



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ
FACULTAD DE AGRONOMÍA
COORDINACION DE POSGRADO
MAESTRÍA EN PRODUCCIÓN AGROPECUARIA



**DETECCION DE MAP (*Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis*)
POR MEDIO DE PCR-ANIDADA EN OVINOS DE LOS MUNICIPIOS DE
SALINAS Y VILLA DE RAMOS, S.L.P.**

Por:

Luis Fernando Oyarvide García

**Tesis presentada como requisito parcial para obtener el grado de
Maestro en Producción Agropecuaria**

Soledad de Graciano Sánchez, S.L.P.

Enero de 2013



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ
FACULTAD DE AGRONOMÍA
COORDINACION DE POSGRADO
MAESTRÍA EN PRODUCCIÓN AGROPECUARIA



**DETECCION DE MAP (*Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis*)
POR MEDIO DE PCR-ANIDADA EN OVINOS DE LOS MUNICIPIOS DE
SALINAS Y VILLA DE RAMOS, S. L. P.**

Por:

Luis Fernando Oyarvide García

Profesor consejero: M.C. Felipe de Jesús Morón Cedillo

Director de Tesis: Dr. César Cortez Romero

Asesor: Dr. Glafiro Torres-Hernández

**Tesis presentada como requisito parcial para obtener el grado de
Maestro en Producción Agropecuaria**

Soledad de Graciano Sánchez, S.L.P.

Enero de 2013

El trabajo titulado “**Detección de MAP (*Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis*) por medio de PCR-anidada en ovinos de los municipios de Salinas y Villa de Ramos, S. L. P.**” fue realizado por Luis Fernando Oyarvide García como requisito para obtener el grado de Maestro en Producción Agropecuaria en el área de Producción de Pequeños Rumiantes, fue revisado por el suscrito comité de tesis.

M.C. Felipe Morón Cedillo
Profesor Consejero

Dr. César Cortez Romero
Director de Tesis

Dr. Glafiro Torres Hernández
Asesor

Ejido Palma de la Cruz, Municipio de Soledad de Graciano Sánchez, S.L.P., a los 15 días del mes de enero de 2013.

DEDICATORIA

A mi madre por guiarme desde niño en esta vida, por corregirme en mis errores y motivarme a seguir adelante.

A mi padre por enseñarme que el trabajo rinde frutos y a que todas las cosas que nos suceden son experiencia que adquirimos.

A mi hermana por que juntos aprendimos muchas cosas, por defenderme y ayudarme en mi infancia.

A mis hermanos Emmanuel y Sandra por que aprendimos a convivir y nos gusto nuestra forma de llevarnos.

A mi pareja por todo lo que hemos vivido, vivimos y viviremos, por encontrar la felicidad.

A toda mi familia por todos los consejos que me dieron y por estar conmigo todos esos momentos difíciles.

Y a la gente que me rodea que hace posible mis logros.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma de San Luis Potosí y la Facultad de Agronomía, por haberme dado esta oportunidad de superación personal y profesional.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada durante el tiempo de estudio.

A mi asesor M.C Felipe Morón Cedillo por su apoyo, orientación y guía, en todos los momentos necesarios.

A mis asesores, maestros y personal de la facultad, por su ayuda en todo lo que necesite y darme más de lo que pude haberles dado.

CONTENIDO

	Página
DEDICATORIA.....	iii
AGRADECIMIENTOS.....	iv
CONTENIDO.....	v
ÍNDICE DE CUADROS.....	vii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	viii
RESUMEN.....	ix
SUMMARY.....	x
INTRODUCCIÓN.....	1
Objetivo.....	3
Hipótesis.....	3
REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
Descripción del genero <i>Mycobacterium</i>	4
Complejo <i>Mycobacterim avium</i>	6
<i>Mycobacterium avium</i> subespecie <i>paratuberculosis</i>	9
Antecedentes históricos.....	9
Características de MAP (<i>Mycobacterium avium</i> subespecie <i>paratuberculosis</i>).....	10
Distribución.....	12
Transmisión.....	14
Factores que intervienen en la presentación de la enfermedad.....	16
Posible impacto en salud pública.....	17
Patogenia.....	17
Signos clínicos y lesiones.....	19
Signos clínicos y progresión de la enfermedad en otros animales.....	21
Diagnóstico.....	21
Prevención y tratamiento.....	23
MATERIALES Y MÉTODOS.....	25
Localización del área de estudio.....	25
Animales.....	26

Muestras.....	26
Prueba PCR-anidada.....	26
Secuencias de inserción.....	27
IS900.....	27
Extracción directa de ADN.....	27
Preparación de las Muestras.....	28
Procedimiento de la PCR anidada.....	29
Método estadístico.....	30
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	31
CONCLUSIONES.....	33
LITERATURA CITADA.....	34

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Principales grupos de micobacterias agrupadas según el criterio de la producción de pigmento.....	7
2	Casos registrados de paratuberculosis en ovinos y caprinos.....	13
3	Distribución de muestras positivas y negativas con su prevalencia.....	32

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Casos de Paratuberculosis en México, de diversos estudios realizados en el Centro de Enseñanza, Investigación y Zootecnia de la UNAM (CONASA, 2010).	14

RESUMEN

La paratuberculosis (Ptb) que es ocasionada por *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* (Map) también conocida como la enfermedad de Johne, tiene la característica de tener periodos largos de incubación, que en ovinos puede alcanzar de 2 hasta 4 años, ocasionando un síndrome de mala absorción en el intestino, que provoca diarreas crónicas en los animales y pérdida de peso hasta la muerte, y se relaciona con la enfermedad de Crohn en humanos. El objetivo del estudio fue detectar la presencia del Map en los municipios Salinas y Villa de Ramos, pertenecientes al estado de San Luis Potosí, por medio del método de PCR-anidada a partir de la secuencia de inserción específica para Map, IS900, de un total de 203 animales muestreados 18 fueron positivos representando el 8.87% de prevalencia de Map. Las prevalencias entre rebaños variaron desde 4.26% a 66.67% en 7 de 30 rebaños muestreados. Se encontró diferencia significativa entre comunidades ($p = 0.002$) de acuerdo a la prueba de Chi-cuadrada. De los 30 rebaños muestreados se obtuvo muestras positivas en 7 de ellos, lo cual representa el 23 % de rebaños infectados con Map.

Palabras Clave: *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* (Map), PCR-anidada, Prevalencia, IS900.

SUMMARY

Paratuberculosis (PtB) which is caused by *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (Map) also known as Johne's disease, characterized by long periods of incubation (2-4 years), resulting in a syndrome of poor absorption in the intestine, with chronic diarrhea and weight loss animals to death, and it is related to Crohn's disease in humans. The aim of the study was to detect the presence of the Map in the municipalities of Salinas y Villa de Ramos, belonging to the state of San Luis Potosi, using nested-PCR technique based on the insertion sequence specific for Map, IS900, out of 203 animals sampled were positive 18 representing 8.87 % prevalence of MAP. The prevalence among herds ranged from 4.26 % to 66.67% in 7 of 30 herds sampled. There was significant difference between communities ($p = 0.002$), according to the Chi-square test. Of the 30 herds sampled positive samples was obtained in 7 of them, which represents 23 % of flocks infected with Map.

Keywords: *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (Map), PCR-nested, Prevalence, IS900.

INTRODUCCIÓN

La paratuberculosis (PTB) o mejor conocida como la enfermedad de Johne es ocasionada por *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* (MAP), la cual es una bacteria gram positiva, que tiene la característica de ser ácido-alcohol resistente; afecta principalmente a los rumiantes aunque ha sido descrita en primates, conejos y una amplia gama de animales salvajes; se ha encontrado que este agente está relacionado con la enfermedad de Crohn en el ser humano, identificándose en algunos casos clínicos, creyendo que puede ser el agente causal de la enfermedad (Chávez *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2011).

Este agente patógeno, tiene la característica de tener periodos largos de incubación, que en la especie ovina puede alcanzar de 2 incluso hasta 4 años, ocasionando un síndrome de mala absorción en el intestino, ocasionando diarreas crónicas en los animales, las cuales no responden al tratamiento y por consiguiente, presentan pérdida de condición corporal progresiva hasta la muerte. Debido al periodo largo de incubación, la enfermedad puede afectar el hato de manera subclínica, ocurriendo en este periodo contagio entre los animales, ocasionando pérdidas para los productores, las cuales se ven hasta que la enfermedad está en un grado avanzado (OIE, 2004).

Parte del diagnóstico de MAP en los ovinos se basa en los síntomas y los signos que presenta, y también buscando lesiones patognomónicas en la necropsia. En esta última, observando lesiones macroscópicas en el área del intestino delgado, y después confirmándolo por medio algunas técnicas diagnosticas, demostrando la presencia del agente. Para detectar la enfermedad de manera subclínica, se puede recurrir a diversas pruebas, como las serológicas e incluso el aislamiento del agente (Collins *et al.*, 1999; Chiodini *et al.*, 1984; OIE, 2004).

Las pérdidas económicas derivadas de esta enfermedad son cuantiosas y se deben tanto a causas directas como a causas indirectas e inaparentes. Cuando la enfermedad está presente en una explotación se producen pérdidas directas debido a una disminución de la producción láctea, mayor susceptibilidad a otras enfermedades, infertilidad, y

disminución del valor de los animales en el rastro (Ott *et al.*, 1999). Las pérdidas indirectas se deben a las restricciones en el mercado, movimiento de los animales, así como la instauración de medidas preventivas o correctivas. Por otra parte, también existen pérdidas de potencial genético ya que se producen sacrificios tempranos y algunas explotaciones infectadas permanecen cerradas lo que limita la mejora genética de la explotación (Kennedy *et al.*, 2001). Un modelo de regresión de la enfermedad de Johne estima que esta pérdida es de \$ 40 a \$ 227 por vaca registrada al año, con base en el porcentaje de vacas de desecho con signos clínicos (Dargatz *et al.*, 2001; NAHMS, 1997).

Desafortunadamente en México, aun está rezagado el estudio de esta enfermedad y no se conoce mucho al respecto de la magnitud del problema (Méndez *et al.*, 2008). En este caso en particular, la paratuberculosis en la zona de estudio del estado de San Luis Potosí, no se ha estudiado de una manera adecuada y no hay datos precisos sobre la presencia de la enfermedad. Sin el conocimiento de la gravedad del problema, no se puede tratar de resolver ni de abordar la enfermedad. Por eso la importancia de determinar la presencia de la enfermedad.

Objetivo

Determinar la prevalencia de *Mycobacterium avium* subs. *paratuberculosis* por medio de la técnica de PCR anidada en ovinos de comunidades de los municipios de Salinas y Villa de Ramos, S.L.P.

Hipótesis

La paratuberculosis no está presente en ovinos de comunidades de Salinas y Villa de Ramos, S.L.P.

REVISIÓN DE LITERATURA

Descripción del género *Mycobacterium*

En la actualidad hay descritas 147 especies dentro del género *Mycobacterium*, las cuales se describen en la lista de nombres procariotas con base en la nomenclatura (*List of prokaryotic names with standing in nomenclature*) de J. P. Euzéby's (Euzéby, 2010).

Los requisitos mínimos necesarios para la inclusión de una especie dentro del género *Mycobacterium*, son la ácido-alcohol resistencia, la presencia de ácidos micólicos con 60-90 átomos de carbono de longitud y un 61-71 % de guanidina y citocina en su genoma (Wayne *et al.*, 1986).

El género *Mycobacterium* está integrado por bacilos largos de 3 a 5 μm de longitud o curvos en forma de maza, inmóviles, no esporulados, ácido-alcohol resistentes. Son bacterias gram positivas, aerobias y su temperatura óptima de crecimiento oscila entre los 30 y 45°C. Algunos son aerobios y otros microaerófilos. En cuanto a la velocidad de crecimiento, algunas especies son de crecimiento rápido y otras lentas. Se destaca en su estructura una gran riqueza en lípidos (20-60 %). El contenido de bases de guanina más citocina en la molécula de ADN es de 62 a 70 % moles (Rodríguez, 2008).

La pared celular de las micobacterias presenta como característica principal un alto porcentaje en lípidos con respecto a la masa celular total (40 %), porcentaje muy elevado en comparación con el descrito en otras bacterias gram positivas (5 %) e incluso gram negativas (10 %). Esta propiedad podría explicar la tendencia de las micobacterias a producir un crecimiento en forma de agregados bacterianos y también la propiedad de ácido-alcohol resistencia (Goren *et al.*, 1979).

La pared celular de micobacterias está constituida por una capa interna y una capa externa que rodean a una membrana plasmática, el compartimento exterior o capa externa está formada a su vez por lípidos y proteínas. Estos lípidos están normalmente asociados a la pared celular a través de ácidos grasos de cadena corta y larga que

complementan las cadenas largas y cortas de la capa interna.

Taxonómicamente, las micobacterias están incluidas en el Phylum *Actinobacteria*, clase *Actinobacteriae*, subclase *Actinobacteridae*, orden *Actinomycetales*, suborden *Corynebacterineae*, familia *Mycobacteriaceae*, género *Mycobacterium* (Ferré, 2005).

Mycobacterium tuberculosis y *Mycobacterium leprae* son los agentes etiológicos más frecuentes de las dos enfermedades más conocidas de este género. Poco tiempo después que Roberto Koch descubriera *Mycobacterium tuberculosis* en 1882, fueron identificadas otras micobacterias, constituyendo el grupo de las micobacterias atípicas (Rodríguez, 2008).

Existen muchas clasificaciones de las micobacterias, una de las más aceptadas es aquella que las divide en dos grandes grupos: el de micobacterias difícilmente cultivables o no cultivables, productoras de lesiones dérmicas y nerviosas (*Mycobacterium leprae* y *Mycobacterium leprae murium*); y el grupo de micobacterias cultivables, que a su vez se dividen en función de la velocidad de crecimiento: de crecimiento lento y de crecimiento rápido, generalmente las micobacterias de crecimiento lento son las patógenas para el hombre y los animales (Ferré, 2005).

También se puede clasificar de alguna manera clínica como micobacterias tuberculosas como *Mycobacterium tuberculosis* y *Mycobacterium bovis*, en micobacterias no tuberculosas o micobacterias atípicas que son distintas a las tuberculosas. En este último se clasificaría a la paratuberculosis (Thorel *et al.*, 1990).

Por otro lado, los avances en el terreno de la biología molecular y de la genética bacteriana han permitido a su vez la clasificación taxonómica de las micobacterias en base a los polimorfismos presentes en las secuencias de diferentes genes que se emplean como diana (Jaimes, 2008).

Complejo *Mycobacterium avium*

El complejo *Mycobacterium avium* (MAC) está constituido principalmente por un grupo de micobacterias medioambientales relacionadas entre sí y en el cual se incluyen *Mycobacterium avium* subespecie *avium*, *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis*, *Mycobacterium avium* subespecie *hominissuis*, *Mycobacterium avium* subespecie *silvaticum* y *Mycobacterium intracellulare* (Castellanos, 2010).

El complejo *Mycobacterium avium* (Mycobacterium avium complex, MAC) está incluido en el grupo III de Runyon y pertenece al grupo de micobacterias distintas de tuberculosis. Está formado por microorganismos ubicuos distribuidos de forma natural en agua y tierra (Manning *et al.*, 2001).

Esta clasificación no tiene validez taxonómica pero sí clínica, ya que las especies de crecimiento lento son generalmente patógenas para los animales y el hombre (Tabla 1).

Cuadro 1. Principales grupos de micobacterias agrupadas según el criterio de la producción de pigmento.

Grupo	Velocidad de Crecimiento	Especies de micobacterias
Grupo I de Runyon fotocromógenas (pigmento amarillo con Luz)		<i>Mycobacterium asiaticum</i> , <i>Mycobacterium kansasii</i> , <i>Mycobacterium marinum</i> , <i>Mycobacterium simiae</i>
Grupo II de Runyon escotocromógenas (pigmento amarillo naranja)		<i>Mycobacterium flavescens</i> , <i>Mycobacterium gordonae</i> , <i>Mycobacterium scrofulaceum</i> , <i>Mycobacterium szulgai</i>
Grupo III de Runyon no cromógenas (no producen pigmento)	Crecimiento lento (> 7 días)	<i>Mycobacterium avium</i> , <i>Mycobacterium</i> subespecie <i>paratuberculosis</i> , <i>Mycobacterium gastri</i> , <i>Mycobacterium haemophilum</i> , <i>Mycobacterium intracellulare</i> , <i>Mycobacterium malmoeense</i> , <i>Mycobacterium terrae</i> , <i>Mycobacterium triviale</i> , <i>Mycobacterium tuberculosis</i> , <i>Mycobacterium ulcerans</i> , <i>Mycobacterium xenopi</i>
Grupo IV de Runyon no cromógenas (no producen pigmento)	Crecimiento rápido (< 7 días)	<i>Mycobacterium abscessus</i> , <i>Mycobacterium cbeloniae</i> , <i>Mycobacterium fortuitum</i> , <i>Mycobacterium goodii</i> , <i>Mycobacterium immunogenum</i> , <i>Mycobacterium muogenicum</i> , <i>Mycobacterium peregrinum</i> , <i>Mycobacterium senegalense</i> , <i>Mycobacterium septicum</i> , <i>Mycobacterium smegmatis</i> , <i>Mycobacterium wolinsky</i>
No Cultivable		<i>Mycobacterium leprae</i>

(Según Runyon *et al.* 1959, citado por Castellanos, 2010).

Hay varias formas de clasificación para MAC. Debido a esto una de las formas de clasificación más aceptada se basa en las características bioquímicas de las especies bacterianas que pertenecen al complejo. Gracias a este análisis, Thorel *et al.* 1990, subdividieron la especie *Mycobacterium avium* en tres subespecies, dependiendo además de su grado de patogenicidad y su rango de hospedadores.

Los miembros de este complejo MAC presentan unas características tanto genéticas como fenotípicas particulares, las cuales les permiten el crecimiento en biotipos naturales sin perder por ello su potencial patógeno. Entre estas características destacan el amplio rango de temperaturas dentro del cual son capaces de crecer (desde 20°C hasta

37°C), la capacidad de adaptación a nuevos sustratos con amplios rangos de pH, desde 4 a 7,5 (estando el pH óptimo comprendido entre 5,4 y 6,5). A su vez, todos los miembros de MAC destacan por ser ácido-alcohol resistente, presentar un crecimiento lento y producir un pigmento amarillo en ausencia de luz (Inderlied *et al.*, 1993).

Los miembros de MAC se han clasificado en 28 serovariedades en función de la seroaglutinación y el grado de virulencia de estas serovariedades fue determinado mediante la inoculación de estas serovariedades en pollos. Así, se clasificaron los que son patógenos para aves aquellos pertenecientes a *Mycobacterium avium*, no patógenos los pertenecientes a *Mycobacterium intracellulare* y el grupo intermedio, serovariedades que producían lesiones en el punto de inoculación (Inderlied *et al.*, 1993).

A su vez, los miembros de MAC han sido aislados fuera de hospedadores, en el medioambiente y en una amplia variedad de biotopos, entre los que se incluyen el suelo, tanques de almacenaje de agua, agua de desecho, agua municipal, aerosoles, protozoos, etc. (Juste *et al.*, 1992).

Estas bacterias también están presentes en aves, animales y en el hombre, donde no causan enfermedad alguna a no ser que el hospedador esté debilitado o en situación de inmunodepresión aunque también hay miembros del grupo de MAC que son capaces de causar infección en un amplio rango de animales domésticos, salvajes rumiantes y no rumiantes, los cuales podrían actuar como reservorio (Castellanos, 2010).

Mycobacterium avium subespecie paratuberculosis

Antecedentes históricos

Dentro de las especies de bacterias del género *Mycobacterium* se encuentra *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* (MAP), miembro también del complejo MAC y agente etiológico de la enfermedad de Johne o paratuberculosis.

La primera referencia de un proceso de enteritis crónica en ganado bovino fue realizada en Francia por Hutrel D'Arboual en 1826. En Inglaterra en 1831 Farrow y Cartwright describen un episodio de enfermedad crónica caquectizante, también en ganado bovino, y Bang en 1875 describe otro proceso crónico intermitente utilizando ya para su diagnóstico un método de tinción de la mucosa intestinal. Sin embargo, hasta el año 1895 no se puso de manifiesto que este proceso era una enfermedad diferente de la Tuberculosis. Fueron Johne y Frothingham quienes establecieron esta conclusión, al observar la presencia de bacterias ácido alcohol resistente en muestras procedentes de un bovino enfermo y enviándoselas así mismo a Koch para conocer su opinión. Koch estimó también que se trataba de un proceso distinto al de la Tuberculosis eliminándose así el concepto existente hasta entonces, de clasificación como otra forma clínica de esta última enfermedad. Bang en 1905 reproduce experimentalmente la enfermedad en animales de laboratorio y ganado vacuno administrando por vía oral trozos de mucosa intestinal procedente de animales enfermos y sugiere el nombre de Paratuberculosis. Twort e Ingram en 1913 logran cultivar el agente en el laboratorio utilizando un medio sólido a base de huevo al que añaden glicerina y bacilos tuberculosos muertos (Tejedor, 1993).

El nombre actual de MAP se debe a Thorel y colaboradores que así lo describieron en 1990 y esto es debido de diferentes modificaciones desde su inicial descripción como Darm tuberculose por Johne y Frothingham en 1895; *Mycobacterium intermitidas chronicae pseudotuberculosis bovis johnei* por Twort e Ingram en 1912; *Bacterium paratuberculosis* por Bergey y colaboradores en 1923; *Bacillus paratuberculosis* por

Krasilnikov en 1941 y más tardíamente *Mycobacterium johnei* por Francis y colaboradores en 1943 (Ferré, 2005).

La paratuberculosis, inicialmente fue reconocida en ganado vacuno, después en ovejas y posteriormente en cabras, se encuentra muy a menudo en rumiantes domésticos y silvestres, y presenta una distribución global, aunque también se ha descrito la enfermedad en caballos, cerdos, ciervos, alpacas y, recientemente en conejos, armiños, zorros y comadreas, aunque se ha descrito en muchas especies (OIE, 2004).

Esta enfermedad está clasificada por la OIE (Organización Mundial de Sanidad animal) en la lista de enfermedades comunes en varias especies ubicada en la lista B (OIE, 2004).

Características de MAP (*Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis*)

MAP es un microorganismo ácido-alcohol resistente (lo cual se refleja en la presencia de una coloración roja en las tinciones de Zielh-Neelsen o Kinyoun), es gram positivo y su tamaño oscila entre 0,5 y 1,5 μm . Fenotípicamente se caracteriza por un crecimiento lento que requiere micobactina en el medio y formación de colonias rugosas no pigmentadas. La principal característica de esta bacteria es la baja velocidad de crecimiento debido a que requiere aproximadamente 16 semanas en cultivo primario y se dificulta aun mas por la posible contaminación del medio de cultivo, crece en medio con huevo, estimulado por el piruvato, tolera la D-cicloserina (50 $\mu\text{g/ml}$) y no produce fosfatasa alcalina (Ferré, 2005). MAP es patógeno obligado de los rumiantes domésticos, ocasionando la paratuberculosis o enfermedad de Johne (Chiodini *et al.*, 1984).

La identificación de MAP se basa en su requerimiento de micobactina y su patogenicidad en el hospedador. La dependencia de micobactina se ha utilizado ampliamente como una característica taxonómica de MAP, porque la mayoría de las micobacterias son capaces de sintetizar micobactina. Sin embargo, *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis*, *Mycobacterium silvaticum* y algunos aislamientos

primarios de *Mycobacterium avium* carecen de esta capacidad y requieren micobactina para crecer en el laboratorio. Así, el requerimiento de micobactina no es exclusivo de *Mycobacterium paratuberculosis*; esta característica existe en diferentes grados dentro del grupo de *M. avium* (Thorel *et al.*, 1990).

La necesidad de metales para el crecimiento microbiano es un factor común en todas las bacterias, concretamente el hierro se quela gracias a los sideróforos presentes en el líquido extracelular (exoquelinas) o en la membrana celular (micobactinas). El primer sideróforo aislado en una micobacteria fue la micobactina, que se caracteriza por ser una estructura hidrofóbica que facilita el transporte del hierro a través de su compleja pared celular (Schwartz *et al.*, 2001).

Debido a esto tienen esta dependencia a los metales, los cuales son necesarios para el crecimiento de la mayoría de las bacterias y especialmente al hierro en el caso de las micobacterias patógenas. Para la entrada y utilización de éste al interior de la bacteria se necesita en primer lugar una fuente orgánica del mismo (Ferré, 2005).

Las micobactinas son moléculas lipídicas de elevado peso molecular que presentan una parte central o armazón al cual se une el hierro, las micobactinas únicamente se encuentran presentes en los géneros *Mycobacterium* y *Nocardia*. Sin embargo, las micobacterias son las únicas especies que contienen tanto las micobactinas como las exoquelinas, aunque con excepciones como son el caso de MAP y algunas cepas de *Mycobacterium avium paratuberculosis* en los que las micobactinas están ausentes. El responsable de la producción de micobactina y el transporte de hierro es un grupo o *cluster* de 10 genes (*mtbA-J*) que se describió en *M. tuberculosis* (Quadri *et al.* 1998), y de los cuales se han identificado homólogos en el genoma de *Mycobacterium avium paratuberculosis* (Li *et al.*, 2005). El análisis del genoma de *Mycobacterium avium paratuberculosis* reveló la presencia de un espacio de 6,6 kb entre los genes *mbtJ* y *mbtI* y un espacio de 19,3 kb entre los genes *mbtA* y *mbtJ*, característica genética que podría ser responsable de la dependencia de micobactina en el medio de cultivo de *M. a. paratuberculosis*. Debido al truncamiento de este gen, el cual desempeña una función crucial en la cascada de reacciones que dan lugar a la producción de micobactina, se cree que la producción de ésta está atenuada en *Mycobacterium avium paratuberculosis* (Li

et al., 2005). Por todo esto es necesaria la adición de la micobactina al medio de cultivo para el crecimiento de *Mycobacterium avium paratuberculosis*. Por otro lado, el efecto del truncamiento en el gen *mbtA* hace que *Mycobacterium avium paratuberculosis* no capte el hierro del medio, por lo que se necesita añadir a su vez citrato férrico amónico en el medio de cultivo (Merkal *et al.*, 1974).

Distribución

La enfermedad se ha descrito en varias partes en el mundo, por lo que se puede decir que es cosmopolita, y se ha descrito en varias especies, aislándose incluso del humano y animales silvestres, lo que puede ser una causa de contagio a los rumiantes. Los estudios sobre la prevalencia e incidencia de esta enfermedad principalmente se han realizado en ganado bovino, y en rumiantes menores no se ha investigado tanto al respecto, haciendo más difícil conocer la situación actual de esta enfermedad y por consiguiente haciendo su control más difícil en estas especies (Salgado *et al.*, 2007).

Las pérdidas por esta enfermedad son grandes para la industria ganadera y se ha descrito en diversos lugares del mundo. En Argentina, se calcula una prevalencia que va del 7 al 19 % para algunas de sus regiones en Bovinos (Paolicchi *et al.*, 2004). En Australia que es un país que su producción ovina es grande, se confirmó la enfermedad a finales del 2001, en 1087 rebaños de un total de 84 mil (Windsor *et al.*, 2002). En España la primera descripción de MAP fue en ovejas, en el país vasco se han descrito prevalencias del 23.5% y un 31% mediante estudios serológicos (Juste *et al.*, 1992).

Un estudio de fabricas de productos lácteos de Estados Unidos señala que aproximadamente un 22 % de los rebaños lecheros, tienen al menos un 10 % de su rebaño infectado con MAP. En Estados Unidos se han realizado estudios serológicos mediante ELISA tanto en ganado vacuno lechero como de carne. En el primer caso, las seroprevalencias oscilaron de un 4.8 % a un 26.8 % mientras que en el vacuno de carne describieron prevalencias entre un 4-9 % (Collins *et al.*, 1999).

En nuestro país se han determinado prevalencias en rastros de 1.2 a 8.4 % para

ganado caprino y de 0.8 a 4.4 % en el caso de ganado ovino (Chávez, 2006). Sin embargo, estos se han limitado a ciertas regiones del país. En estudios de paratuberculosis en ovinos y bovinos en el estado de Guanajuato, reportaron un 4.33 % (60/1385) de seropositividad por medio de inmunodifusión en gel agar (Santillán *et al.*, 2007) y un 8.03% (74/921) de animales positivos (Guzmán *et al.*, 2008), respectivamente. En el caso de un rastro en Querétaro, el serodiagnóstico mostró un 18% (76/418) positivos y un 3.1% (13/418) sospechosos (Méndez, 2008). En México se cuenta con información que indica que esta enfermedad es de alta relevancia, ya que conjuntamente con la tuberculosis bovina, la brucelosis y la infestación por garrapatas del género *Boophilus*, contribuye al decremento en la producción e inocuidad de alimentos. En un estudio realizado en 2005, sobre el impacto económico de la MAP en bovinos lecheros del centro del país, se calculó que este ascendía a \$10,345.00 pesos por vaca al año, con una prevalencia del 8.87 % en una población de casi 30,000 bovinos, donde el mayor impacto se asoció a la pérdida en la producción láctea (CONASA, 2010).

Cuadro 2. Casos registrados de paratuberculosis en ovinos y caprinos.

Entidad	Ovinos	Caprinos
Distrito Federal	5/4	1/1
Guanajuato	199/16	39/3
Jalisco	142/27	
Michoacán		36/1
México		3/3
Querétaro	5/0	3/0
San Luis Potosí	24/14	12/11
Tlaxcla		25/6
Veracruz		549/51

(Tomado de Chávez, 2006).

En los últimos quince años, en los Departamento de Patología y Microbiología, y desde hace poco más de tres años en el Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Animal del Altiplano (CEIEPAA), ubicado en Tequisquiapan, Querétaro,

pertencientes a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM, se ha realizado el diagnóstico de la paratuberculosis mediante diversos procedimientos tales como estudios anatomopatológicos, serológicos, bacteriológicos así como de biología molecular (PCR, RFLP). De lo anterior, se conoce que en 16 estados del país existen frecuencias del 9%, 19.72% y 36% en bovinos, caprinos y ovinos respectivamente, lo que indica su distribución en el territorio nacional en pruebas realizadas en más de 7000 muestras. (CONASA, 2010).

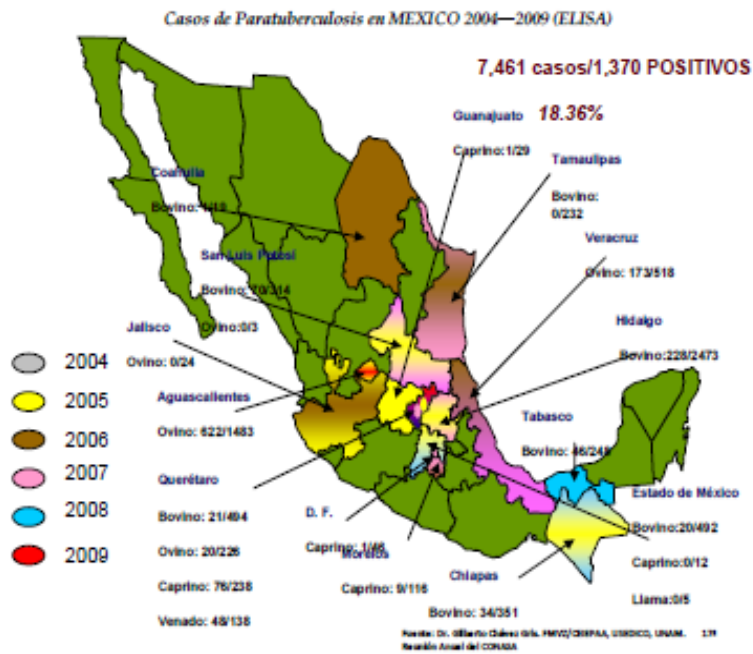


Figura 1. Casos de Paratuberculosis en México, de diversos estudios realizados en el Centro de Enseñanza, Investigación y Zootecnia de la UNAM (CONASA, 2010).

Transmisión

En algunos casos el contagio se produce principalmente durante los primeros meses

de vida por vía fecal-oral a partir sobre todo de las heces que contaminan la ubre de la propia madre. La transmisión de la infección ha sido demostrada por vía transplacentaria. Así mismo la transmisión es a través de la leche, de la cual también se ha aislado (OIE, 2004).

La forma de transmisión natural de esta enfermedad mediante su ingestión por un ambiente contaminado, que puede ser con heces fecales. Su capacidad de infección y patogenicidad reside en su manera de evitar o sobrevivir a la defensa natural del huésped (Collins, 1999).

Siendo el mecanismo de transmisión principal de la enfermedad la vía fecal-oral, por ingestión de pastos, agua o leche contaminados con heces de animales infectados. Hay estudios que revelan que MAP se encuentra en agua de ríos, o lagos donde los animales llegan a tomar agua. También se conocen otras formas de transmisión como la intrauterina, a través del semen, tanto en monta natural como en inseminación artificial, o por ingestión de leche o calostro de madres infectadas, aunque la significación de estas vías sigue siendo confusa y requiere de mayores estudios. Incluso, se ha sugerido, la posible intervención en su diseminación de invertebrados como moscas o lombrices (Tejedor, 1993).

En un estudio, 3-19% de las vacas asintomáticas eliminó *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* en la leche y el 9-36% en el calostro. Hasta un 35% de las vacas sintomáticas eliminó bacteria en la leche, determinando la transmisión que puede ser de esta manera (Kennedy *et al.*, 2001).

Mycobacterium avium subespecie *paratuberculosis* es resistente a las condiciones ambientales y puede sobrevivir en los forrajes por más de un año. También se ha encontrado a la bacteria viable hasta por una semana en la orina, y hasta por 8-11 meses en las heces, bovinas. En un estudio, este organismo sobrevivió hasta 9 meses en el agua de estanque, grifo o agua destilada; en otro estudio, sobrevivió hasta por 19 meses en agua de grifo (OIE, 2004).

Factores que intervienen en la presentación de la enfermedad

En cualquier caso, la relación entre infección y enfermedad no está muy clara, dependiendo fundamentalmente de factores inmunológicos y de la resistencia del animal en la que influirían factores nutricionales y de manejo, aunque la presentación de esta no depende de un solo factor en sí, la predisposición y la presentación misma de la enfermedad se da por una serie de eventos que permiten su prevalencia en el huésped y así mismo la presentación de la enfermedad.

De los factores que afectan la presentación de la enfermedad, son:

- Edad del animal. Los animales jóvenes (aproximadamente menores de seis meses de edad) son los más susceptibles a la infección (Manning *et al.*, 2001). Esto tiene que ver debido a que el sistema inmunológico es más inmaduro, también a la gotera esofágica, que permite mayor viabilidad del microorganismo.
- Dosis ingerida. Otro parámetro importante para el establecimiento de la enfermedad es la dosis ingerida. Se ha establecido que la dosis infectiva es aproximadamente de 10³ bacilos (Brotherston *et al.*, 1961; citado por Collins, 2003).
- Factores ambientales. Estos también son determinantes para la presentación de la enfermedad y aquí entrarían factores del clima, el tipo de sistema de producción, entre otros como el manejo (Chiodini *et al.*, 1984).

Se ha observado una mayor incidencia de enfermedad, en animales que pastorean sobre suelos ácidos. Lo que podría justificarse en base a la mayor dificultad para captar el hierro a este pH (Tejedor, 1993).

También parecen disminuir la incidencia el abonado con fosfatos o la administración de fósforo en la ración, o la disposición “ad libitum” de complejos vitamínico - minerales). Por último, se ha descrito que algunas enfermedades concurrentes como las parasitosis u otras infecciones favorecen la presentación de la enfermedad (Medina, 2001).

Posible impacto en salud pública

Desde 1913 fue sugerida una posible asociación entre *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* y la enfermedad de Crohn en humanos, cuando se encontraron similitudes patológicas y sintomatológicas entre humanos y animales con enfermedad de Johne. Actualmente, después de casi 100 años, muchos trabajos de investigación evidencian esta asociación mediante la detección de MAP por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), por cultivo de biopsias intestinales o ganglios linfáticos de pacientes con enteritis crónica, o por detección de la respuesta serológica a antígenos del microorganismo; también debido a la remisión de la enfermedad tras la aplicación de terapias con antibióticos activos para MAP en este tipo de pacientes. Si bien estos últimos resultados con el uso de terapias antibióticas resultan alentadores, estos deberían ratificarse con pruebas científico-clínicas (Cirone *et al.*, 2007).

En la especie humana se han descrito aislamientos de bacterias micobactina dependientes, a partir de pacientes con la enfermedad de Crohn, sin que su significación epidemiológica haya sido clarificada (Tejedor, 1993)

Patogenia

La vía principal del proceso inmunitario es la inmunidad mediada por células con la intervención de macrófagos y liberación de los mediadores químicos llamados citoquinas, que producirán atrofia muscular, emaciación, alopecia, disturbios renales y leucopenia. Esta sintomatología ocurre en los primeros estadios de la enfermedad; con el transcurso del tiempo, deberá coexistir con la inmunidad humoral, liberación de inmunoglobulinas (IgG) y consecuentemente malabsorción, provocando hipoproteinemia y de esta manera edemas y procesos diarreicos (Ferre, 2005).

De modo semejante a lo que sucede durante el curso de la infección por otras micobacterias, inicialmente se desarrolla el complejo primario, que es donde empiezan a proliferarse esta bacteria. Este, puede establecerse en las tonsilas y los ganglios

retrofaríngeos, ya que la vía de entrada del agente suele ser la oral. A partir del complejo primario se produce la diseminación a órganos diana como: el intestino y los ganglios mesentéricos, desapareciendo posteriormente el bacilo de su localización inicial. Sin embargo, de forma habitual el desarrollo de este complejo tiene lugar en el intestino delgado en la zona terminal del íleon y los ganglios mesentéricos (Tejedor, 1993).

Esta localización inicial en el intestino parece obedecer al máximo desarrollo de las placas de peyer durante las primeras semanas de la vida, abarcando el 80% de la superficie del final del intestino delgado. La penetración en la mucosa intestinal parece realizarse de forma pasiva (hacia los folículos de las placas de peyer) a partir de las células “Natural Killer”, situadas entre los folículos y la luz intestinal y encargadas de la captación de los antígenos. Estas células transferirían las micobacterias a los macrófagos subepiteliales, quienes las conducirían al interior de las placas de Peyer (Tejedor, 1993).

En el interior de los macrófagos estas bacterias se multiplicarían de forma lenta pero constante, produciendo un muy leve efecto lítico en ellos debido a la ausencia en la producción de toxinas. El posterior desarrollo de la enfermedad dependerá de la respuesta inmunitaria del hospedador. Esta última puede ser muy variable, así los animales infectados pueden presentar una respuesta celular y/o una respuesta humoral, o desarrollarse un estado de anergia (Ferre, 2005).

Signos clínicos y lesiones

Los signos clínicos de la enfermedad son poco evidentes, a veces variables y están asociados principalmente a los diferentes estadios de la enfermedad.

Según Castellanos (2010), la enfermedad se divide en cuatro estadios o fases:

Fase I. Infección silente. Esta fase se caracteriza por la ausencia de signos clínicos de la enfermedad y se encuentra presente fundamentalmente en animales jóvenes, aunque en ocasiones también se ha descrito en ganado adulto.

Fase II. Fase subclínica. En este estadio se encuentran principalmente animales adultos portadores de *M. a. paratuberculosis*. Durante el transcurso de esta fase los animales no presentan sintomatología alguna de la enfermedad pero en ocasiones pueden presentar anticuerpos circulantes o respuestas inmunes celulares alteradas. Además, la gran mayoría de los animales son negativos al cultivo en heces, aunque a pesar de esto los animales excretan en heces una carga microbiana baja de manera intermitente.

Fase III. Fase clínica. Esta fase sólo se desarrolla tras varios años de infección por *M. a. paratuberculosis*. Los signos clínicos iniciales y característicos de esta fase son el de la caída de la producción láctea, pelo hirsuto u opaco, pérdida de peso y diarreas intermitentes las cuales remiten.

Fase IV. Fase clínica avanzada. El paso de la fase anterior a esta fase tiene lugar en tan solo unas pocas semanas, durante las cuales los animales entran en un estado de letargo, debilitación y emaciación. Esta fase se caracteriza a su vez por la aparición de un edema intermandibular debido a la presencia de hipoproteinemia esto es debido al síndrome de malabsorción que se produce en el intestino delgado, ya que el animal sigue comiendo mas no absorbe los nutrientes provocando así la hipoproteinemia, además de la presencia de caquexia y diarrea profusa. Es en este estadio en el que los animales son sacrificados debido a la reducción en la producción lechera y a la pérdida de peso, aunque en ocasiones algunos animales mueren por la deshidratación severa y la caquexia que tiene lugar. *M. a. paratuberculosis* puede permanecer en el tracto gastrointestinal de animales subclínicamente infectados durante años sin causar síntoma alguno de la

enfermedad, los cuales pueden llegar a manifestarse debido al estrés originado durante la lactancia (normalmente en la segunda o tercera lactación) o la presencia de una elevada densidad animal entre otros factores. Sin embargo, aunque los animales son más susceptibles cuando la infección se origina a edades tempranas, la enfermedad se puede iniciar en animales adultos sanos si éstos se ven expuestos a una elevada carga infectiva de MAP. En lo que respecta a la susceptibilidad genética de hospedador en cuanto al desarrollo de la enfermedad, se han descrito diversos factores como los asociados a especie y raza.

A su vez, la paratuberculosis tiene un elevado impacto económico de especial relevancia en el ganado vacuno lechero, ya que una de las principales manifestaciones clínicas en el ganado es el de la caída de la producción láctea, la reducción de la vida productiva media debido a la necesidad de un sacrificio temprano con la consiguiente disminución en la mejora genética de los rebaños (Kennedy *et al.*, 2001), la depreciación del valor de la canal (Manning *et al.*, 2001) y la disminución de la fertilidad del animal. En un estudio reciente se vio que el peso y el valor de la canal se vieron reducidos en un 10 y un 17% respectivamente en vacas positivas al ELISA en comparación con vacas negativas a este ensayo y en un 15 y un 31% respectivamente en aquellas positivas al cultivo fecal (Kudahl *et al.*, 2009).

Los síntomas clínicos en sí de la paratuberculosis son debilitamiento lento y progresivo, con trastornos diarreicos que son intermitentes al principio y se hacen progresivamente más severos hasta llegar a la muerte (Collins, 2003).

En las etapas tempranas de la infección, las lesiones se encuentran restringidas a las paredes del intestino delgado y provocan el drenaje de los nódulos linfáticos mesentéricos. Cuando progresa la enfermedad, las lesiones aparecen en el íleon, yeyuno, intestino delgado terminal, ciego y colon y en los nódulos linfáticos mesentéricos. MAP está presente en las lesiones y, finalmente, por todo el cuerpo. Las lesiones intestinales son responsables de la pérdida de proteínas y del síndrome de malabsorción protéica, lo que conduce a un desgaste muscular. Los síntomas clínicos habitualmente aparecen primero en la etapa adulta temprana pero la enfermedad puede presentarse en animales a cualquier edad por encima de 1-2 años (OIE, 2004).

Signos clínicos y progresión de la enfermedad en otros animales

En lo que respecta a los signos clínicos de la enfermedad en ovejas y cabras, éstos son similares a los descritos en vacas, aunque la presencia de diarrea es menos frecuente que en vacas y la aparición de la enfermedad se da en animales más jóvenes. En el caso de otros rumiantes no domésticos, los signos clínicos son más variables aunque similares a los anteriormente descritos en el caso de vacas. Otras especies animales pueden cursar sin sintomatología clínica, como se demostró en un estudio en el que se analizaron conejos europeos infectados con MAP (Greig *et al.*, 1997).

Diagnóstico

Existen diversos tipos de diagnóstico para esta enfermedad algunos de los cuales han sido estudiados para medir su grado de sensibilidad y especificidad aunque la prevalencia real de esta enfermedad puede estar enmascarada por las dificultades que plantea su diagnóstico, debido a la sensibilidad y especificidad de las pruebas, que están determinadas por el grado de infección en el que se encuentra los animales.

El diagnóstico de la paratuberculosis o enfermedad de Johne puede realizarse basándose en aspectos clínicos y epidemiológicos, mediante el estudio de las lesiones producidas en el huésped, de una forma directa mediante la identificación de MAP en las muestras clínicas y de una forma indirecta midiendo la respuesta inmune del animal frente a la infección (Kruze,2006).

Es frecuente la combinación de pruebas de diagnóstico para hacer más eficiente el mismo. Como el aislamiento del agente de heces fecales o tejidos rectales, leche o linfonódulos, esto es específico pero no muy sensible porque los animales expulsan bacterias en forma intermitente. Los test serológicos son algunos como: la Fijación del Complemento, la Inmunodifusión en Gel de Agar (IDGA) y las pruebas inmunoenzimáticas (ELISA). En general, son relativamente específicos del 95% al

100%, la especificidad es la capacidad de detectar los verdaderos negativos, pero la sensibilidad es la capacidad de detectar correctamente los positivos, esta se ve influenciada por una serie de factores como los intrínsecos de la prueba y la presencia de otras Micobacterias entre otras cosas como el estadio de la enfermedad.

Los resultados obtenidos con el uso de diversas pruebas de ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*), no demuestran tener variabilidad significativa entre la sensibilidad y especificidad de estas (Dargatz *et al.*, 2001). Se debe estar consciente de la variabilidad en la sensibilidad de la prueba, que depende del estado clínico y el derramamiento de la enfermedad por parte del huésped, porque esto puede afectar a la interpretación de los resultados de la prueba, entre otras. También se puede diagnosticar esta enfermedad mediante la identificación genética de este agente sometándolo a una prueba de PCR para la amplificación de secuencias específicas del ADN (Manning *et al.*, 2001). Los métodos de extracción directa de ADN en MAP, se han empleado en muestras procedentes de heces, leche, sangre y tejidos.

La tipificación genética de más de mil aislamientos de Map a escala mundial ha permitido (mediante el análisis con endonucleasas de restricción e hibridación de ADN utilizando la secuencia de inserción IS900 como sonda) el establecimiento de diferencias entre cepas ovinas, cepas bovinas, y cepas clasificadas como intermedias sugiriendo una cierta adaptación o preferencia de hospedador (Collins *et al.*, 1990).

Respecto del diagnóstico de MAP por PCR, los iniciadores que más se han estudiado son los diseñados a partir de la secuencia nucleotídica llamada secuencia de inserción 900 (IS900), específica de Map. Erume en el año 2001 diseñó una PCR-anidada a partir de la secuencia IS900, ésta se caracteriza por utilizar dos pares de iniciadores: el primero es diseñado con base en una región de la IS900, con él se obtiene un producto de amplificación mayor a 500 pares de bases (pb); el segundo fue diseñado de una región interna al producto amplificado, con él se obtiene un producto de amplificación más pequeño que el producto original, ello aumenta la sensibilidad y especificidad de la prueba (Erume *et al.*, 2001).

En el caso de PCR se estima que la sensibilidad y la especificidad son aproximadamente del 71,5% y del 92,3%, sin variar mucho entre varios autores (Garrido, 2000), aunque en los últimos años se han estudiado métodos que puedan mejorar la extracción del ADN del agente para mejorar la sensibilidad y especificidad respectivamente.

Prevención y tratamiento

Debido a la dificultad para realizar el diagnóstico de esta enfermedad, el tratamiento resulta no ser efectivo al momento que la enfermedad presenta signos, por lo que se recomienda tener programas de prevención y control de esta enfermedad. Incluso se puede implementar un programa de inmunización (Chávez, 2006).

Por lo tanto, el éxito de los programas de control se basa en la valoración de los riesgos, el establecimiento de pautas de control específicas, dependiendo del tipo de explotación, especie animal y grado de infección, y la formación del personal que lleva a cabo el programa de control (Santillán *et al.*, 2007).

En términos generales, en muchos de los trabajos realizados sobre la vacunación a nivel de rebaños se observó que en aquellos en los que se vacunó se produjo una disminución en lo que respecta al número de animales infectados como de aquellos en un estadio de la enfermedad avanzado, además de una reducción en el número de animales excretores y de la cantidad de micobacterias excretadas al medio (Cocito *et al.*, 1994).

Las vacunas desarrolladas hasta la fecha para la prevención de la enfermedad de Johne o paratuberculosis han sido realizadas a partir de cepas vivas atenuadas, de cepas inactivadas, o de fracciones de *M. a. paratuberculosis* en la cual se ha demostrado la eficacia, más en México no hay vacuna disponible en el mercado, además de que se ha demostrado que presenta cierta interferencia en el diagnóstico de tuberculosis en bovinos.

Las vacunas para la paratuberculosis están recomendadas para su uso en animales muy jóvenes, ya que es necesario prevenir la infección y disminuir la posibilidad de interferencia en el diagnóstico de tuberculosis para los bovinos, aunque esto representa una oportunidad en el área de los ovinos y caprinos. Actualmente, la experiencia con animales mayores de un año es escasa, pero recientes estudios sobre la patogénesis, así como también la opinión de algunos expertos en el campo sugieren que los animales adultos puede tener algún manejo, como la separación de estos y su vacunación de animales de remplazo únicamente así como los avances terapéuticos recientes deben ser tomados en cuenta (Bastida, 2011).

MATERIALES Y MÉTODOS

Localización del área de estudio

Esta investigación se realizó en comunidades de los municipios de Salinas y Villa de Ramos, San Luis Potosí; Villa de Ramos, localizado a 22° 50' LN y 101° 55' LO, a una altitud de 2,200 m; y Salinas a 22°38' LN y 101°43' LO, con una altitud de 2,070 m. Por la cercanía de los dos municipios, son muy parecidos y predominan las rocas ígneas, principalmente al norte y sur de los dos municipios con elevaciones reolíticas y basálticas, y en menor importancia se encuentran rocas sedimentarias como: calizas y areniscas, hacia el oriente y norte, respectivamente.

Entre la gran cantidad de lagunas en la zona centro, se pueden mencionar las de Salinas, las Cruces, la Mesilla y Chalpa, que se caracterizan por su gran cantidad de sales y por encontrarse secas la mayor parte del año; el agua de lluvias se infiltra rápidamente por lo que se encuentran acuíferos libres con un nivel freático muy superficial menor de 10 metros.

Una pequeña porción al norte del municipio tiene un clima muy seco templado, el clima predominante en su parte central de norte a sur es seco templado; en toda la parte este colindando con los municipios de Charcas, Venado y Moctezuma, es semi seco templado. Su temperatura media anual es de 18.7 °C y su precipitación pluvial es de 391 mm.

Con respecto a la flora, los tipos de vegetación se ha definido fundamentalmente por su fisonomía derivada de sus especies predominantes, de las cuales tenemos: matorral desértico, micrófilo, izotal, cardonal y nopalera y la fauna se caracteriza por las especies dominantes como: lagartijas, liebres, aves silvestres y víboras de cascabel.

Las Características del Suelo del 50 % de su superficie está ocupada por suelos litosol, eútrico y diversos tipos como fluvisol y el fluvisol gléyico. Su uso es pecuario en un 80 % del territorio municipal.

Animales

Se muestreó un total de 203 ovinos mayores de dos años de edad, provenientes de 30 rebaños, localizados en ambos municipios; de los cuales no se tenían antecedentes de incidencia de la enfermedad.

Muestras

Se muestreará el 10 % de cada rebaño hasta obtener un total de 203 muestras de heces fecales. Las muestras de heces se toman directamente del recto del animal, para después conservarlo en refrigeración hasta el momento de realizar la prueba.

Prueba PCR-anidada

Erume y colaboradores diseñaron una PCR-anidada a partir de la secuencia IS900, ésta se caracteriza por utilizar dos pares de iniciadores: el primero es diseñado con base en una región de la IS900, con él se obtiene un producto de amplificación mayor a 500 pares de bases (pb); el segundo fue diseñado de una región interna al producto amplificado, con él se obtiene un producto de amplificación más pequeño que el producto original, ello aumenta la sensibilidad y especificidad de la prueba. Erume *et al.*, 2001).

La identificación de este agente implica la realización de una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) dirigida a la secuencia genética específica de MAP. Inicialmente se realiza una extracción del ADN a partir de las colonias mediante un protocolo de extracción o simplemente con el hervido de las colonias en agua ultra-pura estéril. Posteriormente el ADN purificado se somete a una PCR para la amplificación de secuencias específicas del ADN. Este protocolo consta de tres fases:

- 1) Desnaturalización para la separación de la doble cadena de ADN
- 2) Hibridación de los cebadores o iniciadores de forma específica a su secuencia de ADN complementaria
- 3) Elongación de la cadena complementaria. Este proceso se repite un número

determinado de ciclos para la obtención suficiente de ADN que permita ser visualizado generalmente en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio.

Secuencias de inserción

Las secuencias de inserción son elementos genéticos cortos de ADN (0,8-2,5 kb) que pueden moverse de una posición cromosómica a otra del mismo o diferente cromosoma que codifican proteínas relacionadas con su capacidad de transposición, como las proteasas. Las secuencias de inserción se han empleado como elementos genéticos diana para la identificación y caracterización molecular MAP mediante PCR y análisis de los polimorfismos genéticos (RFLP) (Castellanos, 2010).

IS900

Uno de los acontecimientos más importantes en la historia de la paratuberculosis fue la descripción por dos grupos de trabajo de una secuencia de inserción específica de *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis*, la secuencia de inserción IS900 (Collins *et al.*, 1990).

Extracción directa de ADN

La extracción de ADN combinada con una PCR específica también puede realizarse directamente en la muestra clínica. Esto conlleva una serie de ventajas cuando se compara con la técnica de cultivo microbiológico ya que es un protocolo corto obteniéndose resultados muy rápidos (Garrido *et al.*, 2000). Además, estos protocolos son muy útiles para la identificación de aislados de MAP difíciles de cultivar como son algunos aislados de ovinos. Sin embargo, la sensibilidad se ve afectada tanto por la presencia de inhibidores de la PCR en las muestras clínicas (principalmente heces) como por la técnica de extracción de ADN empleada.

La eliminación de los inhibidores de la PCR para evitar falsos negativos, puede realizarse mediante una purificación del ADN, neutralización de estos compuestos, realizando diluciones del ADN obtenido o bien utilizando plásmidos indicadores (Castellanos, 2010).

Preparación de las muestras

En cada rebaño se recolectaron muestras de heces, de un número representativo de animales asintomáticos, hasta completar un total de 203 muestras. Las muestras y los animales muestreados fueron identificados. Las muestras fecales se obtuvieron por vía rectal mediante un guante de plástico de palpación rectal y se conservaron en congelación a -20°C , hasta su procesamiento de extracción de ADN, la cual se llevó a cabo con la técnica descrita por Garrido *et al.* (2000), en donde brevemente se hace lo siguiente: Se tomaron 2 g de heces y se disolvieron durante 15 min en 40 mL de cloruro de N-cetylpiridinio (HCP) (Becton Dickinson, Estados Unidos de América) a 0.76%, se dejaron en reposo durante 18 horas, se tomaron 20 mL de la solución, se centrifugó durante 10 min a 300 g. A la pastilla obtenida, se le realizaron tres lavados con 5 mL de solución amortiguadora de fosfatos (PBS).

La pastilla fue transferida a microtubos y se centrifugó por 5 min a 14 000 g (Jaimes *et al.*, 2008). La lisis celular se realizó con el método de enfriamiento-calentamiento (Garrido *et al.*, 2000). La pastilla obtenida fue transferida a criotubos y resuspendida en 500 μL de TE- Tritón 100X (Tris 50 mM, EDTA 10 mM, pH 8; tritón 50 mM). Las muestras se colocaron tres veces a -80°C en nitrógeno durante 5 min y en horno a 100°C por 5 min (Jaimes *et al.*, 2008). Para el caso de la extracción de ADN, se realizó mediante la técnica descrita por Jaimes *et al.* (2008).

Se agregaron 450 μL de isotiocianato de guanidina (Sigma Chemical Co., Estados Unidos de América) (5M) y 250 μL de acetato de amonio (Sigma Chemical Co., Estados Unidos de América) (7.5 M pH 6.3), y se colocaron en hielo durante 15 min. Las muestras se transfirieron a microtubos y se les adicionó en dos ocasiones 500 μL de

cloroformo (Sigma Chemical Co., Estados Unidos de América), -alcohol isoamílico (24:1), se centrifugó durante 5 min a 14 000 g, y a la fase acuosa obtenida se le agregaron 450 µL de isopropanol (Sigma Chemical Co., Estados Unidos de América) y se colocó a -20°C durante toda la noche. Se centrifugó durante 15 min a 14 000 g, se realizaron dos lavados con 1 mL de etanol a 70% y se centrifugó durante 5 min a 14 000 g, el ADN se secó a temperatura ambiente y se resuspendió en 100 µL de agua miliQ.

Procedimiento de la PCR anidada

Para la PCR anidada se utilizaron los iniciadores (Accseso lab, S.A. de C.V., México) descritos por Erume *et al.* (2001); Ptb1 (5' TGA TCT GGA CAA TGA CGG TTA CGG A 3') y Ptb4 (5'CGC GGC ACG GCT CTT GTT 3') con los que se obtiene un producto de amplificación de 563 pb; para la segunda reacción de PCR se usaron 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 de 210 pb. Los procedimientos de amplificación y visualización se llevaron a cabo según Jaimes *et al. en el* 2008.

Para la primera reacción se utilizaron 3 µL (10 ng/µL) de ADN proveniente de heces de ovinos, 5 µL de amortiguador de PCR (67 mM/µL), 3 µL MgCl₂ (Sigma Chemical Co., Estados Unidos de América) 2mM (30 mM/µL), 1 µL dNTP's (Gibco BRL Co., Estados Unidos de América) 200 mM c/u, 1 µL (25 pMol) de los iniciadores Ptb 1 y Ptb 4 y 0.2 µL (1 U) de ADN polimerasa (Sigma Chemical Co., Estados Unidos de América) termoestable (5 U/µL) y 35.8 µL de agua miliQ, en un volumen final de 50 µL. Las muestras se trabajaron en un termociclador (PCR Sprint1, Termo Electron, Co., Estados Unidos de América) con el siguiente programa: desnaturalización inicial a 95°C por 5 min, seguido de 35 ciclos a 95°C por 1 min, 65°C por 1 min y 72°C por 1 min, así como extensión final a 72°C por 5 min. Para la segunda amplificación, 3 µL de la primera amplificación fueron transferidos a microtubos de PCR que contenían la misma cantidad y concentración de reactivos descritos anteriormente, excepto que los iniciadores Ptb1 y Ptb4 fueron sustituidos por los iniciadores Ptb2 y Ptb3. Se utilizó el mismo programa del

termociclador (PCR Sprint1, Termo Electron, Co., Estados Unidos de América) Se incluyó como testigo positivo el ADN de una cepa Map (ATCC 19698). Los productos de amplificación fueron visualizados en gel de agarosa a los 2%, teñidos con bromuro de etidio (Sigma Chemical Co., Estados Unidos de América).

Método estadístico

Para determinar el tamaño de muestra poblacional ($n = 203$), se consideró una prevalencia de la Paratuberculosis ovina de 15.0 %, empleando un nivel de confianza de un 95.0 % y un porcentaje de error de un 5.0 %, según la metodología descrita por Lwanga y Lemeshow 1991; muestrear el 10% de cada rebaño, determinado por el total de estos. Para el análisis estadístico, se utilizó la prueba de Chi-cuadrada (χ^2), siendo una prueba de hipótesis que determina si dos variables están relacionadas o no, la cual se usó para comparar la prevalencia de la enfermedad entre las comunidades. El análisis se realizó con el programa SPSS 15.0 para Windows.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las muestras se obtuvieron de 30 rebaños ovinos, localizados en 10 comunidades de los municipios de Salinas y Villa de Ramos. De un total de 203 muestras que se procesaron y analizaron, se obtuvieron un total de 18 positivas, obteniendo una prevalencia de 8.87 % (18/203). En el país se han determinado prevalencias en rastros de 1.2 a 8.4 % para ganado caprino y de 0.8 a 4.4 % en el caso de ganado ovino (Chávez, 2006). Otros estudios revelaron 4.33 % (60/1385) de seropositividad por medio de inmunodifusión en gel agar en ovinos (Santillán et al., 2007) y 8.03% (74/921) de animales positivos en bovinos (Guzmán et al., 2008). De la misma manera, Sánchez-Govea (2012) con ovinos del municipio de Villa de Ramos, S.L.P. utilizando la prueba de Inmunodifusión en Gel de Agar, reportó una prevalencia de 8.42 %. En el caso de un rastro en Querétaro, el serodiagnóstico mostró un 18 % (76/418) positivos y un 3.1 % (13/418) sospechosos (Méndez, 2008).

Se encontraron prevalencias entre rebaños de los dos municipios, desde 4.26 % a 66.67 %. Se encontró diferencia significativa entre comunidades ($p = 0.002$), de acuerdo a la prueba de Chi-cuadrada. Esta diferencia pudo ser ocasionada por el tamaño de la muestra, ya que se encontraron rebaños pequeños ($n = 30$). De los 30 rebaños en los dos municipios muestreados, se obtuvieron muestras positivas en 7 de ellos, lo cual representa un 23 % de rebaños infectados con MAP.

Se sabe que cuando se utiliza una prueba de PCR con ADN obtenido de cepas bacterianas puras, la sensibilidad es de 100%, pero al utilizar ADN de muestras biológicas, en este caso heces, la sensibilidad puede verse reducida por la presencia de inhibidores, como las células epiteliales, la sangre, las sales biliares, componentes de vegetales y los carbohidratos complejos, cuya remoción aún representa el mayor reto para mejorar la sensibilidad (Jaimes, 2008).

Cuadro 3. Distribución de muestras positivas y negativas con prevalencia.

COMUNIDAD	TOTAL DE MUESTRAS	POSITIV.	NEG.	PREV. %	No. REBAÑOS
Cerro Pinillos	10	0	10	0.00	1
Diego Martin	7	1	6	14.29	2
El Calvario	3	1	2	33.33	1
El Zacatón	54	6	48	11.11	7
La Herradura	47	2	45	4.26	6
Lagunillas	10	0	10	0.00	1
La mina	3	2	1	66.67	1
San Pedro del Saltito	30	0	30	0.00	5
Villa de Ramos	32	4	28	12.50	5
Zaragoza	7	2	5	28.57	1
TOTAL	203	18	185	8.87	30

CONCLUSIONES

Los resultados de este estudio demuestran que la paratuberculosis se encuentra distribuida en rebaños de ovinos de los dos municipios en estudio.

La excreción intermitente y escaso número del agente causal en heces, dificultan el diagnóstico de Map, lo que podría estar afectando la capacidad de detección de la infección y que la prevalencia podría ser mayor, a la reportada en este estudio. Una de las ventajas de PCR-anidada, es que permite detectar animales que excretan el bacilo tanto viables y no viables en heces; contrario a los métodos serológicos de respuesta humoral, en donde es necesario que la bacteria active el sistema inmune para ser detectada la presencia de la enfermedad.

Una de los problemas más importantes, es la situación en la que se encuentran los productores de esta región, la cual ha sido fuertemente afectada por la sequía, lo cual ha llevado a muchos de estos a tener problemas para su alimentación del ganado, ya que es deficiente por lo que los animales son más propensos a presentar enfermedades, sumándose a esto la falta de esquemas preventivos de enfermedades, y buenas prácticas de manejo, teniendo en si sistemas deficientes, lo cual favorece a una menor producción y haciendo más difícil poder tener un panorama más completo de esta enfermedad, faltando más datos con los cuales se podría saber el impacto real y sus pérdidas.

LITERATURA CITADA

- Bastida, F., Juste R. A. 2011. Paratuberculosis Control: A review with a focus on vaccination. *Journal imm trps vaccs*, 9:8 Doi:10.1186/1476-8518-9-8. Issn 1476-8518, Consultado en la pagina, <Http://Www.Jibtherapies.Com/Content/9/1/8>.
- Castellanos, E., Romero, B., Rodríguez, S., de Juan, L., Bezos, J., Mateos. 2010. Molecular characterization of *Mycobacterium avium* subespecie paratuberculosis Types II and III isolates by a combination of MIRU-VNTR loci. *Vet Microbiol*, Volume 144, Issues 1–2, 29 July 2010, Pages 118–126.
- Cocito, C., Gilot, P., Coene, M., de Kesel, M., Poupart, P., Vannuffel, P. 1994. Paratuberculosis. *Clin Microbiol Rev* 7: 328-345.
- Cirone, K., Morsella, C., Romano, M., Paolicchi, F., Collins, M. T. 2007. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: Presencia en los alimentos y su relación con la enfermedad de Crohn. *Revista Argentina de Microbiología*. 39: 57-68. ISSN 0325-755471
- Collins, D. M., Gabric, D. M., Lisle, G. W. 1990. Identification of two groups of *Mycobacterium paratuberculosis* strains by restriction endonuclease analysis and DNA hybridization. *J Clin Microbiol* 28: 1591-1596.
- Collins, M. T. 1999. *Johne's Disease for busy veterinarians*. Ed. School of Veterinary - Medicine, University of Wisconsin, Madison, USA. Pp. 6.
- Collins, M. T., 2003. Update on paratuberculosis: Pathology and diagnosis. Vol. 56 (12). *Irish Vet Journal*.
- CONASA. 2010. Plan estratégico del programa para la atención de la Paratuberculosis en ganado bovino, ovino y caprino en México. Unidad de Posgrado e Investigación de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM. www.conasamexico.org

- Chávez, G. G., Trigo Tavera, F. J., Ivo Pavlik, P. S. 2004. Identificación del polimorfismo genético de aislamientos de *Mycobacterium avium* subesp. *paratuberculosis* de caprinos del centro de México. *Vet Mex* 35:75- 84.
- Chávez, G.G. 2006. Paratuberculosis en ovinos y caprinos. *Acontecer ovino* Diciembre 33, 45-7.
- Chiodini, R. J., Kruiningen, H. J. Van., Merkal, R. S. 1984. Ruminant *paratuberculosis* Johne's disease: the current status and future prospects. *Cornell Vet.* 74:218–262.
- Dargatz, D., Byrum, B. A., Barber. L. K., Raymond, B. S., Sweeney, W., Whitlock, R. H. 2001. Evaluation of a commercial ELISA for diagnosis of *paratuberculosis* in cattle. *J American Vet Medical*, Vol. 218, No. 7, Pag.1163-1166.
- Erume, J., Spersger, J., Rosengarten, R. 2001. Rapid detection of *mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* from cattle and zoo animals by Nested PCR. *Afr Health Sci*: 1:83 – 89.
- Euzeby J. P. 2010. List of prokaryotic names with standing in nomenclature <http://www.bacterio.cict.fr/m/mycobacterium.html>. Consultado enero de 2011.
- Ferré, L. J. 2005. Paratuberculosis caprina: aportaciones a su diagnóstico, epidemiología molecular y control. Tesis para optar al grado de doctor. Madrid. ISBN: 84-669-2852-9. Universidad Complutense de Madrid. Madrid, España.
- Greig, A., Stevenson, K., Perez, V., Pirie, A. A., Grant, J. M., Sharp, J. M. 1997. Paratuberculosis in wild rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). *Vet Rec* 140: 141-143.
- Garrido, J. M., Cortabarría, N., Oguiza, J. A., Aduriz, G., Juste, R. A. 2000. Use of PCR method on fecal samples for diagnosis of sheep *paratuberculosis*. *Vet Microbiol*; 77:379-386.
- Goren, M. B., Brenna, P. J. 1979. Mycobacterial lipids: Chemistry and biologic activities. In: Younmans, G.P. Edit. *Tuberculosis*, W. B. Saunders, Philadelphia, pp. 69-113.

- Guzmán, R. C. C., Santillán, F. M. A., Córdova, L. D., Martínez, C. A. G., Rosado, R. M. I. 2008. Seroprevalencia de paratuberculosis bovina en 18 municipios del estado de Guanajuato. XLIV Reunión Nacional de Investigación Pecuaria Yucatán. Diagnóstico, Control y Epidemiología .Vol, 41, p.53.
- Inderlied, C. B., Kemper, C. A., Bermudez, L. E.1993. The *Mycobacterium avium* complex. Clin Microbiol Rev 6:266-310.
- Jaimes, N. G., Santillán, F. M. A., Hernández, C. O. A., López, D. C., Guzmán, R. C., Beatriz. 2008. Detección de *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis*, por medio de PCR-anidada a partir de muestras de heces de ovinos. Vet. Méx., 39, 4.
- Juste, R. A., Adúriz, G., Saez de Ocariz, C., Marco, J. C., Cuervo, L. 1992. *Paratuberculosis* in sheep flocks. Epidemiological aspects. En Proceedings of the 3rd International Colloquium on PTB. Edit: Orlando, EEUU. Pag.424-427.
- Kennedy, D. J., Benedictus, G. 2001. Control of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. Infection in agricultural species. Rev.- Off Int Epizoot, 20(1):151-79
- Kruze, J. 2006. *Paratuberculosis* Bovina; Una enfermedad emergente. Jornadas de Actualización Científica en Medicina Veterinaria. Los Angeles, consultado el 10 de Junio de 2010, en la página http://www.cmvbiobio.cl/custom/adjuntos/pres_h_kruze.pdf
- Kudahl, A. B., Nielsen, S. S. 2009. Effect of *paratuberculosis* on slaughter weight and slaughter value of dairy cows. J Dairy Sci 92: 4340-4346.
- Lee A., Griffiths, T. A., Parab, R. S., King, R.K., Dubinsky, M.C., Urbanski, S.J, Wrobel,I, Rioux, K.P. 2011. Association of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* with Crohn Disease in pediatric patients.J Pediatr Gastroenterol Nutr. Feb; 52(2):170-4.

- Li, L., Bannantine, J. P., Zhang, Q., Amonsin, A., May, B. J., Alt, D. 2005. The complete genome sequence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. Proc Natl Acad Sci USA 102: 12344-12349.
- Manning, E. J., Collins, M. T. 2001. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: pathogen, pathogenesis and diagnosis. Rev. Sci. Tech. 20, 133-150.
- Manual de la OIE (Organización Internacional de Sanidad Animal) sobre animales terrestres. 2004. Paratuberculosis (Enfermedad de Johne) capítulo 2.2.6. Pág. 377-390.
- Medina, J. M., Alonso, J. M., Jiménez, G, W., Martínez, R, S., Hermoso De Mendoza, J., Gómez, L., Bazán, J. 2001. Paratuberculosis, una Enfermedad De Difícil Control.
- Méndez, G. M., Perea, A. R., Enríquez, V. A., García, C. L. 2008. Análisis descriptivo de casos recibidos para diagnóstico de paratuberculosis ovina y caprina en el laboratorio de patología animal de Calamanda, Querétaro. Consultado de internet. Junio. 2010. <http://www.ovinoscaprinos.com.ar/SANIDAD/Analisis%20para%20el%20diagnostico%20de%20Partuberculosis%20Ovina%20y%20Caprina.pdf>
- Merkal, R. S., Curran, B. J. 1974. Growth and metabolic characteristics of *Mycobacterium paratuberculosis*. Appl. Microbiol. 28, 276-279.
- National Animal Health Monitoring System (NAHMS). 1997. Johne's disease on U.S. dairy operations. Report N245.1087. USDA:APHIS:VS, CEAH, National Animal Health Monitoring System, Fort Collins, Colo.
- Ott, S. L., Wells, S. J., Wagner, B. A. 1999. Herd-level economic losses associated with Johne's disease on US dairy operations. Prev.Vet.Med., 40:179-92.
- Paolicchi, F., Cirone, K., Morsella, C., Gioffre. A., Cataldi, A. 2005. Isolation of

Mycobacterium avium subsp. *Paratuberculosis* from commercial pasteurized milk. Proceedings of the 8th International Colloquium on Paratuberculosis. p. 68, Copenhagen, Denmark.

Rodríguez, G., M. 2008. Mycobacterias. Public Health Research Institute Center and UMDNJ - New Jersey Med School 225 Warren Street Newark, New Jersey.

Quadri, L. E., Sello, J., Keating, T. A., Weinreb, P. H., Walsh, C. T. 1998. Identification of a *Mycobacterium tuberculosis* gene cluster encoding the biosynthetic enzymes for assembly of the virulence-conferring siderophoremecobactin. ChemBiol 5: 631-645.

Schwartz, B. D., De Voss, J. J. 2001. Structure and absolute configuration of mycobactin J. Tetrahedron Letters 42, 3653-3655.

Santillán, F. M. A., Córdova, L. D., Guzmán, R. C. C., Jaimes, M. N. G., Hernández, C. O. A. 2007. Características generales de la paratuberculosis ovina en grupos GGAVATT del estado de Guanajuato. XLIII Reunión Nacional de Investigación Pecuaria Sinaloa.

Salgado, M., Kruze, J., Collins, T. M. 2007. Diagnosis of paratuberculosis by fecal culture and ELISA on milk and serum samples in two types of Chilean dairy goat herds. J Vet Diagn Invest 19:99-102.

Tejedor, M. F. J. 1993. Estudio epidemiológico de la Paratuberculosis ovina en la provincia de Segovia. Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid, Tesis Doctoral.

Thorel, M. F., Krichevsky, M., Levy-Frebault, V. V. 1990. Numerical taxonomy of mycobactin-dependent mycobacteria, emended description of *Mycobacterium avium*, and description of *Mycobacterium avium* subsp. *avium*., *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* subsp. *nov.*, and *Mycobacterium avium* subsp. *silvaticum* subsp. *nov.* Int. J. Syst. Bacteriol. 40, 254-260.

Wayne, L. G., Diaz, G. A. 1986. A double staining method for differentiating between

two classes of mycobacterial catalase in polyacrylamide electrophoresis gels.
Anal Biochem 157: 89-92.

Windsor, P., Eppleston, J., Whittington, R., Jones, J., Britton, A. 2002. Efficacy of a killed *Mycobacterium avium* subsp. Paratuberculosis vaccine for the control of Jonhes disease in Australian sheep flocks. Proceedings of the 7th international Colloquium on Paratuberculosis. Edit. Bilbao, España. pag. 420-423.