírez PC, Ramírez CC, Valero EG, Trigo TE. Paratuberculosis en cabras en México. *Téc Pec Méx* 1983; 45: 104-106.
- Ramírez CC, González SR, de Lucas TJ. Evaluación de tres métodos de diagnóstico para la detección de paratuberculosis en cabras. *Téc Pec Méx* 1984; 47:128-132.
- Robbe-Austerman S, Gardner IA, Thomsen BV, Morriscal DG, Martin BM, Palmer MV, *et al.* Sensitivity and specificity of the agar-gel-immunodiffusion test, ELISA and the skin test

for detection of paratuberculosis in United States Midwest sheep populations. *Vet Res* 2006; 37(4):553-64. Epub 2006 Apr 28.

- Rodríguez LGA. Enfermedad inflamatoria: Epidemiología y patogénesis. *Méd Sur* 2001; 8(3): 84-89.
- Rossiter CJ, Henning WR. Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from thin market cows at slaughter. *J Anim Sci* 2001;79-113.
- Santillán FMA, Córdova LD, Guzmán Ruiz CC, López MJ, Rosado RMI, Mojarro JFJ, *et al.* Seroprevalencia de paratuberculosis en ganado bovino del Estado de Guanajuato. Memorias del XXVIII Congreso de Buiatría. 2004.
- Schwartz D, Shafran I, Romero C, Piromalli C, Biggerstaff J, Naser M, *et al.* Use of short-term culture for identification of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in tissue from Crohn's disease patients. *Clin Microbiol & Infect* 2000; 6(6):303.
- Seitz SE, Heider LE, Heuston WD, Bech-Nielsen S, Rings DM, Spangler L. Bovine fetal infection with *Mycobacterium paratuberculosis*. *J Am Vet Med Assoc* 1989; 194(10):1423-1426.
- Sistema de Información y Estadística Agroalimentaria y Pesquera (SIAP) SAGARPA. Avance mensual de la producción pecuaria. Leche caprino. Año 2007. Disponible en: [http://www.siap.sagarpa.gob.mx/ar\\_comdetpec.html](http://www.siap.sagarpa.gob.mx/ar_comdetpec.html)
- Sistema de Información y Estadística Agroalimentaria y Pesquera (SIAP) SAGARPA. Avance mensual de la producción pecuaria. Leche bovino. Año 2007. Disponible en: [http://www.siap.sagarpa.gob.mx/ar\\_comdetpec.html](http://www.siap.sagarpa.gob.mx/ar_comdetpec.html)
- Souza MH, Troncon LE, Rodrigues CM, Viana CFG, Onofre PHC, Monteiro RA. Trends in the occurrence (1980-1999) and clinical features of Crohn's disease and ulcerative colitis in a university hospice in southeastern Brazil. *Arq Gastroenterol* 2002; 39(2):98-105.
- Stabel JR. Johne's disease and milk: do consumers need to worry? *J Dairy Sci* 200; 83(7):1659-1663.
- Stehman SM. Paratuberculosis in small ruminants, deer, and South American camelids. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 1996;12(2):441-455.
- Stevenson K, Hughes VM, de Juan L, Inglis NF, Wright F, Sharp JM. Molecular characterization of pigmented and nonpigmented isolates of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *J Clin Microbiol* 2002; 40:1798-1804.
- Streeter RN, Hoffsis GF, Bech-Nielsen S, Shulaw WP, Rings DM. Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from colostrum and milk of subclinically infected cows. *Am J Vet Res.* 1995; 56(10):1322-4.

- Strommenger B, Stevenson K and Gerlach GF. Isolation and diagnostic potential of ISMav2, a novel insertion sequence-like element from *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis. *FEMS Microbiol Lett.* 2001;196(1):31-37.
- Sung N, Collins MT. Thermal tolerance of *Mycobacterium paratuberculosis*, *Applied and Environmental Microbiology* 2000; 64 (3): 999-1005.
- Sweeney RW. Transmission of paratuberculosis. *Vet Clin North Am* 1996; 12(2): 305-312.
- Sweeney RW, Whitlock RH, Rosenberger AE. *Mycobacterium paratuberculosis* isolated from fetuses of infected cows not manifesting signs of the disease. *Am J Vet Res* 1992; 53(4):477-480.
- Taddei S, Robbi C, Cesena C, Rossi I, Schiano E, Arrigoni N, Vicenzoni G, Cavirani S. Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in bovine fecal samples: comparison of three polymerase chain reaction-based diagnostic tests with a conventional culture method. *J Vet Diagn Invest* 2004 ; 16(6):503-8.
- 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.
- Thorel MF. Review of the occurrence of mycobactin dependence among micobacteria species. *Ann Rech Vet* 1984; 15(3): 405-409.
- Torres EA, De Jesus R, Perez CM, Inesta M, Torres D, Morell C, *et al.* Prevalence of inflammatory bowel disease in an insured population in Puerto Rico during 1996. *P R Health Sci J* 2003; 22(3):253-258.
- Tripathi BN, Periasamy S, Paliwal OP, Singh NH. Comparison of IS900 tissue PCR, bacterial culture, johnin and serological tests for diagnosis of naturally occurring paratuberculosis in goats. *Vet Microbiol* 2006; 116(1-3):129-137.
- USDA. 2005. Johne's disease on U.S. Dairy Operations, 2002. USDA: APHIS:VS:CEAH. National Animal Health.
- Unzueta RJ. Contribución al estudio de la enteritis paratuberculosa bovina en México. 1936. Tesis de licenciatura. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM.
- van Kooten HCG. Intra-uterine transmission of paratuberculosis (Johne's disease) in farmed red deer. *N Z Vet J* 2006; 54(1): 16-20.

- Vélez HMV. Comparación de diferentes técnicas de diagnóstico en paratuberculosis caprina (*Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*). Tesis de maestría. FMVZ, UNAM. 1998.
- Wall S, Kunze ZM, Saboor S, Soufleri I, Seechurn P, Chiodini R, *et al.* Identification of spheroplast-like agents isolated from tissues of patients with Crohn's disease and control tissues by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol.* 1993; 31(5):1241-1245.
- Whitlock RH and Buergelt C. Preclinical and clinical manifestations of paratuberculosis (including pathology). *Vet Clin North Am: Food Animal Practice* 1996; 12(2): 345-355.
- Yayo W, Macháčková and Pavlík I. The transmission and impact of paratuberculosis infection in domestic and wild ruminants. *Vet Med* 2001; 46(7-8):205-224.