



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

## MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y SALUD ANIMAL

Evaluación de la interferencia en el diagnóstico serológico de  
*Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* en cabras con  
linfadenitis caseosa.

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE MAESTRA EN CIENCIAS

P R E S E N T A:

MVZ. Yazmin Alejandra Cortés Pérez

Tutor principal:

Dr. Efrén Díaz Aparicio

Instituto Nacional de Investigaciones Forestales,  
Agrícolas y Pecuarias (INIFAP).

Comité tutorial:

Dra. Beatriz Arellano Reynoso

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia UNAM

Dr. Andrés Ernesto Ducoing Watty

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia UNAM



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**

A la mujer que es el pilar más importante en mi vida, mi madre. Gracias por tu infinito amor incondicional, por mostrarme con el ejemplo que la generosidad es la llave de la riqueza espiritual, por darme tu mano todas las veces que caí, por enseñarme que los silencios son en muchas ocasiones, más útiles y reconfortantes que las mismas palabras. Te amo Chikiviky.

A mi padre Rodolfo, por apoyarme incondicionalmente en mis metas de superación personal y profesional, por creer en mí, por tus acertados consejos y enseñarme que la adversidad no es más que una experiencia de aprendizaje y crecimiento como ser humano.

A mi hermano Julio, mi amigo y compañero de esas largas caminatas nocturnas, gracias por alegrarme los días con tu simpatía y anécdotas, me has enseñado que la vida es una aventura.

A mi abuelita Ofe, por tus bendiciones, oraciones y procurar siempre mi bienestar.

A mi perro Ody, ese maravilloso ser que me ha dado su invaluable e incondicional compañía, que me ha visto crecer como profesional, gracias por todas las madrugadas en el que estuviste recostado a mi lado, aguardando pacientemente a que concluyera esta tesis, animándome con una mirada, una caricia...

Este escrito también esta dedicado a las personas que en algún momento formaron parte de mi vida y me compartieron un pedacito de su esencia, alegría, amor y me dieron aliento en esos momentos difíciles. Llevo el regalo de su enseñanza en mi corazón.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Dr. Efrén Díaz, por brindarme la oportunidad de trabajar con su equipo de investigación, por confiar en mí y ser un tutor generoso y de gran corazón que me apoyó siempre incondicionalmente.

A la Dra. Beatriz Arellano por abrirme las puertas del laboratorio a su cargo, gracias por orientarme en todo momento y brindarme su amistad.

Al Dr. Andrés Ducoing por asesorarme en la escritura y corrección de la tesis y estar siempre dispuesto a apoyarme.

A la Dra. Gabriela Palomares, Dr. Francisco Aguilar y Dr. Pedro Mejía, gracias por compartir conmigo tantos momentos amenos y llenos de risas, y al mismo tiempo, permitirme conocer y abrir mi visión a nuevos horizontes.

Al Dr. Alejandro Benitez, te agradezco el haberme compartido tus conocimientos y experiencia en el laboratorio. Por tu compañía que me regaló tantas risas y buenos recuerdos.

A Montserrat Morales, mi gran amiga y confidente, por el apoyo moral, los acertados consejos y soportar tanto drama; además, por el asesoramiento en la corrección y estilo de esta tesis.

A Adrián Muñoz, por enseñarme a ver el lado positivo en la adversidad, por ser mi compañero de viajes y muestreos, así como de largas jornadas de trabajo en el laboratorio.

A Pablito Vera, por regalarme siempre una amable sonrisa matutina y por el invaluable apoyo con el trabajo de laboratorio

# CONTENIDO

RESUMEN .....	VI
ABSTRACT.....	VIII
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
1.1.1 Antecedentes históricos.....	1
1.1.2 Etiología .....	1
1.1.3 Taxonomía .....	2
1.1.3.1 <i>El orden Actinomycetales</i> .....	2
1.1.4 Medios de cultivo.....	3
1.1.5 Aporte externo de micobactina .....	3
1.1.6 Resistencia y susceptibilidad.....	3
1.1.7 Transmisión.....	4
1.1.8 Entrada de MAP en el hospedero.....	5
1.1.9 Respuesta Inmune Celular .....	6
1.1.10 Respuesta Inmune Humoral .....	6
1.1.11 Etapas de infección.....	8
1.1.11.1 <i>Fase I. Latente</i> .....	8
1.1.11.2 <i>Fase II. Subclínica</i> .....	8
1.1.11.3 <i>Fase III. Clínica</i> .....	9
1.1.11.4 <i>Fase IV. Clínica Avanzada</i> .....	9
1.1.12 Pruebas diagnósticas basadas en la inmunidad de MAP.....	9
1.1.12.1 <i>Pruebas diagnósticas para la detección de la inmunidad celular</i> .....	10
1.1.12.2 <i>Pruebas diagnósticas para la detección de la inmunidad humoral</i> .....	10
1.1.12.2.1 <i>Inmunodifusión en gel de agar</i> .....	11
1.1.12.2.2 <i>Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas</i> .....	11
<b>1.2 LINFADENITS CASEOSA (LC). .....</b>	<b>14</b>
1.2.1 Importancia de la linfadenitis caseosa .....	14
1.2.2 Etiología de la linfadenitis caseosa .....	14
1.2.3 Transmisión.....	15
1.2.4 Patogenia .....	15
1.2.5 Fosfolipasa D .....	15
1.2.6 Diagnóstico.....	16
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>18</b>
2.1 Objetivo General .....	18
2.2 Objetivos Específicos .....	18
<b>3. HIPÓTESIS .....</b>	<b>18</b>
<b>4. MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>19</b>
4.1 Origen y características de las muestras .....	19
4.1.1 Descripción del origen de las muestras .....	19
4.1.2 Procedimiento para la colección y transporte de la totalidad de las muestras.....	19
4.2 Pruebas para el diagnóstico de <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> . .....	20
4.2.1 Aislamiento bacteriológico .....	20
4.2.2 Pruebas bioquímicas .....	20
4.2.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) .....	20
4.2.4 ELISA .....	21
4.2.4.1 <i>Obtención del antígeno</i> .....	21

4.2.4.2	Cuantificación de proteína .....	21
4.2.4.3	Desarrollo del ELISA indirecto para la detección de anticuerpos contra <i>C. pseudotuberculosis</i> .....	22
4.2.4.4	Determinación del punto de corte, la sensibilidad y la especificidad del ELISA estandarizado.....	23
<b>4.3</b>	<b>Pruebas para el diagnóstico de <i>M. avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i>.</b> .....	<b>23</b>
4.3.1	Inmunodifusión en gel de agar.....	23
4.3.2	ELISA.....	23
4.3.3	PCR anidada (nPCR) para la detección de la IS900 de <i>M. avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> .....	24
4.3.3.1	Obtención de ADN a partir de heces.....	24
4.3.3.2	Lisis celular y extracción de ADN .....	25
4.3.3.3	Desarrollo de la nPCR IS900.....	25
4.3.3.4	Determinación de la sensibilidad y especificidad de nPCR en la identificación del IS900 de MAP.....	25
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>27</b>
5.1	Resultados de las pruebas para el diagnóstico de <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> .....	27
5.1.1	Aislamiento bacteriológico .....	27
5.1.2	Pruebas bioquímicas .....	27
5.1.3	Identificación molecular de <i>C. pseudotuberculosis</i> .....	28
5.1.4.	Deteción de anticuerpos contra <i>C. pseudotuberculosis</i> mediante ELISA....	29
5.1.4.1	Cuantificación de proteína .....	29
5.1.4.2	Determinación del punto de corte, la sensibilidad y la especificidad del ELISA .....	29
5.1.4.3	Evaluación de las muestras de campo .....	30
5.2	Resultados de las pruebas para el diagnóstico de <i>M. avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> .....	31
5.2.1	Deteción de anticuerpos contra MAP mediante IDGA.....	31
5.2.2	Deteción de anticuerpos contra MAP mediante ELISA Pourquier® Paratuberculosis Screening .....	31
5.2.3	Diagnóstico molecular de MAP .....	32
5.2.3.1	Sensibilidad de la prueba de nPCR.....	33
5.2.3.2	Especificidad de la prueba de nPCR.....	33
5.2.3.3	Evaluación de las muestras de campo por nPCR IS900 .....	34
5.2.3.4	Secuenciación del producto PCR IS900 a partir de muestras clínicas .....	35
<b>6.</b>	<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>36</b>
<b>7.</b>	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>47</b>
<b>8.</b>	<b>ANEXOS .....</b>	<b>48</b>
	<b>LITERATURA CITADA .....</b>	<b>50</b>

## ABREVIATURAS Y SIGLAS EMPLEADAS

ABTS	Azino-di-(3-etil- benzothiazol-sulfona-6–diamonio)
Ac	Anticuerpo
Ag	Antígeno
BCG	Bacilo de Calmette y Guérin
BHI	Caldo Infusión Cerebro Corazón
BSA	Albúmina sérica bovina
C-	Control negativo
C+	Control positivo
CE	Extractos celulares
CF	Filtrados de cultivo
CMNR	<i>Corynebacterium, Mycobacterium, Nocardia y Rhodococcus</i>
CN	Control negativo
CP	Control positivo
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ELISA	Ensayo enzimático ligado a enzimas
FC	Fijación del complemento
GC	Guanina- citocina
GM-CSF	Factores estimuladores de colonias de granulocitos y macrófagos
HCP	N-cetylpiridinio
HEYM	Medio de Herrold con yema de huevo
HRP	Peroxidasa de rábano
IDGA	Inmunodifusión en gel agar
IDR	Intradermorreacción
IFN- $\gamma$	Interferón gamma
Ig	Inmunoglobulina
IL	Interleucina
IS900	Secuencia de Inserción 900
LAM	Lipoarabinomanano
LC	Linfadenitis caseosa
LJ	Löwenstein-jensen
<i>Maa</i>	<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>avium</i>
Man-LAM	Lipoarabinomanano manosilado
MAP	<i>Mycobacterium avium</i> subespecie <i>paratuberculosis</i>
<i>Mas</i>	<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>silvaticum</i>
MHC	Complejo principal de histocompatibilidad
miRNA	micro RNA
Mpm	Marcador de peso molecular
NK	Células asesinas naturales
nm	Nanómetro
nPCR	PCR anidada
OD	Densidad óptica

pb	Pares de bases
PBS	Solución amortiguada de fosfatos
PBS-t	PBS Tween
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
<i>pld</i>	Gen de la Fosfolipasa D
PPD	Extracto proteico purificado
PBMC	Células mononucleares de sangre periférica
SP	Suero problema
TA	Temperatura ambiente
TGF- $\beta$	Factor de crecimiento transformante
TMB	Tetra-metil-benzidina
TNF- $\alpha$	Factor de necrosis tumoral alfa

## ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1. Aislamiento de *C. pseudotuberculosis* a partir de exudado caseoso.
- Figura 2. Producción de hemólisis sinérgica con *R. equi*.
- Figura 3. Amplificación del gen *pld* a partir de las muestras clínicas.
- Figura 4. Límite mínimo de detección de la PCR *IS900*.
- Figura 5. Determinación de especificidad de la PCR anidada *IS900*.
- Figura 6. Detección ADN a partir de muestras de heces.

## ÍNDICE DE CUADROS

- Cuadro 1. Características químicas de *Mycobacterium* y géneros relacionados.
- Cuadro 2. Comparación de las pruebas ELISA y PCR para la identificación de *C. pseudotuberculosis*.
- Cuadro 3. Detección de anticuerpos serológicos mediante ELISAs.

## ÍNDICE DE GRÁFICAS

- Gráfica 1. Cuantificación de proteína cruda de *C.pseudotuberculosis* en el sobrenadante.
- Gráfica 2. Determinación de la sensibilidad y especificidad del ELISA para la detección de anticuerpos contra *C.pseudotuberculosis*.
- Gráfica 3. Evaluación de la especificidad del ELISA Pourquoier® Paratuberculosis Screening.

## RESUMEN

CORTÉS PÉREZ YAZMIN ALEJANDRA. Evaluación de la interferencia en el diagnóstico serológico de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* en cabras con linfadenitis caseosa. (Bajo la asesoría de Dr. Efrén Díaz Aparicio, Dra. Beatriz Arellano Reynoso y Dr. Andrés Ernesto Ducoing Watty.)

La paratuberculosis, también conocida como enfermedad de Johne, es una enfermedad de curso crónico y etiología infecciosa causada por *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* (MAP) que afecta a rumiantes domésticos y silvestres, así como también a animales monogástricos.

Las pruebas serológicas para la detección de paratuberculosis como el ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) e inmunodifusión en gel de agar (IDGA), utilizan como antígeno lisados de células no purificadas que comparten determinantes antigénicos en común con géneros taxónicamente relacionados, como *Corynebacterium*, *Nocardia* y *Rhodococcus*.

El diagnóstico mediante estas pruebas serológicas se ve afectado por la falta de especificidad debido a la presencia de anticuerpos en respuesta a la coinfección con *Corynebacterium pseudotuberculosis*, agente etológico de la linfadenitis caseosa (LC), que afecta principalmente a pequeños rumiantes y que conduce a la obtención de resultados falsos positivos tanto en ELISA como en IDGA debido a las reacciones cruzadas entre anticuerpos.

El objetivo de este estudio consistió en evaluar la interferencia en el diagnóstico serológico de MAP en cabras con abscesos cutáneos producidos por *C. pseudotuberculosis*.

Se colectaron muestras de sangre, exudado purulento de abscesos y heces de 103 caprinos de 14 municipios de 7 entidades federativas de la República mexicana. Del total de cabras muestreadas (n=103), 60 presentaban abscesos cutáneos sugerentes a LC, 13 abscesos fistulizados y 30 cabras consideradas libres de ambas enfermedades.

Las pruebas empleadas para el diagnóstico de LC consistieron en el aislamiento bacteriológico de *C. pseudotuberculosis* a partir de muestras de exudado obtenido de los abscesos (n= 60), posteriormente las colonias en cultivo puro se evaluaron con pruebas bioquímicas y utilizando la técnica de PCR, se determinó la presencia del gen *pld* de *C. pseudotuberculosis* a partir del ADN de cada aislamiento. En el caso de cabras con abscesos fistulizados o sin antecedentes de LC, se realizó un ELISA indirecta para la detección de anticuerpos contra *C. pseudotuberculosis*.

Para el diagnóstico de MAP se utilizaron dos pruebas serológicas, un ELISA indirecto con el kit comercial ELISA IDEXX (Instituto Pourquier®) y la inmunodifusión en gel de agar, utilizando el antígeno protoplásmico PPA-3 (Allied Monitor, Inc®).

Asimismo, el diagnóstico molecular consistió en identificar el sitio de Inserción 900 (IS900) de MAP con una PCR anidada (nPCR), utilizando el ADN obtenido a partir de muestras de excremento.

En el grupo de cabras que presentaban abscesos sugerentes a LC (n=60), se logró el aislamiento de *C. pseudotuberculosis* en el 100% (60/60) de las muestras de exudado, el 100% de los aislamientos fueron confirmados por PCR. En este grupo, el 78.3 % (47/60) de las cabras presentaron anticuerpos contra *C. pseudotuberculosis*, en la prueba de ELISA mientras que el 21.6% (13/60) resultaron seronegativos. Este ensayo obtuvo una sensibilidad de 78.3% y especificidad del 100%.

En el grupo de cabras con abscesos fistulizados (n=13), el ELISA para *C. pseudotuberculosis* detectó anticuerpos en el 69.2% de las cabras (9/13) y el 30.7% (4/13) resultaron seronegativas; en el grupo de cabras sin antecedentes de LC (n=30), el 100% no presentaron anticuerpos contra *C. pseudotuberculosis*.

Posteriormente en estos tres grupos de cabras (n=103), se detectaron anticuerpos contra paratuberculosis con el kit comercial ELISA Pourquoi® y la IDGA.

El ELISA Pourquoi® identificó 2/103 (1.94%) cabras seropositivas a paratuberculosis, ninguna dudosa y 101 cabras seronegativas, mientras que la IDGA detectó únicamente un animal seropositivo de las 103 cabras, este suero también resultó positivo al ELISA de paratuberculosis .

El ELISA de MAP arrojó una sensibilidad de 10% (2/20) y una especificidad de 100% con respecto a la PCR anidada IS900 que detectó 20/103 cabras positivas a MAP. La nPCR IS900 de MAP, identificó como positivas a paratuberculosis a 18 cabras más que el ELISA e IDGA. Los productos de amplificación de la nPCR IS900 se secuenciaron, obteniendo un 99-100% de identidad con la secuencia identificada como *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* insertion sequence IS900 (gb|S74401.1).

Se concluye que la presencia de anticuerpos serológicos contra *C. pseudotuberculosis* no interfiere de manera significativa con los antígenos de captura de las pruebas de ELISA e IDGA de MAP utilizadas en este estudio; siendo la técnica de nPCR IS900, una prueba más sensible que las pruebas serológicas para detectar paratuberculosis en rebaños caprinos.

Asimismo, los resultados de la secuenciación del IS900 permitieron confirmar la presencia de MAP en rebaños de cabras de cinco diferentes estados de la República; siendo los estados de Puebla y Ciudad de México los que presentan el mayor número de cabras afectadas.

**Palabras clave:** Paratuberculosis, linfadenitis caseosa, ELISA, IDGA, PCR, IS900.

## ABSTRACT

Paratuberculosis, known as Johne's disease, is a chronic course and infectious etiology disease caused by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) that affects domestic and wild ruminants, and also other monogastric animals.

The serological tests for paratuberculosis, as the enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) and the agar gel double immunodiffusion (IDGA) use as antigen unpurified cells lysates, that share antigenic determinant with taxonomically related genera as *Corynebacterium*, *Nocardia* y *Rhodococcus*.

Diagnosis by these serological tests is affected by a lack of specificity due to presence of antibodies, in response to coinfection with *Corynebacterium pseudotuberculosis*, which is an ethological agent of caseous lymphadenitis (LC), which mainly affects small ruminants and leads to false positive results in both ELISA and IDGA due to antibodies crossed reaction.

The aim of this study was to evaluate the interference in MAP serological diagnosis, in goats with skin abscesses caused by *C. pseudotuberculosis*.

Blood samples, purulent abscess exudate and feces from 103 goats were collected in 14 municipalities, across 7 states in México. From the whole sampled goats (n=103), 60 shown skin abscesses that suggest LC, 13 fistulized abscesses, and 30 were considered free of both diseases.

The tests used in LC diagnosis, consisted in bacteriological isolation of *C. pseudotuberculosis* from samples obtained from abscesses exudate (n=60), after that, the colonies in pure culture were evaluated with biochemical tests and using the PCR technique, presence of *pld* gene of *C. pseudotuberculosis* were tested in each isolation. For the case of goats with fistulized abscesses, or without history of LC, an indirect ELISA test was performed to detect *C. pseudotuberculosis* antibodies.

For the MAP diagnosis two serological tests were applied, an indirect ELISA using the ELISA IDEXX (Instituto Pourquier®) commercial kit, and the agar gel immunodiffusion using the protoplasmic antigen PPA-3 (Allied Monitor, Inc®).

Likewise, the molecular diagnosis consists in identify the insertion site 900 (IS900) of MAP with a nested PCR (nPCR), using DNA from stool samples.

In the group of goats that had LC-suggestive abscesses (n=60), the isolation of *C. pseudotuberculosis* achieved 100% (60/60) of the exudate samples and 100% of the isolations were confirmed by PCR. In this group, 78.3% (47/60) of the goats had *C. pseudotuberculosis* antibodies in ELISA test, while 21.6% (13/60) were seronegative. This assay had a sensitivity of 78.3% and specificity of 100%.

In the group of goats that had fistulized abscesses (n=13), the ELISA for *C. pseudotuberculosis* detect antibodies in 69.2% of the goats (9/13) and 30.7% (4/13) were seronegative; in the group of goats without a prior history of LC (n=30), 100% had not antibodies against *C. pseudotuberculosis*.

Later, in these three groups of goats (n=103), antibodies against *C.pseudotuberculosis* were detected using ELISA Pourquier ® commercial kit and IDGA.

The ELISA Pourquier ® identified 2/103 seropositive to paratuberculosis, no doubtful result, and 101 seronegative goats, while IDGA detected only a seropositive animal from 103 goats, this serum also tested positive for paratuberculosis ELISA.

MAP's ELISA yielded a sensitivity of 10% (2/20) and a specificity of 100% over nested PCR IS900 that detected 20/103 MAP positive goats (19.4%). The nested PCR IS900 of MAP, identified as positive to paratuberculosis 18 goats more than the ELISA and IDGA. The nPCR IS900 amplification products were sequenced, obtaining between 99-100% of identity with sequence identified as *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* insertion sequence IS900 (gb|S74401.1).

The study concludes that the presence of serological antibodies against *C. pseudotuberculosis* does not interfere significantly with the capture antigens from commercial MAP's ELISA and IDGA tests, being the nPCR IS900 technique, a more sensitive test than serological tests to detect paratuberculosis in herds of goats.

Results of the sequencing of IS900 confirmed the presence of MAP in herds of goats from five different states of the Republic; with the states of Puebla and México City having the highest number of affected goats.

**Keywords:** Paratuberculosis, caseous lymphadenitis, ELISA, IDGA, PCR, IS900.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 PARATUBERCULOSIS

### 1.1.1 Antecedentes históricos

En 1826, Hurrell d'Arboval describe en su *Diccionario Médico, Higiene Quirúrgica y Veterinaria*, lo que pareciera ser uno de los primeros casos documentados de la paratuberculosis, describiendo una forma de enteritis crónica en el ganado vacuno que cursaba con diarrea. En 1881 Hansen y Nielsen observaron esta presentación característica de enteritis señalando el engrosamiento y corrugación de la mucosa intestinal en el ganado vacuno (citado por Chiodini *et al.*, 1984).

En 1895, Johne y Frothingham realizaron la primera descripción detallada de esta enfermedad. Macroscópicamente describen la lesión como una enteritis crónica que afecta principalmente la porción terminal del íleon en el ganado, mientras que microscópicamente demuestran la presencia de bacilos ácido-alcohol resistentes en los tejidos afectados y concluyen que esta condición es una forma de tuberculosis intestinal (Johne y Frothingham, 1895).

Posteriormente, Twort e Ingram lograron aislar el agente etiológico, considerándolo una nueva especie y denominándolo *Mycobacterium enteritidis chronicae pseudotuberculosis bovis johne* (Twort y Ingram, 1912).

También recibió otras denominaciones como *M. johnei* y *M. paratuberculosis* por ser considerada una especie aparte de *M. avium*, sin embargo, debido a la alta homología que presenta MAP con *M. avium* se decidió clasificar al bacilo de MAP como una subespecie de *M. avium*. Es en 1990 cuando Thorel y colaboradores, apoyándose en estudios de caracterización genética y fenotípica, propusieron la taxonomía oficialmente aceptada, denominándose *M. avium* subespecie *paratuberculosis* (Thorel *et al.*, 1990).

De este modo, el complejo *M. avium* quedó dividido en las subespecies *M. avium* subsp. *avium* (*Maa*), MAP y *M. avium* subsp. *silvaticum* (*Mas*), donde los miembros de este grupo presentan más del 90% de homología en su secuencia de ADN, y en el cual MAP se diferencia fenotípicamente de *M. avium* y *M. silvaticum* por su dependencia de micobactina (Collins y De Lisle, 1986) y genotípicamente por la presencia de la secuencia de inserción 900. Esta secuencia se repite de 15 a 20 veces en el genoma de MAP y posee un tamaño de 1.451 pares de bases. La IS900 codifica una transposasa denominada p43 que consta de 399 aminoácidos (Doran *et al.*, 1997).

### 1.1.2 Etiología

*M. avium* subsp. *paratuberculosis* es el agente causal de la enfermedad de Johne y se trata de una bacteria Gram positiva de 1 – 2 µm de longitud por 0.5 µm de ancho, aerobia, intracelular facultativa, su temperatura óptima de crecimiento es de 37° C y se caracteriza por un lento crecimiento que comprende desde cuatro hasta 12

semanas. Se caracteriza por la ácido-alcohol resistencia que le es conferida por los ácidos micólicos que componen su pared celular (Harris y Barletta, 2001).

### **1.1.3 Taxonomía**

El género *Mycobacterium* fue inicialmente propuesto por Lehman y Newman en 1896 para identificar a los agentes etiológicos de la tuberculosis (*M. tuberculosis*) y de la lepra (*M. leprae*).

Las micobacterias pertenecen al suprarreino *Bacteria* división *Firmacutes*, están incluidas en el phylum *Actinobacteria*, clase *Actinobacteria*, subclase *Actinobacteridae*, orden *Actinomycetales*, suborden *Corynebacterinae*, familia *Mycobacteriaceae*, género *Mycobacterium* (Stackebrandt *et al.*, 1977).

El superreino *Bacteria* contempla a las bacterias verdaderas, la división *Firmacutes* incluye a las bacterias Gram positivas, la clase *Actinobacteria* contempla bacterias con alto contenido de guanina y citosina en su ADN (mayor al 50%) (Juste *et al.*, 2000), el orden *Actinomycetales* incluye géneros bacterianos que poseen un patrón de componentes en su pared celular que consiste principalmente en la presencia de azúcares como arabinosa y galactosa; y en menor cantidad aminoácidos, principalmente alanina, ácido glutámico y ácido diaminopimélico (Cummins y Harris, 1956; Cummins y Harris, 1958).

#### **1.1.3.1 El orden Actinomycetales**

El orden *Actinomycetales* también comprende los géneros *Corynebacterium*, *Nocardia*, *Rhodococcus* junto con *Mycobacterium*, que conforman el grupo CMNR (Barksdale y Kim, 1977).

Una de las principales características de los miembros del grupo CMNR es que son los únicos microorganismos capaces de sintetizar ácidos micólicos (Goodfellow y Wayne, 1982), que son cadenas de ácidos grasos  $\alpha$ -ramificados  $\beta$ -hidroxilados que forman parte de la pared celular. Los ácidos micólicos son considerados un importante factor de virulencia debido al carácter hidrofóbico que le confieren a la envoltura celular y que otorga a la micobacteria una elevada capacidad para persistir como un parásito intracelular facultativo (Baird y Fontaine, 2007).

Existen características químicas para diferenciar taxonómicamente a los miembros del grupo CMNR, como son el número de átomos de carbono y el contenido de guanina-citocina (GC) presente en el ADN. En el caso de los ácidos micólicos de las corinebacterias, también conocidos como ácidos corinomicólicos, son los más cortos del grupo, teniendo entre 22 y 38 átomos de carbono de longitud (Dorella *et al.*, 2006), el género *Mycobacterium* posee cadenas entre 60 a 90 átomos de carbono, mientras que *Nocardia* spp. cuenta con 46 a 60 de estos átomos (Barry *et al.*, 1998). En cuanto a la composición base de organismos CMNR, ésta varía desde 48 hasta 73% en su contenido de Guanina-Citosina (Cuadro 1), siendo de 48 a 59% para corinebacterias, el 63 al 73% para *Rhodococcus*, 62 a 70% para micobacterias y 64 a 69% para nocardias (Rastogi *et al.*, 2001).

**Cuadro 1. Características químicas de *Mycobacterium* y géneros relacionados.**

Taxonomía	Contenido de ADN (%mol)	Ácidos grasos	Ácidos micólicos	
			Número de carbonos	Éster liberado por pirólisis
<i>Corynebacterium</i>	48-59	S,U	22-38	8-18
<i>Mycobacterium</i>	62-70	S,U,T	60-90	22-26
<i>Nocardia</i>	64-69	S,U,T	46-60	12-18
<i>Rhodococcus</i>	63-73	S,U,T	34-52	12-18

ADN: Ácido desoxirribonucleico

CG: Guanina y citosina

S: cadena corta

T: tuberculoesteriático

U: Insaturada

Fuente: adaptado de Rastogi *et al.*, 2001.

#### 1.1.4 Medios de cultivo

El aislamiento de MAP en medios de cultivo es la prueba de oro para su identificación (Clark *et al.*, 2008). Se recomienda realizar el aislamiento primario de MAP en medios de cultivo sólido a base de huevo como Löwenstein-Jensen (LJ) y Herrold (HEYM por *Herrold Egg Yolk Medium*) (Whitlock y Rosenberg, 1990) o Middlebrook 7H11 enriquecido con ácido oleico, albúmina, dextrosa y catalasa (OADC), todos adicionados con micobactina; caldos como Middlebrook 7H9, Dubos adicionado con suero (Saxegaard, 1985) o el medio de Watson-Reid también puede emplearse (Morrison, 1965).

MAP se caracteriza por su lento crecimiento que lo diferencia de otras micobacterias con aspecto similar; suele requerir de un mínimo de 8 a 12 semanas de incubación a 37°C para observar la formación de pequeñas colonias rugosas (1-5 mm) que generalmente no están pigmentadas. En el caso de algunos aislados de origen ovino, este periodo de crecimiento puede alargarse incluso hasta más de un año (Collins *et al.*, 1993).

#### 1.1.5 Aporte externo de micobactina

MAP necesita una fuente orgánica de hierro; debido a la naturaleza insoluble del Fe<sup>+3</sup> a pH fisiológico, MAP cuenta con dos sideróforos para el transporte de este metal hacia el interior de la célula: las exoquelinas que sustraen/captan el Fe<sup>+3</sup> de la ferritina en el líquido extracelular y la micobactina, una molécula lipofílica presente en la membrana celular que facilita el transporte del hierro a través de la compleja pared celular micobacteriana (Schwartz y De Voss, 2001).

Para el crecimiento de MAP *in vitro* se requiere adicionar 2 mg de micobactina J por cada litro de medio de cultivo empleado (Thorel *et al.*, 1990; Juste *et al.*, 1991).

#### 1.1.6 Resistencia y susceptibilidad

MAP es una bacteria intracelular que únicamente puede multiplicarse en los macrófagos de un hospedero susceptible (Collins, 2003); sin embargo, al ser

excretado al medio ambiente tiene la capacidad de sobrevivir por largos periodos de tiempo (Chiodini *et al.*, 1984).

Este bacilo puede permanecer viable durante 153 días en agua de río, 270 días en agua estancada y hasta 246 días en heces que se encuentran en el suelo (Chiodini *et al.*, 1984; Lovell *et al.*, 1944).

En ambientes secos y con sombra puede permanecer durante 55 semanas y en agua de presa no expuesta a luz solar por 48 semanas (Whittington *et al.*, 2004).

Si las heces de bovino se mantienen a -14°C, MAP puede permanecer por al menos un año, mientras que temperaturas de -70°C es viable hasta por tres semanas (Richards y Thoen, 1977).

Estudios importantes donde se ha sometido a MAP a condiciones comerciales de pasteurización de la leche, demostraron que esta micobacteria es capaz de resistir y permanecer viable después del proceso de pasteurización con ciertas condiciones (HTST, 71°C por 15 segundos) (Sung y Collins, 2000; Grant, 2005; Ellingson *et al.*, 2005).

Otros estudios realizados en parcelas de tierra experimentalmente contaminada, han aislado con éxito a MAP tanto vegetales como en hortalizas después de un periodo de hasta cuatro semanas (Pavlik *et al.*, 2005).

Existen factores que afectan la viabilidad de MAP como la desecación, la exposición a la luz solar, suelos con altas concentraciones de calcio y pH alto; el contacto continuo con la orina y las heces también reduce la longevidad de la micobacteria (Jorgensen, 1977).

Los desinfectantes en suspensión acuosa que son activos frente a MAP incluyen formalina (5%), compuestos cresólicos (1:32), el fenol (1:40), el bicloruro de mercurio (1:1000), el hipoclorito cálcico (1:50) entre otros, sin embargo, la eficacia de estos compuestos disminuye significativamente en presencia de materia orgánica (Chiodini *et al.*, 1984).

### **1.1.7 Transmisión**

MAP se elimina primordialmente a través de las heces, y la principal ruta de infección es la vía fecal- oral (Clarke, 1997).

Los animales recién nacidos son más vulnerables a la infección con MAP que los animales de mayor edad; esta susceptibilidad parece estar relacionada con el desarrollo incompleto de la respuesta inmune y la facilidad para colonizar el intestino al nacimiento debido a la extensa superficie que ocupan las placas de Peyer en animales jóvenes; donde grandes cantidades de micobacterias pueden ser ingeridas a través del calostro, la leche o al mamar de las ubres contaminadas con heces de los animales excretos.

Por lo tanto, animales más jóvenes (aproximadamente <6 meses) requieren una dosis infectiva más baja para manifestar la enfermedad, siendo poco probable que los animales adultos se contagien a menos que tengan un alto índice de exposición con la micobacteria (McKenna *et al.*, 2006).

Las vacas clínicamente enfermas y probablemente otras especies animales excretan *M. paratuberculosis* directamente a la leche o calostro, principalmente cuando se encuentran en los últimos estadios de infección y eliminan grandes cantidades del bacilo en heces (Sweeney *et al.*, 1992), sin embargo, en cuadros subclínicos también es posible esta transmisión (Taylor *et al.*, 1981), siendo ambas secreciones una de las principales fuentes de infección postnatal.

Con respecto a las vías de transmisión prenatal; un meta-análisis reciente estimó la prevalencia de infección *in utero* en el ganado, se demostró que el 9% de los fetos infectados provenían de vacas con infección subclínica y el 39%, de madres clínicamente afectadas con paratuberculosis, poniendo dentro del contexto las consecuencias de la infección fetal dentro de los programas de diagnóstico y vacunación (Whittington y Windsor, 2009); MAP también ha sido aislada a partir de cotiledones, endometrio y fetos (Collins, 1997; Merkal, 1984), por lo tanto, es posible que los productos del parto contribuyan a la contaminación ambiental con la micobacteria.

Otra fuente de infección es la generada por los machos, ya sea por contacto directo en la monta natural o de manera indirecta durante la inseminación artificial, pues se ha reportado que MAP reside en el tracto genital del toro y se transmite por vía venérea, por el uso de semen o embriones tempranos en la inseminación artificial comercial o la transferencia de embriones (Philpott, 1993).

#### **1.1.8 Entrada de MAP en el hospedero**

MAP penetra las paredes intestinales a través de células M epiteliales que recubren las cúpulas de las placas de Peyer del íleon y yeyuno (Momotani *et al.*, 1988). Debido a la carencia de enzimas digestivas, mucosidad en su superficie, falta de lisosomas y enzimas hidrolíticas, las células M representan un objetivo primario para la infección con MAP (Featherstone, 1997).

La captación e internalización se lleva a cabo a través de interacciones de las proteínas de unión a la fibronectina (FAP) presentes en MAP, y las integrinas  $\beta 1$  localizadas en la superficie luminal de las células M, facilitando la invasión de la lámina propia (Secott *et al.*, 2002; Secott *et al.*, 2003).

MAP es un patógeno intracelular que una vez dentro del macrófago puede prevenir la maduración y acidificación fagosomal, evitando de este modo los componentes antimicrobianos del lisosoma (Hostetter *et al.*, 2003).

Los eventos de fusión fagosoma-lisosoma son controlados por proteínas Rab (proteínas de unión a GTP implicadas en procesos de fusión de membranas y transporte vesicular). Rab5 se encuentra expresada en fagosomas tempranos mientras que Rab7 en endosomas tardíos. En ciertas especies de micobacterias, la maduración fagosomal se interrumpe al excluir selectivamente las GTPasas Rab7 y de esta manera mostrar características de endosoma temprano que impiden la unión con los lisosomas; con este mecanismo de evasión, las micobacterias tiene la capacidad de persistir y replicarse dentro del fagosoma (Woo y Czuprynski, 2008; Rohde *et al.*, 2007).

El lipoarabinomano manosilado (Man-LAM), componente importante de la pared celular de las micobacterias patógenas también posee la capacidad de inhibir la acidificación, la maduración de los fagosomas y por lo tanto atenuar los efectos bactericidas de la célula hospedero (Nigou *et al.*, 2002). También se ha demostrado que el Man-LAM de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* tienen la facultad de suprimir la generación de óxido nítrico y radicales de oxígeno (Majumdar *et al.*, 2008).

### **1.1.9 Respuesta Inmune Celular**

Subsecuentemente a la infección, MAP es inicialmente controlado por una respuesta de células T cooperadoras (Th, del inglés "T helper cells") también conocidos como linfocitos CD4+. Los macrófagos infectados presentan los antígenos a los linfocitos T, que una vez activados producen interleucina 2 (IL-2); la activación de esta IL se traduce principalmente en la proliferación y diferenciación de linfocitos T cooperadores en células efectoras y de memoria.

Una vez activados los linfocitos CD4+ Th1, estos liberan más IL-2, induciendo la liberación de factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), factores estimuladores de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), así como estimulando la síntesis de IFN- $\gamma$  (Begara-McGorum *et al.*, 1998; Clarke, 1997). La secreción de estas sustancias atrae y activa una gran cantidad de macrófagos facilitando la destrucción de las micobacterias, controlando con esta primera respuesta celular la progresión de la infección (Basse y Collins, 1997).

A su vez, el IFN- $\gamma$  es una molécula clave que se encarga de activar a los macrófagos para la producción de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, la activación de las células T y la maduración de células dendríticas (He *et al.*, 2007). Además, sustancias como el TNF- $\alpha$  junto con los linfocitos T CD4+ y linfocitos T  $\gamma\delta$ + son críticos para la formación y mantenimiento de los granulomas, siendo estas lesiones atípicas, generalmente localizadas alrededor del sitio de infección en los segmentos medio y distales del intestino delgado que fungen como mecanismo de contención para prevenir la diseminación de la micobacteria a otros órganos (Harris y Barletta, 2001; Tiwari *et al.*, 2006).

Sin embargo, se ha sugerido que las micobacterias pueden tomar ventaja de estos granulomas para reclutar nuevos macrófagos al sitio de la infección y permitir el desplazamiento de micobacterias a través del granuloma (Davis y Ramakrishnan, 2009). Por lo tanto MAP puede utilizarlos como puentes para infectar nuevas porciones del intestino, así como otros órganos, incluyendo la glándula mamaria y linfonodos mesentéricos (Sweeney *et al.*, 1992).

### **1.1.10 Respuesta Inmune Humoral**

La respuesta humoral ha sido asociada con la progresión de la enfermedad clínica que se produce de forma concomitante con un cambio de dominio de la respuesta inmune protectora Th1 en etapas subclínicas a una respuesta liderada por la presencia de anticuerpos no protectores en animales clínicamente enfermos que excretan intermitentemente la bacteria en heces, lo que suele ser indicativo de

estadios avanzados de la enfermedad (Sweeney *et al.*, 1998; Stabel, 2000). El momento preciso de la producción de anticuerpos depende de la vía de entrada y la dosis ingerida, en algunos estudios se ha demostrado que la inoculación con MAP en dosis elevadas conduce a una producción más temprana de anticuerpos circulantes (Waters *et al.*, 2003).

Es la subpoblación de linfocitos Th2 la responsable de la inducción de la inmune humoral, promoviendo la diferenciación de células B y la producción de anticuerpos, principalmente IgM e IgG1 a través de las citocinas IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10 (Mosmann *et al.*, 1986; Cherwinski *et al.*, 1987; Mosmann y Coffman, 1989).

El rol de la IL-10 en la producción de células reguladoras o supresoras ha sido propuesto en la patogénesis de la paratuberculosis. Esto es apoyado en base a datos experimentales con vacas en etapa clínica de la enfermedad que indican un incremento en la expresión de IL-10 y factor de crecimiento transformante (TGF- $\beta$ ) que a su vez limitan la expresión de IFN- $\gamma$  (Khalifeh y Stabel, 2004).

Datos más recientes apoyan la hipótesis de que los macrófagos infectados con MAP producen IL-10 para ejercer una regulación negativa en las respuestas Th1, específicamente en IFN- $\gamma$ , así como en la regulación positiva de genes pro-inflamatorios IL-1B e IL-6, contribuyendo con la progresión de la enfermedad en el ganado infectado (Weiss y Souza, 2008).

El tiempo de seroconversión ha sido estudiado en distintas especies; Munjal y colaboradores (2005), observaron que el ganado vacuno infectado experimentalmente desarrolló inmunidad humoral de 10 a 17 meses después de la infección con MAP. En el caso de cabras adultas inoculadas experimentalmente, la respuesta humoral se presentó a los 6-9 meses post-infección (Munjal *et al.*, 2005), mientras que en corderos infectados experimentalmente los niveles de anticuerpos comenzaron a elevarse a los 80 días post infección (Juste *et al.*, 1994)

En otro estudio con cabritos de 5- 8 semanas de edad, inoculados vía oral, se pudo detectar anticuerpos contra MAP en 4/7 animales a las 15-20 semanas post inoculación, un animal seroconvirtió en la semana 35, mientras que dos animales inoculados no produjeron títulos de anticuerpos significativos durante el experimento (Storset *et al.*, 2001).

Aunque el cambio de respuesta de tipo Th1 a Th2 es el modelo comúnmente aceptado para explicar la respuesta inmunológica que induce MAP. Un análisis reciente y detallado de la cinética de las respuestas inmunes específicas Th1 y Th2 contra MAP en ovejas infectadas experimentalmente, reveló que la mayoría de los animales no mostraban el "clásico" interruptor Th1/Th2. En este estudio, Magombedze y colaboradores (2014) notaron que alrededor del 50% de los animales infectados combinaron las respuestas Th1/Th2 simultáneamente, mientras que la minoría de los animales (11%) mostraban únicamente una respuesta Th1, explicando que la generación de la respuesta Th1 es impulsada por la densidad de macrófagos infectados, mientras que la generación de la respuesta Th2 es influenciado por la longevidad de MAP en el ambiente extracelular. De hecho, el aumento en la tasa de muerte de bacterias extracelulares elimina de forma efectiva

el interruptor de Th1/Th2 por lo que ambas respuestas son capaces de persistir, siendo la respuesta de tipo Th1 la que predomina (Magombedze *et al.*, 2014).

La gran población de macrófagos infectados conduce a la generación de una respuesta Th1, sin embargo, carece de la capacidad para eliminar la infección. Dentro de estos macrófagos infectados se replican las bacterias que a su vez infectan a los macrófagos recién llegados, con lo que se establece un equilibrio cuasi. Debido a que la respuesta Th1 es incapaz de eliminar las bacterias extracelulares, éstas se acumulan con el tiempo, es entonces cuando el incremento de las bacterias libres sesga la diferenciación de las células Th0 directamente hacia el fenotipo Th2, y este proceso suprime indirectamente la generación de la respuesta Th1 que comienza a disminuir con el tiempo (Magombedze *et al.*, 2014).

### **1.1.11 Etapas de infección**

El progreso de la paratuberculosis se puede dividir en cuatro etapas: fase latente (I), fase subclínica (II), clínica (III) y fase clínica avanzada (IV). La dinámica de infección por *M. paratuberculosis* se describe como un efecto “iceberg”, significa que por cada animal que observamos en etapa clínica avanzada existen otros 15-25 animales infectados (Whitlock, 1992) y sólo del 25-30% de esos animales infectados serán detectados mediante pruebas diagnósticas (Whitlock, 2009).

#### **1.1.11.1 Fase I. Latente**

En esta fase se encuentran animales que no presentan ningún signo clínico. Está conformada principalmente por cabras menores de dos años de edad que mantienen el apetito normal y su condición corporal no se ve mermada. Generalmente no hay anticuerpos circulantes detectables ni excreción bacteriana.

#### **1.1.11.2 Fase II. Subclínica**

En esta etapa se encuentran los portadores asintomáticos, animales que empiezan a excretar MAP intermitentemente en heces, contaminando el medio ambiente y fungiendo como fuente de infección para otros animales del hato. Suelen elegirse pruebas diagnósticas que involucran la respuesta celular como la intradermorreacción y la prueba de IFN- $\gamma$ .

En cuanto a los tiempos de excreción, un meta-análisis reciente evaluó el efecto de la dosis y la edad a la exposición con MAP, demostrando que el contacto con la micobacteria a temprana edad y dosis altas de infección son los factores principales para la excreción temprana de MAP en heces (Mitchell *et al.*, 2012).

En un estudio realizado en becerros de entre 6 a 14 semanas de edad, infectados experimentalmente con dosis de entre  $1 \times 10^{10}$  a  $2 \times 10^{10}$  UFC de MAP o bien, con 15 a 20 g/dosis de tejido macerado de mucosa intestinal, se observó que éstos empezaban a eliminar la bacteria en heces desde el primer mes post inoculación, siendo en algunos casos, excretadores persistentes hasta el mes 25 post-inoculación. En este estudio se demuestra que la excreción de MAP en heces a edad temprana puede llegar a ser dependiente de la dosis infectiva (Stewart *et al.*, 2006).

La tasa de progresión de la enfermedad de un estadio a otro es muy variable. Los animales pueden permanecer en fase subclínica durante años, siendo una amplia

gama de factores los que influyen en la progresión de la enfermedad: edad a la exposición inicial con MAP, la dosis ingerida, la frecuencia de re-exposición, la susceptibilidad y/o resistencia genética, factores nutricionales y productivos. Se ha demostrado que las cabras suelen ser menos resistentes a la infección natural por MAP, comparado con el ganado vacuno y las ovejas, esto basado en infecciones experimentales (Stewart *et al.*, 2007).

#### **1.1.11.3 Fase III. Clínica**

La principal característica clínica de la paratuberculosis en todas las especies es la pérdida de peso progresiva a pesar de la ingesta normal de alimentos (McEwen, 1939).

Debido al constante flujo de células inflamatorias al sitio de infección, las lesiones intestinales se van agravando y como consecuencia se produce el engrosamiento de la pared intestinal, lo que resulta en la mala absorción de proteínas (Patterson *et al.*, 1967; Gilmour, 1976). El adelgazamiento progresivo debido a la hipoproteïnemia, generalmente viene asociado con otros signos como caquexia, deshidratación con edema submandibular, disminución en la producción láctea, deterioro del pelo o lana, así como infertilidad, cojera y mastitis (Merkal *et al.*, 1975).

A diferencia de lo que se observa en el ganado bovino, la diarrea es poco frecuente en las cabras. En los pequeños rumiantes solo un 10-20% de los casos clínicos presenta diarrea (Stehman, 1996; Stamp y Watt, 1954), siendo un sutil reblandecimiento de las heces el principal cambio observado.

En el ganado bovino la manifestación clínica suele aparecer entre los dos a los cinco años, coincidiendo con los partos y el inicio de las lactaciones, donde los animales tienen una mayor demanda productiva. En pequeños rumiantes y cérvidos los signos clínicos suelen presentarse antes que en el ganado bovino, debido a la rápida maduración sexual de estas especies y/o la mayor susceptibilidad a MAP.

En la etapa clínica la mayoría de los animales son cultivo fecal positivo y por lo general los anticuerpos circulantes son detectables por pruebas serológicas como ELISA e IDGA. Se ha reportado que cabras infectadas con paratuberculosis pueden convertirse en excretoras fecales persistentes después de un año post-infección, sin presentar ningún signo clínico de paratuberculosis (Storset *et al.*, 2001).

#### **1.1.11.4 Fase IV. Clínica Avanzada**

Si los animales no se han sacrificado por causas distintas a la paratuberculosis, progresan a la fase avanzada de la enfermedad donde los signos se manifiestan y los animales mueren por deshidratación y caquexia.

#### **1.1.12 Pruebas diagnósticas basadas en la inmunidad de MAP**

El diagnóstico temprano y específico de MAP sigue siendo todavía un reto. El completo entendimiento de los cambios inmunológicos causados por esta enfermedad, se ven obstaculizados por periodos prolongados de incubación y estadios de infección subclínica que se extienden de 2 a 10 años, además de múltiples factores que desencadenan la presentación clínica de la enfermedad.

Adicionalmente, la eliminación del agente a través de las heces es muy variable (Sockett, 1995).

Es por esto, que llevar a cabo una prueba basada en la detección de respuesta inmune de MAP puede tener diversos objetivos: saber si en algún momento el animal estuvo en contacto con la micobacteria, conocer la prevalencia y tomar medidas de control para reducir la cantidad de bacilos al medio ambiente y prevenir futuros contagios, incrementar los parámetros productivos y el bienestar animal; en el caso de países con barreras arancelarias para obtener la certificación de un hato, animal o región específica.

Las pruebas diagnósticas se valoran por su sensibilidad y su especificidad, la sensibilidad de una prueba refleja la capacidad de detectar correctamente a un animal verdadero positivo, es decir, la probabilidad de que un animal infectado obtenga en cierta prueba un resultado positivo; mientras que la especificidad se define como la probabilidad de clasificar correctamente a un verdadero negativo, es decir, la probabilidad de que un animal sano obtenga un resultado negativo.

#### **1.1.12.1 Pruebas diagnósticas para la detección de la inmunidad celular**

Las pruebas diagnósticas basadas en la detección de la respuesta celular en el hospedero pueden realizarse *in vivo* o *in vitro*.

La intradermorreacción (IDR), es una prueba *in vivo*, en la que se inocula un extracto proteico purificado (PPD) ya sea obtenido a partir de MAP, conocido como johnina o paratuberculina (Kormendy, 1988) o bien de *M. avium* conocido como tuberculina aviar. La respuesta consiste en una reacción de hipersensibilidad retardada después de 24-72 horas post-inoculación, midiendo el aumento de grosor en la piel, se realiza interpretación de los resultados.

La prueba de IFN- $\gamma$  es una técnica que se realiza *in vitro*, consiste en la cuantificación mediante un ELISA tipo sándwich de los niveles de IFN- $\gamma$  producidos por células mononucleares periféricas en respuesta a la sensibilización de linfocitos con un antígeno específico. La sensibilidad de este ensayo ha sido estimada entre 13% y 85% con una especificidad entre 88% y 94% (Nielsen y Toft, 2008); sin embargo, se recomienda utilizarla en animales mayores de 15 meses de edad para evitar un resultado falso positivo causado por la producción innata de IFN- $\gamma$  por parte de las células asesinas naturales (NK, por sus siglas en inglés).

La IDR ha sido reemplazada por pruebas *in vitro* en estudios donde se desea conocer la inmunidad celular que despierta MAP.

#### **1.1.12.2 Pruebas diagnósticas para la detección de la inmunidad humoral**

Estas pruebas consisten en detectar la respuesta inmune por parte de los anticuerpos del hospedero ante la infección, siendo la inmunodifusión en gel de agar (IDGA) y el ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA, del inglés “*Enzyme-linked Immunosorbent Assay*”), las pruebas comúnmente utilizadas (Ayele *et al*, 2001).

Algunas investigaciones señalan un aumento en la sensibilidad de estos en ensayos en animales con lesiones lepromatosas/multibacilares (Shulaw *et al.*, 1993; Clarke *et*

*al.*, 1996; Tripathi *et al.*, 2006), animales que se encuentran clínicamente afectados o en estadios avanzados (Munjaj *et al.*, 2004; Manning y Collins, 2001), o en animales que se encuentren excretando grandes cantidades de MAP, principalmente en heces, pues se ha demostrado que existe una correlación positiva entre la respuesta inmune humoral y la excreción micobacteriana (García Marín *et al.*, 1992; Tripathi *et al.*, 2006).

La serología resulta útil como método de vigilancia para establecer el estado de la enfermedad dentro de un hato, la identificación presuntiva de animales infectados, para calcular las prevalencias de la infección o confirmar el diagnóstico en animales con signos clínicos sugerentes a paratuberculosis (Manning y Collins, 2001).

#### **1.1.12.2.1 Inmunodifusión en gel de agar**

Esta prueba consiste en enfrentar un suero problema con un antígeno, de manera que si en el suero existen anticuerpos específicos contra MAP, el complejo antígeno-anticuerpo producirá una precipitación que será visible en un gel de agarosa. El antígeno comúnmente utilizado es la proteína protoplasmática o PPA-3 de la cepa 18 de *M. avium* (St18), que fue inicialmente identificada como MAP (Chiodini, 1993). Entre las ventajas, la IDGA es un método barato, rápido y técnicamente simple.

De manera general, esta prueba no posee gran sensibilidad y los valores suelen variar conforme a las especies. Sin embargo, diversos autores reportan que la IDGA es considerablemente más sensible en cabras que presentan lesiones multibacilares comparado con las que tienen lesiones paubacilares (Gumber *et al.*, 2006; Tripathi *et al.*, 2006), esto también ha sido reportado para la especie ovina (Clarke, 1995; Shulaw *et al.*, 1993; Pérez *et al.*, 1999).

En dos investigaciones diferentes para detectar la paratuberculosis mediante IDGA en cabras, la primera reportó una sensibilidad global de 13.8%, mientras que la especificidad fue de 39.5% (Gumber *et al.*, 2006); la segunda obtuvo una sensibilidad de 8.3% y una especificidad de 99.5% (Robbe *et al.*, 2006).

En la especie bovina los valores de sensibilidad se sitúan entre un 18.9% y especificidad de 57% (Sherman *et al.*, 1984; Sockett *et al.*, 1992; Gumber *et al.*, 2006).

A pesar de que la IDGA es una prueba con menor sensibilidad que el ELISA (Gumber *et al.*, 2006; Robbe *et al.*, 2006; Whittington *et al.*, 2003), tiene la ventaja de ser una prueba altamente específica, obteniendo valores cercanos al 100% (Garrido *et al.*, 2000; Ayele *et al.*, 2001; Nielsen *et al.*, 2001) por lo que se recomienda como prueba confirmatoria en casos de paratuberculosis clínica (Ferreira *et al.*, 2002).

#### **1.1.12.2.2 Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas**

Una de las pruebas más utilizadas para detectar la respuesta inmune humoral es el ELISA, el cual detecta anticuerpos específicos presentes en el suero o la leche, que al unirse a los antígenos fijados en la placa de ELISA forman un complejo Ag-Ac, que a su vez, es detectado por un segundo anticuerpo que reconoce dominios constantes de anticuerpos y suele ser específico de especie, esto permite que un mismo anticuerpo marcado sea capaz de detectar a los anticuerpos unidos al

antígeno. Esta reacción enzimática es fácilmente revelada mediante la adición de un sustrato específico que al actuar la enzima, producirá un color observable a simple vista o cuantificable mediante el uso de un espectrofotómetro o un colorímetro.

La plataforma de esta prueba proporciona a los productores una forma rentable y rápida para establecer la seroprevalencia de MAP en un rebaño, pues su reproductibilidad permite procesar un gran número de muestras simultáneamente, permitiendo diagnosticar hatos completos (Collins, 1996). Además, los puntos de corte pueden ser modificados en función de los objetivos del estudio y la prevalencia de la enfermedad (Sockett *et al.*, 1992).

Uno de los componentes cruciales de esta prueba es el antígeno utilizado para su preparación, ya que de ello dependerá la sensibilidad y especificidad (Mon *et al.*, 2012). En general, la sensibilidad del ELISA para la detección de anticuerpos contra MAP es baja (~5-30%), esta sensibilidad se incrementa con la edad del animal (Nielsen y Toft, 2006), mientras que la estimación de la especificidad es generalmente arriba del 95% para ELISAs comerciales.

Actualmente, los antígenos utilizados para las pruebas serológicas de MAP se basan en conjuntos de proteínas que incluyen extractos de células completas, paquetes de antígeno purificados, lipoarabinomano (LAM) y antígenos protoplasmáticos (Mon *et al.*, 2012). La mayoría de estos extractos celulares (CE) son obtenidos mediante disrupción física o mecánica a partir de cultivos que generalmente se encuentran en la fase estacionaria del crecimiento bacteriano, esto con la finalidad de obtener un mayor rendimiento de extracción del antígeno (Braun *et al.*, 1990; Cox *et al.*, 1991).

A su vez, estos extractos crudos comparten una amplia gama de componentes antigénicos con especies de micobacterias y otros microorganismos estrechamente relacionados como *Corynebacterium* spp., *Nocardia* spp. y *Rhodococcus* spp. (Cocito *et al.*, 1994), lo que conlleva a reacciones cruzadas entre los anticuerpos inespecíficos de bacterias taxonómicamente relacionadas y los de MAP. Esta problemática, logró mejorarse introduciendo un paso previo a la unión Ag- Ac en el ELISA, que consiste en la preadsorción de los sueros con *Mycobacterium phlei* para eliminar algunos anticuerpos inespecíficos y de esta manera disminuir resultados falsos positivos (Milner *et al.*, 1987; Yokomizo *et al.*, 1985).

Actualmente existen en el mercado pruebas comerciales como HerdChek® *M. paratuberculosis* ELISA (IDEXX Laboratories, Inc., Westbrook, ME) y ParaChek® (Prionics AG, Zurich, Switzerland). Un estudio comparativo con ambos kits hecho por Manning y colaboradores (2007) demostró una elevada inespecificidad en el ELISA con rebaños libres de MAP pero con una alta prevalencia de LC, utilizando un primer ELISA (Herdchek®) se obtuvo un 25% de falsos positivos a MAP, mientras que en el segundo ELISA (Parachek®), no se vio afectada la especificidad por la presencia de LC (Manning *et al.*, 2007).

En otro estudio, las reacciones cruzadas también fueron evidentes con el kit Herdchek® al obtener un 14.3% de falsos positivos por la presencia de anticuerpos contra *C. pseudotuberculosis* (Krt *et al.*, 2002).

Otra prueba comercial disponible para la detección de paratuberculosis es el ELISA IDEXX (Instituto Pourquier®, Montpellier, France).

Un estudio con este kit fue evaluado en dos especies (cabras y borregos >6 meses) y obtuvo sensibilidad del 34.9% y especificidad del 98.8% en sueros de borregos; en sueros de cabras se encontró sensibilidad del 56.4% y la especificidad fue del 100.0% (Gumber *et al.*, 2006). Con el mismo kit trabajando con sueros de bovinos se obtuvieron valores de sensibilidad del 27.9% y de especificidad del 100% (Collins *et al.*, 2005).

También se ha evaluado la detección de anticuerpos contra MAP en leche de vaca, obteniendo una especificidad del 99.8% en nuestras individuales y del 100% en muestras de leche a granel (Van Weering *et al.*, 2007). Todas estas investigaciones nos muestran que aunque la sensibilidad del ELISA IDEXX (Instituto Pourquier®) difieren conforme al autor, la especificidad se mantiene constante, fluctuando entre 98.8-100%.

Asimismo, existen otras investigaciones que tratan de la carencia de interferencia debido a las similitudes antigénicas con especies estrechamente relacionadas con MAP. Por ejemplo, en un modelo de infección experimental con cabras inoculadas con *C. pseudotuberculosis*, se observó que la presencia de LC en los animales libres de tuberculosis no daba lugar a resultados falsos positivos en las pruebas convencionales para la detección de tuberculosis (prueba cervical simple y comparativa) ni en la prueba para la detección de IFN- $\gamma$  (Bezós *et al.*, 2015). Esta falta de reactividad concuerda con un estudio similar en cabras infectadas naturalmente con LC y sometidas a intradermorreacción con la tuberculina (Acosta *et al.*, 1995).

Diversos estudios se han realizado con la finalidad de encontrar antígenos con potencial diagnóstico. Investigadores compararon los perfiles de expresión de proteínas y la antigenicidad de filtrados de cultivo (CF) y extractos celulares (CE) de MAP, reportando que los anticuerpos en el suero de ganado naturalmente infectado con paratuberculosis reaccionan con más fuerza y a mayor cantidad de proteínas que se encontraban en CF en comparación con los CE (Cho y Collins, 2008). La explicación para esta diferencia antigénica es la accesibilidad, las proteínas a partir de CF se encuentran más disponibles para la interacción con las células presentadoras de antígeno y los linfocitos T y B, mientras que las proteínas de CE, exceptuando las que se encuentran en la superficie celular micobacteriana ven limitadas su accesibilidad, esto podría explicar la falta de sensibilidad de las ELISAs comerciales.

Las proteínas de secreción temprana de MAP han sido reconocidas como antígenos importantes para el diagnóstico de la paratuberculosis bovina (Cho y Collins, 2008). Shin y colaboradores (2008) profundizaron en el estudio anterior y encontraron que los antígenos inmunodominantes específicos de MAP se expresan en mayor grado entre la fase exponencial temprana y media de los cultivos (Shin *et al.*, 2008); y es que aunque la concentración absoluta de los antígenos CF y CE sea la misma, sólo una pequeña proporción de la proteína total a partir de cultivos en fase estacionaria es rescatada. Observaciones similares han sido reportadas para *M. tuberculosis* (Imaz y Zerbini, 2000; Lodam *et al.*, 1996). De tal modo que utilizaron antígenos a partir de CF que se encontraban incubando entre el principio y la mitad de la fase *log*

y elaboraron una ELISA llamada JTC-ELISA; posteriormente lo compararon con cinco ELISAs comerciales y los resultados de este nuevo ensayo fueron un aumento considerable de la sensibilidad (JTC-ELISA obtuvo 40%, la de los kit comerciales fue del 20%); además, era particularmente sensible a la detección de animales que excretaban MAP en heces en bajas cantidades. La especificidad de esta prueba fue semejante a las reportadas por los ELISAs comerciales utilizados en el estudio (Shin *et al.*, 2008).

## **1.2 LINFADENITS CASEOSA (LC).**

### **1.2.1 Importancia de la linfadenitis caseosa**

La linfadenitis caseosa es una enfermedad infecto-contagiosa de curso crónico que afecta principalmente a cabras y borregos, se caracteriza por la formación de abscesos supurativos/piogranulomatosos en piel o tejido subcutáneo, linfonodos externos e internos y órganos internos. Esta enfermedad también recibe otros nombres como “pseudotuberculosis”, “apostema de los ovinos”, “enfermedad de Preisz-Nocard” y “lobanillos” (Estevao *et al.*, 2006).

La LC toma importancia por ser una enfermedad endémica en México, la falta de estudios en nuestro país al no ser considerada una enfermedad de reporte obligatorio, dificulta el conocimiento de la verdadera prevalencia en rebaños caprinos y el impacto económico que genera la presencia de la enfermedad debido a la disminución en el rendimiento de la canal, el decomiso, la disminución en la producción de lana y la depreciación de la piel, la baja eficiencia reproductiva y en los casos más severos, la mortalidad de los animales (Dorella *et al.*, 2006).

### **1.2.2 Etiología de la linfadenitis caseosa**

El agente etiológico de la LC es *Corynebacterium pseudotuberculosis*, una bacteria intracelular facultativa, anaerobia facultativa, Gram positiva, que exhibe formas pleomórficas que se caracterizan por conformarse en agrupaciones con forma de “empalizada” o “letras chinas” al frotis.

El crecimiento en agar sangre después de 24-48 horas de incubación a 37°C produce colonias de *C. pseudotuberculosis* planas y opacas de color crema que son rodeadas por una estrecha zona de  $\beta$ -hemólisis (Sá *et al.*, 2010).

Bioquímicamente *C. pseudotuberculosis* es catalasa y ureasa positivo, capaz de fermentar glucosa, galactosa, maltosa y manosa. Se han identificado dos biovariedades basadas en la capacidad de producir la enzima nitrato reductasa, que logra metabolizar el nitrato en nitrito (Estevao *et al.*, 2006). Los aislados reductores de nitrato (nitrato-positivos) han sido obtenidos de caballos y bovinos, mientras que los aislados que no reducen el metabolito (nitrato-negativo) provenían de ovinos, cabras y bovinos (Sutherland *et al.*, 1971). Posteriormente, la caracterización bioquímica comparativa y los análisis de restricción del ADN cromosómico de *C.*

*pseudotuberculosis* demostraron que la variación en la capacidad para reducir nitratos coincidía con diferentes patrones de restricción y los términos “biovariedad equi” para organismos nitratos positivos y “biovariedad ovis” para los nitrato negativos fueron propuestos (Songer *et al.*, 1988).

Sin embargo se ha reportado que aislados de cabras y borregos pueden metabolizar el nitrato a nitrito, por lo que se han desarrollado otras pruebas de tipo moleculares en que se busca encontrar mayores diferencias genéticas entre sí (Soares *et al.*, 2013, Retamal *et al.*, 2011).

### **1.2.3 Transmisión**

*C. pseudotuberculosis* penetra en el cuerpo de un animal principalmente a través de heridas en la piel o de las mucosas (oral, nasal y ocular), por ingestión, inhalación o por contacto con equipo que es utilizado en el aretado, el tatuado, la castración y la esquila en el caso de los borregos, además de las instalaciones, los pastos y los abrevaderos contaminados.

El contacto directo con un absceso fistulizado también pueden propagar la bacteria entre animales congregados.

Después de penetrar en el hospedero, la corinebacteria se difunde vía sanguínea o dentro de los macrófagos a través del sistema linfático aferente hacia los ganglios linfáticos locales y los órganos internos (de Sá *et al.*, 2010). Una vez infectado un animal se considera que es portador de por vida. El período de incubación puede variar de 2 a 6 meses.

La infección por *C. pseudotuberculosis* es considerada una zoonosis de baja prevalencia que se presenta como linfadenitis localizada, siendo considerada una enfermedad de tipo ocupacional y no comunicable, por lo que su potencial zoonótico está en duda (Esteveao *et al.*, 2009).

### **1.2.4 Patogenia**

La forma más frecuente de la enfermedad es la linfadenitis caseosa cutánea que se caracteriza por la formación de abscesos supurativos y necrotizantes en el tejido subcutáneo y linfonodos superficiales, especialmente el retrofaríngeo, mandibular, parótideo, preescapular, prefemoral, y los linfonodos poplíteos; la segunda presentación, la forma visceral, puede presentarse de manera complementaria con la primera forma y se caracteriza por la formación de focos caseosos en órganos internos como pulmones, riñones, hígado y bazo, donde la enfermedad evoluciona a estados caquécicos de curso crónico (Merchant y Packer 1967; Piontkowski y Shivers, 1998).

### **1.2.5 Fosfolipasa D**

Una de las características más importantes de *C. pseudotuberculosis* es la producción de su fosfolipasa D (PLD), una potente exotoxina considerada el principal factor de virulencia de la bacteria (Hodgson *et al.*, 1992; Lipsky *et al.*, 1982).

Biológicamente, la PLD funciona como un factor de permeabilidad, promoviendo la hidrólisis de los enlaces éster de esfingomielina en las membranas celulares de

mamíferos y fomentando la difusión del bacilo desde el sitio inicial de la infección a todos los tejidos del hospedador. Además, esta exotoxina tiene la capacidad de provocar dermonecrosis, contribuyendo el paso de *C. pseudotuberculosis* de la dermis hacia pequeños vasos sanguíneos, favoreciendo el drenaje linfático hacia otros tejidos (Jolly, 1965; Carne y Onon, 1978; Batey, 1986). Además, la PLD es considerada una exotoxina citotóxica para las células blancas de la sangre, ya que promueve la destrucción de los macrófagos de cabra durante la infección experimental (Tashjian y Campbell, 1983). En dosis altas es letal para diferentes especies animales domésticos y de laboratorio (Tashjian y Campbell, 1983; Shigidi, 1979).

La fosfolipasa D tiene la propiedad de inhibir la hemólisis de la  $\beta$ -lisina, una esfingomielinasa presente en *Staphylococcus aureus* debido a la ocupación competitiva del sitio de reconocimiento sobre la membrana de los eritrocitos.

Por otra parte, la exotoxina presente en *Rhodococcus equi*, la fosfolipasa C, produce una hemólisis sinérgica en presencia de la fosfolipasa D, generado por la desorganización de las membranas celulares debido a la acción de ambas exotoxinas, lo que resulta en la degradación de la esfingomielina a ceramidas y en consecuencia la lisis celular (Jolly, 1965). Esta propiedad de la PLD ha sido utilizada como base para el diagnóstico de pruebas como CAMP con hemólisis sinérgica con *R. equi* y CAMP- inversa que es la Inhibición de la beta- hemolisina.

### 1.2.6 Diagnóstico

Actualmente el diagnóstico de la LC en pequeños rumiantes se basa principalmente en la observación clínica (abscesos externos), el aislamiento y la identificación de *C. pseudotuberculosis* por cultivo microbiológico y pruebas bioquímicas que siguen siendo los métodos más fiables de diagnóstico (Peel *et al.*, 1997), los cuales permiten diferenciar a la corinebacteria de otros microorganismos patógenos que también inducen abscesos como *Arcanobacterium pyogenes*, *Staphylococcus aureus* subsp. *anaerobius*, *Actinobacillus licheniformis* y *Pasteurella multocida* (Dercksen *et al.*, 2000; Williamson, 2001; Pekelder, 2000).

Aunque el aislamiento de *C. pseudotuberculosis* es la prueba de oro para el diagnóstico de esta enfermedad, tiene el inconveniente de que si la punción y/o el desbride del absceso no se realiza con suficiente precaución, el material purulento puede quedar expuesto al ambiente, siendo un foco de infección y diseminación de la enfermedad. Con la finalidad de mejorar el diagnóstico y evitar estos inconvenientes, se han desarrollado pruebas inmunodiagnósticas menos invasivas como la prueba de hemaglutinación indirecta, IDGA, FC, prueba de la inhibición sinérgica de la hemólisis, ensayo de microaglutinación y el ELISA.

Las técnicas moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) han ido evolucionando hasta convertirse en herramientas rápidas y específicas para la detección de *C. pseudotuberculosis*, para ello se han empleado distintos genes para su identificación, como el *16S rRNA*, éste es el gen de elección para la mayoría de

los estudios de taxonomía microbiana (Cetinkaya *et al.*, 2002; Khamis *et al.*, 2005), *rpoB*, el gen que codifica la subunidad  $\beta$  de la ARN polimerasa bacteriana y que es utilizado actualmente para estudiar las relaciones filogenéticas de los géneros *Corynebacterium* y *Mycobacterium* (Khamis *et al.*, 2004, Khamis *et al.*, 2005) y el gen *pld*, que codifica la exotoxina fosfolipasa D que está implicada en la virulencia de *C. pseudotuberculosis*, *C. ulcerans* y *Arcanobacterium haemolyticum* (McNamara *et al.*, 1995).

Actualmente se han diseñado con éxito oligos para discernir la *pld* producida por *C. pseudotuberculosis* de otros géneros que producen exotoxinas similares, esto se ha logrado teniendo un desajuste en el extremo final 3' cambiando dos guaninas en lugar de dos citocinas, resultando en una PCR con alta sensibilidad (94.6%) y una elevada especificidad (Pacheco *et al.*, 2007), por lo esta técnica se considera la mejor herramienta para la identificación del agente (Muñoz *et al.*, 2016).

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo General

- Evaluar en qué proporción se ve comprometida la especificidad del ELISA e IDGA en el diagnóstico de *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* debido a las reacciones cruzadas con los anticuerpos producidos por *C. pseudotuberculosis* en cabras.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Tomar muestras de cabras a partir de lesiones sugerentes a linfadenitis caseosa y con signos de paratuberculosis en siete entidades federativas de la República Mexicana.
- Realizar pruebas bacteriológicas, bioquímicas, serológicas y moleculares para la identificación de *C. pseudotuberculosis*.
- Determinar la sensibilidad y la especificidad de ELISA en la detección de anticuerpos contra MAP comparando con los resultados de la PCR anidada IS900 de MAP.
- Determinar la sensibilidad de la prueba de IDGA en la detección de anticuerpos contra MAP comparando con los resultados de la PCR anidada IS900 de MAP.
- Comparar entre ellas la sensibilidad y la especificidad de las pruebas de PCR IS900, ELISA e IDGA.

## 3. HIPÓTESIS

- Los anticuerpos producidos en respuesta a la infección por linfadenitis caseosa en cabras causan resultados falsos-positivos en las pruebas serológicas de *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis*.

## 4. MATERIAL Y MÉTODOS

### 4.1 Origen y características de las muestras

El estudio se llevó a cabo con muestras de 103 cabras adultas (>2 años) de siete entidades federativas:

Estado	Municipios	Número de cabras muestreadas
Tlaxcala	Huamantla Ixtenco Alzayanca	45
Jalisco	Tepatitlán de Morelos	18
Puebla	Oriental Libres Tepeyahualco	14
Ciudad de México	Tlalpan	12
Guanajuato	Irapuato Abasolo Valle de Santiago	10
Zacatecas	Villa de Cos	2
Morelos	Huitzilac	2

#### 4.1.1 Descripción del origen de las muestras

Se realizó un muestreo por conveniencia, los hatos caprinos de interés fueron aquellos que presentaban LC y paratuberculosis, así como un rebaño libre de ambas enfermedades; el criterio para considerar hato libre, se basó en la historia clínica y confirmar que no existieran antecedentes de LC ni paratuberculosis desde hace más de cinco años.

El estudio contempló un total de 103 cabras; se obtuvieron muestras de sangre y heces de cada animal; además, se recolectó exudado caseoso por punción de abscesos cutáneos en 60 cabras, 13 cabras presentaban abscesos fistulizados sugerentes a la infección por *C. pseudotuberculosis* y 30 cabras provenían de hatos libres de LC y paratuberculosis.

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

Por medio de venopunción yugular se colectó sangre para la obtención de suero de todos los caprinos (n=103). Los tubos Vacutainer® utilizados fueron mantenidos a 4°C hasta la completa formación del coagulo y el suero se vertió asépticamente en tubos de 1.5 ml para ser conservado a -20°C hasta el momento de utilizarlos.

De las cabras que presentaban abscesos en linfonodos sugerentes a linfadenitis caseosa (n=60), se recolectó el exudado purulento previa asepsia de la piel con Clorhexidina al 2% y/o yodo al 10%; en el caso de los abscesos inmaduros o profundos, se hizo una aspiración con aguja. Las muestras se mandaron en medio de transporte BBL Culture Swab® cuidando la cadena fría.

Las muestras de heces de las 103 cabras se obtuvieron directamente del recto, utilizando bolsas de plástico previamente lubricadas con agua, se tomaron aproximadamente 5 g de heces de cada animal.

## **4.2 Pruebas para el diagnóstico de *Corynebacterium pseudotuberculosis*.**

### **4.2.1 Aislamiento bacteriológico**

El aislamiento bacteriológico de *C. pseudotuberculosis* se realizó partir de las muestras de pus recolectada de los abscesos. Los hisopos fueron sembrados en agar sangre e incubados en aerobiosis a 37 °C durante 24-48 h.

La caracterización de las colonias se realizó de acuerdo a la morfología colonial, presencia de hemólisis y con la técnica de Gram.

### **4.2.2 Pruebas bioquímicas**

De cada aislamiento identificado como bacilos Gram+, con una organización en las colonias en “letras chinas”, se realizaron pruebas bioquímicas como glucosa, sucrosa, reducción de nitratos, urea y catalasa.

También se utilizó la prueba de hemólisis sinérgica frente a *R. equi* (prueba de CAMP), teniendo como control positivo a *C. pseudotuberculosis* ATCC 43924.

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

En cuanto a la identificación molecular, se llevó a cabo la PCR convencional a partir de colonias puras de *C. pseudotuberculosis* para identificar el gen *pld* utilizando los siguientes iniciadores: PLD-F (5´-ataagcgtaagcagggagca-3´) y PLD-R2 (5´-tcagcggg-gattgtcttcca-3´) diseñados por Pacheco y colaboradores, donde se obtiene un producto de amplificación de 203 pb (Pacheco *et al.*, 2007).

Cada reacción se llevó a cabo en un volumen final de 50 µL que contenía 0.2 µL (1 U) de DreamTaq DNA Polimerasa, 5 µL de Buffer 10X (que incluyó 20-mM MgCl<sub>2</sub>), 0.5 µL dNTPs (400-µM), 1 µL de cada primer (0.2 µM) y 30 ng de ADN.

Como control positivo se utilizó el ADN de la cepa de referencia ATCC 43924 de *C. pseudotuberculosis*, en cada corrida de PCR se incluyó un testigo negativo el cual incluía todos los componentes de la reacción a excepción de ADN.

El programa utilizado consistió en una desnaturalización inicial de 94°C por 5 min, 35 ciclos de 94°C por 30s, 55°C por 30s y 72°C por 35s; y una extensión final de 72°C por 5 min.

El producto de la PCR se visualizó en geles de agarosa al 2% teñidos con bromuro de etidio.

#### **4.2.4 ELISA**

Se implementó un ELISA indirecto para la detección de anticuerpos contra *C.pseudotuberculosis* basado parcialmente en el trabajo de Nassar y colaboradores (2014). La finalidad de elaborar este ensayo se centró en confirmar que el hato considerado libre, no presentara anticuerpos contra *C.pseudotuberculosis*, debido a la presentación visceral de esta enfermedad, además, corroborar la presencia de anticuerpos circulantes en las cabras que manifestaban abscesos fistulizados sugerentes a LC.

Para el desarrollo de esta prueba, se utilizaron 60 sueros de cabras positivas al aislamiento de *C.pseudotuberculosis* y confirmados por PCR (control positivo), y 30 sueros provenientes de un sólo hato considerado negativo a ambas enfermedades (paratuberculosis y LC) ubicado en el municipio de Alzayanca, Tlaxcala (el criterio de libre de enfermedad fue basado en la historia clínica de hato libre desde hace más de cinco años).

##### **4.2.4.1 Obtención del antígeno**

Se llevó a cabo la obtención del antígeno creciendo la cepa de referencia ATCC 43924 de *C. pseudotuberculosis* en caldo BHI durante 48 hrs/37°C en agitación a 120 rpm. Se centrifugó el cultivo a 3000 rpm y el sedimento fue lavado con 10 ml de PBS (pH 7.2) tres veces. El paquete celular fue resuspendido en 2 ml del mismo buffer. La disrupción celular se llevó a cabo por sonicación (Ultra Soni Procesor) durante 20 ciclos de 59" cada uno, el material obtenido se centrifugó a 900 xg durante 10 min y el sobrenadante se guardó en microtubos a -20 °C.

##### **4.2.4.2 Cuantificación de proteína**

La cantidad de proteínas en el sobrenadante se estimó mediante el ensayo colorimétrico BCA Protein Assay (Bio-Rad®), el cual involucra la adición del colorante azul brillante de Coomassie que al unirse con ácidos aromáticos esenciales, especialmente arginina y reaccionar con las proteínas del sobrenadante, resulta en el cambio de coloración de la solución que se mide en un espectrofotómetro a una absorbancia de 595 nm.

Para determinar la concentración de proteínas totales del sobrenadante analizado, los resultados de absorbancia se interpolaron a una curva de calibración tomando como referencia una proteína cuya concentración es conocida, la albúmina sérica bovina (BSA) y se trabajaron a diferentes concentraciones de la siguiente manera:

1. Se prepararon por duplicado 5 diluciones de la proteína estándar (BSA) a las concentraciones de 2, 4, 6, 8 y 10 µg para tener un volumen final de 800 µL que se fue completado con agua estéril.
2. También por duplicado se colocaron 20 µL del extracto no purificado de *C. pseudotuberculosis* y se adicionaron 780 µL de agua estéril. Se incorporó a la

curva un "blanco" (sólo agua estéril). \*Las muestras trabajaron siempre en hielo para evitar la degradación por acción de las proteasas.

3. Se colocaron 200  $\mu$ L del reactivo de Bradford® a cada muestra incluyendo el blanco.
4. Incubó a temperatura ambiente (TA) por 10 minutos.
5. Se midió la absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro.
6. Con los valores obtenidos se construyó la curva de calibración, y despejando la ecuación de la gráfica, se calculó la concentración de proteína en el sobrenadante.

#### **4.2.4.3 Desarrollo del ELISA indirecto para la detección de anticuerpos contra *C. pseudotuberculosis*.**

La placa de microtitulación de poliestireno fondo plano (NUNC®) fue sensibilizada con 100  $\mu$ l de antígeno crudo a una concentración de 4  $\mu$ g /ml diluido en solución amortiguadora bicarbonato-carbonato .1M pH 9.6 y se incubaron a 4°C por 18 horas envueltas en papel aluminio. Al siguiente día el líquido se desechó y se realizaron tres lavados con 200  $\mu$ l de PBS- Tween (PBS-T) (pH 7.4).

A cada pozo se le añadió 100  $\mu$ l de albúmina sérica bovina (BSA) al 1% diluida en agua estéril y se incubó por 1 hora para bloquear los sitios libres de proteínas en el fondo de la placa.

Se trabajó con los sueros atemperados diluidos a una concentración 1:200 en una solución amortiguadora de fosfatos con 0.01% Tween 20 y 1% de leche descremada (Svelty®).

Posteriormente se tomaron 100  $\mu$ L de los sueros diluidos en este buffer y se dispensaron en cada pozo, se incubaron a 37°C durante 1 hora. Se descartó el líquido y se realizaron 3 lavados con 200  $\mu$ L de PBS-T.

Cada suero fue probado por duplicado, incluyendo por cada placa un control positivo y uno negativo.

Se utilizó un conjugado anti-IgG caprino marcado con peroxidasa de rábano (HRP) a una dilución de 1:400 con PBS (pH 7.2) y se dispensaron 100  $\mu$ L en cada pozo, incubándose por una hora a 37°C. El líquido fue desechado y se realizaron tres lavados con 200  $\mu$ L de PBS-T.

A cada pozo se agregaron 100  $\mu$ L de solución de sustrato 2-2' azino-di-(3-etil-benzothiazol-sulfona-6)-(diamonio) (ABTS) (AMRESCO®) y se mantuvieron en oscuridad y agitación por 20 minutos a TA. La lectura se realizó a 490 nm en un espectrofotómetro.

Para elaborar el análisis de resultados, los datos expresados en densidades ópticas obtenidos por el cálculo de la media ( $\bar{x}$ ) de cada muestra se basaron en la siguiente fórmula:

#### Cálculo de la media de CP, CN y SP

$$CP\bar{x} = \frac{CP1 A490 + CP2 A490}{2}$$

$$CN\bar{x} = \frac{CN1 A490 + CN2 A490}{2}$$

$$SP\bar{x} = \frac{SP1 A490 + SP2 A490}{2}$$

CP $\bar{x}$ = Promedio Control Positivo (CP)

CN $\bar{x}$ = Promedio Control Negativo (CN)

SP $\bar{x}$ = Promedio Suero Problema (SP)

#### 4.2.4.4 Determinación del punto de corte, la sensibilidad y la especificidad del ELISA estandarizado.

El punto de corte se estableció por Intervalos de Confianza al 95% y dos desviaciones estándar utilizando la siguiente fórmula:  $M = x \pm Z (0.5 - 0.05/2) (\delta/\sqrt{n})$ , donde: n (población), M (media),  $\delta$  (desviación estándar).

Con el software STATA 9.0® se calcularon los valores de la Curva ROC, la sensibilidad y especificidad de la prueba.

### 4.3 Pruebas para el diagnóstico de *M. avium* subsp. *paratuberculosis*.

#### 4.3.1 Inmunodifusión en gel de agar

Los sueros problema se evaluaron por duplicado, utilizando el antígeno protoplásmico PPA-3 (Allied Monitor, Inc®) a una concentración de 4mg/ml, y como control un suero testigo positivo (Allied Monitor, Inc®). El gel de agarosa se preparó al 1% en Buffer de fosfatos, colocando 30 uL de suero por pozo y 30 uL de antígeno en el pozo central de cada roseta. Se incubó a TA en cámara húmeda y las lecturas de la prueba se realizaron a las 24 y 48 horas.

#### 4.3.2 ELISA

El kit comercial ELISA Pourquier® Paratuberculosis Screening, se trabajó de acuerdo con las instrucciones del fabricante, excepto que todos los controles y muestras se realizaron de manera duplicada.

La microplaca de ELISA recubierta con antígeno protoplásmico de *M. paratuberculosis* fue atemperada. Con el fin de minimizar las reacciones cruzadas, las muestras junto con el control positivo y negativo se diluyeron 1:20 en un tampón que contiene *M. phlei* y se colocaron en agitación durante 1 hora a TA.

Con las muestras y controles diluidos se dispensaron 100 uL en la microplaca y se incubaron por 45 minutos ( $\pm 5$  min) a TA, posteriormente el líquido se descartó y se lavaron las placas tres veces con solución amortiguadora.

Posteriormente, un conjugado monoclonal anti-IgG de rumiante marcado con peroxidasa (incluido en el kit), se añadió a cada pocillo y se incubó durante 30 min. ( $\pm 3$  min.) a TA. Las placas se lavaron y se añadió el cromógeno tetra-metil-benzidina

(TMB), se incubó 10 min ( $\pm 3$  min) a TA protegida de la luz. La reacción se paró con 100  $\mu$ l de solución de frenado, se homogenizó el contenido de los pocillos y se realizó la lectura a 450 nm en un espectrofotómetro.

Para elaborar el análisis de datos, se utilizaron dos fórmulas: la primera para calcular la media de OD de las muestras, posteriormente, se aplicó la segunda fórmula para obtener el resultado expresado en porcentaje:

Cálculo de la media de $CP\bar{x}$ , $CN\bar{x}$ y $SP\bar{x}$	Cálculo del porcentaje (P%) de las muestras analizadas (M)
$CP\bar{x} = \frac{CP1 A450 + CP2 A450}{2}$ $CN\bar{x} = \frac{CN1 A450 + CN2 A450}{2}$ $SP\bar{x} = \frac{SP1 A450 + SP2 A450}{2}$	$M/P\% = 100 \frac{(Muestra A450 - CN\bar{x}A450)}{(CP\bar{x} A450 - CN\bar{x} A450)}$

$CP\bar{x}$ = Promedio Control Positivo (CP)

$CN\bar{x}$ = Promedio Control Negativo (CN)

$SP\bar{x}$ = Promedio Suero Problema (SP)

La reacción fue considerada válida si la media del control positivo ( $CP\bar{x}$ ) tenía un valor mínimo medio de 0.350 OD a la lectura en 450 nm y si el coeficiente entre la media del control positivo ( $CP\bar{x}$ ) y el control negativo ( $CN\bar{x}$ ) es igual o superior a 3.00.

#### 4.3.3 PCR anidada (nPCR) para la detección de la IS900 de *M. avium* subsp. *paratuberculosis*

Para el diagnóstico molecular, se utilizó una nPCR para la identificación de la secuencia de Inserción IS900 de MAP utilizando ADN obtenido a partir de las muestras de material fecal.

##### 4.3.3.1 Obtención de ADN a partir de heces

Para la obtención de células se utilizó la técnica descrita anteriormente por Garrido y colaboradores (2000). Dos gramos de heces de cada muestra se maceraron y disolvieron en 45 ml. de un detergente de amonio cuaternario, el cloruro de N-cetylpiridinio (HCP) al 7.6%.

Las muestras se descontaminaron durante toda la noche a TA en posición vertical. Al día siguiente, con una pipeta de transferencia estéril se toman 20 ml. de la solución procurando obtener un poco del material de la interfase, se centrifugó durante 2500 rpm/10 min. A la pastilla obtenida se le realizaron tres lavados con 10 ml. de PBS, se resuspendió en 1.5 ml de PBS y se transfirió a un criotubo donde se centrifugó por cinco minutos a 14,000 rpm para después eliminar el sobrenadante.

Posteriormente, el paquete celular se resuspendió en 500 µL de TE-triton 100x; con la finalidad de romper a las micobacterias, el criotubo se sumergió en nitrógeno líquido durante 5 minutos y enseguida se colocó en calor seco a 100°C, este paso se repitió 3 veces.

#### **4.3.3.2 Lisis celular y extracción de ADN**

Una vez rota la micobacteria se realizó la extracción de ADN agregando 450 µL de isotiocianato de guanidina (5M) y 250 µL de acetato de amonio (7.5 M), se mezcló por inversión y se colocaron en hielo durante 15 min. Las muestras se transfirieron a microtubos y se les adicionó 500 µL de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1) para después centrifugar durante 5 min a 14 000 rpm, el sobrenadante se transfirió a otro tubo microtubo y se repitió una vez más la adición de cloroformo- alcohol y el centrifugado.

A la fase acuosa obtenida se le agregaron 450 µL de isopropanol y se colocaron a -20°C durante toda la noche. Al día siguiente, se centrifugaron los tubos durante 10 min a 14 000 rpm, se lavó la pastilla dos veces con 1 ml. de etanol al 70% y el ADN se dejó secando a TA para ser reconstituido al día siguiente con 30 µL de agua miliQ.

Además, se realizó una purificación del ADN obtenido mediante el uso de columnas de polipropileno (Qiagen®, Ventura, California, USA) y la adición de 500 µL de etanol al 70%. La concentración y pureza del ADN fueron verificados mediante el uso de espectrofotómetro (Nanodrop®).

#### **4.3.3.3 Desarrollo de la nPCR IS900**

Para la identificación del IS900 de MAP, se utilizaron los iniciadores descritos por Erume y colaboradores (2001). En la primera reacción se utilizaron los iniciadores: ptb1 (5' tga tct gga caa tga cgg tta cgg a 3') y ptb4 (5' cgc ggc acg gct ctt gtt 3') donde se obtiene un producto de amplificación de 563 pb y para la segunda reacción los iniciadores ptb2 (5' gcc gcg ctg ctg gag tta a 3') y ptb3 (5' agc gtc ttt ggc gtc ggt ctt g 3'), con los que se obtuvo un producto de amplificación final de 210 pb.

Cada reacción se llevó a cabo en un volumen final de 50 µL que contenía 0.2 µL (1 U) de DreamTaq DNA Polimerasa, 5 µL de Buffer 10X (que incluye 20-mM MgCl<sub>2</sub>), 0.5 µL dNTPs (400-µM), 1 µL de cada primer Ptb1, Ptb, Ptb2 y Ptb3 (20 pMol), 1 µL de Enhancer 10x (Thermo Fisher Scientific®) y 30 ng de ADN. Se incluyó como testigo positivo ADN genómico de la cepa de MAP ATCC 19698.

#### **4.3.3.4 Determinación de la sensibilidad y especificidad de nPCR en la identificación del IS900 de MAP**

Con la finalidad de determinar el límite de detección de sensibilidad de la nPCR, se probaron distintas concentraciones del ADN genómico de la cepa de MAP ATCC 19698, utilizando las condiciones descritas anteriormente. Las concentraciones fueron 100, 50, 25, 10, 7, 5, 4, 3, 2, 1, 0.5 ng/µl de ADN genómico de MAP.

Para evaluar la especificidad del ensayo, se sometió ADN genómico extraído de distintas cepas del género *Mycobacterium* spp. Un total de 6 cepas, incluidas el control positivo fueron utilizadas para esta prueba:

<b>Carril</b>	<b>Identificación</b>
1	MAP ATCC 19698
2	<i>Mycobacterium bovis</i> 1207
3	<i>Mycobacterium colombiense</i>
4	<i>Mycobacterium kansasii</i>
5	<i>Mycobacterium arginum</i>
6	<i>Mycobacterium fortuitum</i>

La amplificación se realizó en un termociclador utilizando el siguiente programa: desnaturalización inicial un ciclo a 95°C por 5 min, 35 ciclos de 95°C por 30s, 69.5 °C por 30s, 72 °C por 30s y extensión final de 72°C por 7 minutos.

Al finalizar la primera amplificación, se tomaron 3 µL de la primera reacción y se transfirieron a microtubos de PCR que contenían la misma cantidad y concentración de los reactivos ya descritos, excepto que los iniciadores Paratb 1 y Paratb 4 fueron sustituidos por los iniciadores Paratb 2 y Paratb 3. Se utilizó el programa del termociclador antes mencionado. Los productos se visualizaron en geles de agarosa al 2% teñidos con bromuro de etidio.

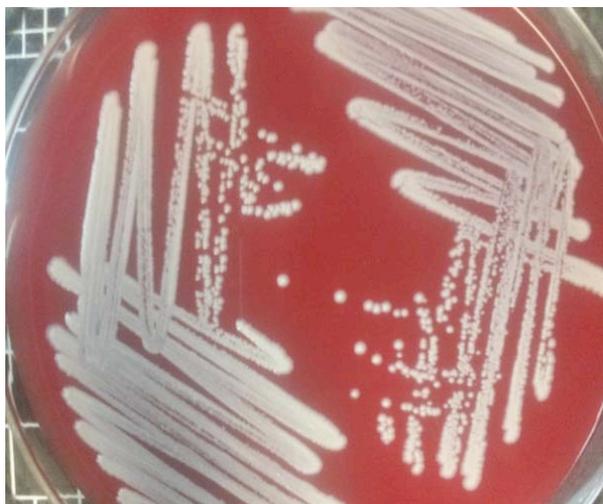
Posteriormente, se realizó la purificación de los productos de amplificación de la nPCR IS900 con el kit QIAprep®, y se secuenciaron en ambas direcciones.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Resultados de las pruebas para el diagnóstico de *Corynebacterium pseudotuberculosis*

#### 5.1.1 Aislamiento bacteriológico

A partir de las 60 muestras de exudado caseoso de los abscesos cutáneos, se logró el aislamiento en cultivo puro de *C. pseudotuberculosis* en el 100% de los casos 60/60, las colonias se observaron blancas, opacas y  $\beta$ -hemolíticas (Figura 1). A la tinción se observaron bacilos Gram+ con agrupación en forma de “empalizada” o “letras chinas”, características que fueron compatibles con *C. pseudotuberculosis*.



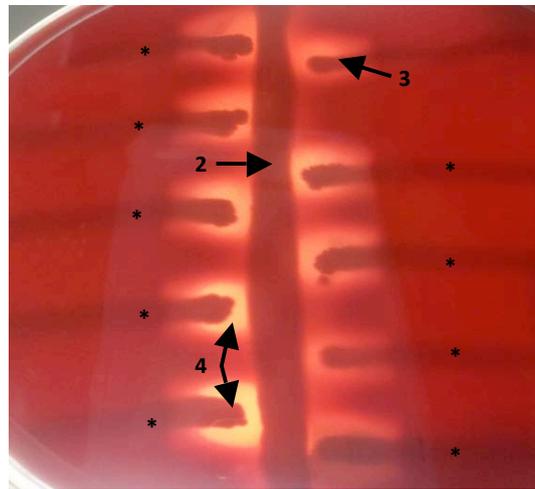
**Figura 1.** Aislamiento de *C. pseudotuberculosis*, placas con medio TSA que contiene 10% de sangre de oveja, 48 horas de incubación.

#### 5.1.2 Pruebas bioquímicas

Resultados de las pruebas bioquímicas de los 60 aislamientos de *C. pseudotuberculosis*.

Pruebas bioquímicas	Resultados	
	Positivos	Negativos
Fermentación de glucosa	51	9
Fermentación de sucrosa	3	57
Hidrólisis de urea	60	0
Reducción de nitratos	58	2
Catalasa	60	0
	60	0

La producción de la hemólisis sinérgica con *Rhodococcus equi* fue positiva en el 100% de los aislamientos (60/60). Esto demuestra la interacción del factor *equi* con la fosfolipasa D de *C. pseudotuberculosis* (Figura 2).

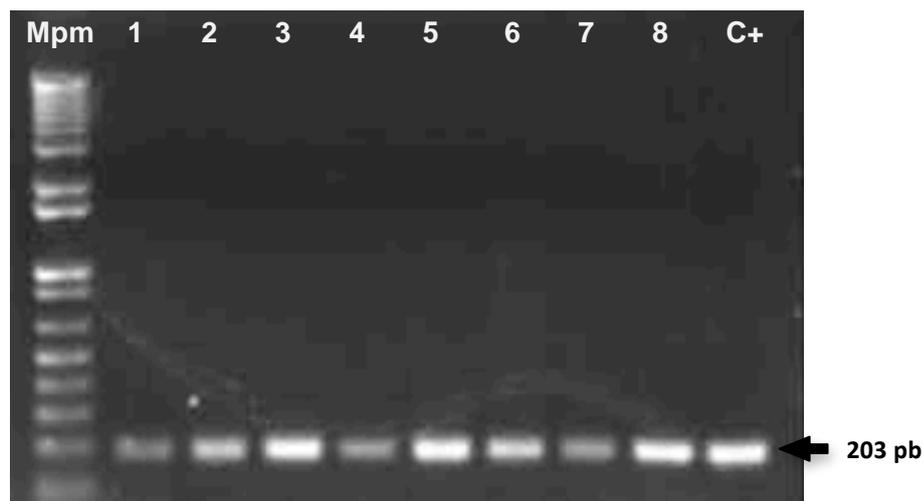


**Figura 2.** Producción de hemólisis sinérgica con *R. equi*. (\*) Aislamientos de campo de *C. pseudotuberculosis*, (2) *R. equi*., (3) *C. pseudotuberculosis* ATCC 43924 como C+, (4) Producción de hemólisis sinérgica.

### 5.1.3 Identificación molecular de *C. pseudotuberculosis*

La PCR fue realizada a partir de las extracciones de ADN obtenidas de las 60 muestras del exudado caseoso.

Al utilizar los iniciadores específicos, la técnica de PCR permitió amplificar el gen *pld* de *C. pseudotuberculosis* en el 100% de las muestras clínicas (60/60) (Figura 3).

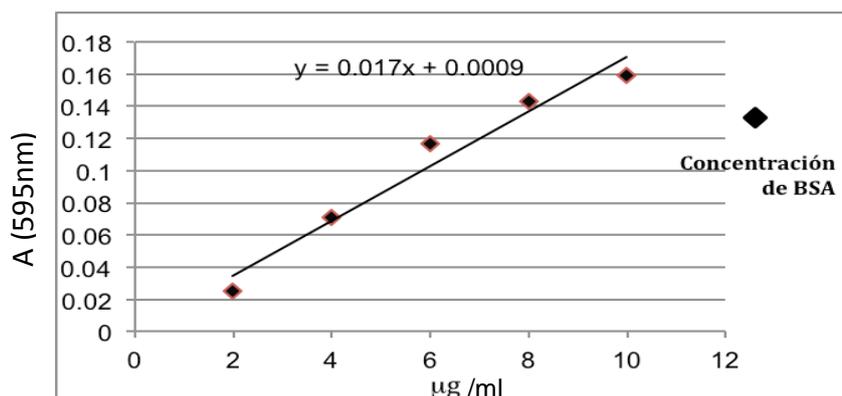


**Figura 3.** Amplificación del gen *pld* a partir de las muestras clínicas. Carril 1, marcador de peso molecular 1Kb (Thermo Scientific®); carriles de 2-8, aislamientos de *C. pseudotuberculosis* de las muestras clínicas; carril 9, *C. pseudotuberculosis* ATCC 43924. La flecha indica el peso del producto esperado (203 pb).

#### 5.1.4. Detección de anticuerpos contra *C. pseudotuberculosis* mediante ELISA

##### 5.1.4.1 Cuantificación de proteína

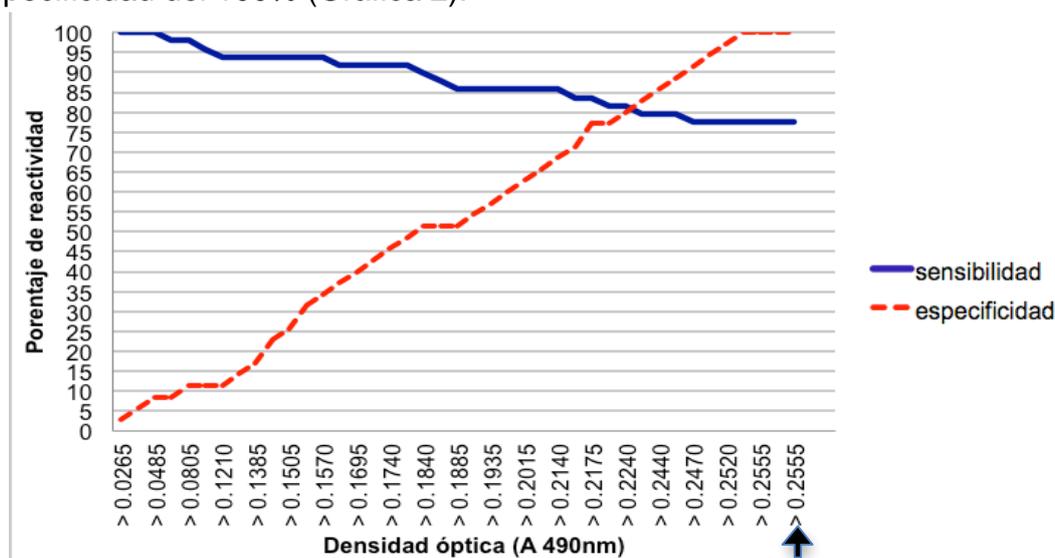
Los resultados de absorbancia de la concentración de proteínas totales contenidas en el sobrenadante de *C. pseudotuberculosis* se interpolaron a una curva de calibración, tomando como valor de referencia la albúmina sérica bovina (BSA). Despejando la ecuación de la gráfica se obtuvo la concentración total de proteína de 695 µg de antígeno por ml. (Gráfica 1).



**Gráfica 1.** Curva de calibración utilizando BSA como proteína de referencia y despeje de la ecuación para conocer la concentración total de proteína cruda de *C. pseudotuberculosis* contenida en el sobrenadante.

##### 5.1.4.2 Determinación del punto de corte, la sensibilidad y la especificidad del ELISA

Utilizando el programa STATA 9.0® se determinó el punto de corte por intervalos de confianza al 95% y dos desviaciones estándar. Los valores obtenidos con los 90 sueros permitieron establecer un punto de corte de 0.255 (OD), por lo que los valores iguales o mayores a este valor fueron considerados como positivos a la prueba (Gráfica 2). Los resultados indicaron que el ELISA tuvo una sensibilidad del 78.3 % y especificidad del 100% (Gráfica 2).



**Gráfica 2.** Determinación de la sensibilidad y especificidad del ELISA para la detección de anticuerpos contra *C. pseudotuberculosis*. Se observa la relación sensibilidad (78.3%) - especificidad (100%) del ELISA con respecto al punto de corte. La flecha indica el punto de corte establecido a 0.255 OD con dos desviaciones estándar y el intervalo de confianza del 95%.

### 5.1.4.3 Evaluación de las muestras de campo

La dilución del suero 1:200 permitió detectar una diferencia de densidad óptica tres veces mayor entre los testigos positivos y negativos, siendo el valor mínimo promedio 0.063 OD y 0.791 OD el valor más alto.

Del total de sueros trabajados en este estudio (n=103), se obtuvieron 56 resultados positivos y 47 negativos a este ensayo (Cuadro 2).

De las cabras previamente diagnosticadas por PCR con *C. pseudotuberculosis* (n=60), 47/60 fueron seropositivas y 13/60 resultaron seronegativas, lo que significa que el 21.66 % son falsos negativos (Cuadro 2).

En cabras que presentaron abscesos fistulizados (n=13) que evidenciaban que en algún momento cursaron con la enfermedad, pero no se obtuvo el aislamiento del agente, hubo nueve cabras seropositivas y cuatro que no presentaron anticuerpos.

Con respecto al rebaño de cabras libre de LC (n=30), provenientes de Alzayanca, Tlaxcala, el 100% (30/30) resultaron seronegativos a ELISA, lo que confirma los antecedentes clínicos del rebaño.

<b>Cuadro 2. Comparación de las pruebas ELISA y PCR para la identificación de <i>C. pseudotuberculosis</i></b>				
<b>Estatus clínico</b>	<b>Positivas a aislamiento y PCR (gen <i>pld</i>)</b>	<b>Resultado ELISA</b>		<b>TOTAL (n)</b>
		<b>POSITIVO</b>	<b>NEGATIVO</b>	
<b>Cabras con LC</b>	60	47	13	60
<b>Cabras con lesión sugerente a LC</b>	-	9	4	13
<b>Cabras libres de LC</b>	-	0	30	30
<b>TOTAL</b>		56	47	103

## 5.2 Resultados de las pruebas para el diagnóstico de *M. avium* subsp. *paratuberculosis*

### 5.2.1 Detección de anticuerpos contra MAP mediante IDGA

Sólo en uno de 103 sueros evaluados se observó una línea de precipitación bien definida entre el pozo del antígeno y el suero a las 24 y 48 horas de incubación, además de que presentó identidad con el suero control positivo (Allied Monitor, Inc®). Este único suero fue considerado positivo a IDGA, en el resto de los 102 sueros no se presentó la formación de la línea de precipitación, por lo que fueron considerados como negativos a la prueba.

### 5.2.2 Detección de anticuerpos contra MAP mediante ELISA Pourquoier® Paratuberculosis Screening

Para la interpretación de resultados, las muestras con porcentaje inferior o igual a 45% se consideraron negativas a la presencia de anticuerpos frente a MAP, muestras superiores a 45% e inferior a 55% son dudosas, y porcentajes superiores o iguales a 55% se consideraron positivas.

La media del control positivo fue de 1.726 OD y el control negativo de 0.042 OD cumpliendo con las especificaciones del kit para poder validar la prueba.

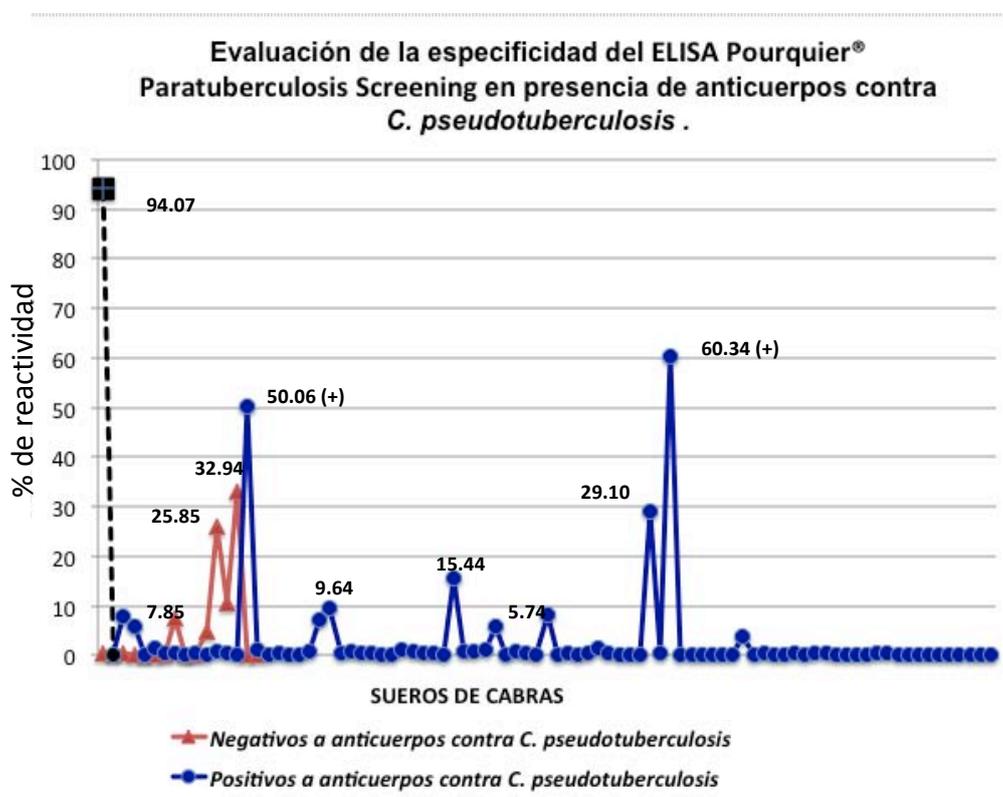
El ELISA Pourquoier® Paratuberculosis detectó 2/103 cabras seropositivas (1.94%), ninguna dudosa y 101 cabras seronegativas (Cuadro 3). Este ELISA de MAP obtuvo una sensibilidad de 10% (2/20) y una especificidad de 100% al ser comparado con los resultados obtenidos con la PCR anidada IS900 de MAP (20/103).

En los dos animales con presencia anticuerpos contra MAP, se confirmó la presencia de LC por pruebas moleculares y serológicas (Cuadro 3). Cabe señalar que una de estas dos cabras seropositivas al ELISA también resultó positiva a IDGA.

<b>Cuadro 3. Detección de anticuerpos serológicos mediante ELISAs</b>			
	<b>Anticuerpos contra <i>M. paratuberculosis</i></b>		<b>TOTAL (n)</b>
	<b>Positivo</b>	<b>Negativo</b>	
Positivo a anticuerpos contra <i>C. pseudotuberculosis</i> (n=56)	<b>2</b>	<b>54</b>	<b>56</b>
Negativo a anticuerpos contra <i>C. pseudotuberculosis</i> (n= 47)	<b>0</b>	<b>47</b>	<b>47</b>
<b>TOTAL</b>			<b>103</b>

Al evaluar los resultados de reactividad expresados en porcentaje del ELISA Pourquoi® Paratuberculosis, se observó que la presencia de anticuerpos contra *C. pseudotuberculosis* en cabras afectadas con linfadenitis caseosa, no interfería de manera significativa con los antígenos presentes en las pruebas comerciales de ELISA e IDGA utilizados en este estudio para el diagnóstico de MAP.

Los dos animales seropositivos a MAP tuvieron lecturas de 60.34 % y 50.05 % en el ELISA Pourquoi® Paratuberculosis (Gráfica 3); sin embargo, este ensayo registró porcentajes de reactividad (oscilaban entre 7% a 32.9%) en sueros de cabras que no presentaban anticuerpos contra *C. pseudotuberculosis*, a pesar de esto, los sueros fueron considerados negativo en el ELISA Pourquoi® Paratuberculosis por tener porcentaje inferior al 45% (Gráfica 3).



**Gráfica 3.** Evaluación de la especificidad del ELISA Pourquoi® Paratuberculosis Screening. Los resultados expresados en porcentaje de las 103 cabras analizadas en este estudio se muestran divididos en dos grupos (seropositivas y seronegativas a *C. pseudotuberculosis*). Se observa las dos cabras seropositivas a paratuberculosis (+), el Control positivo (----■) y ejemplos de porcentajes de reactividad en ambos grupos de cabras.

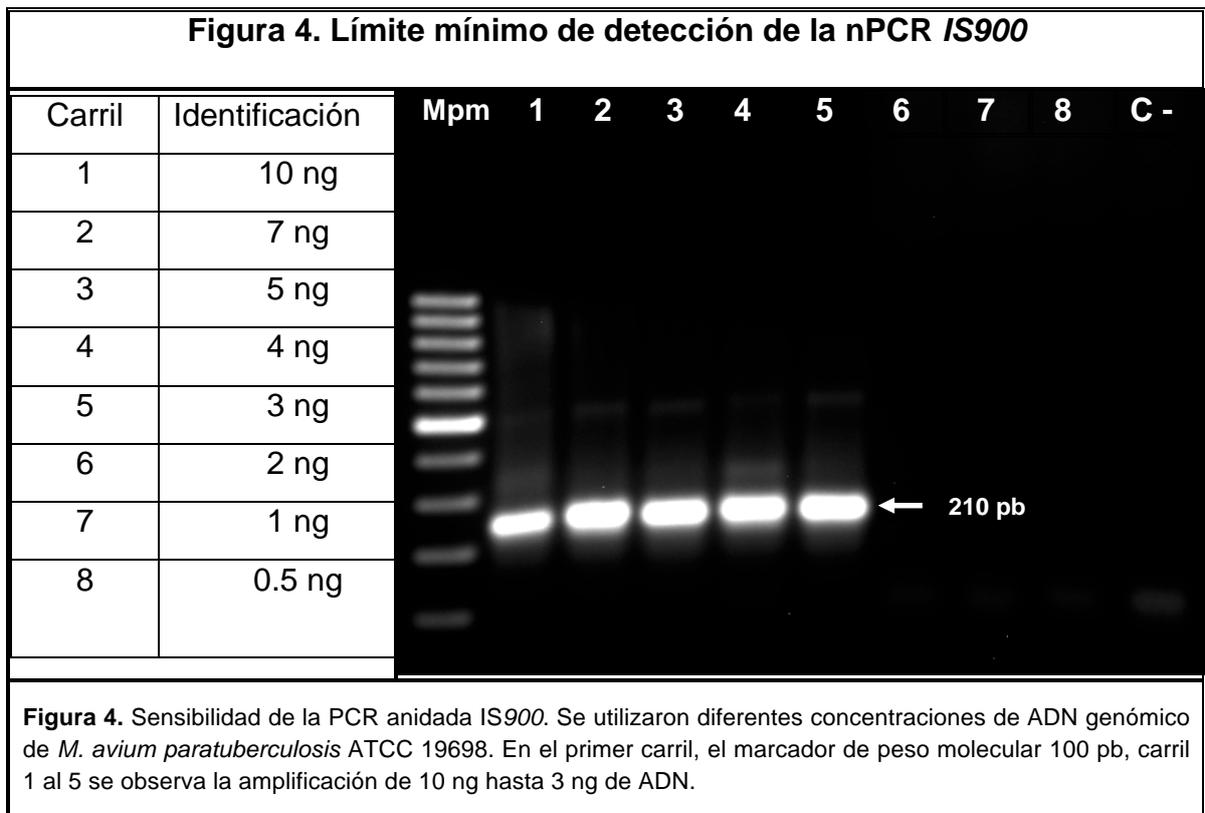
### 5.2.3 Diagnóstico molecular de MAP

El ADN obtenido de la extracción a partir de heces fue purificado mediante columnas y cuantificado en un espectrofotómetro (Nanodrop)®. Se evaluó la calidad y cantidad de ADN antes de ser sometido al ensayo.

### 5.2.3.1 Sensibilidad de la prueba de nPCR

Con la finalidad de determinar el límite de detección de la nPCR para la identificación del sitio de inserción 900, se probaron distintas concentraciones de ADN genómico del control positivo MAP ATCC 19698, utilizando las condiciones descritas anteriormente. Las concentraciones fueron 200, 100, 50, 25, 10, 7, 5, 4, 3, 2, 1, 0.5 ng/μl de ADN genómico de MAP.

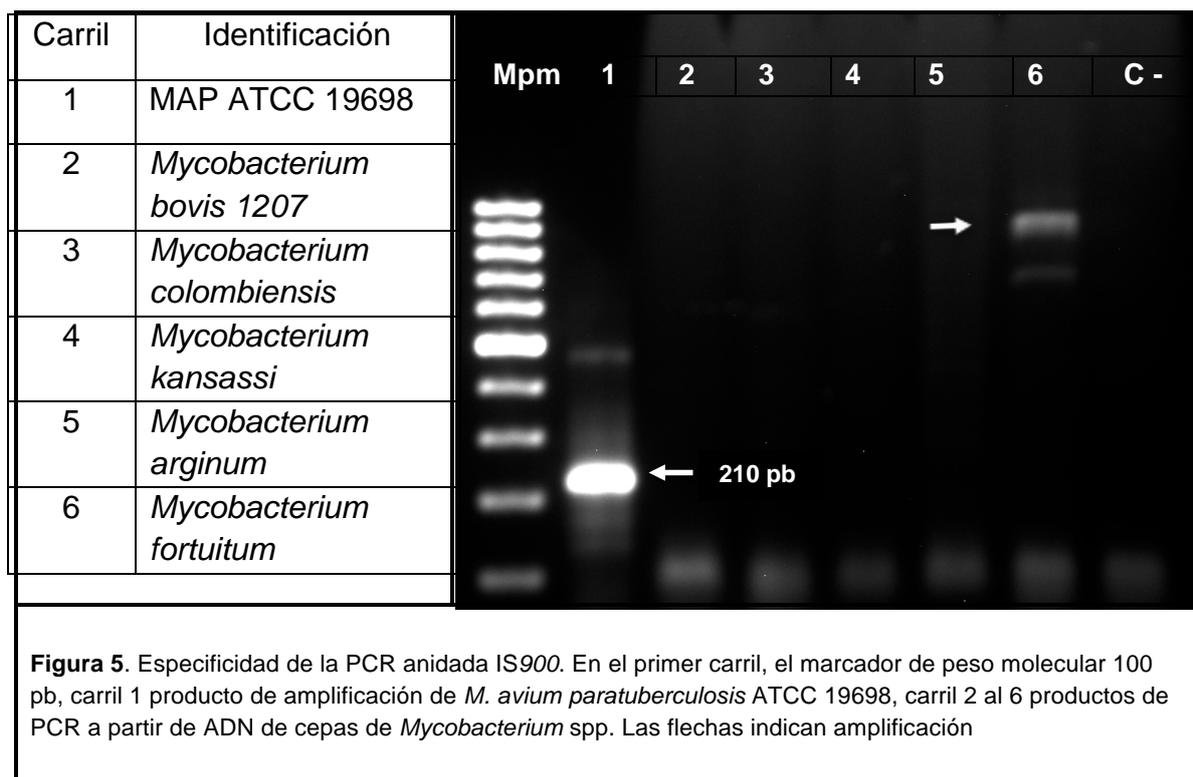
Se determinó que la sensibilidad de la nPCR utilizando ADN purificado con columna obtenido a partir de muestras de heces es de 3 ng/μl, obteniendo un producto de amplificación de 210 pb (Figura 4).



### 5.2.3.2 Especificidad de la prueba de nPCR

Al someter el ADN extraído de distintas cepas bacterianas relacionadas taxonómicamente con MAP y utilizar los iniciadores para la identificación de IS900 de MAP, también se identificó un producto de amplificación de aproximadamente 910 pb para el genoma de *Mycobacterium fortuitum* (Figura 5).

**Figura 5. Determinación de especificidad de la PCR anidada IS900**



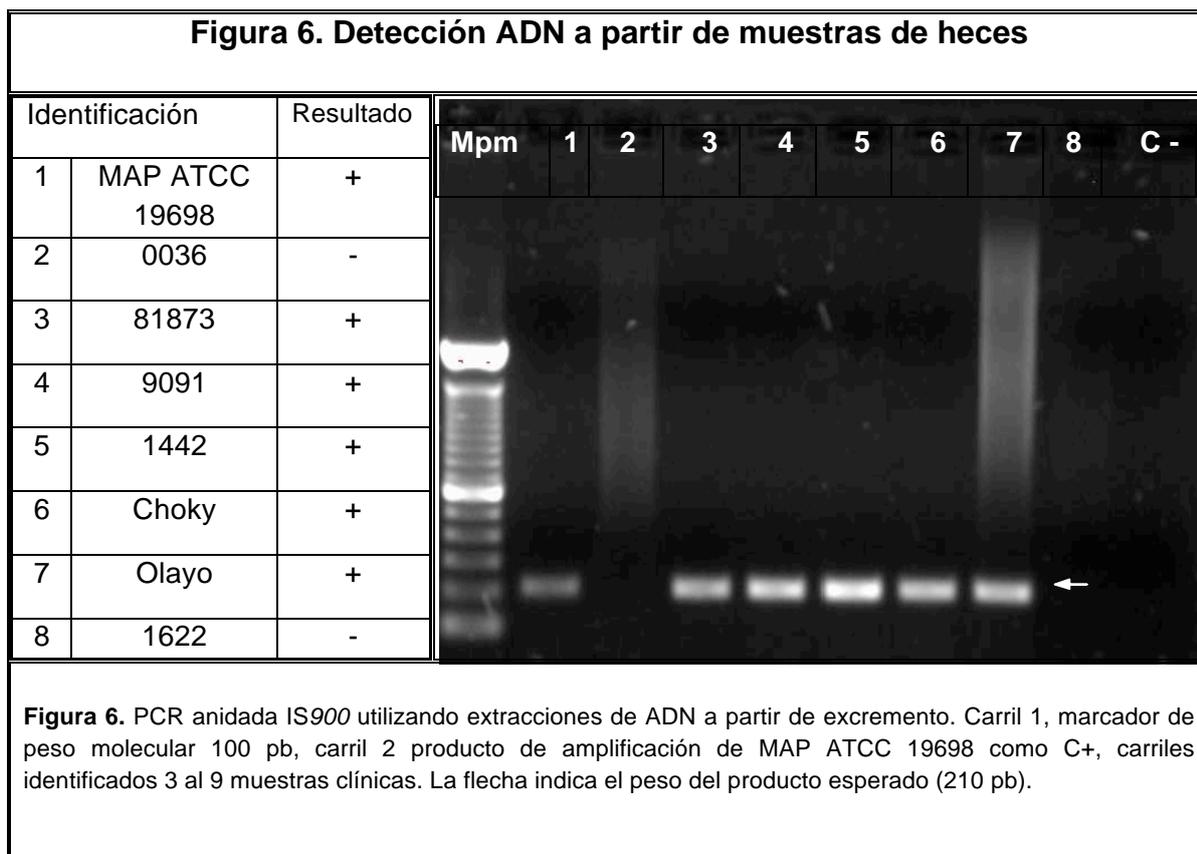
### 5.2.3.3 Evaluación de las muestras de campo por nPCR IS900

Al utilizar los iniciadores de la secuencia de inserción 900, la prueba de PCR anidada identificó genoma de MAP en las muestras de excremento de 20/103 cabras (19.41%) (Figura 6).

Asimismo, con la nPCR se identificó la presencia de esta micobacteria en el 100% de las muestras de excremento proveniente de las dos cabras seropositivas a paratuberculosis diagnosticadas mediante ELISA e IDGA, con lo que se corrobora que los resultados en la detección de anticuerpos contra paratuberculosis no correspondían a sueros falsos positivos.

El protocolo realizado para esta técnica molecular permitió mejorar la sensibilidad de la misma, permitiendo detectar 20/103 cabras (19.41%) por nPCR comparado con 2/103 cabras (1.94%) diagnosticadas mediante ELISA Pourquier® e IDGA. En conclusión, la PCR identificó a 18 cabras más que eliminaban MAP en heces pero resultaban seronegativas en las pruebas serológicas utilizadas.

Cabe señalar que existe una correlación entre las cabras nPCR positivas y las cabras que mostraron porcentajes de reactividad ligeramente elevados de anticuerpos al ELISA Pourquier® Paratuberculosis, pero fueron consideradas negativas (Gráfica 3).



#### 5.2.3.4 Secuenciación del producto PCR IS900 a partir de muestras clínicas

Los productos de amplificación de la PCR anidada para la identificación de IS900 a partir de muestras de excremento se purificaron con kit QIAprep®, se secuenciaron en ambas direcciones. La secuencia de nucleótidos se determinó mediante el Taq FS Dye Terminator Cycle Sequencing Fluorescence-Based Sequencing y el análisis con el sistema de secuenciación de ADN Applied Biosystems 3730. La búsqueda de homología de las secuencias fue obtenida con la base de datos de GenBank Blastn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) (Altschul *et al.*, 1990). Los resultados de la comparación de datos muestran 99 y 100% de identidad con *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* insertion sequence IS900 aislado de una cabra (Identificación de la secuencia: gb|S74401.1|).

## 6. DISCUSIÓN

Se ha sugerido que los anticuerpos producidos en respuesta a la infección por *C. pseudotuberculosis*, el patógeno causante de la linfadenitis caseosa en pequeños rumiantes, interfieren con las pruebas serológicas para la detección de *M. avium* subsp. *paratuberculosis* en los caprinos (Manning *et al.*, 2007; Krt *et al.*, 2002), debido a la cercanía taxonómica y a las similitudes antigénicas entre ambas bacterias.

Esta interferencia serológica ha sido reportada en numerosos estudios entre distintas especies coinfectadas con microorganismos pertenecientes al grupo CMNR (Abou-Zeid *et al.*, 1985; Bercovier *et al.*, 2001; Osterstock *et al.*, 2007; Stabel *et al.*, 2013).

Los antígenos protoplasmáticos de MAP utilizados en los ELISAs comerciales o como antígenos de captura en otras pruebas como la IDGA, son una mezcla del lisado de células que incluyen lípidos, carbohidratos, proteínas y ácidos nucleicos, obtenidos por ruptura física completa de las micobacterias, seguido de la eliminación de los desechos celulares y la obtención del sobrenadante. Entre los componentes presentes en el sobrenadante se encuentran los polipéptidos y polisacáridos que son capaces de actuar como inmunógenos, y están presentes tanto en la pared celular y el citoplasma de los géneros *Mycobacterium* y *Corynebacterium*, y en algunos casos se encuentran también en el fluido extracelular (Cummins, 1962; Lederer *et al.*, 1975; Barksdale y Kim, 1977).

Los resultados del presente estudio demuestran que en cabras con LC, la presencia de anticuerpos serológicos contra *C. pseudotuberculosis* no interfiere de manera significativa con los antígenos de captura de MAP utilizados en las pruebas comerciales de ELISA e IDGA.

Estos resultados concuerdan con lo observado por Gumber y colaboradores (2006), quien reporta que en el diagnóstico de paratuberculosis en hatos caprinos, el uso del ELISA IDEXX (Instituto Pourquier®) no es afectado por los anticuerpos contra *C. pseudotuberculosis*, debido a la alta especificidad que posee este ensayo (Gumber *et al.*, 2006). Otros estudios han evaluado los valores de especificidad de este kit entre 98 y 100% para la detección de anticuerpos en suero de cabra y vaca, respectivamente (Tripathi *et al.* 2008; Collins *et al.* 2005) y de 99 al 100% para la detección de anticuerpos en leche de vaca (Van Weering *et al.*, 2007).

En este estudio, el ELISA IDEXX (Instituto Pourquier ®) presentó una especificidad del 100%; obteniendo 83/83 cabras seronegativas a paratuberculosis comparado con la PCR usada para la detección de la secuencia de inserción 900 de MAP. Nuestros resultados obtenidos en cuanto a la especificidad del ELISA, concuerdan con los reportados por Gumber y colaboradores, donde obtienen 100% de

especificidad utilizando el mismo kit para la detección de anticuerpos en suero. La sensibilidad documentada en este estudio fue de 56.4% en una muestra poblacional de 945 cabras mayores de un año (Gumber *et al.* 2006).

Esta elevada capacidad de descartar falsos positivos se podría deber a la necesidad de comercializar una prueba diagnóstica en la que no interfieran los anticuerpos de otras bacterias que pueden coinfectar al mismo tiempo a los rumiantes, como es el caso de *M. tuberculosis*, *C. xerosis*, *C. pseudotuberculosis* y *M. bovis* en el caso de ganado bovino.

La carencia de interferencia en el ELISA, también se ha reportado en cabras infectadas naturalmente (Acosta *et al.*, 1995), así como en modelos de infección experimentales con *C. pseudotuberculosis* (Bezoz *et al.*, 2015), evidenciando que la presencia de LC en cabras libres de tuberculosis no conducía a resultados falsos positivos en las pruebas de tuberculina cervical simple y comparativa.

En otro estudio en bovinos vacunados con BCG (vacuna viva atenuada) en un modelo de infección con *M. bovis*, se determinó que la presencia de anticuerpos vacunales contra MAP, no afecta el diagnóstico de tuberculosis en las pruebas para la detección de inmunidad celular y humoral (Coad *et al.*, 2013). Mientras que en bovinos naturalmente infectados con MAP o vacunados con Mycopar® (bacterina que contiene células completas inactivadas de MAP), la identificación de anticuerpos contra *M. bovis* mediante un ELISA comercial (IDEXX) tampoco vio afectada la especificidad por la presencia de anticuerpos contra MAP (Tewari *et al.*, 2014).

A pesar de utilizar antígenos no purificados, la mayoría de los ELISAs comerciales disponibles actualmente para el diagnóstico de MAP cuentan con una especificidad mayor del 95%, pero poseen una baja sensibilidad de 13.5 a 42% (Sweeney *et al.*, 2006; Sockett *et al.*, 1992), esta última va incrementando con la edad del animal (Nielsen y Toft, 2006).

En este estudio, la sensibilidad del ELISA IDEXX (Instituto Pourquier ®) fue comparada con los resultados obtenidos con la PCR IS900, siendo considerablemente menor en el ELISA al detectar dos cabras que presentaban anticuerpos contra MAP con respecto a las 20 cabras detectadas como positivas por PCR; la sensibilidad del ELISA resultó ser del 10% (2/20).

Estos resultados reflejan la estimación de la sensibilidad global de los ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas comerciales referida por otros autores, sin embargo, un estudio longitudinal de la seroreactividad del ELISA de MAP, sugiere que estos ensayos podrían tener una tasa aún más baja de sensibilidad (13.5%) (Sweeney *et al.*, 2006).

Los resultados de la IDGA utilizando el antígeno PPA-3, detectaron únicamente un animal seropositivo comparado con la PCR IS900 de MAP. Este resultado coincide con un trabajo realizado en cabras con LC, en donde se detectaron anticuerpos

contra MAP mediante ELISA e IDGA; en dicho estudio, la prueba de IDGA fue menos sensible que el ELISA en rebaños con paratuberculosis, donde no se presentaron falsos positivos en la IDGA. Sin embargo, esta última prueba identificó sólo un tercio de las cabras que fueron positivas al cultivo fecal y positivas a PCR (Manning *et al.*, 2007).

Estas discrepancias en la capacidad de las pruebas serológicas (ELISA e IDGA), para identificar los animales con paratuberculosis, han sido correlacionadas con diversos factores como la disminución o la pérdida de respuesta inmune ante la infección; esta actividad supresora, denominada anergia, en donde la producción de anticuerpos se ve afectada, se presenta a menudo en infecciones micobacterianas, induciendo la incapacidad de las células T específicas a antígeno, que resulta en la progresión de la enfermedad (Waters *et al.*, 1999).

La pérdida de la respuesta inmune ocurre gradualmente y afecta a los isotipos de células B a diferentes tiempos. Presumiblemente, la producción de anticuerpos dependiente de células T es la primera respuesta en perderse, seguido de otros isotipos. Clínicamente, los anticuerpos unidos al sistema de complemento parecen disminuir antes que aquellos detectados mediante la ELISA (Hilbink *et al.*, 1994; Ridge *et al.*, 1991).

La anergia se presenta en animales de mayor edad con respecto a los animales jóvenes, con historial de infección crónica o que se encuentran en las etapas finales de la infección. La progresión de la enfermedad resulta en la excreción intermitente del bacilo, donde finalmente, si un animal se mantiene infectado con la micobacteria por periodos prolongados, la respuesta inmune se vuelve completamente anérgica sin ninguna capacidad de dar respuesta celular o humoral demostrable para los antígenos de MAP (Bernardelli *et al.*, 2000; Clark *et al.*, 2008).

La respuesta anérgica podría ser el resultado de la exposición fetal a MAP, que resulta en la inmuno-tolerancia frente a los antígenos de MAP o en las respuestas de anticuerpos maternos en los terneros que inhiben las respuestas de anticuerpos expuestos a la micobacteria. Se ha demostrado anteriormente que el desarrollo de células T reguladoras en el feto, son responsables de la tolerancia inmune que resulta de la exposición a aloantígenos maternos (Mold *et al.*, 2008). Resultados similares se han reportado en otras infecciones tras la exposición fetal (Endsley *et al.*, 2003), encontrando que las respuestas de células T se conducen con normalidad, pero las células B o las respuestas de anticuerpos se ven afectadas.

Probablemente la escasa detección de anticuerpos serológicos obtenidos en las 103 cabras de este estudio, se deba a que la mayor parte de los animales que resultaron seropositivos a MAP, eran cabras mayores de 4 a 5 años. En la mayoría de las explotaciones visitadas (>90%), el propietario desconocía el estatus sanitario de sus animales, por lo tanto, se ignoraba el tiempo y las generaciones que habían estado

expuestas a esta micobacteria, siendo el muestreo realizado en este estudio, el primer diagnóstico que se le brindaba al productor.

Esta combinación de factores intrínsecos (respuesta inmune del animal, mecanismos que desencadenan anergia, cronicidad, animales viejos, excreción micobacterias) sumado a factores extrínsecos como la baja sensibilidad de esta prueba debido al uso de antígenos poco específicos, podría explicar la baja sensibilidad en el ELISA IDEXX (Instituto Pourquier®) e IDGA. Collins y colaboradores sugieren que el diagnóstico basado en anticuerpos, detecta menos de un tercio de todos los animales infectados por MAP, por lo que el porcentaje de resultados positivos podría multiplicarse por al menos un factor de tres para obtener una estimación aproximada de la verdadera prevalencia de infección dentro de los rebaños donde se desconoce el estatus sanitario de esta enfermedad (Collins y *et al.*, 2005).

Por otra parte, la PCR es una herramienta eficiente en el diagnóstico de infecciones por micobacterias, llegando a ser considerada de elección debido a la rapidez con la que se pueden generar resultados a partir de muestras clínicas de bacterias de crecimiento lento o fastidioso como es el caso de MAP (Hawkey, 1994). La PCR puede ser más sensible que el cultivo fecal, pero esto es difícil de determinar, porque el cultivo de MAP sigue siendo la prueba de referencia actual (Clark *et al.*, 2008). Sin embargo, a pesar de que la PCR es adecuada para confirmar los casos clínicos de la enfermedad de paratuberculosis, en la actualidad se considera que tiene una aplicabilidad limitada en los estudios de prevalencia y en los programas de erradicación (Pearson, 2014).

La PCR se puede adaptar para detectar diferentes dianas genéticas, siendo el sitio de inserción 900, una secuencia comúnmente utilizada para el análisis de muestras clínicas, debido a las múltiples copias de esta secuencia contenidas en el genoma de MAP y por lo tanto, tratarse de un objetivo sensible.

Utilizando un análisis bayesiano, la sensibilidad y la especificidad de una PCR directa de muestras fecales de bovinos naturalmente infectados, fueron estimadas entre 29% al 99.3% (Wells *et al.*, 2006) y 60% al 97% (Alinovi *et al.*, 2009), respectivamente. Observando que el límite mínimo de detección de la PCR varía en función de la concentración de bacterias presentes en la muestra, el proceso de extracción de ADN y el protocolo empleado (Gao *et al.*, 2007).

En el presente estudio el límite mínimo de detección de la PCR IS900 a partir de muestras de heces fue de 4 ng/  $\mu$ L de ADN. Se identificaron 20 de 103 cabras (19.41%) que excretaban el bacilo, resultando positivas a la amplificación de IS900 de MAP a partir de heces.

Lo anterior indica que el protocolo utilizado para la PCR de este estudio, identificó como positivas a paratuberculosis a 18 cabras más en comparación con las dos de 103 cabras (1.94%) positivas con la IDGA y ELISA, siendo la PCR la técnica capaz

de detectar cabras que eliminaban *M. avium* subsp. *paratuberculosis* en heces, pero que resultaban negativas al serodiagnóstico.

El hecho de que la técnica de PCR anidada IS900 haya permitido la identificación rápida y sensible de MAP en el presente estudio, podría atribuirse a una serie de factores:

1) La eficiente lisis de las micobacterias para obtener sus ácidos nucleicos. Garrido y colaboradores comparan diferentes tratamientos químicos combinados con métodos físicos y concluye que la extracción a base de calentamiento-enfriamiento junto con el tratamiento de Tritón 100X, se obtiene la mayor cantidad y calidad de ADN a partir de heces (Garrido *et al.*, 2000).

2) El uso de columnas de polipropileno y de etanol, que tienen la capacidad de unión entre las diferentes cargas que permiten la unión de la matriz intercambiadora de aniones empaquetada en columnas de polipropileno y la carga positiva del ADN; de esta manera, se logró eliminar las impurezas contenidas en el ADN con la eficiente obtención de ácidos nucleicos.

3) La eliminación de sustancias inhibitoras usando el cosolvente PCR Enhancer 10x (Thermo Fisher Scientific®) empleado en la primera reacción de la PCR anidada, permitiendo la amplificación eficiente de las secuencias nucleotídicas ricas en G-C y evitando las dificultades con los templates problemáticos de la PCR.

4) Si este resultado se combina con la secuencia de ADN diana para la identificación molecular de MAP, la IS900, que es ampliamente utilizada por la buena sensibilidad que presenta debido al alto número de copias presentes el genoma de MAP que contiene entre 15 y 20 (Collins *et al.*, 1989; Green *et al.*, 1989). Se ha concluido que en muestras clínicas, el número de micobacterias puede ser mínimo y el número de copias por genoma de la secuencia diana puede ser determinante a la hora de dar un diagnóstico (Van der Giessen *et al.*, 1992).

Por otra parte, también se debe considerar que el alto rendimiento de la PCR comparado con el escaso número de seropositivos, puede deberse a factores que pueden impactar los resultados del ELISA como el estatus sanitario de los animales, la técnica empleada, el punto de corte establecido, entre otros.

Se sabe que la sensibilidad del ELISA es de 50-87% en sueros de bovinos con signos clínicos, de 24-94% en el ganado sin signos pero que excretan MAP; y 7-22% en bovinos infectados con el agente, asintomáticos y con mínima excreción de micobacterias (Nielsen y Toft, 2008).

Probablemente, los sueros trabajados en este estudio, pudieron provenir de cabras que se encontraban en estadios de infección subclínica y que comenzaban a eliminar el bacilo en heces de manera intermitente, siendo detectables por la PCR pero no a los pruebas para la detección de anticuerpos serológicos contra MAP; o en el caso contrario, tratarse de cabras que cursaban por estadios clínicos crónico-avanzados, donde se sabe que la respuesta inmune por parte de CD4+/CD8+

disminuye en esta infección micobacteriana (Chiodini y Davis, 1992).

No obstante, en la utilización de la secuencia de IS900 para la detección de MAP, se conoce la presencia de elementos similares a la IS900 (IS900-like) en otras bacterias.

La IS900 pertenece a una familia de elementos IS relacionados entre sí, que se encuentran en microorganismos del orden *Actinomycetales*, entre las que se incluyen la IS901, IS902 y la IS1110, las cuales han sido descritas en *M. avium* subsp. *avium* (*Maa*), *M. avium* subsp. *silvaticum* (*Mas*) y *Maa* respectivamente (Bölske *et al.*, 2002).

Se han reportado genes IS900-like en muestras provenientes de micobacterias ambientales presentes en heces y estrechamente relacionadas con *M. scrofulaceum* (Coussins, 1999); en microorganismos del complejo *M. avium* procedentes de pacientes con SIDA (Naser *et al.*, 1999), así como en un aislado micobacteriano de heces de bovino llamado *Mycobacterium* spp. 2333 relacionado con *M. cookii*, el cual alberga una copia de la secuencia IS900 con identidad del 94% a nivel del ácidos nucleicos (Englund *et al.*, 2002).

También se informó la presencia de elementos IS900-like en seis aislados a partir de heces y tejidos de animales salvajes (Motiwala *et al.*, 2004), mientras que en muestras de leche a granel de bovinos, se identificó una cepa de *M. porcinum*, obteniendo una identidad de 74.4% con el elemento IS900 de MAP (Taddei *et al.*, 2008).

En este estudio, utilizando los iniciadores descritos por Garrido *et al.* (2000) para la amplificación de la IS900 de MAP producto de la PCR anidada, también se obtuvo un producto de amplificación de aproximadamente 910 pb en el genoma de *Mycobacterium fortuitum*. No existen reportes de amplificación de *M. fortuitum* como secuencia IS900-like con los iniciadores utilizados en este estudio.

A pesar de que se han descrito secuencias alternativas para el diagnóstico molecular de MAP, ninguna secuencia de inserción goza de la sensibilidad que proporciona la IS900. Por lo tanto, para corroborar los resultados de la PCR y sus posibles fallas en la especificidad, el análisis de secuencia del producto de la PCR, sigue siendo el método ideal para confirmar la identidad de la secuencia IS900 de MAP.

La elevada identidad encontrada en la alineación múltiple de las secuencias de nucleótidos en las muestras clínicas a partir de heces, obtuvieron un 99-100% de identidad con la secuencia *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis insertion sequence* IS900 (gb|S74401.1|) de la base de datos del GenBank, nos permitió confirmar la presencia de paratuberculosis en rebaños de cabras de cinco diferentes

estados de la República, entre los que se encuentran Tlaxcala, Puebla, Ciudad de México, Jalisco y Guanajuato; siendo los estados de Puebla y Ciudad de México los que presentan el mayor número de cabras afectadas.

En México ha sido notificada la presencia de paratuberculosis en hatos de cabras provenientes de los estados de San Luis Potosí (Estévez *et al.*, 2007), Ciudad de México (Estévez *et al.*, 2007; Chávez *et al.*, 2004; Favila, 2007), Guanajuato (Estévez *et al.*, 2007; Anduaga, 2014; Favila *et al.*, 2009) Querétaro (Yurame, 2014, Estévez *et al.*, 2007; Favila *et al.*, 2007), Veracruz (Estévez *et al.*, 2007; Martínez *et al.*, 2012), Morelos (Favila *et al.*, 2007), Oaxaca (Favila *et al.*, 2009), Puebla (Favila *et al.*, 2009; Gallaga, 2011), región lagunera de Durango y Coahuila (Toledo *et al.*, 2011) coincidiendo con los estados de la república reportados en este trabajo.

Por otra parte, la información epidemiológica acerca de la situación actual de la paratuberculosis en el país sigue siendo escasa y dispersa, a pesar de que la paratuberculosis en caprinos, ovinos y bovinos está considerada como enfermedad de notificación mensual obligatoria ante la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA, 2016).

En el transcurso de este estudio, se constató que un problema evidente es el desconocimiento mismo de la enfermedad en las diferentes producciones visitadas, por ende, no es posible el registro de casos reales y la notificación correspondiente. Esta falta de información de la situación zoonositaria dificulta la implementación de un programa de control voluntario de la paratuberculosis en nuestro país, con el cual se brindaría información al productor acerca de esta enfermedad y al mismo tiempo, se comprendería la problemática que conlleva la compra de un animal infectado en estado podrómico, los factores implicados en el desarrollo de la paratuberculosis como la patogénesis, el diagnóstico y el impacto que provoca en todo el sistema de producción, que se ve reflejado en pérdidas económicas y la implicación de esta micobacteria como posible agente zoonótico.

La paratuberculosis y la linfadenitis caseosa son enfermedades endémicas en el país, que deben su importancia a las pérdidas económicas que provocan la alta morbilidad, su difícil erradicación una vez establecida dentro del hato, la escasa respuesta ante el tratamiento con quimioterapéuticos y a la poca protección conferida con el uso de inmunógenos que disminuyen el grado de las lesiones pero no evitan el desarrollo de estas enfermedades.

Ambas bacterias se presentan principalmente en rebaños con higiene deficiente, donde el manejo inapropiado de desechos, heces, productos del parto, desbridación y manejo de la pus, desinfección de heridas fistulizadas, junto con medidas sanitarias inadecuadas (desinfección de material quirúrgico, control de vectores, pasteurización del calostro antisepsia de las ubres, así como a la falta de vigilancia en los requisitos sanitarios para la importación y la carencia de barreras arancelarias en México que controlen y vigilen la introducción de animales libres de

paratuberculosis a nuestro país pueden contribuir a la coinfección con ambas bacterias dentro del hato.

El control de la LC no es una tarea fácil. El potencial de *C. pseudotuberculosis* para sobrevivir durante varios meses en el medio ambiente y su comprobada capacidad de sobrevivencia en determinados fómites, contribuyen a la propagación del microorganismo dentro un hato o rebaño (de Sá *et al.*, 2010). Los animales afectados no responden adecuadamente al tratamiento con quimioterapéuticos, debido a que las bacterias se encuentran protegidas por la gruesa cápsula que se forma en los abscesos (Piontkowski y Shivers, 1998; Stanford *et al.*, 1998). La aplicación de inmunógenos no evita el desarrollo de la enfermedad, sin embargo, se ha observado la reducción en el número y el tamaño de las lesiones causadas por *C. pseudotuberculosis*. El uso de una antitoxina ha impedido la propagación de la bacteria dentro del hospedero; pero no es capaz de prevenir el desarrollo de los abscesos (Williamson, 2001). Por otra parte, la vacunación en cabras con una exotoxina-inactivada con formol, inhibió la acción de la fosfolipasa D y también impidió la propagación de bacterias, después de la inoculación experimental (Brown *et al.*, 1986).

En general, se considera que la mejor estrategia para controlar la enfermedad es la identificación y/o eliminación de los animales infectados junto con la vacunación de animales sanos. Sin embargo, las dificultades asociadas con la identificación clínica temprana de los animales infectados pueden ser un obstáculo para una estrategia de este tipo. Diversos autores han referido que la introducción de un animal afectado con LC provoca una alta incidencia de abscesos de 2 a 3 años después de su entrada al hato (Williams, 1980; Ashfaq y Campbell, 1979).

Por otra parte, un punto importante para la prevención de la paratuberculosis depende en gran medida del análisis y del diagnóstico minucioso al momento de ingresar animales nuevos al rebaño, sin embargo, la única medida con la que se podría garantizar que un animal infectado no será introducido a un hato libre de paratuberculosis, es mantener un ciclo de producción completamente cerrado, ya que al adquirir un animal procedente de una explotación ganadera en la que previamente no se ha diagnosticado la enfermedad, o se tiene un diagnóstico presuntivo en el cual los animales recién adquiridos resulten negativos, no asegura que el animal esté verdaderamente libre de la enfermedad.

Los animales deben ser adquiridos de hatos con certificados libres de paratuberculosis, esta certificación ha sido implementada en países como Estados Unidos, Canadá, Australia, Argentina y Chile, no es así en México, donde hasta el momento la certificación de hato libre de paratuberculosis no es un requerimiento zosanitario para la movilización de animales dentro del país, además de que no existen requisitos zosanitarios que controlen la importación de ganado infectado con paratuberculosis.

Los animales más susceptibles de adquirir una infección con MAP son los animales recién nacidos o jóvenes, por lo que el manejo y cuidado de este grupo, es uno de los eslabones más importantes en cualquier programa de control (Goodger *et al.*, 1996). Entre las medidas de control se incluyen la separación de crías de madres inmediatamente después del nacimiento, la alimentación de neonatos con suplemento de calostro libre de paratuberculosis y sustituto de leche, manteniendo a las hembras de reemplazo en lugares separados (Bastida y Juste, 2011).

Los animales que se encuentran en etapa subclínica de la infección, son un riesgo de excreción intermitente de la micobacteria en heces, contribuyendo a la contaminación ambiental, debido a esto, se debe tomar como medida de control el mejorar la higiene general dentro de las instalaciones, con la limpieza periódica de corrales y manejo adecuado de excretas, ya que esta micobacteria, al igual que *C. pseudotuberculosis*, posee la elevada capacidad para sobrevivir en el ambiente que puede ser de alrededor de un año (Whittington *et al.*, 2004; Whittington *et al.*, 2005).

Esta supervivencia de MAP por largos periodos de tiempo en el medio ambiente puede ser riesgo de infección, debido a la convivencia simultánea de varios animales procedentes de distintas producciones de ganadería extensiva y semintensiva que comparten las pasturas, el agua y permiten el contacto estrecho entre hatos y con otras especies animales susceptibles a la paratuberculosis, como es el caso de la fauna silvestre.

La presencia de casos clínicos también representa pérdidas económicas, debido a la merma en la producción, además de que estos animales constituyen un foco de infección y contaminación ambiental. En un estudio realizado en 29 rebaños de ganado bovino lechero en el estado de Hidalgo, se estimó que las pérdidas económicas eran de \$10.345 pesos por vaca/año, encontrando que el 96.55% (28/29) de los hatos muestreados, tenían animales seropositivos a paratuberculosis (Miranda, 2005).

Otra investigación evaluó el impacto económico en explotaciones lecheras de ganado caprino en el estado de Guanajuato, concluyendo que las pérdidas económicas por animal eran de \$454 hasta \$852 pesos, dependiendo de la prevalencia de paratuberculosis en rebaños con producción intensiva (Jorge, 2011).

Para disminuir el riesgo de infección dentro de una explotación, los casos sospechosos a paratuberculosis deben eliminarse, esta práctica en algunos casos es poco viable debido al elevado número de animales infectados, por lo que la separación física de los animales sospechosos o infectados de los animales sanos, es una de las pautas principales de control.

El uso de vacunas a pesar de inducir una respuesta humoral y celular, no confiere una protección absoluta ante la infección, por lo que los animales vacunados pueden desarrollar la enfermedad y/o excretar MAP en las heces (Chiodini, 1996; Körmendy, 1994).

Sin embargo, se ha observado en pequeños rumiantes la disminución de la presencia de signos clínicos, la reducción en el número y en el tamaño de

granulomas intestinales, así como en el número de excretos fecales y de animales positivos en los cultivos bacteriológicos (Bastida y Juste, 2011; Gwozdz *et al.*, 2000; Chiodini *et al.*, 1984).

Las pruebas para la detección de la respuesta inmune, especialmente las serológicas, han tenido una serie de ventajas con respecto a la PCR y al cultivo bacteriológico. El ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas, proporciona resultados rápidos y ofrece una alternativa más económica respecto al cultivo fecal y la PCR. Debido al bajo costo de estas pruebas para la detección de anticuerpos, los productores optan por muestrear sus animales con frecuencia, especialmente en este tipo de enfermedades con periodos de incubación prolongados y respuesta de anticuerpos oscilantes (Nielsen y Toft, 2006).

Dadas las limitaciones de las pruebas diagnósticas actuales, la investigación se ha enfocado en el desarrollo de pruebas sensibles y específicas para la detección de MAP, entre los que se contempla, el descubrimiento de nuevos antígenos o cócteles de antígenos y la expresión diferencial de genes que pueden discriminar MAP de la infección con otras micobacterias (Meade *et al.*, 2007; MacHugh *et al.*, 2009)

Los antígenos más inmunogénicos de MAP, tienden a ser compartidos entre varias especies de micobacterias pero se han identificado una serie de nuevos antígenos prometedores obtenidos a partir del proteoma de filtrados de cultivo, antígenos recombinantes, proteínas de latencia o la combinación de varios antígenos específicos con la finalidad de optimizar la detección de MAP en sus distintas etapas (Cho *et al.*, 2007; Facciuolo *et al.*, 2013).

Un análisis inmunoproteómico a gran escala evaluó las proteínas presentes en los extractos y filtrados de cultivo de MAP con la finalidad de obtener antígenos específicos que pudieran ser utilizados como potenciales candidatos para el desarrollo de nuevas pruebas diagnósticas. La selección de estos antígenos se basó en la especificidad prospectiva en búsquedas BLAST (los antígenos presentes en los CF de MAP se encontraban ausentes en los genomas completos de *M. bovis* y *M. avium* subsp. *avium*) y la antigenicidad en el análisis inmunoproteómico.

El resultado fue la obtención de tres antígenos recombinantes (MAP1693c, MAP4308c y MAP2677c) utilizados en un ELISA que mejoró de manera significativa la especificidad de la prueba, al lograr diferenciar entre los anticuerpos de infección de *M. paratuberculosis* de los de *M. bovis* en el 100% de los sueros, y al mismo tiempo mantener una sensibilidad del 94.74%.

En otro estudio, con una combinación de siete antígenos (MAP0038, MAP0210C, MAP1272, MAP1693C, MAP2020, MAP2513 Y MAP0209C) utilizados en un ELISA para el diagnóstico de MAP, se logró optimizar la especificidad de este ensayo al disminuir la reactividad cruzada de anticuerpos en los sueros de animales infectados experimentalmente con *M. bovis*, comparado con un ELISA comercial que utilizaba un antígeno protoplasmático (PPA-3; Allied monitor). La especificidad del ELISA que utilizó el cocktail de 7 antígenos de MAP resultó ser del 82.35% al reaccionar con el suero de 3 de 17 vacas infectadas con *M. bovis*, mientras que el ELISA PPA-3,

obtuvo 12 de 17 reactores falsos positivos a paratuberculosis (70.5%), resultando en una especificidad del 29.5% (Lu *et al.*, 2012).

Mientras que Biet y colaboradores trabajaron un ELISA basándose en el lipopentapéptido (LP5) de MAP por ser una molécula objetivo en la respuesta inmune humoral. Se observó que particularmente en la fracción peptídica de LP5, se encontraban epítomos específicos que eran reconocidos principalmente por IgM, IgG1 y IgG2; al mismo tiempo, esta molécula era bioquímica y genómicamente diferente de los glipopeptidolípidos producidos por otras especies como *M. smegmatis* y *Mav*.

El ELISA LP5 de MAP mostró una alta reactividad ante los sueros de bovinos y cabras infectadas con paratuberculosis y al mismo tiempo discriminaba los anticuerpos producidos por la infección con *M. bovis* en ganado vacuno, así como los generados por la infección de *M. avium* subsp. *avium* y *M. avium* subsp. *intracellulare* en humanos (Biet *et al.*, 2008).

También se han desarrollado técnicas diagnósticas utilizando microarreglos de ADN y análisis de transcriptoma para identificar si existen diferencias entre los mRNA biomarcadores que expresan las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) de animales infectados con paratuberculosis y los de animales sanos. Se observó que en los animales infectados con MAP había una mayor expresión del inhibidor tisular de metaloproteinasas (TIMP) 1 y TIMP2 además de baja expresión de genes metaloproteinasa de matriz extracelular (MMP) 14, lo que resultaba en deficiencias de remodelación tisular. Al analizar los perfiles génicos de las PBMCs del ganado con paratuberculosis y del grupo control negativo, se observó un aumento en la expresión de genes involucrados en la apoptosis y proteínas implicadas en la transducción de señales como CIDE-A (miembro de la familia del factor de fragmentación del ADN), Bad (miembro de la familia pro-apoptótica BCL-2), TNFR1 y Fas (CD95) en el grupo infectado con MAP (Cousens *et al.*, 2005).

## 7. CONCLUSIONES

No hubo evidencia significativa de reacciones cruzadas entre los anticuerpos de MAP y de *C. pseudotuberculosis* en las pruebas de ELISA e IDGA utilizadas en este estudio para la detección de paratuberculosis en cabras.

La divergencia en los resultados en cuanto a la sensibilidad y la especificidad de estas pruebas, parece depender del tipo de antígeno utilizado y el estatus inmunológico en el que se encuentre cursando el animal al momento de ser muestreado.

Las pruebas serológicas son una herramienta de apoyo para el monitoreo de la paratuberculosis dentro del rebaño; estas pruebas deben utilizarse de manera complementaria junto con técnicas bacteriológicas y/o moleculares para ofrecer un diagnóstico certero al productor.

La PCR anidada para la detección del IS900 fue más sensible que las pruebas serológicas ELISA e IDGA en el diagnóstico de paratuberculosis, pues logró detectar animales seronegativos que excretaban MAP en heces.

## 8. ANEXOS

### Reactivos requeridos para extracción de ADN a partir de heces

#### Acetato de amonio 7.5 M pH 6.3

7.225 g de Acetato de amonio  
12.5 ml de agua destilada

#### TE-Tritón 100X

3.025 ml de Tris HCl 1M pH8  
0.7445 g de EDTA  
1 ml de Tritón 100X  
46.9 ml de agua destilada

#### Isotiocinato de guanidina 5M

29.54 g de Isotiocinato de guanidina  
50 ml de agua destilada

#### HCP (Detergente)

7.6 g Cloruro monohidratado de Hexadecilpiridinio  
1000 ml agua destilada  
Esterilizar en autoclave a 121 °C/ 15 minutos.

#### PBS (Solución amortiguadora de fosfatos)

8 g de Cloruro de sodio (NaCl)  
0.2 g de cloruro de potasio (KCL)  
1.44 g de fosfato dibásico de sodio (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>)  
0.24 g de fosfato monobásico de potasio (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)  
Agua destilada c.b.p. 1 L  
Ajustar el pH a 7.2  
Esterilizar en autoclave a 121 °C/ 15 minutos.

#### PBS- Tween

8 g de Cloruro de sodio (NaCl)  
0.2 g de cloruro de potasio (KCL)  
1.44 g de fosfato dibásico de sodio (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>)  
0.24 g de fosfato monobásico de potasio (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)  
Agua destilada c.b.p. 1 L  
Agregar en agitación permanente 500 µl de Tween 20.  
Ajustar el pH a 7.4  
Esterilizar en autoclave a 121 °C/ 15 minutos.

**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 (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>)

0.24 g de fosfato monobásico de potasio (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)

Agua destilada c.b.p. 1 L

Ajustar el pH a 7.2

**Solución de agarosa al 1%**

1 g de agarosa 100 ml de PBS pH 7.2

**Antígeno**

4 mg de antígeno PPA-3 (Allied Monitor®, USA)

**Reactivos requeridos para ELISA (*C. pseudotuberculosis*)****Buffer de Carbonatos .1 M pH 9.6**

5.3 g Carbonato de sodio (Na<sub>2</sub> CO<sub>3</sub>)

4.2 g Bicarbonato de sodio (NaH CO<sub>3</sub>)

Agua destilada c.b.p. 500 ml

Ajustar el pH a 9.6

**Solución de bloqueo**

1 g Albumina sérica bovina (BSA)

100 ml agua destilada estéril

## LITERATURA CITADA

- Abou-Zeid, C., Harboe, M., Sundsten, B., & Cocito, C. (1985). Cross-reactivity of antigens from the cytoplasm and cell walls of some corynebacteria and mycobacteria. *Journal of Infectious Diseases*, 151(1), 170-178.
- Acosta Hernández, R. V. F., León Vizcaíno, L., Santana González, P., Ferrer Quintana, O., & Suárez, D. Influencia de realizar sucesivas intradermorreacciones en ganado caprino infectado de forma natural por *Corynebacterium pseudotuberculosis*. XX Jornadas Científicas de la SEOC. Madrid. Septiembre de 1995.
- ACUERDO mediante el cual se dan a conocer en los Estados Unidos Mexicanos las enfermedades y plagas exóticas y endémicas de notificación obligatoria de los animales terrestres y acuáticos. Disponible en: <http://sagarpa.gob.mx/normateca/Normateca/ACUERDO%20mediante%20el%20cual%20se%20dan%20enfermedades%20y%20plagas%20exoticas%20y%20end%C3%A9micas%20de%20los%20animales.pdf>
- Alinovi, C. A., Ward, M. P., Lin, T. L., Moore, G. E., & Wu, C. C. (2009). Real-time PCR, compared to liquid and solid culture media and ELISA, for the detection of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*. *Veterinary microbiology*, 136(1), 177-179.
- Anduaga Rosas, G. (2014). Impacto económico de la paratuberculosis en hatos caprinos del suroeste de Guanajuato. Tesis de maestría. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Ashfaq M.K.; Campbell S.G. (1979). "A survey of caseous lymphadenitis and its etiology in goats in United States". *Veterinary Medicine and Small Animal Clinician* 74, 1161-1165.
- Ayele WY, Svastova P, Roubal P, Milan B, Pavlík (2005). *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* cultured from locally and commercially pasteurized cow's milk in the Czech Republic. *Appl Environ Microbiol.*, 71(3):1210-1214.
- Ayele, W. Y., Machackova, M., & Pavlik, I. (2001). The transmission and impact of paratuberculosis infection in domestic and wild ruminants. *Veterinarni Medicina*, 46(7-8), 205-224.
- Barksdale, L., Kim, K. S. (1977). *Mycobacterium*. Barksdale, L., & Kim, K. S. (1977). *Mycobacterium*. *Bacteriological reviews*, 41(1), 217.
- Barry C. E., 3rd, Lee R. E., Mdluli K., Sampson A. E., Schroeder B. G., Slayden R. A., Yuan Y. (1998) Mycolic acids: structure, biosynthesis and physiological functions. *Prog Lipid Res.*; 37(2-3): 143–179.
- Basse, E.O., Collins, M.T. (1997). Study of T-lymphocyte subsets of healthy and *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infected cattle. *Infect. Immun.* 65, 4869-4872.
- Bastida, F., & Juste, R. A. (2011). Paratuberculosis control: a review with a focus on vaccination. *Journal of immune based therapies and vaccines*, 9(1), 1.
- Batey, R. G. (1986). Pathogenesis of Caseous Lymphadenitis in sheep and goats. *Aust. Vet. J.* 63: 269-272.
- Begara-McGorum, I., Wildblood, L.A., Clarke, C.J., Connor, K.M., Stevenson, K., McInnes, C.J., Sharp, J.M., Jones, D.G. (1998). Early immunopathological events in experimental ovine paratuberculosis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 63, 265-287.

- Bercovier, H., & Vincent, V. (2001). Mycobacterial infections in domestic and wild animals due to *Mycobacterium marinum*, *M. fortuitum*, *M. chelonae*, *M. porcinum*, *M. farcinogenes*, *M. smegmatis*, *M. scrofulaceum*, *M. xenopi*, *M. kansasii*, *M. simiae* and *M. genavense*. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*, 20(1), 265-290.
- Bernardelli, A., Cicutta, M. E., Nicola, A., Roibón, W. R., Boehringer, S. I., Benítez, M. C., & Zumárraga, M. (2000). Paratuberculosis ovina en Corrientes, Argentina. *Rev Sci Tech Off Int Epiz*, 19(3), 800-809.
- Bezos, J., Casal, C., Romero, B., Liandris, E., Sánchez, N., Vigo, V., ... & de Juan, L. (2015). Lack of interference with diagnostic testing for tuberculosis in goats experimentally exposed to *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *The Veterinary Journal*, 205(1), 113-115.
- Biet, F., Bay, S., Thibault, V. C., Euphrasie, D., Grayon, M., Ganneau, C., ... & Reyrat, J. M. (2008). Lipopentapeptide induces a strong host humoral response and distinguishes *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from *M. avium* subsp. *avium*. *Vaccine*, 26(2), 257-268.
- Bölske G, Englund S, Johansson K-E and Königsson MH. False positive *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* IS900 PCR and its diagnostic implications. Seventh International Colloquium on Paratuberculosis. Bilbao, Spain: June, 2002.
- Braun, R. K., C. D. Buergelt, R. C. Littell, S. B. Linda, and J. R. Simpson. (1990). Use of an enzyme-linked immunosorbent assay to estimate prevalence of paratuberculosis in cattle of Florida. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 196:1251– 1254.
- Britton, L. E., Cassidy, J. P., O'Donovan, J., Gordon, S. V., Markey, B. (2016). Potential application of emerging diagnostic techniques to the diagnosis of bovine Johne's disease (paratuberculosis). *The Veterinary Journal*, 209, 32-39.
- Brown, C. C., Olander, H. J., Biberstein, E. L., & Morse, S. M. (1986). Use of a toxoid vaccine to protect goats against intradermal challenge exposure to *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *American journal of veterinary research*, 47(5), 1116-1119.
- C,etinkaya, B., Karahan, M., Atil, E., Kalin, R., De Baere, T. & Vaneechoutte, M. (2002). Identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolates from sheep and goats by PCR. *Vet Microbiol* 88, 75–83.
- Carne, H. R., and Onon, E. O. (1978). Action of *Corynebacterium ovis* exotoxin on the endothelial cells of blood vessels. *Nature*, 271: 246-248.
- Chávez, G. G., Trigo, T. F., Svastova, P., & Pavlik, I. (2004). Identificación del polimorfismo genético de aislamientos de *Mycobacterium avium paratuberculosis* de caprinos del centro de México. *Vet Mex*, 35(1), 72-82.
- Chiodini RJ, Van Kruiningen HJ, Merkal RS. (1984). Ruminant Paratuberculosis (Johne's disease): The current status and future prospects. *Cornell Veterinarian*, 74(3):218-262.
- Chiodini RJ. (1993). Abolish *Mycobacterium paratuberculosis* Strain 18. *J.Clin.Microbiol.*, 31:1956-8.
- Chiodini, R. J. (1996). Immunology: resistance to paratuberculosis. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 12(2), 313-343.
- Chiodini, R. J., & Davis, W. C. (1992). The cellular immunology of bovine paratuberculosis: the predominant response is mediated by cytotoxic gamma/delta T lymphocytes which prevent CD4+ activity. *Microbial pathogenesis*, 13(6), 447-463.
- Cho, D., & Collins, M. T. (2006). Comparison of the proteosomes and antigenicities of secreted and cellular proteins produced by *Mycobacterium paratuberculosis*. *Clinical and vaccine immunology*, 13(10), 1155-1161.

- Cho, D., Shin, S. J., Talaat, A. M., & Collins, M. T. (2007). Cloning, expression, purification and serodiagnostic evaluation of fourteen *Mycobacterium paratuberculosis* proteins. *Protein expression and purification*, 53(2), 411-420.
- Clark, D. L., Koziczowski, J. J., Radcliff, R. P., Carlson, R. A., & Ellingson, J. L. E. (2008). Detection of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis: comparing fecal culture versus serum enzyme-linked immunosorbent assay and direct fecal polymerase chain reaction. *Journal of dairy science*, 91(7), 2620-2627.
- Clarke, C. J., Patterson, I. A., Armstrong, K. E., & Low, J. C. (1995). Comparison of the absorbed ELISA and agar gel immunodiffusion test with clinicopathological findings in ovine clinical paratuberculosis. *The Veterinary Record*, 139(25), 618-621.
- Clarke, C.J. (1997). The pathology and pathogenesis of paratuberculosis in ruminants and other species. *J. Comp. Pathol.* 116, 217-261.
- Clarke, C.J., Patterson, I.A., Armstrong, K.E., Low, J.C. (1996). Comparison of the absorbed ELISA and agar gel immunodiffusion test with clinicopathological findings in ovine clinical paratuberculosis. *Vet. Rec.* 139, 618-621.
- Coad M, Clifford DJ, Vordermeier HM, Whelan AO. 2013. The consequences of vaccination with the Johne's disease vaccine, Gudair, on diagnosis of bovine tuberculosis. *Vet. Rec.* 172:266.
- Cocito, C., Gilot, P., Coene, M., de Kesel, M. Y. R. I. A. M., Poupart, P., & Vannuffel, P. (1994). Paratuberculosis. *Clinical Microbiology Reviews*, 7(3), 328-345.
- Collins DM, Hilbink F, West DM, Hosie BD, Cooke MM y de Lisle GW. 1993. Investigation of *Mycobacterium paratuberculosis* in sheep by fecal culture, DNA characterisation and the polymerase chain reaction. *Vet.Rec.*, 133:599-600.
- Collins MT. (1996). Diagnosis of paratuberculosis. *Vet.Clin.North Am.Food Anim.Pract.*, 12(2):357-71.
- Collins MT. (2003). Update on paratuberculosis:1. Epidemiology of Johne's disease and the biology of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Irish Veterinary Journal*, 56 (11): 565-574.
- Collins, D. M., De Lisle, G. W. (1986). Restriction endonuclease analysis of various strains of *Mycobacterium paratuberculosis* isolated from cattle. *American journal of veterinary research*, 47(10), 2226-2229.
- Collins, D.M., Gabric, D.M., De Lisle, G.W. (1989). Identification of a repetitive DNA sequence specific to *Mycobacterium paratuberculosis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 51, 175-178.
- Collins, M. T., Wells, S. J., Petrini, K. R., Collins, J. E., Schultz, R. D., & Whitlock, R. H. (2005). Evaluation of five antibody detection tests for diagnosis of bovine paratuberculosis. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 12(6), 685-692.
- Collins, M.T. (1997). *Mycobacterium paratuberculosis*: a potential food-borne pathogen. *J. Dairy Sci.* 80, 3445- 3448.
- Cousins, D. V., Whittington, R., Marsh, I., Masters, A., Evans, R. J., & Kluver, P. (1999). *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. *Molecular and cellular probes*, 13(6), 431-442.
- Coussens, P. M., Pudrith, C. B., Skovgaard, K., Ren, X., Suchyta, S. P., Stabel, J. R., & Heegaard, P. M. (2005). Johne's disease in cattle is associated with enhanced expression of genes encoding IL-5, GATA-3, tissue inhibitors of matrix metalloproteinases 1 and 2, and factors promoting apoptosis in peripheral blood mononuclear cells. *Veterinary immunology and immunopathology*, 105(3), 221-234.

- Cox, J. C., D. P. Drane, S. L. Jones, S. Ridge, and A. R. Milner. (1991). Development and evaluation of a rapid absorbed enzyme immunoassay test for the diagnosis of Johne's disease in cattle. *Aust. Vet. J.* 68:157–160.
- Cummins C. S., Harris H. (1956). The chemical composition of the cell wall in some gram-positive bacteria and its possible value as a taxonomic character. *J Gen Microbiol.*; 14(3): 583–600.
- Cummins C. S., Harris H. (1958). Studies on the cell-wall composition and taxonomy of Actinomycetales and related groups. *J Gen Microbiol.*; 18(1): 173–189.
- Cummins, C. S. (1962). Chemical composition and antigenic structure of cell walls of *Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Actinomyces* and *Arthrobacter*. *Microbiology*, 28(1), 35-50.
- D. C. Sockett, "Johne's disease eradication and control: regulatory implications," *The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice*, vol. 12, no. 2, pp. 431–440, 1996.
- Davis, J. M., & Ramakrishnan, L. (2009). The role of the granuloma in expansion and dissemination of early tuberculous infection. *Cell*, 136(1), 37-49.
- de Sá Guimarães, A., do Carmo, F. B., Pauletti, R. B., Seyffert, N., Ribeiro, D., Lage, A. P. & Gouveia, A. M. G. (2011). Caseous lymphadenitis: epidemiology, diagnosis, and control. *I/OAB J*, 2, 33-43.
- Dercksen, D. P., Brinkhof, J. M. A., Dekker-Nooren, T., van Maanen, K., Bode, C. F., Baird, G. & Kamp, E. M. (2000). A comparison of four serological tests for the diagnosis of caseous lymphadenitis in sheep and goats. *Vet Microbiol* 75, 167–175.
- Doran, T., Tizard, M., Millar, D., Ford, J., Sumar, N., Loughlin, M., & Hermon-Taylor, J. (1997). IS900 targets translation initiation signals in *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* to facilitate expression of its *hed* gene. *Microbiology*, 143(2), 547-552.
- Dorella, F. A., Pacheco, L. G. C., Oliveira, S. C., Miyoshi, A. & Azevedo, V. (2006). *Corynebacterium pseudotuberculosis*: microbiology, biochemical properties, pathogenesis and molecular studies of virulence. *Vet Res* 37, 201–218.
- Ellingson JL, Anderson JL, Koziczkowski JJ, Radcliff RP, Sloan SJ, Allen SE. (2005). Detection of viable *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in retail pasteurized whole milk by two culture methods and PCR. *J Food Prot.*; 68(5):966-972.
- Endsley JJ, Roth JA, Ridpath J, Neill J. 2003. Maternal antibody blocks humoral but not T cell responses to BVDV. *Biologicals* 31:123–125.
- Englund, S., Bölske, G., & Johansson, K. E. (2002). An IS900-like sequence found in a *Mycobacterium* sp. other than *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *FEMS Microbiology Letters*, 209(2), 267-271.
- Erume, J., Spersger, J., & Rosengarten, R. (2001). Rapid detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from cattle and zoo animals by nested PCR. *African health sciences*, 1(2), 83-89.
- Estevao Belchior, S. G., Gallardo, A. A., Abalos, M. A., Alvarez, L. A., Nuñez, N. C., Guevara, D., & Jensen, O. (2009). *Corynebacterium pseudotuberculosis*, potencial agente zoonótico. Revisión de casos. *REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria*, 10(10).
- Estevao Belchior, S., Gallardo, A., Abalos, A., Jodor, N., & Jensen, O. (2006). Actualización sobre linfadenitis caseosa: el agente etiológico y la enfermedad. *Rev Vet Arg*, 224, 258-278.
- Estévez-Denaives, I., Hernández-Castro, R., Trujillo-García, A. M., & Chávez-Gris, G. (2007). Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in goat and sheep

- flocks in Mexico. *Small ruminant research*, 72(2), 209-213.
- Facciuolo, A., Kelton, D. F., & Mutharia, L. M. (2013). Novel secreted antigens of *Mycobacterium paratuberculosis* as serodiagnostic biomarkers for Johne's disease in cattle. *Clinical and Vaccine Immunology*, 20(12), 1783-1791.
  - Favila HL, Guzmán RCC2, Santillán MA1, Díaz AE1, Córdoba LD1, Martínez CAG3, Gallaga ME3 (2009). Estudio epidemiológico de la paratuberculosis caprina en Guanajuato, Puebla y Oaxaca (resultados preliminares). XLV Reunión Nacional de Investigación Pecuaria. Saltillo, Coahuila
  - Favila-Humara, Hernández-Castro, Chávez-Gris . (2007). Detección de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* en leche de cabras por PCR en México. Vº Congreso de Especialistas en Pequeños Rumiantes y Camélidos Sudamericanos, Mendoza, Argentina.
  - Feathersone, C. (1997) M cells: portals to the mucosal immune system. *Lancet* 350, 1230.
  - 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.
  - Gallaga Maldonado, E. (2011). Determinación de la seroprevalencia y factores de riesgo de la paratuberculosis en las regiones caprinas de Libres y la Mixteca en el estado de Puebla. Tesis de maestría. Universidad Nacional Autónoma de México.
  - Gao, A., Mutharia, L., Raymond, M., & Odumeru, J. (2007). Improved template DNA preparation procedure for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk by PCR. *Journal of microbiological methods*, 69(2), 417-420.
  - Garcia Marin, J. F., Chavez, G., Aduriz, J. J., Perez, V., Juste, R. A., & Badiola, J. J. (1991, September). Prevalence of paratuberculosis in infected goat flocks and comparison of different methods of diagnosis. In *Proceedings of the Third International Colloquium on Paratuberculosis*, eds. RJ Chiodini, and JM Kreeger, Orlando, Florida.
  - Garrido, J. M., Cortabarría, N., Oguiza, J. A., Aduriz, G., & Juste, R. A. (2000). Use of a PCR method on fecal samples for diagnosis of sheep paratuberculosis. *Veterinary microbiology*, 77(3), 379-386.
  - Garrido, J.M., Aduriz, G., Juste, R.A., Geijo, M.V. (2000a). Los métodos de diagnóstico de la paratuberculosis en el ganado vacuno. *Bov*. 93, 49-61.
  - Gilmour, N.J. (1976). The pathogenesis, diagnosis and control of Johne's disease. *Vet. Rec*. 99, 433-434.
  - Goodfellow M., Wayne L.G. (1982). Taxonomy and nomenclature. In *The biology of the mycobacteria*, Vol. 1. Physiology, identification and classification (C. Ratledge & J. Stanford, eds). Academic Press, London, 471-521.
  - Goodger, W. J., Collins, M. T., Nordlund, K. V., Eisele, C., Pelletier, J., Thomas, C. B., & Sockett, D. C. (1996). Epidemiologic study of on-farm management practices associated with prevalence of *Mycobacterium paratuberculosis* infections in dairy cattle. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 208(11), 1877-1881.
  - Grant, I. R., Williams, A. G., Rowe, M. T., & Muir, D. D. (2005). Efficacy of Various Pasteurization Time-Temperature Conditions in Combination with Homogenization on Inactivation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Milk. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(6), 2853–2861.
  - Green, E.P., Tizard, M.L., Moss, M.T., Thompson, J., Winterbourne, D.J., McFadden, J.J., Hermon-Taylor, J. (1989). Sequence and characteristics of IS900, an insertion element identified in a human Crohn's disease isolate of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Nucleic*

Acids Res. 17, 9063-9073.

- Gumber, S., Eamens, G., & Whittington, R. J. (2006). Evaluation of a Pourquier ELISA kit in relation to agar gel immunodiffusion (AGID) test for assessment of the humoral immune response in sheep and goats with and without *Mycobacterium paratuberculosis* infection. *Veterinary microbiology*, 115(1), 91-101.
- Gwozdz, J. M., Thompson, K. G., Manktelow, B. W., Murray, A., & West, D. M. (2000). Vaccination against paratuberculosis of lambs already infected experimentally with *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis. *Australian Veterinary Journal*, 78(8), 560-566.
- Harris, N. B., & Barletta, R. G. (2001). *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Veterinary Medicine. *Clinical Microbiology Reviews*, 14(3), 489–512.
- Hawkey, P. M. (1994). The role of polymerase chain reaction in the diagnosis of mycobacterial infections. *Reviews in medical microbiology*, 5(1), 27-32.
- He, T., Tang, C., Xu, S., Moyana, T., & Xiang, J. (2007). Interferon gamma stimulates cellular maturation of dendritic cell line DC2. 4 leading to induction of efficient cytotoxic T cell responses and antitumor immunity. *Cell Mol Immunol*, 4(2), 105-111.
- Hilbink, F., West, D. M., De Lisle, G. W., Kittelberger, R., Hosie, B. D., Hutton, J., & Penrose, M. (1994). Comparison of a complement fixation test, a gel diffusion test and two absorbed and unabsorbed ELISAs for the diagnosis of paratuberculosis in sheep. *Veterinary microbiology*, 41(1-2), 107-116.
- Hodgson A.L.M., Krywult J., Corner L.A., Rothel J.S., Radford A.J. (1992) Rational attenuation of *Corynebacterium pseudotuberculosis*: potential cheesy gland vaccine and live delivery vehicle, *Infect. Immun.* 2900– 2905.
- Hostetter J, Steadham E, Haynes J, Bailey T y Cheville N. (2003). Phagosomal maturation and intracellular survival of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in J774 cells. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, 26(4):269-83.
- Imaz, M. S., and E. Zerbini. (2000). Antibody response to culture filtrate antigens of *Mycobacterium tuberculosis* during and after treatment of tuberculosis patients. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 4:562–569.
- Johne, H. A., Frothingham, L. (1895). Ein eigenthuemlicher fall von tuberculose beim rind. *Dtsch. Z. Tiermed. Pathol*, 21, 438-454.
- Jolly, R.D. (1965). The pathogenic action of the exotoxin of *Corynebacterium ovis*. *J. Comp. Pathol.* 75: 417-431.
- Jorge R.J.M., Guzmán R.R., López D.C.A, Díaz A.E., Santillán F.M.A., Córdova L.D., Valencia P.M., Favila H.L.C, Mejía H.J. Impacto económico de la paratuberculosis caprina en explotaciones lecheras del estado de Guanajuato. En: Marcof ACF ed. *La Ganadería ante el agotamiento de los paradigmas dominantes*. Universidad de Chapingo 2011; Vol2: 347-358.
- Jorgensen J.B. (1977): Survival of *Mycobacterium paratuberculosis* in slurry. *Nord. Vet. Med.*, 29, 267–270.
- Juste RA, Garrido JM, Aduriz G. (2000). El agente causal de la paratuberculosis y su situación taxonómica; 93:13-28.
- Juste RA, Marco JC, Saez de Ocariz C y Aduriz JJ. (1991). Comparison of different media for the isolation of small ruminant strains of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Vet. Microbiol.*, 28:385-90.

- Juste, R. A., Marin, J. G., Peris, B., de Ocariz, C. S., & Badiola, J. J. (1994). Experimental infection of vaccinated and non-vaccinated lambs with *Mycobacterium paratuberculosis*. *Journal of comparative pathology*, 110(2), 185-194.
- Khalifeh MS, Stabel JR (2004) Effects of gamma interferon, interleukin-10, and transforming growth factor beta on the survival of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in monocyte-derived macrophages from naturally infected cattle. *Infect Immun* 72:1974–1982
- Khamis, A., Raoult, D. & La Scola, B. (2004). rpoB gene sequencing for identification of *Corynebacterium* species. *J Clin Microbiol* 42, 3925–3931.
- Khamis, A., Raoult, D. & La Scola, B. (2005). Comparison between rpoB and 16S rRNA gene sequencing for molecular identification of 168 clinical isolates of *Corynebacterium*. *J Clin Microbiol* 43, 1934–1936.
- Kormendy, B. (1988). Diagnostic value of mammalian, avian and johnin PPD tuberculins in cattle herds infected by *Mycobacterium paratuberculosis*. *Acta Vet. Hung.* 36, 177-183.
- Körmendy, B. (1994). The effect of vaccination on the prevalence of paratuberculosis in large dairy herds. *Veterinary microbiology*, 41(1-2), 117-125.
- Krt B; Ocepek M, Pislak M, Juntas P, Pogacnik M, Cvetnicž, Correlation between seropositive reactors to paratuberculosis and to pseudotuberculosis in sheep. Seventh International Colloquium on Paratuberculosis. Bilbao, Spain: June, 2002.
- Lederer, E., Adam, A., Ciorbaru, R., Petit, J. F., & Wietzerbin, J. (1975). Cell walls of mycobacteria and related organisms; chemistry and immunostimulant properties. *Molecular and cellular biochemistry*, 7(2), 87-104.
- Leroy, B., Roupie, V., Noël-Georis, I., Rosseels, V., Walravens, K., Govaerts, M., ... & Wattiez, R. (2007). Antigen discovery: a postgenomic approach to paratuberculosis diagnosis. *Proteomics*, 7(7), 1164-1176.
- Lipsky B.A., Goldberger A.C., Tompkins L.S., Plorde J.J. (1982) Infections caused by non-diphtheria corynebacteria, *Rev. Infect. Dis.* 4 1220–1235.
- Lodam, A. N., M. V. Reddy, P. Narang, O. P. Gupta, and B. C. Harinath. (1996). Fractionation, analysis and diagnostic utility of *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra excretory-secretory antigen in pulmonary.
- Lovell R, Levi ML y Francis J. (1944). Studies on the survival of John's bacilli. *J.Comp.Pathol.*, 34:120-9.
- MacHugh, D. E., Gormley, E., Park, S. D. E., Browne, J. A., Taraktsoglou, M., O'Farrelly, C., Meade, K. G. (2009). Gene expression profiling of the host response to *Mycobacterium bovis* infection in cattle. *Transboundary and emerging diseases*, 56(6–7), 204-214.
- Magombedze, G., Eda, S., & Ganusov, V. V. (2014). Competition for antigen between Th1 and Th2 responses determines the timing of the immune response switch during *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection in ruminants. *PLoS Comput Biol*, 10(1), e1003414.
- Majumdar N, Bhattacharjee S, Bhattacharyya S, Dey R, Guha P, et al. (2008) Restoration of impaired free radical generation and proinflammatory cytokines by NCP-1 in mycobacterial pathogenesis. *Scand J Immunol* 67: 329–339.
- Manning, E. J., & Collins, M. T. (2001). *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: pathogen, pathogenesis and diagnosis. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*, 20(1), 133-150.

- Manning, E. J., Cushing, H. F., Hietala, S., & Wolf, C. B. (2007). Impact of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection on serologic surveillance for Johne's disease in goats. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 19(2), 187-190.
- Martínez Herrera, D. I., Sarabia-Bueno, C. D. C., Peniche-Cardena, A. E. D. J., Villagómez-Cortés, J. A., Magdaleno-Méndez, A., Hernández-Ruiz, S. G., ... & Flores-Castro, R. (2012). Seroepidemiology of goat paratuberculosis in five municipalities of central Veracruz, Mexico. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 15(S2).
- McEwen, A. D. (1939). Investigations on Johne's disease of sheep. *Journal of Comparative Pathology and Therapeutics*, 52, 69-87.
- McKenna, S. L. B., Keefe, G. P., Tiwari, A., VanLeeuwen, J., & Barkema, H. W. (2006). Johne's disease in Canada Part II: Disease impacts, risk factors, and control programs for dairy producers. *The Canadian Veterinary Journal*, 47(11), 1089–1099.
- McNamara, P. J., Cuevas, W. A. & Songer, J. G. (1995). Toxic phospholipases D of *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *C. ulcerans* and *Arcanobacterium haemolyticum*: cloning and sequence homology. *Gene* 156, 113–118.
- Meade, K. G., Gormley, E., Doyle, M. B., Fitzsimons, T., O'Farrelly, C., Costello, E., MacHugh, D. E. (2007). Innate gene repression associated with *Mycobacterium bovis* infection in cattle: toward a gene signature of disease. *Bmc Genomics*, 8(1), 1.
- Merchant I.A., Packer R.A. (1967) The Genus *Corynebacterium*, in: Merchant I.A., Packer R.A. (Eds.), *Veterinary bacteriology and virology*, The Iowa State University Press, Iowa, pp. 425–440.
- Merkal, R. S., Larsen, A. B., & Booth, G. D. (1975). Analysis of the effect of inapparent bovine paratuberculosis. *American journal of veterinary research*, 36(6), 837-838.
- Merkal, R.S. (1984). Paratuberculosis: advances in cultural, serologic, and vaccination methods. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 184, 939-943.
- Milner, A.R., Lepper, A.W., Symonds, W.N., Gruner, E. (1987). Analysis by ELISA and Western blotting of antibody reactivities in cattle infected with *Mycobacterium paratuberculosis* after absorption of serum with *M. phlei*. *Res. Vet. Sci.* 42, 140-144.
- Miranda, B. M. V. (2005). Evaluación del impacto económico de la paratuberculosis en ganado bovino lechero (Sistema intensivo), en el Complejo Agropecuario Industrial de Tizayuca, Hidalgo. México DF: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM.
- Mitchell RM, Medley GF, Collins MT, Schukken YH (2012) A meta-analysis of the effect of dose and age at exposure on shedding of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis (MAP) in experimentally infected calves and cows. *Epidemiol Infect* 140:231–246
- Mold JE, Michaelsson J, Burt TD, Muench MO, Beckerman KP, Busch MP, Lee TH, Nixon DF, McCune JM. 2008. Maternal alloantigens promote the development of tolerogenic fetal regulatory T cells in utero. *Science* 322:1562–1565.
- Momotani, E., Whipple, D.L., Thiermann, A.B., Chevillat, N.F. (1988). Role of M cells and macrophages in the entrance of *Mycobacterium paratuberculosis* into domes of ileal Peyer's patches in calves. *Vet. Pathol.* 25, 131-137.
- Mon, M. L., Viale, M., Baschetti, G., Alvarado Pinedo, F., Gioffre, A., Travería, G., & Romano, M. I. (2012). Search for *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis antigens for the diagnosis of paratuberculosis. *Veterinary medicine international*, 2012.
- Morrison, N.E. (1965). Circumvention of the mycobactin requirement of *Mycobacterium paratuberculosis*. *J. Bacteriol.* 89, 762-769.
- Motiwala, A. S., Amonsin, A., Strother, M., Manning, E. J., Kapur, V., & Sreevatsan, S.

- (2004). Molecular epidemiology of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis isolates recovered from wild animal species. *Journal of clinical microbiology*, 42(4), 1703-1712.
- Munjal, S. K., Boehmer, J., Beyerbach, M., Strutzberg-Minder, K., & Homuth, M. (2004). Evaluation of a LAM ELISA for diagnosis of paratuberculosis in sheep and goats. *Veterinary microbiology*, 103(1), 107-114.
  - Munjal, S.K., Tripathi, B.N., Paliwal, O.P., (2005). Progressive immunopathological changes during early stages of experimental infection of goats with Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis. *Vet. Pathol.* 42, 427–436.
  - Naser, S. A., Felix, J., Liping, H., Romero, C., Naser, N., Walsh, A., & Safranek, W. (1999). Occurrence of the IS 900 gene in Mycobacterium avium complex derived from HIV patients. *Molecular and cellular probes*, 13(5), 367-372.
  - Nassar, A. F. C., Miyashiro, S., Gregori, F., Piatti, R. M., Daniel, G. T., & Gregory, L. (2014). Standardization of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of antibodies anti-Corynebacterium pseudotuberculosis in sheep. *Small Ruminant Research*, 116(2), 229-232.
  - Nielsen, S. S., & Toft, N. (2006). Age-specific characteristics of ELISA and fecal culture for purpose-specific testing for paratuberculosis. *Journal of dairy science*, 89(2), 569-579.
  - Nielsen, S. S., & Toft, N. (2008). Ante mortem diagnosis of paratuberculosis: a review of accuracies of ELISA, interferon- $\gamma$  assay and faecal culture techniques. *Veterinary microbiology*, 129(3), 217-235.
  - Nielsen, S.S., Nielsen, K.K., Huda, A., Condrón, R., Collins, M.T. 2001. Diagnostic techniques for paratuberculosis. *Bulletin of the international dairy federation. IDF.*
  - Nigou J, Gilleron M, Rojas M, Garcia LF, Thurnher M, et al. (2002) Mycobacterial lipoarabinomannans: modulators of dendritic cell function and the apoptotic response. *Microb Infect* 4: 945–953.
  - Osterstock, J. B., Fosgate, G. T., Norby, B., Manning, E. J., Collins, M. T., & Roussel, A. J. (2007). Contribution of environmental mycobacteria to false-positive serum ELISA results for paratuberculosis. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 230(6), 896-901.
  - Pacheco, L. G., Pena, R. R., Castro, T. L., Dorella, F. A., Bahia, R. C., Carminati, R., ... & Miyoshi, A. (2007). Multiplex PCR assay for identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* from pure cultures and for rapid detection of this pathogen in clinical samples. *Journal of medical microbiology*, 56(4), 480-486.
  - Patterson, D.S., Alien, W.M., Lloyd, M.K. (1967). Clinical Johne's as a protein losing enteropathy. *Vet. Rec.* 81, 717-718.
  - Pavlik, I., Ayele, W. Y., Fischer, O., Matlova, L., Svastova, P., Bartos, M., ... & Lamka, J. (2002). Role of the external environment, plants and non-vertebrates for the spread of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis. In *7th International Colloquium on Paratuberculosis, Spain*.
  - Pearson, J.E. (Ed.), 2014. Paratuberculosis (Johne's Disease). In: *OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*. [http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/tahm/2.01.11\\_PARATB.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.01.11_PARATB.pdf) .
  - Peel MM, Palmer GG, Stacpoole AM, Kerr TK (1997) Human lymphadenitis due to Corynebacterium pseudotuberculosis: report of ten cases from Australia and review. *Am J Med* 24: 185-191.
  - Pekelder, J. J. (2000). Caseous lymphadenitis. *MARTIN, WB; AITEKEN, ID Diseases of Sheep*, 3, 270-274.

- Pérez, V., Tellechea, J., Corpa, J.M., Gutiérrez, M., García Marín, J.F. (1999). Relation between pathologic findings and cellular immune responses in sheep with naturally acquired paratuberculosis. *Am. J. Vet. Res.* 60, 123-127.
- Philpott M. (1993): The dangers of disease transmission by artificial insemination and embryo transfer. *Brit. Vet. J.*, 149, 339–369.
- Piontkowski M.D., Shivvers D.W. (1998) Evaluation of a commercially available vaccine against *Corynebacterium pseudotuberculosis* for use in sheep, *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 212 1765–1768.
- Piontkowski, M. D., & Shivvers, D. W. (1998). Evaluation of a commercially available vaccine against *Corynebacterium pseudotuberculosis* for use in sheep. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 212(11), 1765-1768.
- Radostits, O. M., Gay, C. C., Blood, D. C., & Hinchcliff, K. W. (1971). *Medicina veterinaria: tratado de las enfermedades del ganado bovino, ovino, porcino, caprino y equino.*
- Rambourg A.. Glycoproteins at the surface of animal cells. *International Review of Cytology* 1971; 31:57-114.
- Rastogi N., Legrand E., Sola C. The mycobacteria: an introduction to nomenclature and pathogenesis. *Rev Sci Tech.* 2001 April; 20: 21–54.
- Retamal, P., Ríos, M., Cheuquepán, F., Abalos, P., Pizarro-Lucero, J., Borie, C., Gutierrez, J. (2011) Host associated polymorphisms in the *Corynebacterium pseudotuberculosis rpoB* gene sequence. *Vet. Microbiol.* 151 (3-4), 400–403.
- Richards, WD., Thoen, CO. (1977). Effect of freezing on the viability of *Mycobacterium paratuberculosis* in bovine feces. *J. Clin. Microbiol.* 6, 392-395.
- Ridge, S. E., Morgan, I. R., Sockett, D. C., Collins, M. T., Condrón, R. J., Skilbeck, N. W., & Webber, J. J. (1991). Comparison of the Johne's absorbed EIA and the complement-fixation test for the diagnosis of Johne's disease in cattle. *Australian veterinary journal*, 68(8), 253-257.
- Robbe-Austerman, S., Gardner, I. A., Thomsen, B. V., Morriscal, D. G., Martin, B. M., Palmer, M. V., ... & Ewing, C. (2006). Sensitivity and specificity of the agar-gel-immunodiffusion test, ELISA and the skin test for detection of paratuberculosis in United States Midwest sheep populations. *Veterinary research*, 37(4), 553-564.
- Ruiz, L., Jerónimo, R., Barrera Valle, M., & Frías, M. (2007). Linfadenitis Caseosa I: Aspectos históricos, etiológicos y clínicos. *Rev Electr Clín Vet.*
- Saunders, B. M., & Cooper, A. M. (2000). Restraining mycobacteria: role of granulomas in mycobacterial infections. *Immunology and cell biology*, 78(4), 334-341.
- Saxegaard, F. (1985). Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from intestinal mucosa and mesenteric lymph nodes of goats by use of selective Dubos medium. *J. Clin. Microbiol.* 22, 312-313.
- Schwartz BD, De Voss JJ. (2001). Structure and absolute configuration of mycobactin J. *Tetrahedron Letters* 42, 3653-3655.
- Secott TE, Lin TL y Wu CC. (2002). Fibronectin attachment protein is necessary for efficient attachment and invasion of epithelial cells by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Infect.Immun.*, 70(5):2670-5.
- Secott TE, Lin TL y Wu CC. (2004). *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* fibronectin attachment protein facilitates M-cell targeting and invasion through a fibronectin bridge with host integrins. *Infect.Immun.*, 72(7):3724-32.
- Sherman, D. M., Markham, R. J., & Bates, F. (1984). Agar gel immunodiffusion test for diagnosis of clinical paratuberculosis in cattle. *Journal of the American Veterinary Medical*

*Association*, 185(2), 179-182.

- Shigidi, M. T. A. (1979). Comparison of five serological tests for the diagnosis of experimental *Corynebacterium ovis* infection in sheep. *British veterinary journal*.
- Shin, S. J., Cho, D., & Collins, M. T. (2008). Diagnosis of bovine paratuberculosis by a novel enzyme-linked immunosorbent assay based on early secreted antigens of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Clinical and Vaccine Immunology*, 15(8), 1277-1281.
- Shulaw, W.P., Bech-Nielsen, S., Rings, D.M., Getzy, D.M., Woodruff, T.S. (1993). Serodiagnosis of paratuberculosis in sheep by use of agar gel immunodiffusion. *Am. J. Vet. Res.* 54, 13-19.
- Sigurdardottir OG, Press CM, Saxegaard F y Evensen O. (1999). Bacterial isolation, immunological response, and histopathological lesions during the early subclinical phase of experimental infection of goat kids with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Vet.Pathol.*, 36:542-50.
- Soares, S.C., Silva, A., Trost, E., Blom, J., Ramos, R., Carneiro, A., Ali, A., Santos, A.R., Pinto, A.C., Diniz, C., Barbosa, E.G., Dorella, F.A., Aburjaile, F., Rocha, F.S., Nascimento, K.K., Guimarães, L.C., Almeida, S., Hassan, S.S., Bakhtiar, S.M., Pereira, U.P., Abreu, V.A., Schneider, M.P., Miyoshi, A., Tauch, A., Azevedo, V. (2013) The pan-genome of the animal pathogen *Corynebacterium pseudotuberculosis* reveals differences in genome plasticity between the biovar *ovis* and *equi* strains. *PLoS One* 8 (1).
- Sockett, D. C., Conrad, T. A., Thomas, C. B., & Collins, M. T. (1992). Evaluation of four serological tests for bovine paratuberculosis. *Journal of clinical microbiology*, 30(5), 1134-1139.
- Sockett, D. C., Conrad, T. A., Thomas, C. B., & Collins, M. T. (1992). Evaluation of four serological tests for bovine paratuberculosis. *Journal of clinical microbiology*, 30(5), 1134-1139.
- Songer, J.G., Beckenbach, K., Marshall, M.M., Olson, G.B., Kelley, L., (1988). Biochemical and genetic characterization of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Am. J. Vet. Res.* 49, 223±226.
- Stabel JR (2000) Transitions in immune responses to *Mycobacterium paratuberculosis*. *Vet Microbiol* 77:465–473
- Stabel, J. R., Waters, W. R., Bannantine, J. P., & Palmer, M. V. (2013). Disparate Host Immunity to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* Antigens in Calves Inoculated with *M. avium* subsp. *paratuberculosis*, *M. avium* subsp. *avium*, *M. kansasii*, and *M. bovis*. *Clinical and Vaccine Immunology*, 20(6), 848-857.
- Stackebrandt, E., Rainey, F. A., Ward-Rainey, N. L. (1997). Proposal for a new hierarchic classification system, Actinobacteria classis nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 47(2), 479-491.
- Stamp, J.T., Watt, J.A. (1954). Johne's disease in sheep. *J. Comp. Pathol.* 64, 26-40.
- Stanford, K., Brogden, K. A., McClelland, L. A., Kozub, G. C., & Audibert, F. (1998). The incidence of caseous lymphadenitis in Alberta sheep and assessment of impact by vaccination with commercial and experimental vaccines. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 62(1), 38.
- Stehman, S.M. (1996). Paratuberculosis in small ruminants, deer, and South American camelids. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 12, 441-455.
- Stewart, D. J., Vaughan, J. A., Stiles, P. L., Noske, P. J., Tizard, M. L. V., Prowse, S. J., ... & Jones, S. L. (2006). A long-term study in Angora goats experimentally infected with

- Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: clinical disease, faecal culture and immunological studies. *Veterinary microbiology*, 113(1), 13-24.
- Stewart, D. J., Vaughan, J. A., Stiles, P. L., Noske, P. J., Tizard, M. L. V., Prowse, S. J., ... & Jones, S. L. (2007). A long-term bacteriological and immunological study in Holstein-Friesian cattle experimentally infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and necropsy culture results for Holstein-Friesian cattle, Merino sheep and Angora goats. *Veterinary microbiology*, 122(1), 83-96.
  - Storset, A. K., Hasvold, H. J., Valheim, M., Brun-Hansen, H., Berntsen, G., Whist, S. K., ... & Larsen, H. J. S. (2001). Subclinical *paratuberculosis* in goats following experimental infection: an immunological and microbiological study. *Veterinary immunology and immunopathology*, 80(3), 271-287.
  - Sung N, Collins MT (2000). Thermal tolerance of *Mycobacterium paratuberculosis*, *Applied and Environmental Microbiology*; 64 (3): 999-1005.
  - Sutherland, S. S., Hart, R. A., & Buller, N. B. (1996). Genetic differences between nitrate-negative and nitrate-positive *C. pseudotuberculosis* strains using restriction fragment length polymorphisms. *Veterinary microbiology*, 49(1), 1-9.
  - Sweeney RW, Jones DE, Habecker P, Scott P (1998) Interferon-gamma and interleukin 4 gene expression in cows infected with *Mycobacterium paratuberculosis*. *Am J Vet Res* 59:842–847
  - Sweeney, R. W., Whitlock, R. H., Hamir, A. N., Rosenberger, A. E., & Herr, S. A. (1992). Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* after oral inoculation in uninfected cattle. *American journal of veterinary research*, 53(8), 1312-1314.
  - Sweeney, R. W., Whitlock, R. H., McAdams, S., & Fyock, T. (2006). Longitudinal study of ELISA seroreactivity to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in infected cattle and culture-negative herd mates. *Journal of veterinary diagnostic investigation*, 18(1), 2-6.
  - Sweeney, R.W., Whitlock, R.H., Rosenberger, A.E. (1992a). *Mycobacterium paratuberculosis* isolated from fetuses of infected cows not manifesting signs of the disease. *Am. J. Vet. Res.* 53, 477-480.
  - Taddei, R., Barbieri, I., Pacciarini, M. L., Fallacara, F., Belletti, G. L., & Arrigoni, N. (2008). *Mycobacterium porcinum* strains isolated from bovine bulk milk: implications for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* detection by PCR and culture. *Veterinary microbiology*, 130(3), 338-347.
  - Tashjian JJ, Campbell SG (1983) Interaction between caprine macrophages and *Corynebacterium pseudotuberculosis*: an electron microscopy study. *Am J Vet Res* 44: 690-693.
  - Taylor, T.K., Wilks, C.R., McQueen, D.S. (1981). Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from the milk of a cow with Johne's disease. *Vet. Rec.* 109, 532-533.
  - Tewari, D., Hovingh, E., Linscott, R., Martel, E., Lawrence, J., Wolfgang, D., & Griswold, D. (2014). *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* Antibody Response, Fecal Shedding, and Antibody Cross-Reactivity to *Mycobacterium bovis* in *M. avium* subsp. *paratuberculosis*-Infected Cattle Herds Vaccinated against Johne's Disease. *Clinical and Vaccine Immunology*, 21(5), 698-703
  - Thorel MF, Krichevsky M, Levy-Frebault VV. (1990). Numerical taxonomy of mycobactin-dependent mycobacteria, emended description of *Mycobacterium avium*, and description of *Mycobacterium avium* subsp. *Avium* subsp. Nov., *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* subsp. Nov., and *Mycobacterium avium* subsp. *Silvaticum* subsp. Nov. *Int J Syst Bacteriol.*, 40(3):254-260.

- Tiwari, A., VanLeeuwen, J. A., McKenna, S. L. B., Keefe, G. P., & Barkema, H. W. (2006). Johne's disease in Canada: Part I: Clinical symptoms, pathophysiology, diagnosis, and prevalence in dairy herds. *The Canadian Veterinary Journal*, 47(9), 874–882.
- Tripathi BN, Periasamy S, Paliwal OP, Singh NH (2006). Comparison of IS900 tissue PCR, bacterial culture, johnin and serological tests for diagnosis of naturally occurring paratuberculosis in goats. *Vet Microbiol.*; 116(1-3):129-137.
- Tripathi, B. N., Sonawane, G. G., Munjal, S. K., Bind, R. B., Gradinaru, D., Dubey, S. C., ... & Nielsen, S. S. (2008). Seroprevalence of paratuberculosis in selected population of ruminants in India. In *Proceedings of the 9th International Colloquium on Paratuberculosis, Tsukuba, Japan, 29 October-2 November 2007* (pp. 246-249). International Association for Paratuberculosis
- Twort, F. W., Ingram, G. L. Y. (1912). A method for isolating and cultivating the *Mycobacterium enteritidis chronicae pseudotuberculosis bovis*, Johne, and some experiments on the preparation of a diagnostic vaccine for pseudo-tuberculous enteritis of bovines. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Containing Papers of a Biological Character*, 84(575), 517-542.
- Van der Giessen, J. W., Haring, R. M., Vauclare, E., Eger, A., Haagsma, J., & Van der Zeijst, B. A. (1992). Evaluation of the abilities of three diagnostic tests based on the polymerase chain reaction to detect *Mycobacterium paratuberculosis* in cattle: application in a control program. *Journal of clinical microbiology*, 30(5), 1216-1219.
- Van Weering, H., Van Schaik, G., Van Der Meulen, A., Waal, M., Franken, P., & Van Maanen, K. (2007). Diagnostic performance of the Pourquier ELISA for detection of antibodies against *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis in individual milk and bulk milk samples of dairy herds. *Veterinary microbiology*, 125(1), 49-58.
- Waters, W. R., J. M. Miller, M. V. Palmer, J. R. Stabel, D. E. Jones, K. A. Koistinen, E. M. Steadham, M. J. Hamilton, W. C. Davis, and J. P. Bannantine. (2003). Early induction of humoral and cellular immune responses during experimental *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection of calves. *Infect. Immun.* 71:5130–5138.
- Waters, W. R., Stabel, J. R., Sacco, R. E., Harp, J. A., Pesch, B. A., & Wannemuehler, M. J. (1999). Antigen-specific B-cell unresponsiveness induced by chronic *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection of cattle. *Infection and immunity*, 67(4), 1593-1598.
- Weiss DJ, Souza CD (2008) Review paper: modulation of mononuclear phagocyte function by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Vet Pathol* 45:829–841
- Wells, S. J., Collins, M. T., Faaberg, K. S., Wees, C., Tavorpanich, S., Petrini, K. R., ... & Whitlock, R. H. (2006). Evaluation of a rapid fecal PCR test for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in dairy cattle. *Clinical and Vaccine Immunology*, 13(10), 1125-1130.
- Whitlock, R.H (1992) Diarrhea in cattle. In: Anderson, N.V. (ed.) *Veterinary Gastroenterology*, 2nd edn. Lea&Febiger, Philadelphia, p. 783.
- Whitlock, R.H (2009). Johne's disease. In: Smith, B.P. (ed.) *Large Animal Internal Medicine*, 4th edn. Mosby Elsevier, St Louis, pp. 881-887.
- Whitlock, R.H., Rosenberg, A.E. (1990). Faecal culture protocol for *Mycobacterium paratuberculosis*, a recommended procedure. En: *Proceedings of the 94th Annual Meetings US Animal Health Association*. Colorado, EEUU. 94, 280-285. L

- Whittington RJ, Marshall DJ, Nicholls PJ, Marsh IB y Reddacliff LA. (2004). Survival and dormancy of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in the environment. *Appl Environ Microbiol.*, 70(5): 2989-3004.
- Whittington RJ, Windsor PA. (2009). In utero infection of cattle with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: a critical review and meta-analysis. *Vet J.* 179:60–69.
- Whittington, R. J., Eamens, G. J., & Cousins, D. V. (2003). Specificity of absorbed ELISA and agar gel immuno-diffusion tests for paratuberculosis in goats with observations about use of these tests in infected goats. *Australian veterinary journal*, 81(1-2), 71-75.
- Whittington, R. J., Marsh, I. B., & Reddacliff, L. A. (2005). Survival of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in dam water and sediment. *Applied and environmental Microbiology*, 71(9), 5304-5308.
- Whittington, R. J., Marshall, D. J., Nicholls, P. J., Marsh, I. B., & Reddacliff, L. A. (2004). Survival and dormancy of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in the environment. *Applied and environmental microbiology*, 70(5), 2989-3004.
- Williams C.S.F. (1980) "Diferential diagnosis of caseous lymphadenitis in the goats". *Veterinary Medicine and Small Animal Clinician.* 75, 1165-1169.
- Williamson, L. H. (2001). Caseous lymphadenitis in small ruminants. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 17(2), 359-371.
- Windsor, P. A., & Whittington, R. J. (2010). Evidence for age susceptibility of cattle to Johne's disease. *The Veterinary Journal*, 184(1), 37-44.
- Woo, S. R., & Czuprynski, C. J. (2008). Tactics of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* for intracellular survival in mononuclear phagocytes. *Journal of veterinary science*, 9(1), 1-8.
- Yokomizo, Y., Yugi, H., Merkal, R.S. (1985). A method for avoiding false-positive reactions in an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the diagnosis of bovine paratuberculosis. *Nippon Juigaku. Zasshi* 47, 111-119.
- Yurame López, J. (2014). Evaluación de estrategias de control en paratuberculosis en hatos bovinos y rebaños caprinos, ovinos y ciervos afectados en el Centro de enseñanza, investigación y extensión en producción animal en Altiplano. Tesis de maestría. Universidad Nacional Autónoma de México.