



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS
CAMPECHE-CÓRDOBA-MONTECILLO-PUEBLA-SAN LUIS POTOSÍ-TABASCO-VERACRUZ

CAMPUS SAN LUIS POTOSÍ

DOCTORADO EN CIENCIAS
EN LA MODALIDAD DE INVESTIGACION

**DIAGNÓSTICO, ESTUDIO EPIDEMIOLÓGICO Y RESISTENCIA
GENÉTICA A LA PARATUBERCULOSIS OVINA (*Mycobacterium
avium* subsp. *paratuberculosis*)**

FELIPE DE JESÚS MORÓN CEDILLO

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

Salinas de Hgo, San Luis Potosí, México
Junio de 2014



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS
CAMPECHE-CÓRDOBA-MONTECILLO-PUEBLA-SAN LUIS POTOSÍ-TABASCO-VERACRUZ

CAMPUS SAN LUIS POTOSÍ

DOCTORADO EN CIENCIAS
EN LA MODALIDAD DE INVESTIGACION

**DIAGNÓSTICO, ESTUDIO EPIDEMIOLÓGICO Y RESISTENCIA
GENÉTICA A LA PARATUBERCULOSIS OVINA (*Mycobacterium
avium subs. paratuberculosis*)**

FELIPE DE JESÚS MORÓN CEDILLO

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

Salinas de Hgo, San Luis Potosí, México
Junio de 2014

La presente tesis, titulada: **DIAGNÓSTICO, ESTUDIO EPIDEMIOLÓGICO Y RESISTENCIA GENÉTICA A LA PARATUBERCULOSIS OVINA (*Mycobacterium avium* subs. *paratuberculosis*)**, realizada por el alumno **Felipe de Jesús Morón Cedillo**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada y aceptada por el mismo como requisito parcial para obtener el grado de:

**DOCTORADO EN CIENCIAS
EN LA MODALIDAD DE INVESTIGACION**

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO:

DR. BENJAMIN FIGUEROA SANDOVAL

DIRECTOR DE TESIS:

DR. CESAR CORTEZ ROMERO

ASESOR:

DR. GILDARDO AQUINO PEREZ

ASESOR:

DR. ALEJANDRO AMANTE OROZCO

ASESOR:

DR. JAIME GALLEGOS SÁNCHEZ

SALINAS DE HGO., SAN LUIS POTOSÍ
JUNIO DE 2014

DIAGNÓSTICO, ESTUDIO EPIDEMIOLÓGICO Y RESISTENCIA GENÉTICA A LA PARATUBERCULOSIS OVINA (*Mycobacterium avium* subs. *paratuberculosis*)

Felipe de Jesús Morón Cedillo, M.C.

Colegio de Postgraduados, 2014

Resumen

La paratuberculosis (Ptb) es una afección crónica del intestino causada por *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (*Map*), que afecta principalmente a rumiantes. Es una enfermedad de difusión mundial y provoca importantes pérdidas económicas en el sector ganadero. A pesar de no haber sido demostrado de manera concluyente, *Map* también parece estar involucrado en la enfermedad de Crohn en humanos. En esta tesis doctoral se han abordado distintos aspectos relacionados con la paratuberculosis ovina, principalmente difundir la importancia de prevalencia de la infección en ovinos de la zona del altiplano potosino, así como evidenciar los factores de manejo que influyen sobre la presencia del *Mycobacterium avium* subs. *paratuberculosis* (*Map*) y la caracterización molecular y su aplicación práctica en la susceptibilidad / resistencia de la enfermedad.

Este trabajo consta de tres estudios cuyos objetivos están relacionados con el conocimiento, diagnóstico y transmisión de la enfermedad.

En el primer estudio el objetivo fue el diagnóstico de la prevalencia de la enfermedad en ovinos por dos métodos: la prueba de Inmunodifusión en Gel de Agar (IDGA) en sangre y la prueba de Reacción en Cadena de la Polimerasa anidada (PCR-anidada) en heces. Con la prueba IDGA se obtuvo una prevalencia de Ptb ovina de 9.48 %, con rangos de 4.35 a 33.33 % entre las comunidades estudiadas; y con la prueba de PCR-anidada, la prevalencia fue 7.58 %, teniendo prevalencias entre las comunidades en estudio desde 4.26 a 33.33 %. No se encontró diferencia significativa ($p = 0.262$) para el diagnóstico de *Map* con las pruebas utilizadas.

En el segundo estudio el objetivo fue identificar prácticas de manejo como: sanidad, tamaño del rebaño, edad de los animales, y componente racial entre otros, asociadas con la seroprevalencia de paratuberculosis en ovinos. Se diagnosticaron 242 muestras sanguíneas de ovejas usando la prueba de inmunodifusión en gel de agar (IDAG). Se encontró que la edad es un factor de riesgo para diagnosticar ovinos enfermos (OR = 3.57). La raza Rambouillet presentó mayor riesgo de contraer la enfermedad (OR = 1.11). Al no llevar prácticas de manejo sanitario en los rebaños ovinos, resultó un factor de riesgo para la enfermedad (OR = 9.49). La compra de animales fuera de la localidad, también puede ser un factor de riesgo (OR = 4.51 y 5.86). Los resultados sugieren que existe más riesgo de paratuberculosis, por el contagio fecal-oral propio de esta enfermedad, en cuanto más grande sea el total de animales y más intensivo sea el manejo en el predio.

En el tercer estudio, el objetivo fue detectar polimorfismos en la región 3'UTR del gen SLC11A1 en ovinos, y estimar su relación con los resultados de diagnóstico serológico y fecal a la paratuberculosis. Los resultados de este estudio indican una posible asociación de polimorfismos encontrados dentro de la región 3'UTR del gen, con la resistencia a la paratuberculosis en ovinos al mostrar una diferencia ($p < 0.001$) entre las frecuencias alélicas encontradas. Los alelos encontrados con mayor frecuencia (A22, A23 y A24), sugiere pueden ser utilizados como marcador para asociar la resistencia de la paratuberculosis ovina en región A polimórfica, de los siete alelos polimórficos encontrados (A19, A20, A21, A22, A23, A24 y A25).

Palabras clave: Paratuberculosis, Prevalencia, IDGA, PCR, Diagnóstico, polimorfismos, SLC11A1.

**DIAGNOSIS, EPIDEMIOLOGY STUDY AND GENETIC RESISTANCE TO
OVINE PARATUBERCULOSIS (*Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*)
FELIPE DE JESÚS MORÓN CEDILLO**

Colegio de Postgraduados, 2014

Abstract

Paratuberculosis is a chronic condition of the intestine caused by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (*Map*), which mainly affects ruminants. It is broadcast worldwide and causes significant economic losses in the livestock sector. Despite not having been conclusively demonstrated, *Map* also appears to be involved in Crohn's disease in humans, and the detection of the bacterium in potential vehicles of transmission to humans has raised concerns in public health.

This survey consists of three studies whose objectives are related to the understanding, diagnosis, transmission and control of disease.

In the first study by GAID and PCR was diagnosed in blood and feces, respectively, samples of sheep. AGID test with a prevalence of 9.48% Ptb sheep was obtained, ranging between 4.35 and 33.33% among the communities studied; and test-nested PCR, the prevalence was 7.58%, with a fluctuation between communities of 33.33% and 4.26. No significant difference ($p = 0.262$) for diagnostic tests used with *Map* found.

In the second study objective was to identify herd management practices associated with paratuberculosis seroprevalence in sheep. Two hundred and forty two sheep blood samples were diagnosed using the test agar gel immunodiffusion (GAID). It was found that age is a risk factor for diagnosing sick sheep (OR = 3.57). The Rambouillet breed had a higher risk of contracting the disease (OR = 1.11). By not carrying health management practices proved to be a risk factor for the disease (OR = 9.49). The purchase of animals outside the resort, may also be a risk factor (OR = 4.51 and 5.86). The results suggest that there is more risk of paratuberculosis by fecal-oral transmission of the disease itself, in the larger animals and the total is more intensive management on the farm.

In the third study objective was to detect polymorphisms in the 3'UTR region of the SLC11A1 gene in sheep, and estimate its relationship with the results of serological and fecal paratuberculosis diagnosis. The results of this study indicate a possible association of polymorphisms found in the 3'UTR region of the gene, with resistance to ovine paratuberculosis to show a difference ($p < 0.001$) between the allelic frequencies encountered. The most frequently found alleles (A22, A23 and A24) suggests can be used as a marker to associate the resistance of ovine paratuberculosis in A polymorphic region of the seven polymorphic alleles found (A19, A20, A21, A22, A23, A24 and A25).

Keywords: Paratuberculosis, Prevalence, IDGA, PCR, Diagnosis, Polymorphisms, SLC11A1.

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a Dios, por estar en todo momento a mi lado, porque me da fuerza, humildad y cariño hacia mis seres queridos.

A mis padres: Hugo Morón Rocha (†) y Ma. De Jesús Cedillo de Morón, especialmente a mi madre por ser una mujer fuerte y admirable, Dios los bendiga.

A mi esposa: Judith Hernández Rodríguez, por su comprensión y ser mi compañera mejor, con todo mi amor.

A mis hijitas: Elisa y Mariana, gracias por darme la oportunidad de ser padre, las quiero.

A mis hermanos: Joel, Paco (†), La Muñe, Gerardo, Pepe, Luis, Nato, Arnoldo, Lulú, y Miguel, Gracias por quererme.

A toda mi gran familia MORÓN.

AGRADECIMIENTOS

Al COLPOS, especialmente al *Campus* San Luis, por brindarme la oportunidad de realizar mis estudios de Doctorado.

Al Fideicomiso para la Investigación Científica y Desarrollo Tecnológico del Colegio de Postgraduados (modalidad tesis), por el financiamiento en la elaboración de este trabajo.

A la Línea Prioritaria de Investigación número 5 (LPI-5): Biotecnología Microbiana, Vegetal y Animal, por su apoyo brindado en mi formación profesional.

A mi Profesor Consejero, Dr. Benjamín Figueroa Sandoval, quien siempre estuvo pendiente de la culminación de mis estudios, a pesar de sus muchas actividades, Gracias.

A mi Director de Tesis, Dr. Cesar Cortez Romero, por apoyarme siempre para lograr mi superación profesional.

A mis Asesores, Dr. Gildardo Aquino Pérez, Dr. Alejandro Amante Orozco y Dr. Jaime Gallegos Sánchez, por la confianza brindada y acertados consejos.

A mis Sinodales externos Dr. Gilberto Chávez Gris (CEIEPAA - FMVZ-UNAM) y Dr. José Francisco Morales Alvarez (CENID Microbiología Animal, INIFAP) gracias por su apoyo incondicional en mi formación doctoral.

A todas las Personas que me ayudaron a través de mi formación doctoral, y que al mencionarlas no cabrían en este escrito, Muchas gracias.

CONTENIDO

I. INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
1.1. Objetivo General.....	3
1.2. Objetivos Específicos.....	3
1.3. Hipótesis.....	3
II. REVISION DE LITERATURA.....	5
2.1. La Ganadería Ovina.....	5
2.2. Situación Sanitaria del Ganado Ovino en México.....	6
2.3. Etiología.....	7
2.3.1. Antecedentes históricos.....	7
2.3.2. Morfología y metabolismo del <i>Map</i>	8
2.3.3. Cepas de <i>Map</i>	8
2.3.4. Resistencia de <i>Map</i>	9
2.4. Infección y Patogenia.....	9
2.4.1. Entrada <i>Map</i> en el hospedero y mecanismos de supervivencia de <i>Map</i>	12
2.4.2 Establecimiento y progresión de lesión a la infección.....	15
2.5. Signos Clínicos.....	16
2.5.1. Lesiones macroscópicas.....	18
2.5.2. Lesiones microscópicas.....	19
2.5.3. Respuesta inmune del hospedero.....	20
2.6. Epidemiología.....	23
2.6.1. Factores que Influyen en la adquisición de la enfermedad.....	24
2.6.2. Edad, dosis ingerida, otros factores.....	24
2.6.3. Persistencia en el medio.....	25
2.6.4. Prevalencia.....	26
2.7. Diagnóstico.....	28
2.7.1. Identificación del agente.....	29
2.7.2. Pruebas serológicas.....	32

2.7.3. Pruebas de Inmunidad Mediada por Células.....	34
2.8. Control.....	35
2.8.1. Cambios en las prácticas de manejo.....	36
2.8.2. Prácticas de prueba y desecho.....	37
2.8.3. Vacunación.....	37
2.8.4. Tratamiento.....	39
2.9. Salud Pública.....	39
2.10. Literatura Citada.....	40
CAPITULO 1. PREVALENCIA DE LA INFECCIÓN POR <i>Mycobacterium</i>	
<i>avium</i> SUBESPECIE <i>paratuberculosis</i> EN REBAÑOS DE OVINOS DE DOS	
MUNICIPIOS DE SAN LUIS POTOSÍ, MÉXICO*	
	56
1.1. Resumen.....	56
1.2. Abstract.....	57
1.3. Introducción.....	58
1.4. Materiales y Métodos.....	60
1.4.1. Localización del área de estudio.....	60
1.4.2. Población de estudio.....	60
1.4.3. Preparación de las muestras.....	61
1.4.4. Prueba de Inmunodifusión en Gel de Agar (IDGA).....	62
1.4.5. Procedimiento de la PCR Anidada.....	62
1.4.5. Análisis Estadístico.....	63
1.5. Resultados y Discusión.....	64
1.6. Conclusiones.....	66
1.7. Agradecimiento.....	66
1.8. Literatura Citada.....	69
CAPITULO 2. PRÁCTICAS DE MANEJO ASOCIADAS CON LA SEROPRE-	
VALENCIA DE PARATUBERCULOSIS EN REBAÑOS DE OVINOS EN DOS	
MUNICIPIOS DE SAN LUIS POTOSÍ, MÉXICO**	
	72
2.1. Resumen.....	72
2.2. Abstract.....	73

2.3. Introducción.....	73
2.4. Materiales y Métodos.....	76
2.4.1. Localización del área de estudio.....	76
2.4.2. Diseño del Estudio.....	76
2.4.3. Procedimiento Serológico.....	76
2.4.4. Análisis Estadístico.....	77
2.5. Resultados y Discusión.....	78
2.5.1. Variables del Predio.....	79
2.5.2. Variables de Rebaño.....	80
2.5.3. Variables de Manejo.....	81
2.6. Conclusiones.....	82
2.7. Agradecimientos.....	83
2.8. Literatura Citada.....	87
CAPITULO 3. ASOCIACIÓN DE POLIMORFISMOS DEL GEN SLC11A1 CON LA INFECCION POR <i>Mycobacterium avium</i> SUBSP. <i>paratuberculosis</i> EN OVINOS***	
	91
3.1. Resumen.....	91
3.2. Abstract.....	92
3.3. Introducción.....	92
3.4. Materiales y Métodos.....	95
3.4.1. Muestras.....	95
3.4.2. Clasificación de los Rebaños.....	96
3.4.3. Extracción y cuantificación de ADN.....	96
3.4.4. Análisis de polimorfismos.....	97
3.4.5. Análisis Bioinformático.....	98
3.4.6. Análisis Estadístico.....	98
3.5. Resultados y Discusión.....	98
3.5.1. Resultados positivos y negativos a la detección de <i>Map</i> por las pruebas IDGA y PCR.....	99
3.5.2. Frecuencias de los alelos polimórficos detectados en el gen	

SLC11A1.....	99
3.5.3. Asociación de resultados positivos y negativos a <i>Map</i> con los alelos polimórficos de la región A.....	100
3.5.4. Asociación entre cada uno de los microsatélites polimórficos de la región A con los resultados a la infección con <i>Mycobacterium</i> <i>avium</i> subs. <i>paratuberculosis</i> (<i>Map</i>).....	105
3.6. Conclusiones.....	106
3.7. Agradecimientos.....	107
3.8. Literatura Citada.....	101
III. CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS.....	113

LISTA DE CUADROS

Cuadro	Descripción	Página
1	Resultados de la prevalencia de <i>Map</i> por las técnicas inmunodifusión en agar gel (IDAG) y reacción en cadena de polimerasa – anidada (PCR-anidada) en rebaños de los municipios de Salinas y Villa de Ramos, San Luis Potosí.....	67
2	Análisis de sensibilidad, especificidad y concordancia de la comparación Inmunodifusión en Gel de Agar (IDGA) empleando PCR-anidada como prueba definitiva.....	68
3	Variables relacionadas con la seropositividad por IDGA a <i>Mycobacterium avium</i> subs. <i>paratuberculosis</i> en el análisis univariado.....	85
4	Resultados de la regresión logarítmica para la relación entre las variables en estudio y los resultados positivos a <i>Map</i>	86
5	Distribución de ovinos negativos y positivos por las pruebas diagnósticas de IDAG y PCR en tres rebaños.....	104
6	Frecuencias de alelos polimórficos detectados en la región 3'UTR de gen ovino SLC11A1.....	104
7	Asociación de los resultados de las pruebas de Inmunodifusión en Gel de Agar (IDGA) y de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) con la frecuencia polimórfica identificada en la región A, en los grupos: negativo, negativo en contacto con positivo y positivo.....	105

8	Asociación entre cada uno de los microsatélites polimórficos de la región A con los resultados a la infección con <i>Mycobacterium avium</i> subs. <i>paratuberculosis</i> (<i>Map</i>).....	106
---	--	-----

LISTA DE FIGURAS

Figura	Descripción	Página
1	Amplificación del ADN genómico de heces de ovinos por PCR anidada. Amplificación de un producto de 210 pb de la IS900 de <i>Map</i> . Carril 1: marcador de tamaño molecular de 50 pb; carril 2: control positivo K1O <i>Map</i> ; carriles 3 y 6 muestras que no amplificaron; carriles 4, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12 y 13 muestras amplificadas; carril 14: control negativo.....	68

I. INTRODUCCIÓN GENERAL

A más de 100 años de que fue descrita por primera vez, la paratuberculosis (Ptb) es aun considerada un problema importante en la salud animal (Kennedy y Benedictus, 2001). La paratuberculosis también llamada enfermedad de Johne, es una enteritis granulomatosa que afecta a los rumiantes domésticos y silvestres (Erume *et al.*, 2001). También ha sido relacionada con la enfermedad de Crohn en humanos (Chiodini *et al.*, 1984b). Es una enfermedad causada por la bacteria *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (*Map*). Clínicamente se manifiesta con diarrea progresiva, pérdida de peso y eventualmente la muerte, pero esto se observa solamente en 5 a 10% de los animales infectados. Esta enfermedad se encuentra distribuida en el ámbito mundial, ocasionando grandes pérdidas económicas para los productores debido al descenso en la producción láctea, menor peso de venta, menor número de crías, costos de tratamiento y por reemplazo de animales eliminados (Dhand *et al.*, 2007). El número de casos clínicos que aparece cada año en un hato es un indicativo de la tasa de infección, ya que por cada caso clínico es probable que existan 5 ó 10 casos subclínicos (Stehman, 1996).

Además, *Map* podría jugar un papel relevante como agente zoonótico ya que actualmente está en estudio su implicación como posible agente etiológico de la enfermedad de Crohn que afecta al hombre (Hermon-Taylor *et al.*, 2000). La posible vía de transmisión del agente de los animales al hombre podría ser la leche y sus derivados. En concreto ya se ha identificado *Map* mediante PCR en leche de cabras en Reino Unido, Noruega y Suiza (Grant *et al.*, 2000; Djonne *et al.*, 2003;). Por lo tanto, la Ptb podría tener también especial importancia en la Salud Pública. En los últimos años, la producción animal presenta cambios y retos dados por un cambio en el consumidor, que exige cada vez más productos de origen animal inocuos, provenientes de rebaños certificados libres de enfermedades zoonóticas que afectan la salud pública, lo que tiene un fuerte impacto económico en el mercado.

La prevalencia de Ptb en México está poco documentada; sin embargo, un gran número de cabezas de bovinos, ovinos y caprinos han sido introducidos recientemente de Estados Unidos, Europa, Canadá, Nueva Zelanda y Australia, y en estos países se tienen reportes de la presencia de la enfermedad, por lo que se deben tener las consideraciones debidas para sospechar que existe en nuestro País. Como la Ptb no es una condición importante para la importación, algunos animales pueden llevar el microorganismo y subsecuentemente transmitir la infección a la población ganadera en México. Resultados serológicos obtenidos de casos en los estados de San Luis Potosí, Guanajuato, Querétaro, Distrito Federal, Estado de México y Veracruz, confirman la presencia de Ptb en cabras y borregos (Estévez-Denaives *et al.*, 2007)

La falta de éxito en la erradicación de enfermedades infecciosas con enfoques tradicionales, indica la necesidad de nuevas estrategias como base a resistencia genética natural a las enfermedades (Templeton *et al.*, 1988), que es la capacidad inherente de un animal previamente expuestos a resistir a la enfermedad. Aunque el ambiente de consolidación influye la variabilidad en la expresión de la enfermedad, la resistencia natural se ha encontrado ser heredable y se transmite de padres a hijos (Adams y Templeton, 1998). El gen Nramp1 (resistencia natural asociada a proteínas de macrófagos) actualmente denominado SLC11A1 (portador de solutos de la familia 11 miembro A1) parece ser uno de estos factores genéticos. La proteína se encuentra en el fagolisosoma de la membrana de los macrófagos y participa en la muerte de las bacterias (Bellamy, 2000). Se ha reportado que la susceptibilidad a la infección por *Map*, está determinada en parte por factores genéticos, así que la selección asistida por marcadores, podría ayudar a obtener poblaciones bovinas, ovinas o caprinas, cada vez más resistentes a la infección (Ruiz-Larrañaga *et al.*, 2010). Por lo que se deben instrumentar prácticas de manejo que reduzcan al mínimo o eviten completamente la aplicación de químicos, fármacos, vacunas y hormonas a los animales, con sistemas de manejo que no comprometan su bienestar. Con base en lo expuesto, y derivado de la necesidad de poder evaluar animales resistentes a la enfermedad desde temprana

edad, se pretende estudiar el gen SLC11A1 en rebaños de ovinos naturalmente infectados, con o sin signos clínicos.

1.1. Objetivo General

Estudiar la situación actual de la paratuberculosis en ganado ovino del Altiplano Potosino, debido a la importancia tanto sanitaria como económica, y a la poca información de esta enfermedad en México. Por lo que es importante establecer la tasa de prevalencia, de acuerdo a un método de diagnóstico práctico y relacionar la prevalencia con las prácticas de manejo empleadas en cada rebaño. Con estos datos relacionar una posible resistencia genética con el diagnóstico de la enfermedad.

Para lograr el objetivo general nos planteamos los siguientes:

1.2. Objetivos Específicos

1. Estimar la prevalencia de la infección por *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* (*Map*) en ovinos del Altiplano Potosino.
2. Identificar aquellas prácticas de manejo asociadas con la seroprevalencia de Ptb en ovejas infectadas naturalmente de rebaños en el Altiplano Potosino.
3. Evaluar la asociación de polimorfismos del gen SLC11A1 con ovinos probados sanos e infectados con *Map*.

1.3. Hipótesis

1. La paratuberculosis esta presente en ovinos del Altiplano Potosino.

2. Las prácticas de manejo no influyen en la seroprevalencia de paratuberculosis en ovinos del Altiplano Potosino.
3. No existe asociación entre los polimorfismos del gen ovino SLC11A1 y el estado de infección en ovinos.

II. REVISION DE LITERATURA

2.1. La Ganadería Ovina

El ovino doméstico (*Ovis aries*) produce tres productos principales: carne, lana y leche, en algunas ocasiones también es apreciada la producción de pelo (raza Karakul). Los ovinos contribuyen a la alimentación del hombre y a proveerle fibras o pieles para su vestido y otros usos industriales. El ovino, junto con el bovino y el caprino, son animales rumiantes; carecen de dientes incisivos superiores y caninos; tienen, en oposición a los incisivos inferiores, un rodete dentario contra el que presan los alimentos fibrosos que son digeridos por los microorganismos que viven en simbiosis en los compartimentos ruminales. También les permite utilizar otras fuentes simples de nutrientes como los compuestos nitrogenados no proteicos o utilizar proteína de mala calidad. El peso y tamaño de los ovinos es más bien bajo, aunque variable entre razas; junto con la cabra se le clasifica entre los “pequeños rumiantes”.

El territorio nacional cuenta según cifras preliminares a 2012 con 8'375,656 cabezas de ovinos siendo los seis estados con mayor número de cabezas de ovinos: Estado de México con 1'326,982 (15.84%), Hidalgo con 1'162,556 (13.88%), Veracruz con 664,258 (7.93%), Oaxaca con 527,369 (6.29%), Puebla con 486,786 (5.81%) y San Luis Potosí con 388,006 (4.63%). La ganadería ovina tuvo un crecimiento durante los últimos 5 años (de 2008 a 2012) del 1.8 % anual.

El estado de San Luis Potosí cuenta con 58 municipios, de los cuales los diez con mayor producción en toneladas de ovinos en pie son: Villa De Arriaga (746,975), Santo Domingo (267,053), Villa De Ramos (264,184) Charcas (207,601), Moctezuma (167,670) Mexquitic De Carmona (142,926), Venado (131,155), San Vicente Tancuayalab (122,465), San Luis Potosí (109,203) y Salinas (98,736) (SIAP, 2014).

Por otra parte la industria pecuaria nacional no es ajena a los problemas económicos por los que atraviesa el país; siendo la especie ovina una de las más afectadas a partir de una sensible baja del precio de la lana, comenzando en la década de los noventa con la desintegración de la ex URSS y la recesión económica de China, los principales países consumidores de lana, posteriormente en el nuevo siglo la recesión económica mundial liderada por Estados Unidos de América da como consecuencia la caída e inestabilidad del precio en la venta de ovinos, representado una caída en la producción mundial ovina de 40 % entre 1990 y 2007 (TWCo., 2012). Estos factores son la causa de la reducción en el rebaño ovino en general, pero particularmente el explotado en forma extensiva, dando lugar a sistemas de explotación intensiva (estabulado), aunado a estos factores influye también el aumento en los costos de producción. (Ochoa, 2001).

2.2. Situación Sanitaria del Ganado Ovino en México

Debido a la globalización, la calidad sanitaria de los animales o de los productos derivados de los mismos es actualmente un tema donde debe tomarse en cuenta la sanidad animal y la inocuidad alimentaria. Deben existir, criterios técnicos para evitar el ingreso de enfermedades, restringir la movilización y comercialización de animales que padezcan o sean posibles portadores asintomáticos de las enfermedades. La Brucelosis causada por una bacteria del género *Brucella*, el ectima contagioso causado por un virus de la familia *Poxviridae* y la paratuberculosis, podrían tener carácter de zoonosis. Las enfermedades que puedan causar enfermedades al hombre y que no están clasificadas con tal, deberán ser estudiadas para garantizar la salud humana (Tórtora, 2004).

Por otra parte, las enfermedades infecciosas ocasionan pérdidas económicas a la ganadería, tanto de manera directa, resultado de las lesiones y alteraciones que el agente infeccioso causa a los animales enfermos, lo que repercute en pérdida de peso,

se afecta la capacidad de conversión de alimento en carne, disminución de la producción de leche, algunas enfermedades producen aborto, así como baja de fertilidad, lo que ocasiona que un importante porcentaje de hembras infectadas permanezcan sin preñarse durante meses. Los animales en estas condiciones siguen consumiendo alimento, pero no generan utilidades. Las pérdidas indirectas son el resultado de las limitaciones comerciales que representa para una región o para todo un país, la presencia de determinada enfermedad infecciosa. Este aspecto ha cobrado fuerza a raíz de las políticas competitivas de comercio internacional que se viven en el mundo de hoy (Flores, 2003).

2.3. Etiología

El agente causal de la paratuberculosis es un bacilo de 1-2 μm de longitud por 0,5 μm de anchura, que normalmente forma colonias rugosas. Generalmente presenta una tinción homogénea con los métodos de tinción y decoloración con alcohol ácido (como el de Ziehl-Neelsen; ZN), aunque en el caso de formas de pared deficiente o inexistente (Chiodini *et al.* 1986a). Tal y como puede observarse en extensiones de heces y tejidos, los bacilos tienden a agruparse en grumos, supuestamente debido a la disposición que adoptan al replicarse dentro de los macrófagos que infectan (Thoen *et al.*, 1979).

2.3.1. Antecedentes históricos

La paratuberculosis también conocida como enfermedad de Johne, está causada por *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* ("Map"). Este microorganismo está incluido dentro del género *Mycobacterium*, para incluir los agentes de la tuberculosis (*M. tuberculosis*) y de la lepra (*M. leprae*). En 1985 Johne y Frothingham fueron los primeros en describir la enfermedad, tras demostrar la presencia de bacilos ácido-alcohol resistente (BAAR) en el tejido intestinal infectado de bovinos (Johne y Frothingam 1895). A pesar de denominarse inicialmente como *M. paratuberculosis* y

M. johnei durante largo tiempo, fueron Thorel *et al.* (1990), quienes revisaron la clasificación taxonómica y establecieron oficialmente el nombre, por el que se conoce actualmente a esta micobacteria, al poner en evidencia la gran similitud que presentaba con la especie *M. avium*.

2.3.2. Morfología y metabolismo del *Map*

Estos bacilos son considerados Gram positivos a pesar de la escasa penetración de colorante por medio de esta técnica. Esto es debido a la presencia de ácidos micólicos en la compleja envoltura celular de que están provistos, gracias a la cual poseen su característica resistencia. Esta envoltura está constituida por tres componentes (Rastogi *et al.*, 2001): la cápsula, cuya síntesis parece estar controlada por mecanismos reguladores en micobacterias patógenas; la pared celular, formada por unión covalente entre peptidoglicano, arabinogalactano y ácidos micólicos; y por último, la membrana citoplasmática, cuya composición es similar a la de otras bacterias. El lipoarabinomano es un fosfolípido unido a la membrana que atraviesa toda la envoltura celular y cuya composición difiere entre las distintas especies micobacterianas (Daffe *et al.*, 1998).

En comparación con otras bacterias, incluidas el resto de micobacterias, *Map* se caracteriza por su extremadamente baja actividad metabólica, lo que conlleva una velocidad de crecimiento en condiciones óptimas 24 veces inferior que la de bacterias como *Escherichia coli* (Juste *et al.*, 1991b). Esa cualidad de metabolismo disminuido en combinación con la defensa que le confiere la compleja pared celular, hace de *Map* una bacteria muy resistente a condiciones adversas, al mismo tiempo que le permite ser la primera en estar ahí cuando estas sean más favorables (Ratledge y Ewing, 1996).

2.3.3. Cepas de *Map*

Los avances en biología molecular en las últimas décadas han permitido distinguir diversas cepas de *Map* y clasificarlas en tipos y subtipos mediante técnicas de tipificación. Se han identificado debido a la especie animal que infecta dos genotipos de *Map*: “S” (Sheep) para las cepas de tipo ovino y “C” (Cattle) para las de tipo bovino (Collins *et al.*, 1990; Whittington *et al.*, 2000a), a pesar de no ser estrictamente específicas. También se reporta un tercer genotipo “B” (Bison), aislado de bisontes americanos y cabras de la India (Collins *et al.*, 1990; Sevilla *et al.*, 2005), y una cepa I (intermedia), con patrones de hibridación intermedios entre los de las cepas C y S, aislada de dos ovejas procedentes de Canadá (Collins *et al.*, 1990).

2.3.4. Resistencia de *Map*

El bacilo de *Map*, es capaz de sobrevivir 9 meses en agua de estanque y 163 días en agua de río (Lovell *et al.*, 1944), en agua corriente con pH no neutro hasta 14 meses (Larsen *et al.*, 1956) y en agua destilada hasta 15 meses, reduciéndose la concentración inicial en 1 Log₁₀ cada 68.5 días (Sung y Collins, 1998). La supervivencia en heces de bovinos puede llegar hasta los 246 días (Lovell *et al.*, 1944), en orina de la misma especie animal, hasta 287 días (Jorgensen, 1977) y entre 21 y 28 días durante la digestión anaeróbica de orina bovina de una planta de biogás (Olsen *et al.*, 1985), aunque supuestamente la mezcla de heces y orina produce un efecto bactericida (Chiodini *et al.*, 1984a). También *Map* permanece 55 semanas en ambientes secos y sombríos, y 48 semanas en agua de presa no expuesta a luz solar (Whittington *et al.*, 2005). Pueden recuperarse células de *Map* viables después de largos períodos de congelación (Richards y Thoen, 1977), también *Map* es capaz de sobrevivir e incluso replicarse en el interior de protistas ambientales (Mura *et al.*, 2006). Además, su resistencia le permite soportar tratamientos de esterilización aplicados a la leche y al agua destinada al consumo humano (Whan *et al.*, 2001, Grant *et al.*, 2002). Por el contrario, *Map* parece sensible a la luz solar, las altas temperaturas, la desecación, la

elevada concentración de calcio y el hervido (Whittington *et al.*, 2005). *Map* también puede ser inactivado por medio de desinfectantes en suspensión acuosa como el amonio (3 %), el formol (5 %), compuestos cresólicos (1:32), el fenol (1:40), el bicloruro de mercurio (1:1000), el hipoclorito cálcico (1:50), el cloro, cianamida cálcica o el etanol (Chiodini *et al.*, 1984a). El efecto de estas sustancias es mucho menor en heces secas, aunque puede incrementarse si se combinan con detergentes (Merkal y Whipple, 1982).

2.4. Infección y Patogenia.

Aunque *Map* no produce toxinas conocidas, el organismo es un parásito intracelular muy exitoso, capaz de sobrevivir en el interior de los macrófagos por periodos prolongados (Zurbrick y Czuprynski, 1987). La persistencia de *Map* se traduce en una estimulación antigénica continua y el reclutamiento de células inflamatorias. Hay pruebas de que esta infiltración inflamatoria distorsiona la arquitectura normal del intestino que conlleva un deterioro de la absorción de nutrientes y el aumento de la pérdida de proteína intestinal (Allen *et al.*, 1974a).

En la infección con *Map*, el hígado realiza un aumento compensatorio de síntesis de proteínas, al permanecer la infección el hígado ya no se realiza este aumento compensatorio de síntesis de proteínas, lo que resulta en el desarrollo de los signos clínicos (Allen *et al.*, 1974b). Sin embargo, en algunos animales infectados la gravedad de los signos clínicos no corresponde con la magnitud de las lesiones y el aumento de ácido ribonucleico mensajero (mRNA) del gen de IL-6 (Interleucina-6) y TNF- α (Factor de necrosis tumoral alfa) en la mucosa intestinal y en la sangre de los animales paratuberculosos, sugiere que la caquexia puede tener un base inmunológica (Adams y Czuprynski, 1995).

Los animales jóvenes (menores de seis meses de edad) son más susceptibles a la infección con *Map*. Esta alta susceptibilidad puede estar relacionada con el sistema inmune inmaduro (Manning y Collins, 2001) y el hecho de que los recién nacidos tienen el estómago abierto durante las primeras 24 h de vida, para permitir la absorción de las inmunoglobulinas del calostro, por lo que también podría facilitar la absorción de *Map* (Sweeney, 1996). También se ha sugerido que la gotera esofágica puede tener una ventaja sobre la infección a *Map*, la gotera esofágica es formada como un reflejo para que la leche pueda evadir acidez, enzimas digestivas, bilis y otras sustancias digestivas del rumen inmaduro y de este modo *Map* puede también evitar alguna defensa natural del sistema inmune (Clarke, 1997).

Se cree que la ingestión de *M. paratuberculosis* es la principal vía de infección. Se han hecho infecciones orales experimentales y han producido la enfermedad en el ganado bovino, ovino y caprino (Gilmour *et al.*, 1977). Animales clínicamente enfermos pueden arrojar miles de millones de bacilos por día en las heces (Chiodini *et al.*, 1984a). Se asume que la mayoría de los animales se infectan por la ingestión de los bacilos de una ubre contaminada con estiércol, poco después del nacimiento (Chiodini *et al.*, 1984b; Gay y Sherman, 1992). Se ha demostrado que una dosis oral de 100 unidades formadoras de colonias, repetida una vez a la semana, por más de 10 semanas, causó infección intestinal en corderos (Brotherston *et al.*, 1961). Además de la presencia de bacterias en la sangre (bacteremia), la difusión de *M. paratuberculosis* a otros órganos, incluyendo la ubre y órganos sexuales, puede conducir a la transmisión vertical de la infección, de una madre a la descendencia (Sweeney *et al.*, 1992a). El organismo ha sido aislado del calostro de 22.2% de las vacas asintomáticas infectadas (Streeter *et al.*, 1995) y a partir de leche de 34.6% de vacas con la paratuberculosis clínica (Taylor *et al.*, 1981). Por lo tanto, tanto la leche y el calostro pueden ser una fuente importante de infección, a pesar de la baja concentración de organismos de *M. paratuberculosis*, que es probable que estén presentes en la leche (Sweeney *et al.*, 1992a).

La infección intrauterina del feto ha sido reportado en cabras (Goudswaard, 1971) y en bovinos (Sweeney *et al* 1992b). El porcentaje de los fetos infectados congénitamente de vacas con paratuberculosis clínica varió de 26.4% a 63.9% (Gay y Sherman, 1992), mientras que no se detectó la infección en 8.6% de los fetos de vacas infectadas asintomáticas (Sweeney *et al.*, 1992b). *M. paratuberculosis* se ha recuperado también de semen bovino (Larsen y Kopecky, 1970). Experimentalmente, la infección por *M. paratuberculosis* también se ha transmitido por vía parenteral (intratraqueal, inoculación intravenosa y/o subcutánea) en ovejas (Kluge *et al.*, 1968) y ganado (Johnson *et al.*, 1977), dando como resultado la infección en los intestinos y en otros lugares. Tras la inyección de *M. paratuberculosis* en la glándula mamaria del organismo, fue transportado a los ganglios linfáticos en 5 de 6 vacas y para el intestino de una vaca (Larsen y Miller, 1978).

2.4.1. Entrada *Map* en el hospedero y mecanismos de supervivencia de *Map*

Las células M son células epiteliales especializadas localizadas en el denominado “epitelio asociado a folículos” que tapiza las placas de Peyer intestinales, y cuya función principal es absorber y transportar los antígenos de diversos microorganismos, para que sean procesados y presentados a las células linfoides subepiteliales por endocitosis transcelular, desde la luz intestinal hacia el tejido linfoide subyacente, encargado de desencadenar una respuesta inmune frente a dichos agentes (Corr *et al.*, 2008). Se ha comprobado que estas células especializadas son precisamente la principal vía de penetración de *Map* hacia las capas subyacentes, donde el bacilo es fagocitado por los macrófagos subepiteliales, en las placas de Peyer ileales de terneros (Momotani *et al.*, 1988), corderos (García-Marín *et al.*, 1992). El motivo de que animales jóvenes sean más susceptibles a la infección que aquellos de más edad, parece residir en la extensa superficie que abarcan las placas de Peyer intestinales en animales jóvenes, que va reduciéndose gradualmente con la edad, ya que ése parece ser el punto de entrada de la bacteria al organismo (Liebler *et al.*, 1988). Además, la captación y transporte del bacilo por estas células transcurre de manera muy rápida. Así,

tras la inoculación directa en la luz de segmentos de intestino delgado de cabras, la mayor parte de las bacterias atravesaron las células M en menos de una hora (Sigurdardóttir *et al.*, 2001). De la misma manera, Wu *et al.* (2007) demostraron que el bacilo era capaz de cruzar la barrera intestinal y alcanzar los nódulos linfáticos mesentéricos en una hora, tras la inoculación intestinal de terneros con *Map*, mientras que en el experimento de Momotani *et al.* (1988), el microorganismo tardó entre 5 y 20 h en atravesar la barrera intestinal.

Previo a la entrada de *Map* al cuerpo, cuando esta en la luz intestinal, debe adherirse a las células de la mucosa intestinal. Los mecanismos implicados en este proceso aún no están claros. No obstante, se han identificado proteínas micobacterianas implicadas en la invasión (Secott *et al.*, 2002). Estas “proteínas de acoplamiento a la fibronectina” (FAP), ubicadas en la superficie de *Map*, parecen conferir al bacilo la capacidad de unirse con la fibronectina, proteína de la matriz extracelular de las células epiteliales. Se ha descrito que la interacción entre ambas proteínas favorecería el proceso de captación de *Map* (Lee *et al.*, 2009). La formación del puente de unión entre FAP y la fibronectina se ve favorecido en presencia de un pH ácido de alrededor de 3 (Secott *et al.*, 2001). Por ello se sospecha que este proceso en infecciones naturales no tendría lugar directamente a nivel de íleon, sino que requeriría un paso previo de activación que sucede cuando *Map* atraviesa el medio ácido del abomaso de los rumiantes, uniéndose posteriormente a la fibronectina secretada en el duodeno, donde el pH se acerca a 4.5, y el complejo penetraría entonces las células M en el íleon (Secott *et al.*, 2004).

Una vez cruzada la barrera del epitelio intestinal, el bacilo es transportado por endocitosis dentro de vacuolas y posteriormente, fagocitado por macrófagos sub- e intraepiteliales adyacentes (Tessem *et al.*, 2001). A continuación, *Map* es transportado hacia las zonas interfoliculares del tejido linfoide, aquí los antígenos de *Map* son expresados a los linfocitos T, y así desencadenan la respuesta inmune (Stabel, 2000).

Inicialmente, las células dendríticas presentan los antígenos a los linfocitos Th, los cuales liberan interleuquina 2 (IL-2). Esta linfocina provoca una expansión principalmente de los linfocitos CD4+ Th1, los cuales producen entre otros IL-2, -interferón gamma (IFN γ), factor de necrosis tumoral (TNF- α) y los factores estimuladores de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) (Clarke, 1997). Por una parte, la secreción de estas sustancias atrae y activa a los macrófagos facilitando la destrucción de los microorganismos controlando de esta forma la progresión de la infección (Basssey y Collins, 1997). Por otro lado, sustancias como el TNF- α activan la formación de granulomas alrededor de la infección micobacteriana y de esta forma se aísla el foco de infección, conteniendo a la bacteria y previniendo la diseminación a otros órganos (Saunders y Cooper, 2000). Esta fase también se denomina fase paucibacilar, ya que se caracteriza por la presencia de un infiltrado tisular formado principalmente por linfocitos y pocos o ningún microorganismo detectable en el interior de los macrófagos de los tejidos. Los mecanismos responsables de la pérdida o disminución de la respuesta Th1 de tipo celular para dar paso a una respuesta Th2 de tipo humoral se desconocen, pero se cree que están relacionados con factores genéticos del hospedero, exposición constante al antígeno, desarrollo de poblaciones celulares específicas, deficiente presentación del antígeno por parte de los macrófagos, proliferación de linfocitos T $\gamma\delta$ que inhiben la actividad de los CD4+ Th1 o localización del antígeno durante la infección (Chiodini y Davis, 1993).

Una vez que el sistema inmune de tipo celular ha fallado, las micobacterias proliferan y se produce un cambio progresivo en el tipo de respuesta de tipo Th1 a Th2. En esta fase, los linfocitos CD4+ Th2 producen IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10, que suprimen la respuesta de tipo Th1 promoviendo la proliferación de linfocitos B y la producción de anticuerpos. En este periodo, la respuesta celular declina y aumenta la respuesta de tipo humoral a medida que *Map* se multiplica (Chiodini *et al.*, 1984a). Este tipo de respuesta no es efectiva frente a microorganismos intracelulares como es el caso de *Map* y por lo tanto, en la fase lepromatosa no se detiene la progresión de la infección, el desarrollo de la patología ni la proliferación bacteriana (Ellner y Wallis,

1989). En este momento, los animales presentan un elevado nivel de anticuerpos séricos y escasa reactividad a las pruebas de inmunidad celular. A esta fase se la conoce como fase multibacilar, ya que se caracteriza por la presencia de un elevado número de bacilos en el interior de una gran cantidad de macrófagos. El flujo de células inflamatorias origina un engrosamiento de la pared intestinal hasta que pierde su funcionalidad, originando un síndrome de malabsorción y enteropatía con pérdidas de proteínas (Gilmour, 1976). En esta fase el microorganismo puede diseminarse por el interior y exterior del tracto gastrointestinal, manifestándose lesiones formadas por infiltrados de macrófagos con *Map* en el riñón, hígado, glándula mamaria, entre otros órganos o tejidos. El animal comienza a manifestar signos clínicos inespecíficos de la enfermedad como pérdida de peso y diarrea.

Una vez dentro de estas células, *Map* dispone de diversas estrategias para asegurar su supervivencia, poder replicarse y así diseminarse por el organismo. Estas estrategias, como el hecho de que las micobacterias tienen la capacidad de inhibir la maduración del fagosoma y consecuente formación del fagolisosoma, proporcionan una manera de eludir la actividad antimicrobiana directa de la respuesta inmune innata, así como de evitar la presentación de sus antígenos a linfocitos T y posterior desencadenamiento de una respuesta inmune adaptativa (Stabel, 2006). Por otro lado, también se ha relacionado la presencia de *Map* con la inhibición de la acidificación del fagosoma, con la consecuente creación de un medio protector en el que la bacteria puede replicarse y persistir (Souza *et al.*, 2008). *Map* soporta las enzimas lisosómicas, el óxido nítrico y los demás mecanismos bactericidas que producen los macrófagos, ayudada entre otras cosas, por su envoltura celular lipídica (Tessema *et al.* 2001).

2.4.2 Establecimiento y progresión de lesión a la infección

La progresión de 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 animales adultos.

Fase II. Fase subclínica. En este estadio se encuentran principalmente animales adultos portadores de *Map*. Durante el transcurso de esta fase los animales no presentan síntomas de alguna 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, pérdida de peso y diarrea.

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, además de la presencia de caquexia y diarrea profusa. Aunque la presencia de diarrea es menos frecuente en ovinos y caprinos que en vacas y la aparición de la enfermedad se da en animales más jóvenes (Stehman, 1996). 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 (Whitlock y Buergelt, 1996).

El *Map* 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 (Manning y Collins, 2001). Sin embargo, aunque los animales son más susceptibles cuando la infección se origina a edades tempranas (hasta el desarrollo clínico de la enfermedad pueden transcurrir meses o incluso años), la enfermedad se puede iniciar en animales adultos sanos si éstos se ven expuestos a una elevada carga infectiva de *Map* (Rankin, 1961).

2.5. Signos Clínicos

El número de animales infectados que enferma es en general bajo, menos del 3%, pero todos los animales que inician el cuadro clínico mueren, las muertes se presentan en “goteo” en los rebaños afectados a lo largo del año y los animales que enferman pueden presentar cuadros recurrentes durante dos o tres años, para morir luego de un proceso de emaciación de más de dos meses, aún en esta etapa de emaciación progresiva, los animales no dejan de comer, se alimentan normalmente. A diferencia de los bovinos, que presentan un cuadro de diarrea acuosa muy aparente, las ovejas pueden no presentar diarrea o presentar una diarrea pastosa, se pierde la forma típica de excremento en “bolitas”, al mismo tiempo que se observa el proceso de adelgazamiento progresivo. El cuadro clínico se asocia frecuentemente a condiciones de estrés, como el parto, el destete o deficiencias de alimentación y puede recurrir por sí solo sin mediar tratamientos, para reaparecer nuevamente tiempo después (Tórtora, 2008).

Debido al carácter crónico de la paratuberculosis y a pesar de infectarse en las primeras semanas de vida, los animales no empiezan a manifestar signos clínicos hasta la edad adulta, tras un largo período de incubación, apareciendo los síntomas

con mayor frecuencia entre los dos y cinco años, frecuentemente tras el parto, durante la primera o la segunda lactación (Chiodini *et al.*, 1984a; Pérez *et al.*, 1996).

Sin embargo, en una ganadería en la que los animales están en contacto continuo con *Map*, aquellos que desarrollan la enfermedad clínica constituyen una minoría (la punta del iceberg), siendo mucho más elevado el porcentaje de animales subclínicos, que permanecen infectados de forma latente, pero sin llegar a progresar hacia la forma clínica de la paratuberculosis (Pérez *et al.*, 1996). La enfermedad clínica se considera, por tanto, la fase terminal de una infección crónica subclínica, y el paso de una forma a otra puede estar desencadenado por numerosas situaciones causantes de estrés, tales como la gestación, el parto, un manejo inadecuado, una mayor exigencia productiva de leche, la desnutrición, infecciones parasitarias, o el pastoreo en suelos secos y deficientes en minerales (Chiodini *et al.*, 1984a).

El signo clásico y más característico de la paratuberculosis en rumiantes es la pérdida de peso y condición corporal, a pesar de que los animales siguen manteniendo el apetito y reciben una alimentación adecuada (Chiodini *et al.*, 1984a; García-Marín *et al.*, 1994; Pérez *et al.*, 1996; Whitlock y Buergelt, 1996; Clarke, 1997;). Esta pérdida de peso sería consecuencia de la malabsorción y pérdida de proteínas asociados a la inflamación del intestino (Allen *et al.*, 1974a). Otro de los signos clínicos que se pueden encontrar es el edema hipoproteínémico en las partes bajas, siendo muy típico el edema submandibular, que suele preceder incluso de los demás signos clínicos (Chiodini *et al.*, 1984a). Los animales enfermos no presentan fiebre, beben y comen mucho; sin embargo, siguen adelgazando de forma progresiva hasta llegar en los casos más avanzados a un estado de caquexia, debilitamiento general, con atrofia muscular, fragilidad o caída de la lana en el caso de ovinos, palidez de las mucosas, emaciación, postración y finalmente la muerte (Juste *et al.*, 1983; García-Marín *et al.*, 1994; Pérez *et al.*, 1996; Clarke, 1997;). En este sentido, la mortalidad anual en un rebaño puede variar entre el 3 y el 10% de los animales adultos (Chiodini *et al.*, 1984a).

La diarrea no es un signo característico de la paratuberculosis en las especies ovina y caprina, en las que a menudo el único signo clínico observado es la pérdida de peso progresiva, que suele manifestarse generalmente después del parto. No obstante, la diarrea puede aparecer más frecuentemente, o se puede notar un reblandecimiento de las heces, que puede observarse de manera intermitente (García-Marín *et al.*, 1994). Por ello, en ovino, se puede observar la presencia de heces adheridas a la lana, manchando la zona de la cola, del periné y del tercio posterior (García-Marín *et al.*, 1994). Por otro lado, mientras el curso clínico de la enfermedad puede durar de 3 a 6 meses o incluso prolongarse durante más tiempo en el ganado vacuno, éste suele ser mucho más corto en los pequeños rumiantes (Chiodini *et al.*, 1984a).

En la fase subclínica, los animales también pueden presentar otros signos inespecíficos, principalmente relacionados con problemas de carácter reproductivo como infertilidad, además de una mayor sensibilidad a padecer problemas de mastitis (Merkal *et al.*, 1975). Por ello, no es extraño que muchos animales no lleguen a desarrollar signos clínicos claros de paratuberculosis, sino que suelen ser enviados al matadero de forma prematura a causa del bajo rendimiento productivo, de la pérdida de peso o de las diarreas intermitentes, que el ganadero o veterinario suelen confundir con otros problemas digestivos no infecciosos (Pérez *et al.*, 1996).

2.5.1. Lesiones macroscópicas

El hallazgo característico y constante de la paratuberculosis, especialmente en ovinos y caprinos, es la presencia de linfangitis y linfangiectasias en los tramos afectados. En estas lesiones, los vasos linfáticos intestinales aparecen como cordones blanquecinos o transparentes que discurren de forma tortuosa haciendo prominencia sobre la serosa intestinal, y en casos extremos pueden verse en su recorrido hacia los nódulos linfáticos mesentéricos a través del mesenterio (Kurade *et al.*, 2004). En la especie bovina, estas linfangiectasias no son tan frecuentes, y suelen ser focales y menos aparentes (Buergelt *et al.*, 1978). En ovinos, y especialmente en el ganado caprino, también se

ha señalado la aparición de focos de necrosis caseosa y calcificación en los nódulos linfáticos mesentéricos y también, aunque menos frecuentemente, en la mucosa, submucosa, serosa o vasos linfáticos (Valheim *et al.*, 2002).

En el ganado ovino y caprino, la formación de pliegues en el intestino puede no ser tan evidente como en la especie bovina, y el incremento de grosor de la pared puede ser moderado-leve, incluso a veces muy sutil, por lo que resulta muy fácil pasarlo por alto en la necropsia si el examen no es cuidadoso (García-Marín *et al.*, 1994). En pequeños rumiantes, en ocasiones, la linfangitis es el único cambio macroscópico apreciable que sirve para el diagnóstico presuntivo de paratuberculosis, además, en ovinos, se ha descrito la coloración amarillenta o anaranjada de la mucosa intestinal en casos de infecciones por cepas pigmentadas de *Map* (Clarke y Little, 1996).

2.5.2. Lesiones microscópicas

Estas se caracterizan por una enteritis granulomatosa cuyas lesiones más evidentes se localizan en los últimos tramos de intestino delgado, en los primeros tramos del intestino grueso, y nódulos y vasos linfáticos asociados. La lesión característica es un infiltrado celular compuesto por macrófagos, linfocitos, y células epiteloides y plasmáticas. Los macrófagos aparecen normalmente llenos de bacilos, acompañados frecuentemente de células gigantes, también con numerosas bacterias en su interior (Buergelt *et al.*, 1978).

En ovinos, además, los nervios ileales de la submucosa se pueden encontrar rodeados de agregados inflamatorios mononucleares (Gwozdz *et al.*, 2001). Los bacilos en este tipo de lesiones multibacilares son fácilmente detectables en el citoplasma de macrófagos y células gigantes mediante la tinción de ZN o bien, más específicamente, mediante técnicas inmunohistoquímicas (Kheirandish *et al.*, 2008).

En la especie ovina, y principalmente la caprina, es frecuente encontrar focos de necrosis caseosa y calcificación en los granulomas, incluso en ocasiones con encapsulamiento fibroso, tanto en la mucosa, submucosa, serosa intestinal como en los vasos, y especialmente en los nódulos linfáticos mesentéricos. En cambio, estos hallazgos son muy raros en el ganado bovino (Valheim *et al.*, 2002).

2.5.3. Respuesta inmune del hospedero

Como es típico en casos de paratuberculosis natural, tras la infección se abre una fase asintomática de dos años o más, durante la que no es posible observar una respuesta inmunológica celular ni humoral diferenciada, ni detectar la excreción de la bacteria en heces (Clarke, 1997). En casos de paratuberculosis inducida experimentalmente, se ha observado la producción de anticuerpos anti-*Map* que incluso, preceden a la respuesta celular inicial típica (Waters *et al.*, 2003). Los estadios iniciales y subclínicos de la enfermedad se caracterizan por una alta respuesta inmune celular (CMI), mientras en estadios clínicos avanzados predomina la respuesta inmune humoral (Stabel, 2000).

El sistema inmune innato constituye la primera barrera defensiva del hospedero frente a los patógenos microbianos. Los macrófagos, células dendríticas y otras células presentadoras de antígenos (CPA) constituyen la primera línea de defensa frente a los patógenos intracelulares mediante una serie de mecanismos propios de la respuesta inmune innata. Se trata de un mecanismo protector evolutivamente antiguo cuya activación se inicia con el reconocimiento de moléculas altamente conservadas presentes en la mayoría de los microorganismos, los denominados “patrones moleculares asociados al patógeno” (PAMP). Los PAMPs son estructuras esenciales para la supervivencia microbiana, ausentes en el hospedero, que pueden ser lipopolisacáridos de la pared celular, lipoproteínas, proteínas o ácidos nucleicos. Las células del sistema inmune innato son capaces de reconocer los PAMPs del patógeno para poder fagoci-

tarlo de manera rápida. Para ello, disponen de cantidades limitadas de receptores codificados genéticamente, los “receptores del patrón de reconocimiento” (PRR) (Uematsu y Akira, 2006).

En el momento en el que una infección intracelular se establece y asienta en un hospedero, se empieza a activar la respuesta inmune adaptativa o adquirida, mediada principalmente por los linfocitos T y B, y caracterizada fundamentalmente por su especificidad para reconocer un número amplio de antígenos, así como por su capacidad de “memoria” de larga duración (Stabel, 2006).

Durante varios años, se ha pensado que ambas respuestas desarrollaban sus funciones de manera totalmente separada e independiente, y la inmunidad innata incluso estaba considerada como secundaria o de menor importancia en la defensa del hospedador (Medzhitov y Janeway, 1997). Sin embargo, últimamente, se ha ido demostrando que no solamente ambas respuestas pueden traslaparse sino que también interaccionan entre sí en un objetivo común de lucha antimicrobiana, como en el caso de las micobacteriosis (Sohal *et al.*, 2008).

Los primeros signos de la infección son la producción de IFN- γ y la proliferación de linfocitos en respuesta a la inoculación de antígenos micobacterianos, como el derivado proteico purificado (PPD). Esto indica la activación de la inmunidad celular, y la excreción intermitente de la bacteria en heces. Esta respuesta irá en incremento junto con la carga micobacteriana excretada en las heces, mientras, los anticuerpos de la respuesta humoral pueden ir apareciendo. Esta fase de aparente equilibrio entre patógeno y hospedero puede durar años. Al final, la respuesta celular cae y la excreción de bacterias aumenta, lo que lleva al estado clínico de la enfermedad (Chiodini, 1996). En la especie bovina se distinguen bajos excretores, excretores moderados y grandes excretores (o súper-excretores) (Whitlock *et al.*, 2006). En comparación con los menos excretores, el grupo de grandes excretores se asocia con animales de baja respuesta celular (sobre todo en las fases iniciales de infección), asentamiento más temprano de

la enfermedad y títulos de anticuerpos más altos (Koets *et al.*, 2006). Se considera que la inmunidad de protección contra *Map* viene dada por la respuesta inmune celular, con lo que esa protección depende de las interacciones entre las células T y las células presentadoras de antígeno infectadas (Kaufmann, 2001). En la respuesta inmune celular, las células T excretan citocinas que activan la eliminación de *Map* en los macrófagos (Stabel, 2000). Los macrófagos presentan los antígenos de *Map* a las células T, que liberan IL-2. Esta interleuquina impulsa la propagación de los LT CD8+ citolíticos y los CD4+ LTh1 (Chiodini y Davis, 1993), y estos últimos, liberan más IL-2, IFN γ , TNF y factor estimulante de colonias de granulocitos de macrófago (GM-CSF), con el objetivo de activar el poder bactericida de los macrófagos (Stabel, 1995). Después, la población de CD4+ LTh1 cae impulsada al final por la proliferación de las células T gamma-delta ($\gamma \delta$), entrando así en una fase anérgica (Chiodini y Davis, 1993). Hipotéticamente, el descenso de la respuesta inmune celular refleja un cambio de respuesta de tipo 1 (con LTh1) a tipo 2 (con LTh2), de acuerdo con la dicotomía de las células T auxiliares (Chiodini, 1996). Los estudios realizados con animales con paratuberculosis no han sido capaces de demostrar ese hipotético cambio de Th1 protector a Th2 permisivo; sin embargo, el descenso de IFN- γ , y el incremento de IL-10 y TGF- β parecen más evidentes (Lee *et al.*, 2001). En la última fase, la fase clínica, los CD4+ LTh2 producen citocinas (IL-4 e IL-10, entre otras) que suprimen la respuesta celular y activan la respuesta humoral, con el aumento de los linfocitos B y la producción de anticuerpos, quedando establecida la respuesta humoral (Langelaar *et al.*, 2005).

A nivel histopatológico se compara la paratuberculosis con la lepra, en la que fueron establecidos 5 tipos inmunopatológicos principales que correlacionan las lesiones histológicas y la respuesta inmune: tuberculoide, tuberculoide intermedio, intermedio, lepromatoso intermedio y lepromatoso. En las formas tuberculoides existe una fuerte resistencia a la infección detectable por pruebas de inmunidad celular y una baja (o muy baja) cantidad de bacilos, mientras en las formas lepromatosas se da todo lo contrario. Estudios en paratuberculosis confirman un modelo similar para esta patolo-

gía, y sugieren que se da una evolución de una respuesta tuberculoide (lesiones iniciales en el punto de infección) hacia otra de tipo lepromatoso dependiendo del estado inmunitario del hospedador (Buergelt *et al.*, 1978).

2.6. Epidemiología

Entender la epidemiología de la enfermedad de Johne tiene importancia para determinar las estrategias del manejo y control de la enfermedad. Se considera a los rumiantes domésticos (ganado bovino, caprino y ovino) los hospedadores por excelencia (Chiodini *et al.*, 1984a). Cuando se determinó la importancia de esta enfermedad en los rumiantes domésticos se aumentaron los estudios a rumiantes salvajes como los cérvidos (Mackintosh *et al.*, 2004) y el búfalo (*Bubalus bubalis*) (Sivakumar *et al.*, 2005), así mismo en animales no rumiantes, siendo el conejo uno de los más importantes (*Oryctolagus cuniculus*) (Greig *et al.*, 1999), poniéndose de manifiesto su importancia principalmente como reservorios de la enfermedad para los animales domésticos. La identificación de *Map* en animales salvajes tiene una clara repercusión en los programas de control. También han sido hallados casos naturales de infección en cerdo y jabalí (*Sus domesticus* y *Sus scrofa*; Alvarez *et al.*, 2005), en burro (*Equus asinus*; Dierckins *et al.*, 1990), en perro (*Canis familiares*; Vogel 1977), en primates (McClure *et al.*, 1987), en liebre (*Lepus europaeus*), en zorro (*Vulpes vulpes*), en mustélidos (*Mustela erminea*, *Mustela minuta*, *Meles meles*), en ratón de campo y rata (*Apodemus sylvaticus*, *Rattus norvegicus*), y en córvidos (*Corvus corone*, *Corvus frugilegus*, *Corvus monedula*) (Beard *et al.*, 2001). Estos aislamientos podrían tener importancia desde el punto de vista epidemiológico, ya que estos animales podrían actuar como reservorios de *Map* y contribuir a la difusión de la paratuberculosis, pudiendo incluso participar como fuentes de infección para el ganado doméstico.

Por otro lado, a pesar de que los casos de infección natural de paratuberculosis parecen haberse descrito con mayor frecuencia en determinadas razas (Julian, 1975).

Otros autores opinan que en realidad no existe mayor o menor resistencia a esta enfermedad entre las diferentes razas, sino más bien un manejo diferente según el tipo de explotación, que puede favorecer en mayor o menor medida la diseminación y la transmisión de *Map* entre los animales (Kennedy y Benedictus, 2001).

2.6.1. Factores que Influyen en la adquisición de la enfermedad

Existen varios factores que pueden influenciar el resultado de la infección y que por conveniencia, se clasifican en variables ambientales, variables propias del patógeno y factores del hospedador. Los factores ambientales pueden incluir, entre otros, la nutrición, las toxinas ambientales y la edad de exposición al patógeno. Por otra parte, aquellas variables derivadas del patógeno generalmente implican factores de virulencia que, por ejemplo, pueden incrementar o atenuar la habilidad de colonización del organismo o aumentar la virulencia a través de la expresión de una toxina. Finalmente, los factores atribuidos al hospedero, implican principalmente la dotación genética del organismo (Díaz *et al.* 2005).

2.6.2. Edad, dosis ingerida, otros factores

Los animales jóvenes (menores de seis meses de edad) son los más susceptibles a la infección (Manning y Collins, 2001), debido principalmente: a) El desarrollo incompleto de su sistema inmune (Cocito *et al.*, 1994); b) El máximo desarrollo en animales jóvenes de las placas de Peyer ileales que son la puerta de entrada de *Map* al intestino; c) Gracias a la presencia de la gotera esofágica en animales jóvenes, evadiendo los mecanismos defensivos del tracto alimentario del hospedero (Clarke, 1997); d) Los animales recién nacidos tienen lo que traducido directamente del inglés se denomina “intestino abierto” (*open gut*), que hace referencia al espacio intersticial entre las células del intestino delgado que permite el paso de macromoléculas como las inmunoglobulinas del calostro a la mucosa intestinal. Esta mayor separación celular hace más fácil la invasión tisular de *Map* (Sweeney, 1996).

Otro parámetro importante para el establecimiento de la enfermedad es la dosis ingerida. Se ha establecido que la dosis infectiva es aproximadamente de 10^3 bacilos (Brotherston *et al.*, 1961). Teniendo en cuenta que el número de bacilos viables eliminados en heces de animales infectados es de 10^6 - 10^8 unidades formadoras de colonias/g (UFC/g) (Whittington *et al.*, 2000b); una mínima contaminación fecal del ambiente es suficiente para producir la infección de los animales susceptibles.

Existen otros factores que influyen en la adquisición y desarrollo de la infección como son la distinta patogenicidad de los aislados de *Map* (Saxegaard, 1990), el tiempo de exposición a la bacteria (Whitlock y Buergelt, 1996) y la respuesta del hospedador (Clarke, 1997). Esta respuesta se ve afectada de una forma directa con el sistema de producción (sistema intensivo), raciones alimenticias, estrés por transporte, parto y lactación, inmunosupresión causada por otros agentes como el virus de la diarrea vírica bovina (BVD) (Lepper *et al.*, 1989) y hacinamiento de los animales (Collins *et al.*, 1994). Factores como el tipo de suelo, agua de la explotación y contacto con animales salvajes (conejos) (Daniels *et al.*, 2001).

2.6.3. Persistencia en el medio

En cuanto a su capacidad de resistencia, *Map* puede sobrevivir en el medio ambiente durante largos períodos de tiempo. Así, su viabilidad ha sido estimada en 163 días en ríos, 9 meses en aguas fangosas, 11 meses en heces bovinas y hasta 1 año en pastos, pero únicamente 7 días en orina (Juste, 1984). También se ha comprobado su resistencia a -14 °C durante al menos un año (Richards y Thoen, 1977). Sin embargo, se ha demostrado que tras almacenar durante una semana a -20 °C muestras de heces procedentes de 11 vacas con paratuberculosis, la viabilidad de *Map* en dichas muestras se redujo (Khare *et al.*, 2008). El grado elevado de resistencia que presenta este bacilo, se explica en parte por la gruesa capa cérica que le rodea, lo que le permite soportar condiciones físico-químicas que no suelen aguantar otras

especies, y por otro lado, por la posibilidad de disminuir su metabolismo en determinadas condiciones (Juste *et al.*, 2000).

Por otro lado, *Map* también dispone de una enorme capacidad para soportar los desinfectantes que funcionan para la mayor parte de los agentes biológicos. Se han realizado algunos estudios para conocer aquellos capaces de eliminar el bacilo de superficies externas, encontrando que tanto el hipoclorito sódico (lejía comercial), el formol al 5 %, los cresoles al 3 %, el fenol al 2,5 %, el bicloruro de mercurio al 0,1 %, así como el hipocloruro cálcico al 2 %, son eficaces para matar al bacilo en menos de 10 minutos en condiciones adecuadas, con mayor eficacia si actúan en soluciones acuosas (Hole, 1958). Por otro lado, se ha comprobado el efecto bactericida del cloro, desinfectante usado en el tratamiento del agua, sobre cepas bovinas y humanas de *Map* (Whan *et al.*, 2001). Si bien posteriormente, los mismo autores encontraron que esta micobacteria podía adquirir una mayor capacidad de resistencia al cloro cuando era ingerida por el protozoo *Acanthamoeba* spp., lo que debería de tenerse en cuenta en los procesos de cloración del agua para el consumo humano (Whan *et al.*, 2006).

Por las posibles implicaciones de *Map* en la salud pública, se han llevado a cabo diferentes estudios para conocer el efecto de la pasteurización de la leche o los procesos de fabricación y curación del queso sobre la viabilidad de esta bacteria. En efecto, se ha detectado la presencia del bacilo en leche cruda y pasteurizada de vacas, ovejas y cabras, así como en quesos de venta al por menor en diferentes países, lo que indica que los humanos podrían estar expuestos a *Map* a través del consumo de estos productos de origen animal (Ikonomopoulos *et al.*, 2005; Eltholth *et al.*, 2009). Se ha estimado que el someter la leche cruda a una temperatura de 72 °C durante 15 s sería suficiente para la eliminación total del microorganismo (Rademaker *et al.*, 2007).

2.6.4. Prevalencia

Desde la primera descripción de un caso de paratuberculosis en 1895 se ha extendido afectando a un elevado número de países; sin embargo, la dificultad en su diagnóstico hace que en ocasiones la estimación de la prevalencia real sea difícil (Chiodini *et al.*, 1984b). En Estados Unidos de América, un estudio en Nueva Inglaterra mostró una tasa de prevalencia del 18 %, cuando se empleó la técnica de cultivo, además de prueba histológica; que cuando solo se utilizó la técnica del cultivo, dando falsas estimaciones bajas a causa de imprecisiones y falta de sensibilidad de la prueba (Chiodini *et al.*, 1986). La evidencia serológica de la paratuberculosis en ganado de Florida indica animales seropositivos que comprende 8.6 % y 17.1 % de la población de prueba en bovinos de carne y leche, respectivamente (Braun *et al.*, 1990). En una extensa prueba, que incluyó a 32 Estados y Puerto Rico, se examinaron los ganglios linfáticos de 7,540 bovinos mediante técnicas de cultivo, dando prevalencia general de 1.6 % (Merkal *et al.*, 1987). Otros estudios serológicos mediante ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) en ganado vacuno lechero, las seroprevalencias fluctuaron de un 4.8 % (Collins *et al.*, 1994) a un 26.8 % (Sorensen *et al.*, 2003), mientras que en el vacuno de carne describieron prevalencias entre un 3.3 % (Hill *et al.*, 2003) y 3.95 % (Pence *et al.*, 2003). En Australia, el nivel de infección en Victoria y Nueva Gales del Sur se ha descrito como un 22 y 9 %, respectivamente (Kennedy y Allworth, 2000).

En Europa, en Gran Bretaña, también se han llevado a cabo estudios en matadero mediante cultivo microbiológico y PCR, observándose prevalencias de un 2.6 % y un 3.5 %, respectivamente (Cetinkaya *et al.*, 1998). En pequeños rumiantes no hay tantos estudios de prevalencia de la paratuberculosis, como en el caso del ganado vacuno. En España, en ganado ovino se han realizado estudios mediante métodos histopatológicos, encontrando prevalencias de hasta un 49.4 % (Pérez *et al.*, 1996). Estos mismos resultados se encontraron en un estudio que combinaba los resultados obtenidos mediante pruebas serológicas, cultivo y estudio anatomopatológico en la

Comunidad Autónoma de Aragón (Juste *et al.*, 1991a). En Noruega, la paratuberculosis en ganado vacuno es esporádica; sin embargo, en cabras es endémica. En un estudio realizado entre 1996 y 1999 se analizaron 9,456 sueros de cabras de 754 rebaños y un 7.7 % fueron positivos (Tharaldsen *et al.*, 2003). En Australia, sin embargo, la principal especie animal afectada con paratuberculosis son las ovejas, confirmando la enfermedad a finales del año 2001 en 1,087 rebaños de un total de 84,362 (Windsor *et al.*, 2002).

En México, Unzueta (1936) diagnosticó la presencia de la enfermedad por primera vez en bovinos lecheros, utilizando como método diagnóstico la aplicación de Johnina y tuberculina aviar, y también al observar el bacilo al microscopio. El primer informe en una publicación seriada de aislamiento de *Mycobacterium paratuberculosis* (Bacilo de Johne) a partir de muestras de ganglios mesentéricos e intestino delgado de bovinos lecheros sacrificados en un rastro de Tulancingo, Hgo., fue hecho por Ramírez *et al.*, en 1979. Posteriormente en un estudio que se realizó con un rebaño caprino ubicado en los alrededores de la ciudad de México, con antecedentes clínicopatológicos, serológicos y bacteriológicos, en donde para su detección se utilizó el análisis de RFLP empleando la sonda la IS900 y la enzima de restricción *BstEII*, revelando que el tipo de *Map* correspondió al tipo C1, que es uno de los más diseminados en el ámbito mundial entre las diferentes especies domésticas y silvestres (Chávez *et al.*, 2004). También en los estados de Querétaro y Morelos, se tiene evidencia clínica y serológica de paratuberculosis, en donde fue identificada la cepa de *Map* "C"1, por medio de PCR en leche de cabras (Favila-Humara *et al.*, 2007).

En 2009, se organizó un taller sobre planificación estratégica para la atención de paratuberculosis en el ganado bovino, ovino y caprino; llegando a concluir que se necesitan más estudios para determinar la prevalencia de la enfermedad en todo el país (CONASA, 2009).

2.7. Diagnóstico

El progresivo desarrollo de la enfermedad es una característica distintiva de la paratuberculosis, se han dirigido extensos esfuerzos hacia un medio eficaz para el diagnóstico de los animales portadores no clínicos, ya que son capaces de propagar el organismo a otros compañeros de hato o rebaño. Incluso, la enfermedad crónica puede ser difícil de diagnosticar positivamente de una manera no invasiva y rápida. El cultivo del organismo sigue siendo el único medio definitivo de diagnóstico. Con períodos de incubación que van desde semanas a meses, este método es considerado inadecuado para un programa de erradicación de la enfermedad (Kreeger, 1991).

Según la OIE (2008), los métodos de diagnóstico se basan principalmente en dos partes: el diagnóstico de la enfermedad clínica y la detección de la infección sub-clínica. Con métodos específicos para cada uno según lo siguiente:

2.7.1. Identificación del agente

2.7.1.1. Necropsia

La paratuberculosis no se puede diagnosticar a través de un examen superficial de los intestinos buscando síntomas de engrosamiento. Los intestinos deben abrirse desde el duodeno al recto para exponer la mucosa. No siempre existe una relación estrecha entre la gravedad de los síntomas clínicos y la extensión de las lesiones intestinales. Las primeras lesiones se manifiestan como el engrosamiento y el encadenamiento de los vasos linfáticos. Los nódulos linfáticos mesentéricos se encuentran habitualmente prominentes y edematosos.

2.7.1.2. Bacteriología (microscopía)

Los frotis fecales o de mucosa intestinal teñidos según el método de Ziehl–Neelsen se examinan al microscopio. Se puede diagnosticar la paratuberculosis de modo preliminar si se encuentran agregados (tres o más microorganismos) de bacilos ácido-resistentes pequeños (0,5–1,5 μm) y fuertemente teñidos. La presencia de bacilos ácido-resistentes aislados en ausencia de agregados es un resultado dudoso. La desventaja de esta prueba es que no permite la diferenciación con otras especies de micobacterias y sólo una pequeña proporción de casos puede confirmarse mediante el examen microscópico de una muestra fecal única. Este método tiene la ventaja de ser simple, rápido y barato, pero tiene la desventaja de tener una baja sensibilidad y especificidad. En los casos de diarrea grave, la concentración de *Map* disminuye en relación a la cantidad de heces, aumentando así la probabilidad de resultados negativos falsos. La concentración de bacilos en las heces por centrifugación y posterior descontaminación utilizando descontaminante hexa-decilo cloruro de piridinio (HPC) mejora la sensibilidad de esta prueba (Eamens *et al.*, 2000). Una condición similar se produce en los animales con paratuberculosis subclínica, donde hay una baja tasa de excreción fecal. En los frotis o secciones de tejidos (intestinos cerca de la válvula íleo-cecal o en los ganglios linfáticos intestinales con lesiones macroscópicas) de visualización de grupos de color rosa brillante bacilos de colores dentro de los macrófagos residentes en las lesiones es muy sugerente de paratuberculosis (Singh *et al.*, 2014).

2.7.1.3. Bacteriología (cultivo)

El aislamiento de *M. avium paratuberculosis* de un animal proporciona un diagnóstico definitivo de infección con el microorganismo. Aunque el cultivo es técnicamente difícil y su realización requiere tiempo, es la única prueba que no da positivos falsos en sus resultados (100% de especificidad). El cultivo fecal es capaz de detectar la mayoría de los animales en un estado avanzado de la enfermedad, pero solo unos

cuantos en la fases iniciales de la infección. En las muestras fecales y de tejido intestinal, los microorganismos de *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* están enmascarados por otras bacterias y hongos. El aislamiento efectivo de *M. paratuberculosis* a partir de tales muestras depende de la eficacia en la inactivación de estos microorganismos no deseados.

Debido a la excreción intermitente del *Map*, es recomendable tomar muestras en serie a través del tiempo (Pinedo *et al.*, 2008). El cultivo bacteriano requiere como mínimo 100 UFC (unidades formadoras de colonias) por g (Merkal, 1970). Esta cantidad se supera por los animales con paratuberculosis clínica, pero no por excretores fecales sub-clínicos de baja y / o moderada excreción, y solamente 15-25% de ellos puede ser detectada por cultivo bacteriano (Whitlock y Buergelt, 1996). El cultivo bacteriano de la leche de los animales en esta etapa es difícil, porque la tasa de excreción bacteriana es 2-8 UFC/50 ml (McKenna *et al.*, 2005). El cultivo a partir de muestras de tejido proporciona una sensibilidad de 70% y una especificidad del 95% (Tiwari *et al.*, 2006).

2.7.1.4. Sondas de ADN y reacción en cadena de la polimerasa

Se han elaborado sondas de ADN que permiten detectar *M. paratuberculosis* en las muestras de diagnóstico e identificar rápidamente las bacterias aisladas (Ellingson *et al.*, 1998). McFadden *et al.* (1987) han identificado una secuencia, denominada IS900, que es una secuencia específica de inserción de *M. paratuberculosis*.

La caracterización de la secuencia de inserción IS900 que tiene 1451 pares de bases y está presente con 15 a 20 copias en el genoma de *Map* ha permitido la identificación específica del ADN bacteriano mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La PCR se puede realizar en muestras como heces, leche, sangre y tejidos (íleon, o yeyuno, o válvula ileocecal cerca yeyunal, o ganglios linfáticos ileocecal). Se debe tener cuidado para evitar la contaminación con inhibidores de la PCR que podrían

causar que los resultados falsos negativos. La PCR se ha convertido en una alternativa al cultivo, sin embargo, la sensibilidad de la PCR convencional se ve obstaculizada por factores como sustancias inhibidoras, baja carga de *Map* en muestras (heces, leche, tejidos, semen, secreciones vaginales), la manipulación de estas muestras, que son altamente contaminado con otros microbios y materiales. Por lo tanto se han propuesto variantes a la PCR convencional como: i) PCR anidada, que implica dos rondas de amplificación de la misma secuencia con diferentes pares de cebadores cada uno y por lo tanto, permite aumentar la sensibilidad de la reacción; ii) PCR multiplex, que utiliza varios pares de cebadores en la misma reacción para amplificar múltiples secuencias diana del genoma bacteriano simultáneamente; iii) en tiempo real o PCR cuantitativa (RT-PCR), que utiliza una sonda marcado con fluorocromo complementaria a un fragmento intermedio de la secuencia diana que se amplifica. La cuantificación de la fluorescencia emitida durante cada ciclo de PCR es proporcional a la cantidad de ADN. La ventaja de la PCR es la detección oportuna de *Map*, y sin la necesidad de bacterias viables en la muestra. La ventaja de la RT-PCR es que permite la inmediata observación de la amplificación de la diana, cuantificación y tiene una mayor sensibilidad que el cultivo bacteriano (Bogli-Stuber *et al.*, 2005).

2.7.2. Pruebas serológicas

Las pruebas serológicas utilizadas habitualmente para la paratuberculosis en el ganado vacuno son la fijación del complemento (FC), la técnica de enzimoimmunoensayo (ELISA) y la inmunodifusión en gel de agar (IGDA) (Sockett *et al.*, 1992) en lo referente a inmunidad humoral, y la técnica del interferón gamma cuando se trata de inmunidad celular.

2.7.2.1. Prueba de Fijación del Complemento (FC)

Se emplea como antígeno un extracto acuoso de la bacteria del que se han eliminado los lípidos. Se inactivan todos los sueros a diagnosticar en un baño de agua

a 60°C durante 30 minutos. Se mezcla el antígeno y el sensibilizante correspondiente se añade el suero, que contiene por consiguiente el complemento, éste desaparece del suero que, por tanto, se vuelve incapaz de reactivar otra mezcla que contenga un antígeno y el sensibilizante. Es lo que se expresa diciendo que el complemento ha sido fijado sobre el primer antígeno.

La prueba de FC es adecuada cuando se trata de animales clínicamente sospechosos, pero no presenta suficiente especificidad para fiarse de su uso con fines de control en la población general. Sin embargo, a menudo es solicitada por países que importan ganado. Esta prueba puede identificar a los animales con signos clínicos, pero no lo suficientemente específica como para ser utilizado en los programas de control (Singh *et al.*, 2014).

2.7.2.2. Técnica del Enzimoimmunoensayo (ELISA)

ELISA es la prueba diagnóstica más utilizada para el diagnóstico serológico de la paratuberculosis. Se puede aplicar en las muestras de sangre, suero y leche. Cuando ELISA da resultados positivos en rebaños aparentemente sanos o de baja prevalencia, un cultivo bacteriano debe llevarse a cabo para confirmar la etapa de la infección. La especificidad de la prueba ELISA se incrementa mediante la absorción de sueros a *M. phlei* (Singh *et al.*, 2014).

En los pequeños rumiantes, el ELISA comercializado presentó una especificidad del 98,2–99,5% (intervalos de confianza [IC] del 95%) y detectó el 35-54% (IC del 95%) de animales con evidencia histológica de infección (Hope *et al.*, 2000). En otro estudio, la especificidad estimada de un ELISA doméstico fue del 99% y su sensibilidad referida a los resultados histológicos fue del 21,9% (Sergeant *et al.*, 2003).

La prueba de ELISA tiene varias ventajas, tales como fácil automatización, la repetibilidad y la posibilidad de evaluar múltiples muestras juntas. Tiene muy buena

sensibilidad y especificidad en etapas clínicas y es relativamente barata. La desventaja es la variabilidad antigénica en diferentes pruebas de ELISA y las diferentes edades de los animales que puede conducir a errores en la sensibilidad y especificidad (Collins, 2002).

2.7.2.3. Prueba de Inmunodifusión en Gel de Agar (IDGA)

Esta prueba se basa en la precipitación de los complejos inmunes formados por los anticuerpos de animales infectados con un antígeno soluble de un extracto de protoplasmática de *Map* en una matriz de gel de agar. Es un método simple, rápido y relativamente barato, pero tiene baja sensibilidad en la etapa temprana de la enfermedad (Ferreira *et al.*, 2002). La prueba IGDA es útil para confirmar la enfermedad en las vacas, ovejas y cabras clínicamente sospechosas (Shermann *et al.*, 1984). Se ha descrito que en pequeños rumiantes de Nueva Zelanda, la IDGA presenta una sensibilidad y especificidad ligeramente mayor que la obtenida por los ELISA (Sergeant *et al.*, 2003). La especificidad y la sensibilidad descritas para la IDGA medidas respecto a los resultados histológicos fueron 99–100% (IC del 95%) y 38–56% (IC del 95%), respectivamente (Hope *et al.*, 2000).

2.7.3. Pruebas de Inmunidad Mediada por Células

La detección de una respuesta sistémica mediada por células precede a la producción de anticuerpos detectables. Los animales que están infectados con frecuencia a un mínimo nivel no dan reacciones en las pruebas serológicas, pero pueden reaccionar positivamente en las pruebas que miden la inmunidad mediada por células.

2.7.3.1. Técnica del Gamma Interferón

Esta técnica se basa en la liberación de gamma interferón a partir de linfocitos sensibilizados durante un periodo de incubación de 18–36 h con antígeno específico (tuberculina del tipo derivado proteico purificado [PPD] aviar, tuberculina PPD bovina

o johnina). En los animales con la etapa de sub-clínica, la sensibilidad de este ensayo es superior a la de las pruebas serológicas, pero baja en términos absolutos (41.0 %) (Gwozdz *et al.*, 2000). La ventaja de la prueba de IFN- γ es la secreción significativa de IFN- γ durante las primeras etapas y puede ser utilizado para detectar animales en la etapa de sub-clínica. Sin embargo, tiene varias desventajas: i) las posibles reacciones cruzadas, ii) su alto costo y iii) su baja sensibilidad (Stabel y Whitlock, 2001).

2.7.3.2. Hipersensibilidad de Tipo Retardado

La prueba de hipersensibilidad cutánea de tipo retardado (DTH) es una medida de inmunidad mediada por células, pero tiene un valor limitado. La prueba se realiza mediante la inoculación intradérmica de 0.1 mL de antígeno en una zona esquilada o rasurada, normalmente en lateral del tercio medio del cuello. En el pasado se usaba para este fin, la tuberculina PPD aviar o johnina, porque se pensaba que la tuberculina aviar y la johnina tenían una sensibilidad y especificidad comparable. El grosor de la piel se mide con un calibrador antes de la inoculación y 72 horas después de la misma. Los aumentos del grosor de la piel superior a 2 mm se considerarán indicativos de la presencia de DTH.

Esta prueba tiene una sensibilidad estimada de 54.0 % y una especificidad del 79.0 % (Kalis *et al.*, 2003). Las ventajas son que es fácil de realizar en el campo, y que hay una posibilidad de la detección temprana de los animales infectados. Las desventajas son su baja sensibilidad y su especificidad baja (debido a probables reacciones cruzadas).

En conclusión para la detección de la *Map*, el cultivo bacteriano, se considera como estándar de oro. Sin embargo, debido a la falta de signos clínicos en la etapa temprana de la infección esta prueba no permite la identificación precisa de los animales verdaderamente infectados. Las pruebas para el diagnóstico de paratuberculosis dependen principalmente de (i) la detección directa de bacilos (*Map*) por microscopía

fecal, la cultura del organismo y de inmunofluorescencia (tejidos infectados) (ii) la detección de su genoma en las heces / tejido / sangre por PCR. Indirectamente, se puede detectar por la medición de anticuerpos-*Map* específica (ELISA) y las células T (ensayo de linfoproliferación). Además histopatología se puede realizar para visualizar los cambios degenerativos en los tejidos infectados. Cada una de estas pruebas tiene una sensibilidad y especificidad variable y por lo tanto es necesario analizar cuidadosamente los resultados de cada prueba de forma independiente (OIE, 2008).

2.8. Control

El control de la paratuberculosis es un gran desafío, ya que el organismo es omnipresente y es capaz de sobrevivir durante largos periodos de tiempo, incluso en condiciones ambientales extremas, así como su capacidad de infectar múltiples especies (Pickup *et al.*, 2006). La incapacidad de las pruebas de diagnóstico para detectar los animales con infección subclínica también posee un gran desafío. Actualmente la mayoría de las prácticas de control de la paratuberculosis se basan en las intervenciones de gestión diseñados para limitar la introducción, así como la transmisión del patógeno. Los factores a nivel hato incluyen: la resistencia de la manada y sus reemplazos; fuentes comunes de agua y alimento; corrales comunales; contaminación del alimento y agua con estiércol, así como los terneros, el lavado de la ubre antes del ordeño y el tipo de alojamiento (Ott *et al.*, 1999). Como ninguna prueba es 100 % sensible o específica, el control de la enfermedad por eliminación de los reactivo-positivos se realiza con pruebas repetidas a intervalos de 6 meses o de un año durante varios años así como por la eliminación de los reactivo-positivos a las pruebas serológicas o pruebas fecales; también se considera prudente la separación de la descendencia de las hembras reactivas. Incluso estos procedimientos no siempre tienen éxito sin cambios en los hábitos de higiene y en el manejo del ganado para reducir la transmisión de la infección en el rebaño (Argente, 1988). Se han emprendido muchas iniciativas para controlar y erradicar la paratuberculosis y hay 3 métodos seguidos: 1) restricción de la transmisión de *Map* a través del cambio en el manejo, 2) las prácticas de prueba

y desecho para eliminar la fuente de infección y, 3) vacunar a los reemplazos para aumentar su resistencia a la infección.

2.8.1. Cambios en las prácticas de manejo

Los cambios en el manejo se centran en evitar el contacto entre animales infectados y sanos y disminuir la carga ambiental del *Map*. Tales medidas incluyen la separación de las crías de madres inmediatamente después del nacimiento; alimentación con sustitutos de leche libre de paratuberculosis a los terneros, cría de reemplazo (corral independiente) por separado, evitar fertilización con abono las tierras de pastoreo, mejorar la higiene de la granja en general. Además, al introducir nuevos animales al rebaño se debe considerar: el diagnóstico y observar el estado de paratuberculosis del rebaño de origen. El mayor retroceso de estas prácticas, es la capacidad del *Map* de sobrevivir en el ambiente por períodos prolongados (Whittington *et al.*, 2005). Las limitaciones económicas de las explotaciones pueden limitar aún más el éxito de este enfoque. Estas medidas, además, no proporcionan resultados inmediatos (Muskens *et al.*, 2003).

2.8.2. Prácticas de prueba y desecho

La baja sensibilidad de los métodos diagnósticos es la mayor desventaja en esta estrategia y es costosa para los productores. Si el desecho se basa en el cultivo fecal, existe la posibilidad que algunos casos de animales infectados fueran falsos negativos. El cultivo puede tomar varias semanas para detectar animales positivos y durante este período, los animales infectados seguirán arrojando *Map* en el ambiente. El control y progreso de la enfermedad es lento, por tanto, a menudo es decepcionante, ya que los animales positivos aparecen regularmente en los últimos años, incluso después de la eliminación de todos los animales que presenten la enfermedad clínica. ELISA es una prueba de diagnóstico rentable; sin embargo, su sensibilidad y especificidad también se ve comprometida. Por lo tanto, la decisión de los animales

para sacrificio sufrirá siempre con sospecha por falso positivo. Otro problema es que varios kits de ELISA de diagnóstico disponibles comercialmente tienen especificidad y sensibilidad variable (Singh *et al.*, 2007; Dieguez *et al.*, 2009,), lo que afecta gravemente los programas de control. El sacrificio por detección de PCR también se ha aplicado. Las mejoras en la técnica de PCR, los precios bajos de reactivos, la mejora de la sensibilidad y de procesamiento de alto rendimiento de las muestras, han hecho de esta prueba una estrategia fructífera. El cultivo de heces ha sido recientemente sustituido en Holanda por pruebas basadas en la PCR para el control de la paratuberculosis (Bastida y Juste, 2011). En campo, PCR y la eliminación selectiva, aún no están muy probados como lo está ELISA y la eliminación selectiva (Singh *et al.*, 2014).

2.8.3. Vacunación

La vacunación se considera rentable y como forma más eficaz en el control de la paratuberculosis (Juste y Casal, 1993; Reddacliff *et al.*, 2006; Juste y Pérez, 2011,). Además, se ha sugerido que la vacunación puede iniciar el final del gran problema de la paratuberculosis en todo el mundo, tal vez marcando la diferencia entre no hacer nada y avanzar hacia el control a nivel mundial (Juste *et al.*, 2002). La principal desventaja de la vacunación es que los animales vacunados no pueden diferenciarse de los animales infectados, y por otra parte, interfiere con la serología de la tuberculosis (Juste y Pérez, 2011). En España, se desarrolló una vacuna viva, con lo cual se mantuvo la paratuberculosis ovina en observación. La vacunación contra la paratuberculosis en Cabras está actualmente en uso en España, los Países Bajos, Francia, Noruega y la India (Juste y Pérez, 2011).

La vacunación en Noruega de ganado caprino, resultó en una reducción de 98% en hallazgos post mortem de las lesiones, y durante un período de 16 años, se redujo la incidencia de 53% a 1% (Saxegaard y Fodstad, 1985). En los Estados Unidos, la vacuna Mycopar (microorganismo muerto) usada en ovinos redujo 75.3% las lesiones histológicas (Thonney y Smith, 2005).

Se supone que la vacunación modifica los procesos inmunopatológicos que conducen a la persistente inflamación intestinal progresiva, responsable de la enfermedad clínica, de una manera tal que los individuos inmunizados son capaces de detener la progresión de la infección y las lesiones resultantes. Dando como resultado la reducción de la excreción de *Map* y disminución significativa en la gravedad de los signos clínicos y pérdidas económicas (Singh *et al.*, 2014).

La vacunación también ayuda a reducir la contaminación del medio ambiente debido a la *Map*. En el estudio de vacunación de van Schaik *et al.* (1996) la reducción global de contaminación fue del 66,6%. Esto se debió a la disminución en el número de excretores. En 49 ensayos de diferentes estudios, la vacunación en el ganado ovino, se observaron efectos positivos de la vacunación en el 94% de los casos. En las cabras, se reportaron efectos positivos en el 92% de los casos en 24 ensayos (Juste y Pérez, 2011).

2.8.4. Tratamiento

Los tratamientos con antibióticos no son muy efectivos ya que no llegan a curar la enfermedad y los animales tratados mejoran clínicamente, pero siguen eliminando el bacilo por las heces, el tratamiento solo es recomendable para animales de alto valor genético (Merkal y Larsen, 1973).

La falla en el éxito del tratamiento radica en la dificultad mostrada por los fármacos antimicobacterianos para acceder a los compartimentos intracelulares del bacilo (Jean, 1996). Los compuestos más eficaces tanto *in vitro* como *in vivo*, son: la isoniazida, la clofazimina, la rifampicina, y la gentamicina, sin embargo, ninguno de ellos es capaz de eliminar totalmente la infección. (Chiodini *et al.*, 1984a; Cocito *et al.*, 1994).

2.9. Salud Pública

La paratuberculosis se considera una zoonosis menor, pues *Map* se ha aislado de casos esporádicos de colitis crónica en humanos, la enfermedad de Crohn; sin embargo, ni los aislamientos, ni los estudios con herramientas moleculares (PCR) han arrojado resultados definitivos en cuanto a que efectivamente la bacteria sea el agente causal (Harris y Barletta, 2001).

La enfermedad de Crohn, caracterizada por una enteritis granulomatosa crónica que afecta a las personas, fue descrita por primera vez en 1932 por Crohn *et al.* (1932). Los signos clínicos de esta enfermedad, parecidos a los de la paratuberculosis, incluyen malestar general, pérdida crónica de peso, dolor abdominal, diarrea y pueden manifestarse de forma intermitente (Chiodini, 1989). Fue hasta 1984 cuando Chiodini *et al.* (1984b), aislaron *Map* de tres pacientes enfermos de Crohn. Este hallazgo, junto con el aislamiento de dicho bacilo a partir de sangre y tejidos de pacientes (Naser *et al.*, 2004; Sechi *et al.*, 2005), han suscitado aún más interés sobre el posible papel zoonótico de esta micobacteria; y han abierto un debate muy controvertido en estas dos últimas décadas (Greenstein, 2003).

A pesar de las evidencias a favor, aún se acepta con reserva el hecho de que esta micobacteria sea el agente causal de la enfermedad de Crohn, ya que en el caso de que *Map* fuera el agente etiológico de esta enfermedad, los ganaderos y el personal más expuesto a esta micobacteria deberían tener mayor predisposición a padecer la enfermedad de Crohn, mientras que no se ha observado una mayor proporción de individuos afectados entre estas poblaciones (Jones *et al.*, 2006). Por lo que aún se requieren muchos más estudios para poder confirmar su papel como agente causal en la enfermedad de Crohn (Grant, 2005; Pierce, 2009).

Si se confirmara *Map* como agente etiológico en la enfermedad de Crohn, esto implicaría la preocupación de la micobacteria en la cadena alimenticia. Por ello, se han

abierto ya varias líneas de investigación para valorar la presencia de *Map* en la leche, la carne o productos derivados, así como el agua, que pudiera participar en una posible transmisión a la especie humana (Eltholth *et al.*, 2009)

2.10. Literatura Citada

- Adams L.G.; Templeton J.W. 1988. Genetic resistance to bacterial diseases of animals. *Rev Sci Tech.* 17(1):200-19.
- Adams, L.G.; Czuprynski C.J. 1995. Ex vivo induction of TNF alpha and IL-6 mRNA in bovine whole blood by *Mycobacterium paratuberculosis* and mycobacterial cell Wall components. *Microbial Pathogenesis* 19: 19-29.
- Allen, W.M.; Berrett, S.; Patterson, D.S.P. 1974a. A biochemical study of experimental Johne's disease. II. An in vitro study of L-histidine uptake by sheep intestinal mucosa. *J. Comp. Pathol.* 84; 385-389.
- Allen, W.M.; Patterson D.S.; Slater T.F. 1974b. A biochemical study of experimental Johne's disease. III. Protein metabolism in sheep and mice. *Comp. Pathol.* 84:39-398.
- Alvarez, J.; de Juan L.; Briones V.; Romero B.; Aranaz A.; Fernandez-Garayzabal J.F.; Mateos A. 2005. *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in fallow deer and wild boar in Spain. *Vet.Rec.*, 156(7):212-3.
- Argente, G. 1988. Utilisation de la culture fécale dans un plan de prevention de la paratuberculose dans 500 troupeaux; justifications techniques et économiques. *En: Second International Colloquium on Paratuberculosis.* Laboratoire Central de Recherches Vétérinaires, 94703 Maisons-Alfort Cedex, France, 30–35).
- Bassey, 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. *J. Immune Based Ther. Vaccines* 9:8
- Beard, P.M.; Daniels M.J.; Henderson D.; Pirie A.; Rudge K.; Buxton D.; Rhind S.; Greig A.; Hutchings M.R.; McKendrick I.; Stevenson K.; Sharp J.M. 2001. Paratuberculosis infection of nonruminant wildlife in Scotland. *J.Clin.Microbiol.* 39(4):1517-21.

- Bellamy, R. 2000. Identifying genetic susceptibility factors for tuberculosis in africans: a combined approach using a candidate gene study and a genome-wide screen. *Clin. Sci. (Lond.)*, 98: 245-250.
- Bogli-Stuber K.; Kohler C., Seitert G.; Glanemann B.; Antognoli M.C.; Salman M.D.; Wittenbrink M.M.; Wittwer M.; Wassenaar T.; Jemmi T.; Bissig-Choisat B. 2005. Detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in Swiss dairy cattle by real-time PCR and culture: a comparison of the two assays. *J. Appl. Microbiol.* 99:587-597.
- Braun, R.K.; Buergelt C.D.; Littell R.C.; Linda S.B.; Simpson J.R. 1990, Use of an enzyme-linked immunosorbent assay to estimate prevalence of paratuberculosis in cattle of Florida. *J Am Vet Med Assoc* 196:1251-1254.15
- Brotherston, J.B.; Gilmour N.J.L.; Mc Samuel J. 1961. Quantitative studies of *Mycobacterium johnei* in the tissues of sheep. *J. Comp. Pathol.* 71:286-299.
- Buergelt, C.D.; Hall C.; Mcentee K.; Duncan J.R. 1978. Pathological evaluation of paratuberculosis in naturally infected cattle. *Vet. Pathol.*, 15:196-207.
- Cetinkaya, B.; Erdogan H.M.; Morgan K.L. 1998. Prevalence, incidence and geographical distribution of Johne's disease in catle in England and the Welsh borders. *Vet. Rec.* 143:265-269.
- Chávez, G.G.; Trigo F.J.T.; Svastova P.; Pavlik I. 2004. Identificación del polimorfismo genético de aislamientos de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* de caprinos del centro de México. *Vet Mex* 35:75-84.
- Chiodini, R.J. 1989. Crohn's disease and the mycobacterioses: a review and comparison of two disease entities. *Clin. Microbiol. Rev.* 2:90-117.
- Chiodini, R.J. 1996. Immunology: resistance to paratuberculosis. *Vet.Clin.North Am.Food Anim.Pract.* 12(2):313-43.
- Chiodini R.J.; Van Kruiningen H.J.; Merkal R.S. 1984a. Ruminant paratuberculosis (Johne's disease): The current status and future prospects. *Cornell Vet.*, 74:218-62.
- Chiodini R.J.; Van Kruiningen H.J.; Merkal R.S.; Thayer W.R.; Coutu J.A. 1984b. Characteristics of an unclassified *Mycobacterium* species isolated from patients with Crohn's disease. *J.Clin.Microbiol.*, 20(5):966-71.
- Chiodini, R.J.; Davis W.C. 1993. The cellular immunology of bovine paratuberculosis: immunity may be regulated by CD4+ helper and CD8+ immunoregulatory T lymphocytes which down-regulate gamma/delta+ T-cell cytotoxicity. *Microb. Pathog.* 14:355-367.

- Chiodini, R.J.; Van Kruiningen H.J. 1986. The prevalence of paratuberculosis in New England. *Cornell Vet* 76:91-104.
- Clarke, C.J. 1997. The pathology and pathogenesis of paratuberculosis in ruminants and other species. *J. Comp. Pathol.* 116, 217-261.
- Clarke, C.J.; Little D. 1996. The pathology of ovine paratuberculosis: gross and histological changes in the intestine and other tissues. *J. Comp. Pathol.*, 114: 419-437.
- Cocito, C.; Gilot P.; Coene M.; de Kesel M.; Poupart P.; Vannuffel P. 1994. Paratuberculosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 7:328-345.
- Collins M.T. 2002. Interpretation of a commercial bovine paratuberculosis Enzyme linked immunosorbent assay by using likelihood ratio. *Clin. Diag. Lab. Immunol.* 9:1367-1371.
- Collins, D.M.; Gabric D.M.; De Lisle G.W. 1990. Identification of two groups of *Mycobacterium paratuberculosis* strains by restriction endonuclease analysis and DNA hybridization. *J. Clin. Microbiol.*, 28: 1591-1596.
- Collins, M.T. 1994. Clinical approach to control of bovine paratuberculosis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 204, 208-210.
- Collins, M.T., Sockett D.C.; Goodger W.J.; Conrad T.A.; Thomas C.B.; Carr D.J. 1994. Herd prevalence and geographic distribution of, and risk factors for, bovine paratuberculosis in Wisconsin. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 204:636-641.
- CONASA. Consejo Técnico Consultivo Nacional de Sanidad Animal. 2009. Taller de trabajo de planeación estratégica para la atención de la paratuberculosis en bovinos, caprinos y ovinos de México. Tequisquiapán, Querétaro, México. <http://www.conasamexico.org.mx/conasatequis.pdf> (Consultado: Enero 5 de 2013).
- Corr, S.C.; Gahan C.C.; Hill C. 2008. M-cells: origin, morphology and role in mucosal immunity and microbial pathogenesis. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 52: 2-12.
- Crohn, B.B.; Ginzburg I.; Oppenheimer G.D. (1932). Regional ileitis: a pathologic and clinical entity. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 99:1323-1328.
- Daffe M.; Draper P. 1998. The envelope layers of mycobacteria with reference to their pathogenicity. *Adv. Microb. Physiol.*, 39:131- 203.
- Daniels, M.J.; Ball N.; Hutchings M.R.; Greig A. 2001. The grazing response of cattle to pasture contaminated with rabbit faeces and the implications for the transmission of paratuberculosis. *Vet. J.* 161:306-313.

- Dhand, N. K.; Eppleston J.; Whittington R. J.; Toribio J-A.L.M.L. 2007. Risk factors for ovine Johne's disease in infected sheep flocks in Aust. *Prev Vet Med.* 82:51–71.
- Díaz, S.; Ripoli M.V.; Peral-García P.; Giovambattista G. 2005. Marcadores genéticos para resistencia y susceptibilidad a enfermedades infecciosas en animales domésticos. Los loci del complejo principal de histocompatibilidad (mhc) como genes candidatos. *Analecta veterinaria* 25 (1): 40-52.
- Dieguez, F.J.; González A.M.; Menéndez S.; Vilar M.J.; Sanjuan M.L.; Yus E. 2009. Evaluation of four commercial serum ELISAs for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in dairy cows. *Vet. J.* 180:231-235.
- Dierckins, M.S.; Sherman D.M.; Gendron F. 1990. Probable paratuberculosis in a Sicilian ass. *J.Am.Vet.Med.Assoc.* 45:459-61.
- Djonne, B.; Jensen M.R.; Grant I.R.; Holstad G. 2003. Detection by immunomagnetic PCR of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk from dairy goats in Norway. *Vet. Microbiol.* 92, 135-143.
- Eamens, G.J.; Whittington R.J.; Marsh I.B.; Turner M.J.; Saunders V.; Kemsley P.D.; Rayward D. 2000. Comparative sensitivity of various faecal culture methods and ELISA in dairy cattle herds with endemic Johne's disease. *Vet. Microbiol.* 77 (3-4): 357-367.
- Ellingson, J.L.E.; Bolin C.A.; Stabel J.R. 1998. Identification of a gene unique to *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* and application to diagnosis of paratuberculosis. *Mol. Cell. Probes*, 12: 133–142.
- Ellner, J.J.; Wallis R.S. 1989. Immunologic aspects of mycobacterial infections. *Rev. Infect. Dis.* 11:455-459.
- Eltholth, M.M.; Marsh V.R.; Van Winden S.; Guitian F.J. 2009. Contamination of food products with *Mycobacterium avium paratuberculosis*: a systematic review. *J. Appl. Microbiol.*, 107: 1061-1071.
- Erume, J.; Spergser J.; Rosengarten R. 2001. Rapid detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* from cattle and zoo animals by nested PCR. *African Health Sciences* 1: 83-89.
- 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 Rumin Res* 72:209–213.
- Favila-Humara, L.; Hernández-Castro R.; Chávez-Gris G. 2007. Detección de *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* en leche de cabras por PCR en

México. V° Congreso de especialistas en pequeños rumiantes y camélidos sudamericanos. Mendoza, Argentina. http://www.produccionbovina.com/sanidad_intoxicaciones_metabolicos/enfermedades_caprinos/10-chavez,%20mycobacterium.pdf (Consultado 29 de Febrero, 2012)

- Ferreira, R.; Fonseca L.S.; Lilenbaum W. 2002. Agar gel immunodiffusion test (AGID) evaluation for detection of bovine paratuberculosis in Rio de Janeiro, Brazil. *Letters Appl. Microbiol.* 35:173-175.
- Flores, C. R. 2003. La salud animal en ovinos como factor de valor agregado en la comercialización de carne. 1er. Simposium Internacional de Ovinos de Carne. Pachuca, Hidalgo 17 a 19 de noviembre.
- García-Marín, J.F.; Benazzi S.; Perez V.; Badiola J.J. 1992. Study of entrance of *M. paratuberculosis* in the lambs intestinal mucosa using immunohistochemical methods for antigens detection. En: Chiodini, R.J.; Kreeger, J.M. (Eds.). *Proc 3rd Int. Coll. PTBC*. IAP. Providence. EE.UU. pp 371-377.
- García-Marín, J.F.; Pérez V.; García De Jalón J.A.; De Las Heras M.; Barberán M.; Fernández De Luco D.; Badiola J.J. 1994. Diagnóstico de casos clínicos de paratuberculosis ovina y caprina. *Med. Vet.*, 11: 491-502.
- Gay, J.M.; Sherman D.M. 1992. Factors in the epidemiology and control of ruminant paratuberculosis. *Vet. Med.*, 1133-1139.
- Gilmour, N.J.L. 1976. The pathogenesis, diagnosis and control of Johne's disease. *Vet. Rec.* 99:433-434.
- Gilmour, N.J.L.; Angus K.W.; Mitchell B. 1977. Intestinal infection and host response to oral administration of *Mycobacterium johnei* in sheep. *Vet. Microbiol.*, 2; 223-235.
- Goudswaard, J. 1971. Studies on the incidence of *Mycobacterium johnei* in the organs of experimentally infected goats. *Neth. J. Vet. Sci.* 4:65-75.
- Grant, I.R. 2005. Zoonotic potential of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*: the current position. *J. Appl. Microbiol.*, 98: 1282-1293.
- Grant, I.; Pope C.; O'Riordan L.; Ball H.; Rowe M. 2000. Improvement detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk by immunomagnetic PCR. *Vet microbial* 77:369-378.
- Grant, I.R.; Ball H.J.; Rowe M.T. 2002. Incidence of *Mycobacterium paratuberculosis* in bulk raw and commercially pasteurized cows' milk from approved dairy processing establishments in the United Kingdom. *Appl. Environ. Microbiol.* 68(5):2428-35.

- Greenstein, R.J. 2003. Is Crohn's disease caused by a mycobacterium? Comparisons with leprosy, tuberculosis, and Johne's disease. *Lancet. Infect. Dis.*, 3: 507-514
- Greig, A.; Stevenson K.; Pérez V.; Pirie A.A.; Grant J.M.; Sharp J.M. 1999. Paratuberculosis in wild rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). *Vet.Rec.* 140:141-3.
- Gwozdz, J.M.; Thompson K.G.; Manktelow B.W. 2001. Lymphocytic neuritis of the ileum in sheep with naturally acquired and experimental paratuberculosis. *J. Comp. Pathol.*, 124: 317-320.
- Gwozdz, J.M.; Thompson K.G.; Murray A.; Reichel M.P.; Manktelow B.W.; West D.M. 2000. Comparison of three serological tests and an interferon-gamma assay for the diagnosis of paratuberculosis in experimentally infected sheep. *Aust. Vet. J.*, 78(11):779-783.
- Harris, N.B.; Barletta R.G. 2001. *Mycobacterium avium* Subs. *paratuberculosis*. In Veterinary medicine. *Clin. Microbiol. Rev.* 14:492-512.
- Hermon-Taylor J.; Bull T.J.; Sheridan J.M.; Cheng J.; Stellakis M.L. 2000. Causation of Crohn's disease by *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis. *Can J Gastroenterol* 14: 521–539.
- Hill, B.B.; West M.; Brock K.V. 2003. An estimated prevalence of Johne's disease in a subpopulation of Alabama beef cattle. *J. Vet. Diagn. Invest* 15, 21-25.
- Hole, N.H. 1958. Johne's disease. *Adv. Vet. Sci.*, 4: 341-387.
- Hope, A.F.; Kluver P.F.; Jones S.L.; Condron R.J. 2000. Sensitivity and specificity of two serological tests for the detection of ovine paratuberculosis. *Aust. Vet. J.*, 78 (12):850-856.
- Ikonomopoulos, J.; Pavlik I.; Bartos M.; Svastova P.; Ayele W.Y.; Roubal P.; Lukas J.; Cook N.; Gazouli M. 2005. Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in retail cheeses from Greece and the Czech Republic. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71: 8934-8936.
- Jean, G.S. 1996. Treatment of clinical paratuberculosis in cattle. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.*, 12:417-430.
- Johne, H.A.; Frothingham, L. 1895. Ein eigentümlicher Fall von Tuberkulose beim Rind. *Dtsch. Ztschr. Tiermed. Path.* 21:438-454.
- Johnson, D.W.; Muscoplat C.C.; Larsen A.B.; Thoen C.O. 1977. Skin testing, fecal culture, and lymphocyte immunostimulation in cattle inoculated with *Mycobacterium paratuberculosis*. *Am. J. Vet. Res.* 38:2023-2025.
- Jones, P.H.; Farver T.B.; Beaman B.; Cetinkava B.; Morgan K.L. 2006. Crohn's disease in people exposed to clinical cases of bovine paratuberculosis. *Epidemiol. Infect.*, 134: 49-56.

- Jorgensen J.B. 1977. Survival of *Mycobacterium paratuberculosis* in slurry. *Nord.Vet.Med.* 29:267-70.
- Julian, R.J. 1975. A short review and some observations on Johne's disease with recommendations for control. *Can. Vet. J.*, 16: 33-43.
- Juste R.A.; Geijo M.V.; Sevilla I.; Aduriz G.; Garrido J.M. 2002. Control of paratuberculosis by vaccination. In *Proceedings of the 7th International Colloquium on Paratuberculosis*; Bilbao, Spain. Edited by: Juste RA. International Association for Paratuberculosis. pp. 331.
- Juste R.A.; Marco J.C.; Saez de Ocariz C.; Aduriz J.J. 1991b. Comparison of different media for the isolation of small ruminant strains of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Vet.Microbiol.*, 28:385-90.
- Juste, R.; Casal J. 1993. An economic and epidemiologic simulation of different control strategies for ovine paratuberculosis. *Prev. Vet. Med.* 15:101-105.
- Juste, R.A. 1984. Paratuberculosis: una revisión. *Med. Vet.*, 1: 197-216.
- Juste, R.A.; Badiola J.J.; Arnal M.C.; Balaguer L.; García-Marín J.F.; Sáez de Ocariz C.; Marco J.C. 1991a. A survey of ovine paratuberculosis in Aragon (Spain) by different methods. *Paratuberc. Newslett.* 3, 3-4.
- Juste, R.A.; Cuervo L.A.; Gelabert J.L.; Sáez De Ocariz C.; Marco J.C.; Camon J. 1983. Paratuberculosis bovina en Vizcaya. *Hyg. Pec.*, 5:57-67.
- Juste, R.A.; Garrido J.M.; Adúriz G. 2000. El agente causal de la paratuberculosis y su situación taxonómica. En: Juste Editor. Paratuberculosis. *BOVIS, Aula Veterinaria*, 93:13-28.
- Juste, R.A.; Perez V. 2011. Control of Paratuberculosis in Sheep and Goats. *Vet. Clin. North Am: Food Animal Prac.* 27(1):127-138.
- Kalis, C.H.J.; Collins M.T.; Hesselink J.W.; Barkema H.W. 2003. Specificity of two tests for the early diagnosis of bovine paratuberculosis based on cell-mediated immunity: the Johnin skin test and the gamma interferon assay. *Vet. Microbiol.* 97:73-86.
- Kaufmann, S.H. 2001. How can immunology contribute to the control of tuberculosis? *Nat.Rev.Immunol.* 1(1):20-30.
- Kennedy, D.J.; Allworth M.B. 2000. Progress in national control and assurance programs for bovine Johne's disease in Australia. *Vet. Microbiol.* 77, 443-451.
- Kennedy, D.J.; Benedictus G. 2001. Control of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in agricultural species. *Rev. Sci. Tech.*, 20: 151-179.

- Khare, S.; Adams L.G.; Osterstock J.; Roussel A.; David L. 2008. Effects of shipping and storage conditions of fecal samples on viability of *Mycobacterium paratuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.*, 46: 1561-1562.
- Kheirandish, R.; Khodakaram-Tafti A.; Hosseini A. 2008. The comparative evaluation of immunohistochemical and acid fast staining with histopathological changes in naturally occurring paratuberculosis in sheep. *Comp. Clin. Pathol.*, 17: 111-116
- Kluge, J.P.; Merkal, R.S.; Monlux W.S.; Larsen AB.; Kopecky K.E.; Ramsey F.K.; Lechmann R.P. 1968. Experimental paratuberculosis in sheep after oral, intratracheal, or intravenous inoculation: Lesions and demonstration of etiologic agent. *Am. J. Vet. Res.* 29:953-962.
- Koets, A.P.; Langelaar M.; Hoek A.; Bakker D.; Willemsen P.T.J.; van Eden W.; Rutten V. 2006. Evidence for distinct host response patterns in cows experimentally infected with *M. avium* subspecies *paratuberculosis*. En: Manning y Nielsen editores. *Proc.8th Int.Coll.Paratub.* p. 154. IAP, Madison, WI, USA.
- Kreeger, J.M. 1991. Ruminant paratuberculosis - a century of progress and frustration. *J Vet Diagn Invest* 3:373-383.
- Kurade, N.P.; Tripathi B.N.; Rajukumar K.; Parihar N.S. 2004. Sequential development of histologic lesions and their relationship with bacterial isolation, fecal shedding, and immune responses during progressive stages of experimental infection of lambs with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Vet. Pathol.* 41:378-387.
- Langelaar, M.F.; Weber C.N.; Overdijk M.B.; Muller K.E.; Koets A.P.; Rutten V.P. 2005. Cytokine gene expression profiles of bovine dendritic cells after interaction with *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (M.a.p.), *Escherichia coli* (E. coli) or recombinant M.a.p. heat shock protein 70. *Vet.Immunol.Immunopathol.*, 107(1-2):153-61.
- Larsen A.B.; Merkal R.S.; Vardaman T.H. 1956. Survival time of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Am. J. Vet. Res.* 17(64):549-51.
- Larsen, A. B.; Kopecky, K.E. 1970. *Mycobacterium paratuberculosis* in reproductive organs and semen of bulls. *Am. J. Vet. Res.*, 31:255-258.
- Larsen, A.B.; Miller J.M. 1978. Mammary gland exposure of cows to *Mycobacterium paratuberculosis*. *Am. J. Vet. Res.* 39:1972-1974.
- Lee, H.; Stabel J.R.; Kehrl M.E. Jr. 2001. Cytokine gene expression in ileal tissues of cattle infected with *Mycobacterium paratuberculosis*. *Vet.Immunol.Immunopathol.* 82(1-2):73-85.

- Lee, J.S.; Shin S.J.; Collins M.T.; Jung I.D.; Jeong Y.I.; Lee C.M.; Shin Y.K.; Kim D.; Park Y.M. 2009. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* fibronectin attachment protein activates dendritic cells and induces a Th1 polarization. *Infect. Immun.*, 77: 2979-2988.
- Lepper, A.W.; Wilks C.R.; Kotiw M.; Whitehead J.T.; Swart K.S. 1989. Sequential bacteriological observations in relation to cell-mediated and humoral antibody responses of cattle infected with *Mycobacterium paratuberculosis* and maintained on normal or high iron intake. *Aust. Vet. J.* 66, 50-55.
- Liebler, E.M.; Pohlenz J.F.; Woode G.N. 1988. Gut associated lymphoid tissue in the large intestine of calves. I. Distribution and histology. *Vet.Pathol.* 25:503-508.
- Lovell R.; Levi M.L.; Francis J. 1944. Studies on the survival of Johne's bacilli. *J.Comp.Pathol.* 34:120-9.
- Mackintosh, C.G.; de Lisle G.W.; Collins D.M.; Griffin J.F. 2004. Mycobacterial diseases of deer. *N.Z.Vet.J.* 52(4):163-74.
- Manning, E.J.; Collins M.T. 2001 *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: pathogen, pathogenesis and diagnosis. *Rev Sci Tech* 20: 133-150.
- McClure, H.M.; Chiodini R.J.; Anderson D.C.; Swenson R.B.; Thayer W.R.; Coutu J.A. 1987. *Mycobacterium paratuberculosis* infection in a colony of stump-tail Macaques (*Maccaca arctoides*). *J.Infect.Dis.* 155:1011-1019.
- Mcfadden, J.J.; Butcher P.D.; Thompson J.; Chiodini R.; Hermon-Taylor J. 1987. The use of DNA probes identifying restriction fragment length polymorphisms to examine the *Mycobacterium avium* complex. *Mol. Microbiol.*, 1:283-291.
- McKenna S.L.B.; Keefe G.P.; Barkema H.W. Sockett D.C. 2005. Evaluation of three ELISAs for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* using tissue and fecal culture as comparison standards. *Vet. Microbiol.* 110:105-111.
- Medzhitov, R.; Janeway C.A. Jr. 1997. Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Curr. Opin. Immunol.*, 9:4-9.
- Merkal, R.S. 1970. Diagnostic methods for detection of paratuberculosis (Johne's disease), p. 620–623. *In: Proceedings of the 74th Annual Meeting of the U.S. Animal Health Association.* USAHA, Philadelphia, Pa.
- Merkal, R.S.; Larsen A.B.; Booth G.D. 1975. Analysis of the effect of inapparent bovine paratuberculosis. *Am. J. Vet. Res.*, 36: 837-838.
- Merkal, R.S.; Larsen, A.B. 1973. Clofazimine treatment of cows naturally infected with *Mycobacterium paratuberculosis*. *Am. J. Vet. Res.*, 34: 27-28.

- Merkal, R.S.; Whipple D.L. 1982c. Effectiveness of disinfectants on *Mycobacterium paratuberculosis*. *Proc.86th Annu.Meet.USAHA*. pp. 514-8.
- Merkal, R.S.; Whipple D.L.; Sacks J.M.; Snyder G.R. 1987. Prevalence of *Mycobacterium paratuberculosis* in ileocecal lymph nodes of cattle culled in the United States. *J Am Vet Med Assoc* 190:676-680.
- Momotani, E.; Whipple D.L.; Thiermann A.B.; Cheville 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.
- Mura M.; Bull T.J.; Evans H.; Sidi-Boumedine K.; McMinn L.; Rhodes G.; Pickup R.; Hermon-Taylor J. 2006. Replication and longterm persistence of bovine and human strains of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* within *Acanthamoeba polyphaga*. *Appl. Environ. Microbiol.* 72(1):854-9.
- Muskens, J.; Elbers A.R.; Van Weering H.J.; Noordhuizen P.T. 2003. Herd management practices associated with paratuberculosis seroprevalence in Dutch dairy herds. *J. Vet. Med. B* 50(8):372-377.
- Naser, S.A.; Ghobrial G.; Romero C.; Valentine J.F. 2004. Culture of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* from the blood of patients with Crohn's disease. *Lancet*, 364:1039-1044.
- Ochoa, C.M.A. 2001. Producción y composición de la leche de ovejas Rambouillet en México. Tesis Doctoral. Fac. de Agronomía. UASLP.
- OIE. 2008. Organización Mundial de la Sanidad Animal. Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres 2013 (versión 2008 en español en línea) http://www.oie.int/esp/normes/mmanual/e_summry.htm (consultado: marzo 24 de 2014).
- Olsen J.E.; Jorgensen J.B.; Nansen P. 1985. On the reduction of *Mycobacterium paratuberculosis* in bovine slurry subjected to batch mesophilic or thermophilic anaerobic-digestion. *Agricultural Wastes* 13(4):273-80.
- 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.* 40:179-192.
- Pence, M.; Baldwin C.; Black C.C. 2003. The seroprevalence of Johne's disease in Georgia beef and dairy cull cattle. *J. Vet Diagn. Invest.* 15, 475-477.
- Pérez, V.; García-Marín J.F.; Badiola J.J. 1996. Description and classification of different types of lesión associated with natural paratuberculosis infection in sheep. *J. Comp. Pathol.* 114:107-122.

- Pickup, R.W.; Rhodes G.; Bull T.J.; Arnott S.; Sidi-Boumedine K.; Bull T.J.; Weightman A.; Hurley M.; Hermon-Taylor J. 2006. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in lake catchments, in river water abstracted for domestic use, and in effluent from domestic sewage treatment works: diverse opportunities for environmental cycling and human exposure. *Appl. Environ. Microbiol.* 72:4067-4077.
- Pierce, E.S. 2009. Where are all the *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in patients with Crohn's disease? *PLoS Pathog.*, 5 (3): 1-11 e1000234.
- Pinedo, P.J.; Rae D.O.; Williams J.E.; Donovan G.A.; Melendez P.; Buergelt C.D. 2008. Association among results of serum ELISA, faecal culture and nested PCR on milk, blood and faeces for the detection of paratuberculosis in dairy cows. *Transboundary Emerg. Dis.* 55:125 – 133.
- Rademaker, J.L.; Vissers M.M.; Te Giffel M.C. 2007. Effective heat inactivation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in raw milk contaminated with naturally infected feces. *Appl. Environ. Microbiol.*, 73: 4185-4190.
- Ramírez, C. P.; Trigo E.T.; Suarez F.G.; Merkal R. 1979. Aislamiento e identificación de *Mycobacterium paratuberculosis* en México. *Téc. Pec. Méx.* 36:1979.
- Rankin, J.D. 1961. The experimental infection of cattle with *Mycobacterium johnei* III. Calves maintained in an infectious environment. *J Comp Pathol* 71: 10-15.
- Rastogi N.; Legrand E.; Sola C. 2001. The mycobacteria: an introduction to nomenclature and pathogenesis. *Rev. Off. Int. Epizoot.* 20(1):21-54.
- Ratledge C.; Ewing M. 1996. The occurrence of carboxymycobactin, the siderophore of pathogenic mycobacteria, as a second extracellular siderophore in *Mycobacterium smegmatis*. *Microbiology*, 142(Pt 8):2207-12
- Reddacliff L.; Eppleston J.; Windsor P.; Whittington R.; Jones S. 2006. Efficacy of a killed vaccine for the control of paratuberculosis in Australian sheep flocks. *Vet. Microbiol.* 115:77-90.
- Richards W.D.; Thoen C.O. 1977. Effect of freezing on the viability of *Mycobacterium paratuberculosis* in bovine feces. *J.Clin.Microbiol.* 6(4):392-395.
- Ruiz-Larrañaga, O.; Garrido J.M.; Manzano C.; Irion M.; Molina E.; Gil A.; Koets A.P.; Rutten V.P.; Juste R.A.; Estonba A. 2010. Identification of single nucleotide polymorphisms in the bovine solute carrier family 11 member 1 (SLC11A1) gene and their association with infection by *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *J. Dairy Sci.*, 4: 1713-1721.
- Saunders, B.M.; Cooper A.M. 2000. Restraining mycobacteria: role of granulomas in mycobacterial infections. *Immunol. Cell Biol.* 78:334-341.

- Saxegaard, F. 1990. Experimental infection of calves with an apparently specific goat-pathogenic strain of *Mycobacterium paratuberculosis*. *J. Comp. Pathol.* 102:149-156.
- Saxegaard, F.; Fodstad F.H. 1985. Control of paratuberculosis (Johne's disease) in goats by vaccination. *Vet. Rec.* 116:439-441.
- Sechi, L.A.; Scanu A.M.; Molicotti P.; Cannas S.; Mura M.; Dettori G.; Fadda G.; Zanetti S. 2005. Detection and Isolation of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* from intestinal mucosal biopsies of patients with and without Crohn's disease in Sardinia. *Am. J. Gastroenterol.* 100:1529-1536.
- Secott, T.E.; Lin T.L.; Wu C.C. 2001. Fibronectin attachment protein homologue mediates fibronectin binding by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Infect. Immun.*, 69: 2075-2082.
- Secott, T.E.; Lin T.L.; Wu C.C. 2002. Fibronectin attachment protein is necessary for efficient attachment and invasion of epithelial cells by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Infect. Immun.* 70:2670-2675.
- Secott, T.E.; Lin T.L.; Wu C.C. 2004. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* fibronectin attachment protein facilitates M-cell targeting and invasion through a fibronectin bridge with host integrins. *Infect. Immun.*, 72:3724-3732.
- Sergeant, E.S.; Marshall D.J.; Eamens G.J.; Kearns C.; Whittington R.J. 2003. Evaluation of an absorbed ELISA and an agar-gel immuno-diffusion test for ovine paratuberculosis in sheep in Australia. *Prev. Vet. Med.*, 61(4):235-248.
- Sevilla, I.; Singh S.V.; Garrido J.M.; Aduriz G.; Rodriguez S.; Geijo M.V.; Whittington R.J.; Saunders V.; Whitlock R.H.; Juste R.A. 2005. Molecular typing of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* strains from different hosts and regions. *Rev. Sci. Tech.*, 24:1061-1066.
- Shermann, D.M.; Markham R.J.F.; Bates F. 1984. Agar gel immunodiffusion test for the diagnosis of clinical paratuberculosis in cattle. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 185:179-182.
- SIAP. 2014. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Secretaría de Agricultura Ganadería Desarrollo Rural Pesca y Alimentación (SAGARPA), en línea <http://www.siap.gob.mx/poblacion-ganadera/> y <http://www.siap.gob.mx/ganaderia-resumen-municipal-pecuario/>. Consultado 9 de mayo de 2014.
- Sigurdardóttir, O.G.; Press C.M.; Evenson O. 2001. Uptake of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* through the distal small intestinal mucosa in goats: an ultrastructural study. *Vet. Pathol.*, 38:184-189.

- Singh, S.V.; Singh P.K.; Singh A.V.; Sohal J.S.; Subodh S.; Narayanaswamy K. 2007. Non-chemical method of DNA recovery and characterization of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* using IS900 PCR. *Ind. J. Experimental Biol.* 45:812-816.
- Singh, S.V.; Sohal J.S.; Kumar N.; Gupta S.; Chaubey K.K.; Rawat K.D.; Chakraborty S.; Tiwari R.; Dhama K. 2014. Recent approaches in diagnosis and control of mycobacterial infections with special reference to *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Adv. Anim. Vet. Sci.* 2 (1S): 1 – 12.
- Sivakumar, P.; Tripathi B.N.; Singh N. 2005. Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in intestinal and lymphnode tissues of water buffaloes (*Bubalus bubalis*) by PCR and bacterial culture. *Vet. Microbiol.* 108(3-4):263-70.
- Sockett, D.C.; Conrad T.A.; Thomas C.D.; Collins M.T. 1992. Evaluation of four serological tests for bovine paratuberculosis. *J. Clin. Microbiol.* 30:1134-1139.
- Sohal, J.S.; Singh S.V.; Tyagi P.; Subhodh S.; Singh P.K.; Singh A.V.; Narayanasamy K.; Sheoran N.; Singh-Sandhu K. 2008. Immunology of mycobacterial infections: with special reference to *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Immunobiology*, 213:585-598.
- Sorensen, O.; Rawluk S.; Wu J.; Manninen K.; Ollis; G. 2003. *Mycobacterium paratuberculosis* in dairy herds in Alberta. *Can. Vet. J.* 44, 221-226.
- Souza, C.D.; Evanson O.A.; Weiss D.J. 2008. Role of cell membrane receptors in the suppression of monocyte anti-microbial activity against *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Microb. Pathog.*, 44: 215-223.
- Stabel J.R. 2000. Transitions in immune responses to *Mycobacterium paratuberculosis*. *Vet. Microbiol.*, 77(3-4):465-473.
- Stabel, J.R. 1995. Temporal effects of tumor necrosis factor-alpha on intracellular survival of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 45(3-4):321-32.
- Stabel, J.R. 2006. Host responses to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: a complex arsenal. *Anim. Health Res. Rev.*, 7: 60-70.
- Stabel, J.R.; Whitlock R.H. 2001. An evaluation of a modified interferon-gamma assay for the detection of paratuberculosis in dairy herds. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 79:69-81.
- Stehman, S.M. 1996. Paratuberculosis in small ruminants, deer, and South American camelids. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 12: 441-455.

- Streeter, R.N.; Hoffsis G.F.; Bech-Nielsen S.; Shulaw W.P.; Rings D.M. 1995. Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from colostrum and milk of subclinically infected cows. *Am. J. Vet. Res.* 56:1322- 1324.
- Sung N.; Collins M.T. 1998. Thermal tolerance of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 64(3):999-1005.
- Sweeney, R.W. 1996. Transmission of paratuberculosis. *Vet. Clin. North. Am. Food Anim. Pract.* 12: 305-312.
- Sweeney, R.W.; Whitlock R.H.; Rosenberger A. E. 1992a. *Mycobacterium paratuberculosis* cultured from milk and supramammary lymph nodes of infected asymptomatic cows. *J. Clin. Microbiol.*, 30; 166- 171.
- Sweeney, R.W.; Whitlock R.H.; Rosenberger A.E. 1992b. *Mycobacterium paratuberculosis* isolated from fetuses of infected cows not manifesting signs of the disease. *Am. J. Vet. Res.*, 53; 477-480.
- Taylor, T.K.; Wilks, C.R.; McQueen, D.S. 1981. Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from the milk of cows with Johne's disease. *Vet. Rec.* 109: 532-533.
- Templeton, J.W.; Smith R.; Adams L.G. 1988. Natural disease resistance in domestic animals. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 192: 1306-1315.
- Tessema, M.Z.; Koets A.P.; Rutten V.P.; Gruys E. 2001. How does *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* resist intracellular degradation? *Vet. Q.*, 23:153-162.
- Tharaldsen, J.; Djonne B.; Fredriksen B.; Nyberg O.; Siguroardottir O. 2003. The National Paratuberculosis Program in Norway. *Acta Vet. Scand.* 44, 243-246.
- Thoen C.O.; Muscoplat C.C. 1979. Recent developments in diagnosis of paratuberculosis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 174(8):838-40.
- Thonney, M. L. S. S. and Smith M. C. 2005. Control of Johne's disease in sheep by vaccination Preliminary Report. Cornell University.
- Thorel, M.F.; Krichevsky, M.; Lévy-Frébault, V.V. 1990. Numerical taxonomy of mycobactin-independent 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: 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. *Can. Vet. J.* 47:874-882.

- Tórtora P.J.L. 2004. Brucelosis en ovinos. En: VI Seminario de producción de ovinos en el trópico. Del 7 al 9 de Marzo. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. Villahermosa, Tabasco. Pp 142-149.
- Tórtora, J.L.P. 2008. Enfermedades reemergentes para el rebaño ovino mexicano. *La Revista del Borrego*, v. 10(53), p. 4-12.
- Uematsu, S.; Akira S. 2006. Toll-like receptors and innate immunity. *J. Mol. Med.* 84:712-725.
- Unzueta, R. J. 1936. Contribución al estudio de la enteritis paratuberculosa bovina en México. Tesis de Licenciatura. Fac. de Med. Vet. y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F.
- Valheim, M.; Storset A.K.; Aleksandersen M.; Brun-Hansen H.; Press C.M. 2002. Lesions in subclinical paratuberculosis of goats are associated with persistent gut-associated lymphoid tissue. *J. Comp. Pathol.*, 127: 194-202.
- van Schaik G.; Kalis C.H.; Benedictus G.; Dijkhuizen A.A.; Huirne R.B. 1996. Cost benefit analysis of vaccination against paratuberculosis in dairy cattle. *Vet. Rec.* 139:624-627.
- Vogel O. 1977. Paratuberculosis in a dog. *Berl.Munch.Tierartzl.Wochenschr.* 90(21):419-21.
- Waters W.R.; Miller J.M.; Palmer M.V.; Stabel J.R.; Jones D.E.; Koistinen K.A.; Steadham E.M.; Hamilton M.J.; Davis W.C.; Bannantine J.P. 2003. Early induction of humoral and cellular immune responses during experimental *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection of calves. *Infect.Immun.*, 71(9):5130-8.
- Whan, L; Grant I.R.; Ball H.J.; Scott R.; Rowe M.T. 2001. Bactericidal effect of chlorine on *Mycobacterium paratuberculosis* in drinking water. *Lett. Appl. Microbiol.*, 33: 227-231.
- Whan, L.; Grant I.R.; Rowe M.T. 2006. Interaction between *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and environmental protozoa. *BMC Microbiol.* 6:63.
- Whitlock, R.H.; Buergelt C. 1996. Preclinical and clinical manifestations of paratuberculosis (including pathology). *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 12: 345-356.
- Whitlock, R.H.; Sweeney R.W.; Fyock T.L.; Smith J. 2006. MAP Super-Shedders: Another factor in the control of Johne's disease. En: Manning y Nielsen editores. *Proc.8th Int.Coll.Paratub.* p. 164. IAP, Madison, WI, USA.
- Whittington R.J.; Marsh I.B.; Reddacliff L.A. 2005. Survival of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in dam water and sediment. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:5304-5308.

- Whittington, R.J., Reddacliff, L.A., Marsh, I., McAllister, S., Saunders, V. 2000b. Temporal patterns and quantification of excretion of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in sheep with Johne's disease. *Aust. Vet. J.* 78, 34-37.
- Whittington, R.J.; Hope A.F.; Marshall D.J.; Taragel C.A.; Marsh I. 2000a. Molecular epidemiology of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: IS900 restriction fragment length polymorphism and IS1311 polymorphism analyses of isolates from animals and a human in Australia. *J. Clin. Microbiol.*, 38: 3240-3248.
- Windsor, P.; Eppleston J.; Whittington R.; Jones S.; Britton A. 2002. Efficacy of a killed *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* vaccine for the control of OJD in Australian sheep flocks. En: *Proceedings of the Seventh International Colloquium on Paratuberculosis*. Juste, R.A., Geijo, M.V., Garrido, J.M. Eds. Bilbao, España. 420-423.
- Wu, C.W.; Livesey M.; Scmoller S.K.; Manning E.J., Steinberg H.; Davis W.C.; Hamilton M.J.; Talaat A.M. 2007. Invasion and persistence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* during early stages of Johne's disease in calves. *Infect. Immun.*, 75: 2110-2119.
- Zurbrick, B.G.; Czuprynski C.J. 1987. Ingestion and intracellular growth of *Mycobacterium paratuberculosis* within bovine blood monocytes and monocyte derived macrophages. *Infect. Immun.* 55; 1588-1593.

CAPITULO 1. PREVALENCIA DE LA INFECCIÓN POR *Mycobacterium avium* SUBESPECIE *paratuberculosis* EN REBAÑOS DE OVINOS DE DOS MUNICIPIOS DE SAN LUIS POTOSÍ, MÉXICO*

Prevalence of Infection by *Mycobacterium avium* Subspecie *paratuberculosis* In Flocks of Sheep of Two Regions of San Luis Potosi, Mexico

1.1. Resumen

La paratuberculosis, también conocida como enfermedad de Johne, es causada por el *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* (*Map*). La enfermedad es contagiosa en bovinos, ovinos, cabras y otros rumiantes; en humanos está relacionada con la enfermedad de Crohn. En ovinos se manifiesta con pérdida progresiva de peso, y en estados avanzados, con heces aglutinadas y diarrea. Para el diagnóstico de la enfermedad existen diferentes pruebas: una en heces, de donde se obtiene una secuencia de inserción 900 (IS900) del genoma de *Map*, pudiendo identificar el organismo por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y otra en suero sanguíneo, por medio de la prueba de Inmunodifusión en Gel de Agar (IDGA). Se seleccionaron estas dos técnicas para estimar la prevalencia de *Map*. Se analizaron muestras sanguíneas y fecales de 211 ovinos asintomáticos en 32 rebaños de 10 comunidades de Salinas y Villa de Ramos, San Luis Potosí. La prevalencia de *Map* por rebaño entre comunidades con la prueba de IDGA fluctuó desde 4.35 hasta 33.33 %, con promedio de 9.48 %. La prevalencia con la prueba de PCR-anidada se presentó de 4.26 a 33.33 % y un promedio entre comunidades de 7.58 %. La prueba de IDGA detectó 20 ovinos positivos con anticuerpos de *Map*. La técnica de PCR-anidada detectó 16 ovinos que excretaban *Map*. Al utilizar la prueba de PCR como prueba de

*Investigación publicada en: Revista Científica, FCV-LUZ / Vol. XXIII, Nº 4, 293 - 299,

oro, la prueba de IDGA tuvo una sensibilidad de 81 % y una especificidad de 96 %, con una concordancia kappa de 0.96. Con la presencia de *Map* en los municipios de Salinas y Villa de Ramos de San Luis Potosí, es necesario tomar las medidas pertinentes en su control y erradicación, para evitar la diseminación y pérdidas económicas en las explotaciones pecuarias.

Palabras clave: Paratuberculosis, prevalencia, IS900, IDGA, PCR.

1.2. Abstract

Paratuberculosis, also known as Johne's disease, is caused by *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (*Map*). The disease is contagious in cattle, sheep, goats and other ruminants; in humans it is associated with Crohn's disease. Progressive weight loss is observed in sheep, and in advanced stages, clumped stools and diarrhea. To diagnose this disease there are different tests: one is using the feces, from which an insertion sequence 900 (IS900) *Map* genome is obtained, making possible the organism identification through a Polymerase Chain Reaction (PCR), and a second one in blood serum through the Agar Gel Immunodiffusion test (AGID). These two techniques were selected to estimate the prevalence of *Map*. Fecal and blood samples of 211 asymptomatic sheep were analyzed in 32 flocks from 10 communities in Salinas and Villa of Ramos, San Luis Potosi. The *Map* prevalence per flock between communities with the AGID test ranged from 4.35 to 33.33 %, with a mean of 9.48 %. The prevalence with the nested PCR test came out with a value varying from 4.26 to 33.33 % and a mean of 7.58 % between communities. The AGID test detected 20 positive sheep to *Map* antibodies. The nested PCR detected 16 sheep excreting *Map*. By using the PCR test as the gold standard, the AGID test had a sensitivity of 81 % and a specificity of 96 %, with a kappa agreement value of 0.96. Being *Map* present in the Municipalities of Salinas and Villa de Ramos, San Luis Potosi, it is necessary to take the relevant measures to control and eradicate it, preventing its spread and economic losses in all livestock farms.

Key words: Paratuberculosis, prevalence, IS900, AGID, PCR.

1.3. Introducción

La paratuberculosis (Ptb), también conocida como enfermedad de Johne es causada por el *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* (*Map*). Esta enfermedad causa desordenes infecciosos del tracto intestinal, principalmente en rumiantes domésticos, pero también en rumiantes salvajes e incluso primates (Kennedy y Benedictus, 2001). También se ha asociado con la enfermedad de Crohn, una enfermedad crónica multifactorial inflamatoria del intestino humano (Ghadiali *et al.*, 2004). La manifestación clínica de la paratuberculosis ovinos (*Ovis aries*) se manifiesta a edades más tempranas que en bovinos (*Bos taurus*), siendo la pérdida progresiva de peso la primera manifestación (Dhand *et al.*, 2007). Se ha observado que en 10 a 20% de los casos clínicos de Ptb en ovinos se presentan heces aglutinadas o diarrea (Stehman, 1996). La Ptb es una enfermedad común en muchos países (Stabel, 1998), incluyendo México. Desafortunadamente en México, aún se desconoce la magnitud del problema (Méndez *et al.*, 2009). La base del control de esta enfermedad es la identificación y eliminación de los animales infectados. Sin embargo, el carácter subclínico de la enfermedad y la baja sensibilidad de los métodos de identificación dificultan el diagnóstico (Collins, 1996). La Ptb se puede encontrar en hatos bovinos y ovinos siendo difícil identificar un ovino con infección subclínica, de esta manera, animales asintomáticos infectados pueden estar diseminando el microorganismo mediante heces por varios años (Reddacliff *et al.*, 2004). Para detectar la enfermedad de manera subclínica se pueden hacer pruebas como: las serológicas y el aislamiento del agente (OIE, 2004). En ovinos, la detección mediante los cultivos fecales son efectivos para detectar al menos 12% de los casos subclínicos, la desventaja es que requieren de dos a cuatro meses (mes) para incubar la bacteria (Satoko *et al.*, 2007). Una alternativa a las limitaciones del procedimiento anterior son las pruebas serológicas como son: la prueba de fijación de complemento (FC), la técnica de ensayo inmunoenzimático (ELISA) y la

inmunodifusión en gel de agar (IDGA) (Clarke *et al.*, 2006). En Nueva Zelanda y Australia, la técnica de IDGA en pequeños rumiantes ha demostrado una mayor sensibilidad y especificidad que la prueba de ELISA (Sergeant *et al.*, 2003). Por otra parte, la prueba serológica de IDGA es sencilla y rápida, lo que permite analizar rebaños completos en pocos días (d), con buena sensibilidad entre 70 a 80% y especificidad de hasta 100% (Sweeney, 1996). Actualmente, los avances en biología molecular, como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), ofrecen una alternativa por ser más sensible y específica para la detección de enfermedades infecciosas (Garrido *et al.*, 2000). La secuencia nucleótida de inserción 900 (IS900) contiene múltiples copias (14-18) del genoma de *Map*, lo que facilita la identificación de este microorganismo (Green *et al.*, 1989). Aprovechando esta ventaja, Erume *et al.* (2001), implementaron a partir de la secuencia IS900, la técnica de PCR-anidada, que se caracteriza por utilizar dos pares de iniciadores. El primer iniciador es diseñado de una secuencia de la región IS900, con él se obtiene un producto de amplificación mayor a 500 pares de bases (pb). El segundo iniciador fue diseñado de la secuencia de la región interna del producto amplificado (500pb) del que se obtiene un producto de amplificación más pequeño que el producto original lo que aumenta la sensibilidad y especificidad de la prueba. Las ventajas que tiene este método sobre el cultivo bacteriano es que, los resultados se pueden obtener en tres o cuatro d, eliminando los periodos de incubación. También la secuencia de inserción IS900 es específica para *Map*, lo que elimina los problemas de contaminación de la muestra; además, con la misma técnica se puede diferenciar las bacterias viables y las no viables (Collins, 2003; Toman *et al.*, 2003). La base del control de esta enfermedad es la identificación y eliminación de los animales infectados; sin embargo, el carácter subclínico de la infección y escasos diagnósticos hacen que la enfermedad esté subestimada en México, causando un impacto negativo en la economía de las explotaciones ovinas. Por lo anterior, el objetivo de este estudio fue estimar la prevalencia de la infección por *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (*Map*) con la técnicas IDGA y PCR-anidada, en ovinos de los municipios de Salinas y Villa de Ramos, San Luis Potosí, México.

1.4. Materiales y Métodos

1.4.1. Localización del área de estudio.

Esta investigación se realizó con rebaños ovinos de las comunidades: Lagunillas, La Herradura, El Calvario, Villa de Ramos, Pinillos, El Zacatón y San Pedro del Saltito del municipio Villa de Ramos, localizado geográficamente a los 22°37'N y 101°42'O, a una altitud de 2070 m (INEGI, 1994). Asimismo, las comunidades: Zaragoza, Diego Martín y Salinas de Hidalgo del municipio Salinas, localizado geográficamente a los 22° 50' N y 101° 55' O, a una altitud de 2200 m (INEGI, 1994); ambos municipios del estado de San Luis Potosí. Por la cercanía geográfica, sus características son muy parecidas, el clima predominante es seco templado, su temperatura media anual es de 18.7°C y su precipitación pluvial media anual es de 391 mm. Predomina una vegetación de matorral micrófilo desértico, espinoso, izotal, pastizal, nopalera y cardonal de cuyas asociaciones se tienen especies como: *Larrea tridentata*, *Prosopis laevigata*, *Acacia berlandieri*, *Flourensia cernua*, *Opuntia* spp. *Yucca filiferay* una variedad de pastos como: *Bouteloua gracilis*, *Bouteloua curtipendula*, *Erioneuron pulchellum* y *Distichlis spicata* (Rzedowski, 1978).

1.4.2. Población de estudio

Se muestrearon 211 ovinos mayores de dos años de edad, provenientes de 32 rebaños, localizados en ambos Municipios. Se seleccionaron ocho comunidades para ser incluidas en este estudio de acuerdo a la disposición y cooperación de los productores, dado que algunos productores se mostraron poco cooperantes para proporcionar datos y permitir tomar las muestras necesarias. La raza ovina predominante en el área de estudio fue Rambouillet y sus cruza. Se tomaron muestras sanguíneas del 10% de animales del rebaño ovino en cada predio de cada comunidad, con una edad mayor a dos años, confirmada por fórmula dentaria. Se identificaron los ovinos por

medio de aretes plásticos con número, para poder dar seguimiento a los animales que pudieran resultar positivos. En estos rebaños no se tenían antecedentes de incidencia de la enfermedad y los ovinos no presentaban signos clínicos de infección por *Map*.

1.4.3. Preparación de las muestras.

En cada rebaño se recolectaron muestras de heces y sangre, de un número representativo de animales asintomáticos, hasta reunir un total de 211 muestras de cada tipo. Se muestrearon cinco mL de sangre por animal de la vena yugular y se colocaron en tubos de plástico para suero de 13 x 100 mm x 5,0 mL (BD Vacutainer®, tapón rojo Hemogard™, EUA) adicionados con activador de coagulación y cubierta interior de silicón, que fueron procesados para separar el suero, el cual se almacenó en un congelador (Thermo Scientific, Forma 7000 modelo 7320A, EUA) a -20°C hasta procesarlos mediante la prueba de inmunodifusión en gel de agar (IDGA) (Sergeant *et al.*, 2003). Las muestras fecales se obtuvieron del recto del animal con la ayuda de un guante de plástico, las muestras se conservaron en congelación a -20°C hasta su uso para la extracción de ADN, la cual se llevó a cabo con la técnica descrita por Garrido *et al.* (2000), que brevemente consistió en: tomar dos g de heces, las que se disolvieron durante 15 min en 40 mL de una solución de cloruro de N-cetilpiridinio (HCP) (Sigma Chemical Co., EUA) a 0.76%, después se dejaron en reposo durante 18 h; de esta solución se tomaron 20 mL, los cuales se centrifugaron durante 10 min a 300 x *g*. El sedimento se lavó tres veces con cinco mL de solución amortiguadora de fosfatos (PBS), después se transfirió a microtubos de un mL y se centrifugó por cinco min a 14 000 x *g* (Jaimes *et al.*, 2008). La lisis celular se realizó mediante enfriamiento-calentamiento (Garrido *et al.*, 2000). Para llevar a cabo este proceso, el producto de lisis se centrifugó, el sedimento fue transferido a criotubos y se resuspendió con 500 µL de TE-Tritón100X (Tris 50 mM, EDTA 10 mM, pH 8; tritón 50mM). Los criotubos se colocaron tres veces en un termo criogénico (Taylor-Wharton 3K, EUA) a -80°C durante cinco min para luego retirarlos y colocarlos en un horno (Felisa HR, México) a 100°C por cinco min (Jaimes *et al.*, 2008) de acuerdo con el protocolo, este proceso se llevó

a cabo tres veces. La extracción de ADN se realizó usando la técnica descrita por Jaimes *et al* (2008); que brevemente consistió en lo siguiente, a una muestra fecal de ovino se agregó 450 μ L de isotiocianato de guanidina (Sigma Chemical Co., EUA) 5M y 250 μ L de acetato de amonio (Sigma Chemical Co., EUA) 7.5 M pH 6.3 y se colocó en hielo durante 15 min. Las muestras se transfirieron a microtubos y se les adicionó en dos ocasiones 500 μ L de cloroformo (Sigma Chemical Co., EUA), alcohol isoamílico (24:1), se centrifugó durante cinco min a 14 000 x *g*. Se recuperó la fase acuosa a la que se le agregó 450 μ L de isopropanol (Sigma Chemical Co., EUA) y se incubó en un ultracongelador (Thermo Scientific Forma 7000 modelo 7320A, EUA) a -20°C durante toda la noche. Después, las muestras se centrifugaron durante 15 min a 14 000 x *g*, se realizaron dos lavados con un mL de etanol a 70% y se centrifugó durante cinco min a 14 000 x *g*. El ADN se secó a temperatura ambiente y se resuspendió en 100 μ L de agua miliQ.

1.4.4. Prueba de Inmunodifusión en Gel de Agar (IDGA)

Para la preparación del gel se pesaron 3.75 g de agar noble (Difcolaboratories), los cuales se disolvieron por calentamiento en 50 mL de buffer salino de fosfatos (PBS 1X) para obtener una concentración final de 0.75% de agar; luego se añadió un mL de azida de sodio al 0.2% y posteriormente se adicionaron 15 mL de la solución de agar en una placa de petri para formar el gel. Una vez polimerizado, se realizaron las perforaciones en forma de rosetas. En el pozo del centro se colocó el antígeno 3065 de *Map* (Martínez *et al.*, 2012). En los pozos periféricos se colocaron 30 μ L de sueros problemas. La placa con las muestras se colocó en una cámara húmeda y se incubaron a 37°C por un periodo entre 24 y 48 h. Las placas se inspeccionaron para detectar una banda de precipitación definida. Si la banda se presentaba dentro del periodo de 48 h, la muestra se consideraba como positiva; de lo contrario se consideraba negativa (Sherman *et al.*, 1984).

1.4.5. Procedimiento de la PCR Anidada

Para la PCR anidada se utilizaron los iniciadores (Accesolab, S.A. de C.V., México) diseñados por Erume *et al.* (2001); ptb1 (5' TGA TCT GGA CAA TGA CGG TTACGG A 3') y ptb4 (5'CGC GGC ACG GCT CTT GTT3'), 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 CTGGAG TTA A 3') y ptb3 (5' AGC GTC TTT GGC GTCGGT 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 de acuerdo a procedimiento descrito por Jaimes *et al.* (2008). Para la primera reacción se utilizaron 3 μL (10 ng μL^{-1}) de ADN proveniente de heces de ovinos, 5 μL de amortiguador de PCR (67 mM μL^{-1}), 3 μL MgCl_2 (Sigma Chemical Co., EUA) 2mM (30 mM μL^{-1}), 1 μL dNTP's (Gibco BRL Co., EUA) 200 mM c/u, 1 μL (25 p Mol) de los iniciadores Ptb 1 y Ptb 4 y 0,2 μL (1 U) de ADN polimerasa (Sigma Chemical Co., EUA) termoestable (5 U μL^{-1}) y 35,8 μL de agua miliQ en un volumen final de 50 μL . Las muestras se amplificaron en un termociclador (PCR Sprint1, Termo Electron, Co., EUA) 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, y una extensión final a 72°C por 5 min. Para la segunda amplificación se usaron tres μL de la primera amplificación en 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. Se incluyó como testigo positivo el ADN de una cepa *Map* (K10 19698). Los productos de amplificación fueron visualizados en gel de agarosa al 2 %, teñidos con bromuro de etidio (Sigma Chemical Co., EUA).

1.4.5. Análisis Estadístico

Para determinar el tamaño de la muestra se consideró una prevalencia estimada de para tuberculosis ovina de 4.4 % (Méndez *et al.*, 2009), para poder utilizarla

en un muestreo aleatorio simple, ya que no existen datos en la región, empleando un nivel de confianza de 95.0 % y un porcentaje de error de 5,0 %, en donde según la metodología de Lwanga y Lemeshow (1991), se obtuvo un tamaño de muestra de 73 animales, pero se tuvo la oportunidad de muestrear un mayor número de ovinos (211) para dar más validez al estudio. Para calcular las diferencias de prevalencia entre comunidades, obtenida de cada una de las pruebas de diagnóstico, se utilizó una prueba de t-student (Snedecor y Cochran, 1989). Al utilizar dos métodos diferentes para el diagnóstico de una enfermedad, es necesario conocer el grado de concordancia entre ellos. El grado de concordancia entre ambas pruebas de diagnóstico se expresa con el valor de kappa (κ). Este valor expresa el grado de concordancia más allá del azar (Cohen, 1960).

1.5. Resultados y Discusión

Los ovinos no presentaban signos clínicos de infección con *Map*, asimismo las comunidades no tenían antecedentes de diagnóstico de la enfermedad. Se encontraron 20 muestras de suero sanguíneo ovino con anticuerpos a *Map* por la prueba IDGA. De acuerdo con los iniciadores diseñados por Erume *et al.* (2001), para reconocer secuencias contenidas en las amplificaciones de un producto con 210 pares de bases en la prueba de PCR-anidada, se presentaron bandas amplificadas en 16 de las 211 muestras de heces, lo que corresponde a la IS900 de *Map* (Figura 1) y 13 de las 211 muestras resultaron positivas en ambas pruebas (Cuadro 1). Con la prueba IDGA se obtuvo una prevalencia global de Ptb ovina de 9.48 %, oscilando entre 4.35 y 33.33 % entre las comunidades estudiadas; y con la prueba de PCR-anidada, la prevalencia fue 7.58 %, teniendo una fluctuación entre comunidades de 4.26 y 33.33 %. No se encontró diferencia significativa ($p = 0.262$) para el diagnóstico de *Map* con las pruebas utilizadas. En un estudio realizado en los estados de Querétaro y Guanajuato, México, por Chávez *et al.* (2004) reportaron prevalencias en caprinos (*Capra hircus*) de 8.8 % y en ovinos de 4.4 %. Por otra parte, Vélez-Hernández *et al.* (1999) determinaron seroprevalencias en el Valle de México de 6.39 y 4.89 % en dos rebaños caprinos. En

este estudio, IDGA y PCR, se utilizaron comparativamente con el fin de lograr una evaluación descriptiva del nivel de positividad de Ptb en la población objetivo. De los 20 sueros positivos a Ptb detectados por IDGA, siete muestras fecales fueron negativas a la prueba de PCR, representando el 35 % (7/20) de los animales (Cuadro 2). Como se observa en los resultados, por la prueba de IDGA se obtuvo un número mayor de animales positivos comparada con la prueba de PCR; 20 vs. 16, respectivamente. Este número menor de muestras positivas obtenidas por PCR, se explica porque los bacilos son desechados de manera intermitente en las heces (Sergeant *et al.*, 2003), lo que permite sugerir que si solo se utiliza la prueba de PCR para diagnosticar Ptb, se realicen diferentes muestreos para dar un resultado más certero. Los autores apoyan la hipótesis de que estos ovinos están infectados, a pesar de que el grupo criterio tenía una condición corporal clínicamente sana, pero es probable que en el momento de la toma de muestra los individuos no estuvieran excretando un número de organismos adecuados para ser detectados por la prueba de PCR. Aún y cuando el grupo criterio eran animales mayores de dos años edad, ya que la literatura reporta que en este periodo de edad es en donde existe mayor probabilidad de encontrar anticuerpos circulantes y excreción de microorganismos en heces (Collins, 2003). Con base en los resultados obtenidos, se puede decir que IDGA presentó mayor sensibilidad al compararla con PCR, 81 vs 65 %, respectivamente (Cuadro 2); de igual forma es mayor a las sensibilidades reportadas por Gumber *et al.* (2006) de 8.3 % y por Hope *et al.* (2000) de 56.0 %. La sensibilidad de la prueba IDGA está relacionada con el tipo de antígeno utilizado. En este estudio el antígeno utilizado fue el 3065 (Martínez *et al.*, 2012), por lo que pueden diferir los resultados de otros reportes de IDGA. La prueba de IDGA tiene capacidad de detectar un número mayor de animales infectados, lo cual ofrece ventaja al utilizarla como prueba de diagnóstico para esta enfermedad. Las pruebas de IDGA y PCR coincidieron en 56.5 % (13/23) del total de animales positivos, y la amplificación del elemento de inserción IS900 específico para *Map* en heces está asociada con la titulación de los sueros reactivos detectados por IDGA en 6. 2% (13/211) del total de ovinos muestreados. Esto indica que los ovinos, además de presentar anticuerpos detectables por IDGA, también eliminaban el bacilo por heces,

como lo reporta Gwozdz *et al.* (1997). Los resultados del análisis revelaron que la prueba tuvo una sensibilidad de 81 % y una especificidad de 96 % (Cuadro 2). Con respecto al 18.75 % (3/16) de los ovinos que resultaron negativos a IDGA, pero positivos a PCR, se considera que pudo deberse a la falta de anticuerpos detectables, pues esta prueba necesita gran cantidad de anticuerpos para expresar la precipitación en el gel. Esto sucede en las etapas tempranas de la infección y pueden pasar varios meses o años, antes de que el nivel de anticuerpos circulantes sea suficiente para desencadenar una reacción positiva, permaneciendo la respuesta humoral bajo el límite de detección de las pruebas serológicas actualmente disponibles (Toman *et al.*, 2003). Por lo tanto, los factores que afectan la capacidad de detección de la infección como: niveles bajos o nulos de anticuerpos en sangre y excreción intermitente de la bacteria en heces (Stabel, 1998), así como la posibilidad de una transmisión vertical de madre a feto vía intrauterina y a través del calostro en los corderos (Toman *et al.*, 2003), es probable que los niveles de infección encontrada en los rebaños examinados sea mayor a la reportada en esta investigación. Si bien los resultados expuestos en este estudio muestran que no existe diferencia entre los métodos de diagnóstico usados, se sugiere el método de Inmunodifusión en Gel de Agar (IDGA) por ser una técnica que no requiere equipos costosos de laboratorio para su uso. Cualquier método de diagnóstico elegido será válido para iniciar el diagnóstico de la Ptb y tomar las medidas para su control, como separar y eliminar animales positivos, con el fin de disminuir la diseminación de la enfermedad en el rebaño, aun y cuando existe poca información epidemiológica que implica la enfermedad; sin embargo, se conoce que un animal que conviva con el menor número de patógenos va a tener mayor producción.

1.6. Conclusiones

Este estudio es el primer reporte de la infección por *Map* en el estado de San Luis Potosí, México. Con base en los resultados obtenidos en el estudio se reporta una prevalencia de la infección por *Map* en los municipios de Villa de Ramos y Salinas

del estado de San Luis Potosí de 9.48% y de 7.58% con las técnicas IDGA y PCR, respectivamente. Por medio de la prueba IDGA, se obtuvo una mayor sensibilidad al compararla con la prueba de PCR, aunque los resultados muestran que no existe una diferencia significativa entre los métodos de diagnóstico utilizados.

1.7. Agradecimiento

Esta investigación fue financiada con el proyecto LEADER. Los autores agradecen al laboratorio del Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Microbiología Animal (CENID-INIFAP), Palo Alto, Estado de México, por el apoyo en la realización de los análisis de las muestras.

Cuadro 1. Resultados de la prevalencia de *Map* por las técnicas inmunodifusión en agar gel (IDAG) y reacción en cadena de polimerasa – anidada (PCR-anidada) en rebaños de los municipios de Salinas y Villa de Ramos, San Luis Potosí.

COMUNIDAD	TOTAL DE OVI- NOS	POSITIVO CON IDAG	PREV. %	POSITIVO CON PCR	PREV. %
Cerro Pinillos	10	0	0.00	0	0.00
Salinas	3	1	33.33	0	0.00
Diego Martin	7	1	14.29	1	14.29
El Calvario	3	1	33.33	1	33.33
El Zacatón	54	8	14.81	6	11.11
La Herradura	47	3	6.38	2	4.26
Lagunillas	23	1	4.35	0	0.00
Sn Pedro del Saltito	29	0	0.00	0	0.00
Villa de Ramos	28	3	10.71	4	14.29
Zaragoza	7	2	28.57	2	28.57
TOTAL	211	20	9.48	16	7.58

Cuadro 2. Análisis de sensibilidad, especificidad y concordancia de la comparación Inmunodifusión en agar gel (IDAG) empleando PCR-anidada como prueba definitiva.

IDAG	PCR (IS900)		Total
	+	-	
+	13 _a	7 _b	20 _(a+b)
-	3 _c	188 _d	191 _(c+d)
Total	16 _(a+c)	195 _(b+d)	211 _n

Sensibilidad : $a / (a + c) \times 100 = 81\%$

Especificidad: $d / (b + d) \times 100 = 96\%$

Concordancia: *Kappa* = 0.96

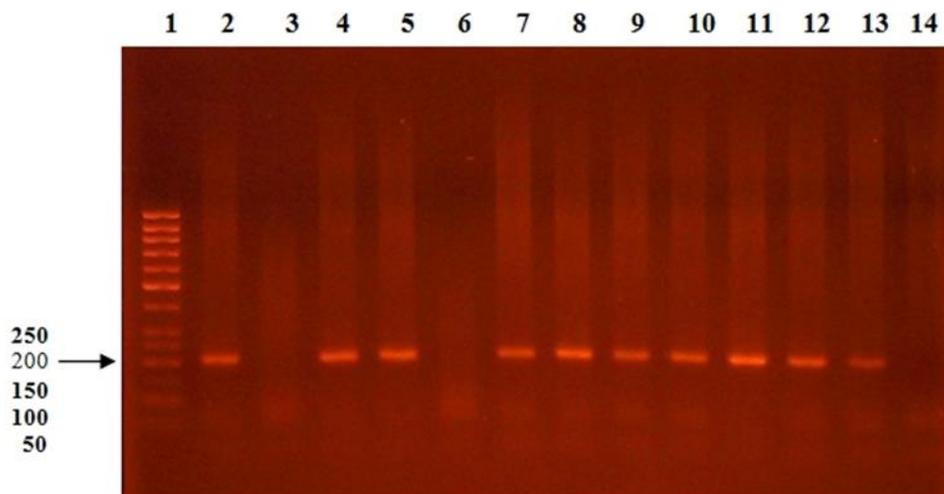


Figura 1. Amplificación del ADN genómico de heces de ovinos por PCR anidada. Amplificación de un producto de 210 pb de la IS900 de *Map*. Carril 1: marcador de tamaño molecular de 50 pb; carril 2: control positivo K10 *Map*; carriles 3 y 6 muestras que no amplificaron; carriles 4, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12 y 13 muestras amplificadas; carril 14: control negativo.

1.8. Literatura Citada

- Clarke, C.J.; Patterson, I.A.; Armstrong, K.E.; Low, C. 1996. Comparison of the absorbed ELISA and agar gel immunodiffusion test with clinic pathological findings in ovine clinical paratuberculosis. *Vet. Rec.*139:618-621.
- Chávez G.G.; Trigo, F.J.; Svastova, T.P.; Pavlik, I. 2004. Identificación del polimorfismo genético de aislamientos de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* de caprinos del Centro de México. *Vet. Méx.* 35 (1):75-82.
- Cohen, J. A 1960. Coefficient of agreement for nominal scales. *Educ. Psychol. Meas.* XX (1): 37-46.
- Collins, M.T. 1996. Diagnosis of paratuberculosis. *Vet. Clin. N. Am-Small (Veterinary Clinics of North America-Small Animal Practice)* 12: 357-371.
- Collins, M.T. 2003. Update on paratuberculosis: 2. Pathology and diagnosis. *Irish Vet. J.* 56 (12): 619-623.
- Erume, J.; Spergser, J.; Rosengarten, R. 200. Rapid detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* from cattle and zoo animals by nested PCR. *Afr. Health Sci.*1:83-89.
- 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.
- Ghadiali, A.H.; Strother, M.; Naser, A.S.; Manning, E.J.; Sreevatsan, S. 2004. *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* strains isolated from Crohn's disease patients and animal species exhibit similar polymorphic locus patterns. *J. Clin. Microbiol.* 42: 5345- 5348.
- 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. *Vet. Microbiol.* 115(1-3):91-101.
- Gwozdz, J.M.; Reichel, M.P.; Murray, A.; Manketelow, W.; West, D.M.; Thompson, K.G. 1997. Detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in

- ovine tissues and blood by polymerase chain reaction. *Vet. Microbiol.* 51: 233-244.
- Hope, A.F.; Kluver, P.F.; Jones, S.L.; Condrón, R.J. 2000. Sensitivity and specificity of two serological tests for the detection of ovine paratuberculosis. *Aust. Vet. J.* 78(12):850-856.
- INEGI (Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática). 1994. Coordenadas geográficas. Anuario Estadístico del Estado de San Luis Potosí. Ed. INEGI, México. 106 pp.
- Jaimes G.N.; Santillán, M.A.; Hernández, O.A.; Córdova, D.; Guzmán, C.C.; Arellano, B.; Díaz, E.; Tenorio, V.R.; Cuéllar, A. 2008. Detección de *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* por medio de PCR-anidada a partir de muestras de heces de ovinos. *Vet. Méx.* 39 (4): 377-386.
- Kennedy, D.J.; Benedictus, G. 2001. Control of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in agricultural species. *Rev. Sci. Tech. OIE.* 20: 151-179.
- Lwanga, S.K.; Lemeshow, S. 1991. Estimating a population proportion with specified absolute precision. In: *Sample Size Determination in Health Studies. A Practical Manual.* WHO Geneva, Switzerland. 80 pp.
- Martínez A.G.; Santillán, M.A.; Guzmán, C.C.; Favila, L.C.; Córdova, D.L.; Díaz, E.A.; Hernández, L.A.; Blanco, M.Á. 2012. Desarrollo de un inmuno-ensayo enzimático (ELISA) para el diagnóstico de paratuberculosis en bovinos. *Rev. Mex. Cien. Pec.* 3(1):1-18.
- Méndez G.M.; Perea, A.R.; Enríquez, V.A.; García, C.L. 2009. Análisis descriptivo de casos recibidos para diagnóstico de paratuberculosis ovina y caprina en el laboratorio de patología animal de Calamanda, México. VI Congreso Latinoamericano de la Asociación de Especialistas en Pequeños Rumiantes y Camélidos Sudamericanos (ALEPR y CS). Sanidad. Ciudad de Querétaro 7 al 11 de Septiembre, México. 24 pp.
- Dhand, N. K., J. Eppleston, R. J. Whittington, J-A. L. M. L. Toribio. 2007. Risk factors for ovine Johne's disease in infected sheep flocks in Aust. *Prev Vet Med.* 82:51-71.
- OIE (Office International des Epizooties), Organización Mundial de Salud Animal. 2004. Paratuberculosis (Enfermedad de Johne) In: *Manual de la OIE Sobre Animales Terrestres.* Cap. 2.2.6. Pp 377- 390.
- Reddacliff, L.A.; McClure, S.J.; Whittington, R.J. 2004. Immunoperoxidase studies of cell mediated immune effectors cell populations in early *Mycobacterium avium*

- subsp. *paratuberculosis* infection in sheep. *Vet. Immunol. Immunop.* 97:149-162.
- Rzedowski J. 1978. Tipos de vegetación. En: *La Vegetación de México*. Ed. Limusa, México, Pp 151-158.
- Satoko, K.; Deborah, L.T.; Yasuyuki, M.; Whittington, R.J. 2007. Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in ovine faeces by direct quantitative PCR has similar or greater sensitivity compared to radiometric culture. *Vet. Microbiol.* 125:36-48.
- Sergeant, E.S.G.; Marshall, D.J.; Eamensc, G.J.; Kearns, C.; Whittington, R.J. 2003. Evaluation of an absorbed ELISA and agar-gel immuno-diffusion test for ovine paratuberculosis in sheep in Australia. *Prev. Vet. Med.* 61: 235-248.
- Sergeant, E.S.; Whittington, R.J.; More, S.J. 2003. Sensitivity and specificity of pooled faecal culture and serology as flock-screening tests for detection of ovine paratuberculosis in Australia. *Prev. Vet. Med.* 52: 199- 211.
- Sherman, D.M.; Markham, R.J.F.; Bates, F. 1984. Agar gel immunodiffusion test for diagnosis of clinical paratuberculosis in cattle. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 185: 179-182.
- Snedecor, G.; Cochran, W. 1989. Student's *t* distribution. In: *Statistical Methods*. thEd. Iowa State University Press, Pp 53-58.
- Stabel, J.R. 1998. Johne's disease: A hidden threat. *J. Dairy Sci.* 81: 283-288.
- Stehman, S.M. 1996. Paratuberculosis in small ruminants, deer, and South American Camelides. *Vet. Clin. N. Am-Food A.* 12:441-455.
- Sweeney, R.W. 1996. Transmission of paratuberculosis. *Vet. Clin. N. Am-Food A.* 12: 305-312.
- Toman, M.; Faldyna, M.; Pavlik, I. 2003. Immunological characteristics of cattle with *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis infection. *Vet. Med-Czech.* 48 (6): 147-154.
- Vélez-Hernández, M.; Domínguez-Punaro, M.; Chávez-Gris, G.; Suárez-Güemes, F. Control of paratuberculosis in two goat flocks. 1999. Proceedings of the 6th International Colloquium on Paratuberculosis. Melbourne, Australia. On line: <http://www.paratuberculosis.org/pubs/proc6/section2.htm>.18.02.99 299

CAPITULO 2. PRÁCTICAS DE MANEJO ASOCIADAS CON LA SEROPREVALENCIA DE PARATUBERCULOSIS EN REBAÑOS DE OVINOS EN DOS MUNICIPIOS DE SAN LUIS POTOSÍ, MÉXICO**

Management Practices Associated with Seroprevalence Paratuberculosis Herd Sheep in two municipality of San Luis Potosí, Mexico

2.1. Resumen

El objetivo fue identificar prácticas de manejo de rebaño asociadas con la seroprevalencia de paratuberculosis (Ptb) en ovinos. Se diagnosticaron 242 muestras sanguíneas de ovejas usando la prueba de inmunodifusión en gel de agar (IDAG). La información de los rebaños a través de una encuesta fue agrupada en: variables del Predio, variables del Rebaño, variables de Manejo y variables de Origen y Destino de los ovinos. Se usó una regresión logística (RL) para analizar los datos. El nivel de seroprevalencia fue de 9.99%. Se encontró que la edad es un factor de riesgo para diagnosticar ovinos enfermos (OR = 3.57). La raza Rambouillet presentó mayor riesgo para contraer la enfermedad (OR = 1.11). Al no llevar prácticas de manejo sanitario resultó un factor de riesgo para la enfermedad (OR = 9.49). La compra de animales fuera de la localidad, también puede ser un factor de riesgo (OR = 4.51 y 5.86). Los resultados sugieren que existe más riesgo de paratuberculosis, por el contagio fecal-oral propio de esta enfermedad, en cuanto más grande sea el total de animales y más intensivo sea el manejo en el predio. Serán necesarios más estudios para aclarar los factores del huésped que están asociados con la resistencia a la infección, ya que lo encontrado en este estudio fue que existe un factor racial para animales seropositivos. Se confirmó que la prevalencia de Ptb en ovinos, es mayor en rebaños que adquieren sus ovinos fuera de su localidad, sin tomar en cuenta las condiciones de salud.

Palabras clave: Diagnóstico, paratuberculosis, Regresión Logística, IDAG.

****Investigación aceptada para publicación en: AGROciencia Año 8, Vol.8 Núm.4, Jul- Ago-2015.**

2.2. Abstract

The objective was identify flock management practices associated with seroprevalence of paratuberculosis (PTB) in sheep. Two hundred and forty two sheep blood samples were diagnosed using the test agar gel immunodiffusion (AGID). Information flock using a survey was grouped into Farm variables, Flock Management variables, Origin and Destination of sheep variables. To analyze the data, a logistic regression (LR) was used. The level of seroprevalence was 9.99 %. It was found that age is a risk factor for diagnosing sick sheep (OR = 3.57). The Rambouillet breed had a higher risk of contracting the disease (OR = 1.11). By not carrying health management practices proved to be a risk factor for the disease (OR = 9.49). The purchase of animals outside the locality, may also be a risk factor (OR = 4.51 and 5.86). The results suggest that there is more risk of paratuberculosis by fecal-oral transmission due to the nature of the disease, in the larger total animals and more intensive management on the farm. Further studies will be needed to clarify host factors that are associated with resistance to infection, since it was found in this study that there is a racial factor for seropositive animals. It was confirmed that the prevalence of Ptb in sheep is higher in flocks that purchase their sheep outside your locality, regardless of health conditions.

Key words: Paratuberculosis, diagnosis, Logistic Regression, AGID.

2.3. Introducción

La paratuberculosis, es una enfermedad contagiosa en bovinos, ovinos, cabras y otros rumiantes (Kennedy y Benedictus, 2001). La enfermedad se manifiesta como una enteritis crónica que conduce a la reducción de la producción, pérdida de peso y finalmente la muerte (Harris y Barletta, 1996). La enteritis crónica provoca mala absorción de nutrientes esenciales en el tracto intestinal y conforme se vaya desarrollando la fase clínica de la enfermedad, se hará más notoria la pérdida progresiva de la condición corporal, ocasionada principalmente por el estado de hipoproteïnemia en que

se encuentra el animal infectado con *Map* (Clarke y Little, 1996). La manifestación clínica de Ptb en ovinos se observa a edades más tempranas que en bovinos, siendo la pérdida progresiva de peso la primera manifestación (Dhand *et al.*, 2007). La fuente primaria de infección son los animales adultos infectados. A diferencia del ganado bovino, los ovinos y las cabras normalmente no muestran signos de diarrea y debido al gradual enflaquecimiento, la enfermedad se pasa por alto en la mayoría de los casos (Khodakaram y Rashidi, 2000). Las mortalidades y las subsecuentes pérdidas económicas de ovinos con enfermedad de Johne varían considerablemente entre los rebaños infectados, incluso entre lotes con características aparentemente similares. Alguna variación inter-rebaño podría estar relacionada con diferencias en la etapa de la epidemia de la enfermedad; sin embargo, parece que hay otros factores de riesgo que son capaces de afectar la prevalencia de Ptb en el rebaño o explotación (Bush *et al.*, 2006). Existe poca información en el área de estudio de esta investigación acerca de los factores de riesgo que afectan a los ovinos con enfermedad de Johne. Las investigaciones actuales se han enfocado en la vida silvestre como una fuente potencial de infección, dado que el agente causal se ha aislado en conejos, zorros, roedores y cérvidos, lo que sugiere que la vida silvestre puede estar involucrada en la perpetuación del ciclo de la enfermedad (Daniels *et al.*, 2003). Sin embargo, dos estudios identificaron a las prácticas relacionadas con el manejo intensivo, el tamaño del rebaño, la introducción de razas de ovinos de otros países, en donde la enfermedad es endémica y la alta tasa de reemplazo, son factores de riesgo para la Ptb (Mainar-Jaime y Vazquez-Boland, 1998). Una encuesta por correo aplicada a productores con rebaños afectados por *Map* en Australia, informó de las asociaciones con factores como: el tiempo de infección en el rebaño, altitud, la raza, la práctica de sacrificio, la proporción de calidad de los pastos y la textura del suelo (Lugton, 2004). Una investigación de factores de riesgo con la tasa de mortalidad de Ptb en 12 granjas infectadas en el sur de Nueva Zelanda del Oeste, encontraron asociaciones con el tamaño del rebaño, la proporción de pasturas mejoradas, la carga animal y la edad del cordero del destete (Toribio *et al.*, 2005). Una prueba de campo, que se llevó a cabo en el sur de Nueva Zelanda del Oeste, identificó altos niveles de contaminación de pastos y la exposición

de ovinos jóvenes, como los principales factores responsables de la presencia de daños histológicos, lesiones o la aparición de la mortalidad por Ptb (Whittington y McGregor, 2005). Los factores ambientales en los cuales se establece un rebaño son muy importantes para tener un manejo adecuado de la raza y especie a producir (Dhand *et al.*, 2007). En los sistemas de manejo extensivo, las ovejas paren y crían a sus ovejas en los pastos. Práctica que no es factible para separar a los corderos recién nacidos de las ovejas y criarlos artificialmente, como se hace con el ganado lechero. Tampoco es posible eliminar a las ovejas y corderos de las pasturas, y darles de comer una ración preparada. Por estrategia comercial, madres y crías deberán estar juntas en los pastos hasta que se puedan ser destetados (Abbot *et al.*, 2004). Se considera que hay una mayor prevalencia de la enfermedad en el ganado ovino cuyas madres tenían una condición corporal muy baja, que son indicadores de la mala nutrición y estrés. Por otra parte, una condición corporal baja aumenta la posibilidad y transmisión de la infección a la descendencia por ambas rutas, horizontal y vertical. Una prueba más del impacto de la nutrición inadecuada y el estrés que se enfrentan las crías en las primeras 12 semanas de vida, en las cuales son más susceptibles a la enfermedad (Dhand *et al.*, 2004). La gravedad de la infección o el grado de difusión dentro de un rebaño depende de las condiciones de manejo, el número de animales infectados y la duración de la infección en el grupo. Debido al largo periodo de incubación, muchos animales en el grupo pueden estar expuestos o infectados subclínicamente por el tiempo que cada caso clínico se hace evidente. Esto ha sido referido como efecto iceberg en el rebaño. Para cada caso clínico, hasta 15 a 25 animales pueden ser asintomáticos en la granja (Stehman, 1996). Una alta carga animal conduce a una mayor contaminación de las pasturas con *Map*, debido a un mayor número de animales por unidad, incrementando el esparcimiento de *Map* como resultado del estrés nutricional. En consecuencia, los corderos conocidos por ser altamente susceptibles a la infección están expuestos a dosis más altas de *Map*, que se traduce a una mayor prevalencia de la enfermedad entre ellos a través del tiempo (Stehman, 1996). Comprender las vías de transmisión de la enfermedad será crucial para el control de la Paratuberculosis. Por lo anterior, el objetivo del presente estudio fue identificar algunas prácticas de manejo

asociadas con la seroprevalencia de Ptb, por medio del análisis de regresión logística, en ovejas infectadas naturalmente de rebaños en dos municipios de San Luis Potosí, México.

2.4. Materiales y Métodos

2.4.1. Localización del área de estudio

Se utilizaron rebaños de ovinos de dos municipios del Altiplano Potosino; Villa de Ramos: 22° 37' N y 101° 42' O a 2070 m de altura, y Salinas: 22° 50' N y 101° 55' O, a 2200 m de altitud (INEGI, 1994). Presentan una temperatura media anual de 18.7°C y una precipitación pluvial media anual de 391 mm, predomina una vegetación de matorral micrófilo desértico, espinoso, izotal, pastizal, nopalera y cardonal (Medina *et al.*, 2005).

2.4.2. Diseño del Estudio

Los datos sobre prácticas de manejo fueron colectados a partir de una encuesta realizada a los productores, directamente en la propiedad. La población de estudio se basó de acuerdo al censo ganadero del estado de San Luis Potosí. Para determinar el tamaño de la muestra se consideró una prevalencia estimada de paratuberculosis ovina de 15% (Santillan *et al.*, 2007) y se utilizó en un muestreo aleatorio simple, ya que no existen datos en la región, empleando un nivel de confianza de 95.0% y un porcentaje de error de 5.0%, en donde según la metodología de Lwanga y Lemeshow (1991), obtenemos un tamaño de muestra de 196 ovinos para encontrar al menos un caso. En estos rebaños no se tenían antecedentes de incidencia de la enfermedad, y los ovinos no presentaban signos clínicos de infección por *Map*. La selección de las explotaciones se hizo de forma aleatoria y de acuerdo a la disposición y cooperación de los productores, para facilitar datos y la toma de las muestras sanguíneas. Se tomaron muestras de sangre de acuerdo al tamaño del rebaño seleccionado.

2.4.3. Procedimiento Serológico

Se tomaron 242 muestras sanguíneas de hembras adultas en etapa productiva, mayores de dos años de edad. El diagnóstico serológico se hizo por la prueba de inmunodifusión en gel de agar (IDGA). Las muestras de sangre, 5 mL por animal, se obtuvieron de la vena yugular en tubos de ensayo para venopunción, a las cuales se les separó el suero y se congeló a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta procesar los sueros. Los sueros se procesaron por duplicado mediante la prueba de IDGA. Para la preparación del gel, se pesaron 0.5 g de agar noble (Difco laboratories), los cuales se disolvieron por calentamiento en 50 mL de buffer salino de fosfatos (PBS 1X) para obtener una concentración final de 0.75 % de agar. Una vez disuelta, se añadió 1 mL de azida de sodio al 0.2 % y posteriormente, se colocaron 15 mL del agar en una caja de petri para formar el gel. Una vez polimerizado, se realizaron las perforaciones para formar las rosetas. En el pozo del centro se colocó el antígeno protoplasmático de la cepa de *Map* 3065 (18) y en los pozos periféricos, los sueros problema en cantidades iguales (30 μL). La caja se mantuvo en una cámara húmeda y se incubaron a 37°C entre 4 y 48 horas para realizar la lectura. Se utilizó un suero control positivo comercial (Allied Monitor Inc., Estados Unidos de América). Si se presentaba una línea de precipitación bien definida entre el pozo del antígeno y suero, se consideraba como resultado positivo, mientras que en la ausencia de dicha banda se daba un resultado negativo (Matínez *et al*, 2012).

2.4.4. Análisis Estadístico

Se realizó un análisis univariado con la prueba de Chi-cuadrada y las variables con un valor $p \leq 0.15$ se sometieron a un análisis multivariado mediante regresión logística (RL) para conocer la asociación de algunas prácticas de manejo y la seroprevalencia de Ptb, con el programa computacional SPSS versión 15.0 para Windows (SPSS Inc, Chicago IL, USA). Si los animales fueron considerados positivos o negativos a Ptb por medio de la prueba de IDGA fue la variable respuesta. La información

colectada fue clasificada en cuatro secciones como variables predictoras: 1) Variables concernientes al predio como: a) localidades; La Herradura, Villa de Ramos y Salinas, las dos primeras del municipio de Villa de Ramos y Salinas del municipio de Salinas, cada localidad con rebaños seleccionados al azar; b) superficie (la que ocupa el ganado, expresado en Ha); c) tamaño del rebaño (total de ovinos en el predio), d) manejo alimenticio (si el ganado es alimentado en pastoreo o en estabulación); 2) Variables concernientes al rebaño, tales como: a) edad (expresado en años), b) raza (criolla, cruce con Rambouillet y Rambouillet) y 3) Variables relacionadas con el manejo del rebaño, tales como: a) tipo de alimentación (agostadero, alimento balanceado o esquilmos), b) sanidad, c) reproducción y d) manejo general. Finalmente, 4) Variables relacionadas con el origen y destino, como lugar de: a) venta y b) compra del ganado ovino.

2.5. Resultados y Discusión

De los 242 sueros de ovejas muestreadas, 21 fueron positivos a la prueba IDGA, resultando una prevalencia real de 9.99 %, tomando en cuenta una sensibilidad de 85.71 % y especificidad de 72.6 % (Sherman *et al.*, 1984). En el tamaño de los rebaños encuestados, predominaban las explotaciones entre 61-150 cabezas (48.35 %; 117/242), en los otros grupos eran menores a 60 cabezas (28.51 %; 69/242) y mayores a 150 cabezas (23.14 %; 56/242). Se componían mayoritariamente por razas cruzadas obtenidas a partir de la raza Rambouillet (74.8 %; 181/242). Más de la mitad de los rebaños (64.9 %; 157/242) fueron catalogados como rústicos, sin registros ni control sanitario o reproductivo. Los corrales, en donde alojaban o guardaban el rebaño en la noche, estaban contruidos con madera y alambre de púas. La mayoría de las explotaciones de ovinos eran de tipo extensivo (80.1 %; 196/242); es decir, los ovinos pasaban una gran parte del día en pastoreo, realizado en terrenos comunales, con superficies entre 0 y 200 ha (59.5 %; 144/242). La reproducción era inspeccionada alguna vez (cubriciones controladas, sincronización de celos) en el 68.6 % de los rebaños (166/242). Para el manejo sanitario, los servicios veterinarios mostraron una

baja asistencia (10.0 %) y solamente tres propietarios dijeron ocupar los servicios para vacunaciones oficiales (brucelosis), los entrevistados dijeron pagar servicios veterinarios (Cuadro 3).

Los análisis de seroprevalencia son una buena herramienta en epidemiología para estimar las tasas de infección o contacto con un determinado agente en las poblaciones (Tyler *et al.*, 1989). Son pocos los resultados de prevalencia de *Map* que han sido reportados en México, prevalencias de 4.4 % en ganado ovino, reportado en un estudio de casos recibidos para diagnóstico serológico en el laboratorio de patología animal de Calamanda, Querétaro (Méndez *et al.*, 2009), de 8.8 % en ovinos del estado de Guanajuato (Chávez, 2009), y por otra parte, Santillán *et al.* (2007), reportaron una seroprevalencia de 15.0 % en Silao, municipio de Guanajuato. La prevalencia del 9.99 % encontrada en este estudio, es considerada alta en los municipios en estudio, de acuerdo a los autores previamente mencionados. Es conveniente indicar que el impacto de la enfermedad no se refleja económicamente, pues cuando los productores tienen problemas con los ovinos infectados (emaciación), y al no responder a tratamientos de desparasitaciones y vitamínicos que usan, prefieren enviarlos al rastro o matadero; razón por la cual los productores no reportan bajas por muerte.

2.5.1. Variables del Predio

En el análisis univariado se encontró asociación significativa ($p < 0.15$) entre los rebaños con al menos un ovino seropositivo a la prueba IDGA con las doce variables, todas fueron incluidas en el modelo de regresión logística. En el análisis final de regresión logística se encontró que no hubo diferencias significativas entre las variables: “Localidad”, “Superficie”, “Pastoreo”, “Alimentación”, “Reproducción”, “Manejo general” y “Venta”.

Las muestras de este estudio fueron estratificadas por localidades a causa de presentar diferencias en el tipo de manejo que se da en cada zona, ya que se encontraban a distancias relativamente grandes (20 km), aunque las condiciones ambientales (orográficas, suelo y vegetación) eran semejantes en las tres localidades; sin embargo, no hubo asociación significativa entre localidades y la presencia de ovinos seropositivos. En caso particular de la brucelosis, Reviriego *et al.* (2000), mencionan que de las condiciones ambientales, los tipos de suelos tienen un papel importante en la epidemiología de dicha enfermedad. Los rebaños fueron agrupados de acuerdo a la superficie en donde alojaban el ganado la mayor parte del tiempo, y de igual forma al total de animales que conformaba el rebaño, con la finalidad de determinar la densidad animal, el hacinamiento o el contacto con otros ovinos que pudieran ser factores para la transmisión de *Map*, encontrando que ninguna de las tres categorías de superficie fue un factor de riesgo para contraer la enfermedad, pero si en el total de animales del predio, en donde existió menor riesgo de contraer la enfermedad fue en los rebaños > 61 ovinos. Esto concuerda con lo reportado por Coelho *et al.* (2010), que en rebaños con 31 a 60 ovinos, tienen un alto riesgo de presentar la enfermedad, comparado con aquellos rebaños con mayor o menor número de ovinos; infiriendo que en los rebaños pequeños, el contacto entre animales es mayor que en rebaños más grandes. Situación similar ocurre en aquellas explotaciones que son manejadas en patios o en la misma casa, teniendo mayor contacto con las excretas (Muskens *et al.*, 2003). En rebaños mayores, Mainar-Jaime y Velázquez-Boland (1998) reportan mayor cantidad de seropositivos en rebaños mayores de 200 ovinos, lo que fue asociado con prácticas de manejo deficiente y mayor contacto con otros ovinos. Por otra parte, se ha mencionado que la tasa alta de población en sistemas extensivos, tiene efectos perjudiciales que conducen a la mala la condición corporal de las ovejas de parto o de su progenie debido a la competencia por el alimento, y en animales estresados e infectados pueden empezar a eliminar micobacterias; así mismo, las ovejas en movimiento a lo largo de las carreteras, también frecuentados por las ovejas de los rebaños vecinos, aumenta la probabilidad de contagio (Dhand *et al.*, 2007).

2.5.2. Variables de Rebaño

Se encontró que la edad es un factor de riesgo para diagnosticar ovinos enfermos, pues resultó un OR = 3.57 con los ovinos de entre cuatro y seis años de edad. La raza Rambouillet presentó mayor riesgo de contraer la enfermedad (OR = 1.11) que los ovinos cruza con esta raza y los ovinos criollos de este estudio.

La edad apareció como un factor de riesgo en los ovinos de entre 4 y 6 años de edad, comparado con los grupos de menor y mayor edad, condición presentada por la naturaleza de la enfermedad y la técnica de diagnóstico elegida (IDGA), ya que los animales más susceptibles de contraer la infección son los jóvenes, especialmente antes de los seis meses de edad, pero las manifestaciones clínicas aparecen a la edad de dos a cinco años (Harris y Barletta, 2001). Al igual, tener presente que un resultado negativo no prueba que el animal está libre de la infección, ya que puede ser reflejo únicamente de que las muestras analizadas no contienen anticuerpos (Manning y Collins, 2001), y debido a que la sensibilidad de esta técnica serológica es mayor en animales con lesiones lepromatosas (Clarke y Little, 1996), con un nivel elevado de excreción de *Map* en heces o animales que se encuentran en las fases más tardías de la enfermedad con signos clínicos (Sweeney, 1996), siendo incapaces de identificar animales en fases tempranas de la infección.

En cuanto a los resultados de las razas y sus cruza, se encontró mayor número de animales seropositivos en los ovinos de la raza Rambouillet, en comparación con los criollos o cruza; esto podría estar relacionado, aunque no fue posible medirlo, con la susceptibilidad-resistencia de la infección entre razas (Koets *et al.*, 2000). La diferencia encontrada con respecto a los ovinos criollos podría deberse a la adaptación, o bien que los ovinos de raza pura están infectados y al ser introducidos al rebaño, se disemina la enfermedad. Por otra parte, también se observó que las razas puras son adquiridas para mejora genética y tienen un manejo intensivo en el área de estudio. Por ejemplo en el bovino, se ha manifestado que las mejores ejemplares parecen ser

más propensos a desarrollar la Ptb y resultar positivos a la prueba de IDGA (Merkal *et al.*, 1995).

2.5.3. Variables de Manejo

Al no llevar prácticas de manejo sanitario resultó un factor de riesgo para la enfermedad (OR = 9.49). La compra de animales fuera del municipio o aun en otro estado, también puede ser un factor de riesgo (OR = 4.51 y 5.86, respectivamente). Rebaños de entre 61 y 150 cabezas tuvieron mayor riesgo de ser seropositivos (Cuadro 4).

Las prácticas de manejo como alimentación no fueron representativas para ser un factor de riesgo, ya que de acuerdo a esta variable no hubo diferencia en el tipo de alimento que se ofreció. Sobre las prácticas sanitarias como manejo del estiércol, desparasitaciones y vacunaciones de rutina (brucelosis, clostridiosis y salmonelosis) previenen la transmisión de la enfermedad (Coelho *et al.*, 2010), ya que se encontraron baja incidencia de Ptb, así como que la poca acumulación de estiércol (Goodger *et al.*, 1996). De acuerdo a los rebaños encontrados en este estudio, la mayoría son manejados como explotaciones extensivas de pastoreo y el manejo del estiércol no es un problema latente para la transmisión de la enfermedad, pues los rebaños que utilizan corrales de encierro nocturno son rotativos; es decir, según se vaya agotando la vegetación van construyendo nuevos corrales y así evitan la acumulación de estiércol en una área determinada. Por otro lado, el aspecto de sanidad animal es incipiente o escasa, pues la mayoría de los rebaños no tiene acceso a los servicios médicos veterinarios y menos a información sobre la transmisión y prevención de la enfermedad, razones importantes para el control de la Ptb. El manejo reproductivo no fue significativo para estar relacionado con la transmisión de la paratuberculosis en este estudio.

2.6. Conclusiones

La mayoría de las explotaciones se infectan a través de la compra de animales enfermos aparentemente sanos; a partir de animales portadores, la transmisión ocurre por la vía fecal-oral y por la ingestión accidental de materia fecal, situación a considerar cuando se diagnostica un rebaño positivo. Por lo tanto, factores como la compra y venta de ganado, deberán ser tomados en cuenta para minimizar el riesgo de la infección. En este estudio, la compra resultó ser la práctica de mayor riesgo en la seroprevalencia de la Ptb. Por lo tanto, para este punto se debe contar con un diagnóstico eficiente para reducir el riesgo del ingreso de nuevas enfermedades a cada rebaño.

Debido a las limitaciones por el diseño de este estudio tipo transversal, los resultados deben ser interpretados cuidadosamente, dado que no fue posible identificar claramente una relación causa-efecto. Sin embargo, la información proporcionada por la presente investigación puede hacer una contribución importante para que las futuras estrategias de diseño sean más apropiadas. Varios factores de este estudio fueron asociados con la seropositividad. Los resultados sugieren que en cuanto más grande sea el total de animales en el predio, mayor será la seroprevalencia, y también que en cuanto más intensivo sea el manejo, es posible que exista más riesgo de Ptb, por el contagio fecal-oral propio de esta enfermedad. Serán necesarios más estudios para aclarar los factores del huésped que están asociados con la resistencia a la infección, ya que lo encontrado en este estudio fue que existe un factor racial para animales seropositivos. Se confirmó que la prevalencia de Ptb en ovinos, es mayor en rebaños que adquieren sus ovinos fuera de su localidad, sin tomar en cuenta las condiciones de salud. Las variaciones de Ptb entre rebaños, nos llevó a especular que el manejo es un factor que influye en la expresión de la Ptb y que las recomendaciones sobre este tema pueden mejorar en el rebaño el control de la enfermedad en aéreas con características similares a este trabajo. Estos factores no deben ser considerarse en lo individual, sino como elementos que forman parte de un proceso complejo y que en

conjunto, contribuyen a la presencia de ovinos seropositivos con *Map*, confirmándose la naturaleza multifactorial de la paratuberculosis ovina.

2.7. Agradecimientos

Este estudio fue financiado con recursos provenientes del Colegio de Postgraduados, *campus* San Luis Potosí, del Fideicomiso para la Investigación Científica y Desarrollo Tecnológico del Colegio de Postgraduados (modalidad tesis) y de la Línea Prioritaria de Investigación número 5 (LPI-5): Biotecnología Microbiana, Vegetal y Animal.

Cuadro 3. Variables relacionadas con la seropositividad por IDGA a *Mycobacterium avium* subs. *paratuberculosis* en el análisis univariado.

Variable	Categoría	Núm.	%	Variable	Categoría	Núm.	%
		Anim.	IDGA			Anim	IDGA
Localid.	Herradura	52	5.8	Manejo	Pastoreo	196	7.7
	Salinas	24	12.5	Aliment.	Estab.	46	13.0
	V. Ramos	166	9.0	Tipo de	Agostad.	37	0.0
Superf.	0-200	144	9.7	alimento	A. balanc.	134	9.0
	201-500	57	7.0		Esquilmos	71	12.7
	501-3000	41	7.3	Raza	Criollo	51	5.9
Tamaño rebaño	10-60	69	8.7		C X R	181	9.4
	61-150	117	6.8		Ramb.	10	10.0
	151-600	56	12.5	Manejo	Rústico	157	5.1
Edad	2-3	127	10.2		Tecnif.	85	15.3
	4-6	84	8.3	Reprod.	C. manej	166	9.0
	7-8	31	3.2		S. manej	76	7.9
Venta	M. Mpio.	195	7.2	Sanidad	C. manej	218	8.3
	O. Mpio.	47	14.9		S. manej	24	12.5
Compra	M. Mpio.	167	7.8				
	O. Mpio.	54	13.0				
	O. Edo.	21	4.8				

M = mismo; O = otro.

C = con; S = sin.

Cuadro 4. Resultados de la regresión logística para la relación entre las variables en estudio y los resultados positivos a *Map*.

Clasificación	Variable	P	OR ^a	I.C. ^b 95 %	
				Inferior	Superior
Predio	Localidad				
	La Herradura				
	Salinas	0.281	1.08	1.67	7.83
	Villa de Ramos	0.149	5.82	2.85	40.13
	Superficie ha				
	1 - 20				
	201 - 500	0.085	1.83	1.06	60.66
	501 - 3000 has	0.103	0.89	0.27	30.67
	Total animales				
	20 – 60				
	61 – 150	0.008	0.79	0.03	24.59
	151 – 600	0.023	0.15	0.02	1.31
	Pastoreo				
Estabulado					
Pastoreo	0.998	0.03	0.00	45.86	
Rebaño	Edad (años)				
	2 – 3				
	4 – 6	0.002	3.57	0.36	35.53
	7 – 10	0.076	1.49	0.13	17.56
	Raza				
	Criolla				
	Cruza	0.228	0.01	0.00	21.48
<i>Rambouillet</i>	0.036	1.11	0.00	13.37	
Manejo	Alimentación				
	Agostadero				
	Alim. Balanc. ^c	0.989	1.80	0.00	0.00

Orig y dest ^f	Esquilmos	0.870	0.88	1.18	0.14
	Sanidad				
	con manejo				
	<i>sin manejo</i>	0.040	9.49	0.01	63.27
	Reproducción				
	sin manejo				
	con manejo	0.658	0.41	0.01	20.67
	Manejo general				
	Rústico				
	Tecnificado	0.100	0.08	0.00	1.64
	Compra				
	Mismo mpio ^d				
	Otro mpio	0.015	4.51	0.11	95.12
	<i>Otro edo^e</i>	0.021	5.86	0.08	130.73
	Venta				
Mismo mpio					
Otro mpio	0.296	2.30	0.11	106.24	
Constante	0.001	1.20	0.32	143.12	

^a Odds ratio; ^b intervalo de confianza; ^c alimento balanceado; ^d municipio; ^e estado; ^f origen y destino.

2.8. Literatura Citada

- Abbot, K.; Whittington R.; Mcgregor H. 2004. Exposure Factors Leading to Establishment of OJD Infection and Clinical Disease. Faculty of Veterinary Science. University of Sidney, Animal Health and Welfare, Sydney.
- Bush, R.D.; Windsor P.A.; Toribio J-A.L.M.L. 2006. Losses of adult sheep due to ovine Johne's disease in 12 infected locks over a 3-year period. Aust Vet J; 84: 246–253.

- Chávez G.G. 2009. Taller de planeación enfocado a la atención de la paratuberculosis en México, CEIEPAA (Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Animal en Altiplano), FMVZ (Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia)-UNAM (Universidad Nacional Autónoma de México) 24 y 25 de septiembre de 2009, Tequisquiapan, Querétaro.
- Clarke, C.J.; Little D. 1996. The pathology of ovine paratuberculosis: gross and histological changes in the intestine and other tissues. *J Comp Pathol*; 114: 419–437.
- Coelho, A.C.; Pinto M.L.; Coelho A.M.; Aires A.; Rodríguez J. 2010. A seroepidemiological survey of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in sheep from the North of Portugal. *Pesq Vet Bras*; 30(11):903-908.
- Daniels, M.; Hutchings M.R.; Greig A. 2003. The risk of disease transmission to livestock posed by contamination of farm stored feed by wildlife excreta. *Epidemiol Infect*; 130: 561–568.
- Dhand, N.K.; Eppleston J.; Whittington R.J.; Toribio J-A.L.M.L. 2007. Risk factors for ovine Johne's disease in infected sheep flocks in Australia. *Prev Vet Med*; 82:51-71.
- Goodger, W.J.; Collins M.T.; Nordlund K.V. 1996. Epidemiologic study of on-farm management practices associated with prevalence of *Mycobacterium paratuberculosis* infections in dairy cattle. *J Am Vet Med Assoc*; 208: 1877-1881.
- Harris, N.B. and Barletta R.G. 2001. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in veterinary medicine. *Clin Microbiol Rev*; 4:489-512.
- Hernández, C.O.A. 2007. Obtención de un antígeno protoplasmático de *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* para el diagnóstico de la enfermedad de Johne en ovinos. *Tesis de licenciatura*. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia – Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México.
- INEGI, (Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática). 1994. Coordenadas geográficas. Anuario Estadístico del Estado de San Luis Potosí. Ed. INEGI, México, 1-106.
- Kennedy, D.J. and Benedictus G. 2001. Control of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in agricultural species. *Rev Sci Tech OIE*; 20, 151-179.
- Khodakaram, T. and Rashidi K. 2000. The Pathology of Goat Paratuberculosis: Gross and Histopathological Lesions in the Intestines and Mesenteric Lymph Nodes. Department of Pathology, School of Veterinary Medicine, Shiraz University. *J Vet Med B*; 47: 487- 495.

- Koets, A.P.; Adugna G.; Janss L.L.G; van Weereing H.J.; Kalis C.H.J.; Wetink G.H. 2000. Genetic variation of susceptibility to *Mycobacterium avium* spp. *paratuberculosis* infection in dairy cattle. *J Dairy Sci* 83: 2702-2708.
- Lugton, I.W. 2004. Cross-sectional study of risk factors for the clinical expression of ovine Johne's disease on New South Wales farms. *Aust Vet J*; 82: 355-365.
- Lwanga, S.K. and Lemeshow S. 1991. Estimating a population proportion with specified absolute precision. In: *Sample Size Determination in Health Studies. A Practical Manual*. WHO Geneva, Switzerland; 1-80.
- Mainar-Jaime, R.C. and Vazquez-Boland J.A. 1998. Factors associated with seroprevalence to *Mycobacterium paratuberculosis* in small-ruminant farms in the Madrid region (Spain). *Prev Vet Med* 1998; 34: 317–327.
- Manning, E.J.; Collins M.T. 2001. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: pathogen, pathogenesis and diagnosis. *Rev Sci Tech*; 20: 133-150.
- Martínez A.G; Santillán M.A.; Guzmán C.C.; Favila L.C.; Córdova D.L.; Díaz E.A. 2012. Desarrollo de un inmuno-ensayo enzimático (ELISA) para el diagnóstico de paratuberculosis en bovinos. *Rev Mex Cienc Pecu*; 3(1):1-18.
- Medina G.M.; Díaz P.G.; Loredó O.C.; Serrano A.V. 2005. Estadísticas climatológicas básicas del Estado de San Luis Potosí. *Instituto de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP)*, Centro de Investigación Regional Noreste. Campo Experimental San Luis Potosí, México. Libro Técnico 2: 322.
- Méndez, G.M.; Perea A.R.; Enríquez V.A; García C.L. 2009. Análisis descriptivo de casos recibidos para diagnóstico de paratuberculosis ovina y caprina en el laboratorio de patología animal de Calamanda, México. VI Congreso Latinoamericano de la Asociación de Especialistas en Pequeños Rumiantes y Camélidos Sudamericanos (ALEPRyCS). Sanidad. 7 al 11 de Septiembre 2009., Ciudad de Querétaro, México.
- Merkal, R.S.; Larsen A.B.; Booth G.D. 1975. Analysis of the effects of inapparent bovine paratuberculosis. *Am J Vet Res*; 36: 837-838.
- Muskens, J.; Elbers A.R.; Van Weering H.J.; Noordhuizen P.T. 2003. Herd management practices associated with paratuberculosis seroprevalence in Dutch dairy herds. *J Vet Med B*; 50(8):372-377.
- Reviriego, F.J.; Moreno M.A.; Domínguez L. 2000. Risk factors for brucellosis seroprevalence of sheep and goat flocks in Spain. *Prev Vet Med*; 44:167-173.

- Santillán, F.M.A.; Córdova L.D.; Guzmán R.C.C.; Jaimes M.N.G.; Hernández C.O.A. 2007. Paratuberculosis en ovinos. 15ª Reunión anual del Consejo Técnico Consultivo Nacional de Sanidad Animal (CONASA). Unidad de Congresos del Centro Médico Nacional Siglo XXI, México, D.F. 17, 18 y 19 de septiembre de 2007. 50 -56.
- Sherman, D.M.; Markham R.J.F.; Bates F. 1984. Agar gel immunodiffusion test for diagnosis of clinical paratuberculosis in cattle. *J Am Vet Med Assoc*; 185 (2): 179-182.
- Stehman, S.M. 1996. Paratuberculosis in small ruminants, deer and South American camelids. *Vet Clin N Am Food A*; 12:441–455.
- Sweeney, R.W. 1996. Transmission of paratuberculosis. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*; 12, 305-312.
- Toribio, J.A.; Bush R.; Windsor P. 2005. A Study of the Biological and Economic Impact of OJD in Affected Sheep Flocks in NSW. *Meat and Livestock Australia, MLA Sydney*. 2005. (fecha de acceso 20 noviembre 2010). URL disponible en <http://www.mla.com.au>
- Tyler, J.W.; Cullor J.S. 1989. Titers, test, and truisms: rational interpretation of diagnostic serologic testing. *J Am Vet Med Assoc*; 194 (11): 1550-1558.
- Whittington, R. and McGregor H. 2005. Epidemiology of Ovine Johne's Disease. 2. Pasture Contamination Level and Age Susceptibility. *Meat and Livestock Australia*. (MLA), Sydney. 2005. (fecha de acceso 20 noviembre 2010). URL disponible en <http://www.mla.com.au>

CAPITULO 3. ASOCIACIÓN DE POLIMORFISMOS DEL GEN SLC11A1 CON LA INFECCION POR *Mycobacterium avium* SUBSP. *paratuberculosis* EN OVINOS***

Association SLC11A1 Gene Polymorphism with Infection *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Ovine

3.1. Resumen

La paratuberculosis, también llamada enfermedad de Johne es una enteritis granulomatosa que afecta a rumiantes domésticos y salvajes, que es causada por *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. Identificar la base molecular de la resistencia del huésped a patógenos ofrece la posibilidad de mejorar la resistencia a enfermedades a través de la selección asistida por marcadores. Los objetivos de este estudio fueron la detección de polimorfismos en la región 3'UTR del gen SLC11A1 y relacionándolo con los resultados de las pruebas de diagnóstico, estimados por serología y prueba fecal en ovinos. Ciento cuarenta y dos muestras de sangre y de heces de los animales se obtuvieron de tres diferentes rebaños de ovejas y se diagnosticaron mediante la prueba serológica de inmunodifusión en gel de agar (IDGA) y heces (anidada-PCR). Las muestras del polimorfismo de la región 3' no traducida (3'UTR) del gen SLC11A1, que fue negativo, se asociaron en la A22 microsatélites polimórficos, A23 y A24 ($P < 0,007$). Sin embargo, la A19 microsatélites polimórficos, A20, A21 y A25 no se asociaron con el 3'UTR ($P > 0,05$). En las conclusiones, se observó siete alelos polimórficos (A19, A20, A21, A22, A23, A24 y A25). Pero sólo, A22, A23 y A24 se observaron con mayor frecuencia en las dos pruebas de diagnóstico utilizados en este estudio. Esto sugiere un posible marcador para la resistencia asociada con la paratuberculosis ovina en la región A polimórfica. Los resultados pueden contribuir a los conocimientos actuales sobre la susceptibilidad / resistencia a la paratuberculosis.

Palabras clave: Paratuberculosis, polimorfismos, SLC11A1.

***Investigación enviada a: Small Ruminant Research.

3.2. Abstract

The objective was detect polymorphisms in the 3'UTR region of the SLC11A1 gene in sheep, and estimate its relationship with the results of serological and fecal paratuberculosis diagnosis. Three flocks classified as negative, positive and negative in contact with positive, were taken two diagnostic tests confirmed status. Were diagnosed 24 positive and 118 negative samples that by both tests. The genotyping of the 142 animals in the population under study, seven different alleles (A19, A20, A21, A22, A23, A24 and A25) were determined. Only in a very low number of animals, the A19 and A25 alleles were found. The allele most often found in each population were A22, A23 and A24 and make up 78.9% of alleles found. The results of this study indicate a possible association of polymorphisms found in the 3'UTR region of the gene, with resistance to ovine paratuberculosis to show a difference ($p < 0.001$) between the allelic frequencies encountered. The most frequently found alleles (A22, A23 and A24) suggests can be used as a marker to associate the resistance of ovine paratuberculosis in A polymorphic region of the seven polymorphic alleles found (A19, A20, A21, A22, A23, A24 and A25). It is recommended to conduct research with sizes larger population sample, experiments and functional activity of SLC11A1 gene polymorphisms found to clearly elucidate the functions thereof.

Key words: Paratuberculosis, polymorphisms, SLC11A1.

3.3. Introducción

La paratuberculosis, también llamada enfermedad de Johne, es una enteritis granulomatosa que afecta a los rumiantes domésticos y silvestres (Erume *et al.*, 2001). Es una enfermedad causada por la bacteria *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, un patógeno intracelular, habitante de los macrófagos; la bacteria es excretada por heces y leche de animales infectados en estados tardíos de la enfermedad (Koets *et al.*, 2010). Causa pérdida de peso y diarrea progresiva, eventualmente muerte, pero

esto se observa solamente en 5 a 10 % de los animales infectados (Chiodini *et al.*, 1984). La enfermedad constituye una amenaza mundial, ocasionando grandes pérdidas económicas para los productores debido al descenso en la producción láctea, menor peso de venta, menor número de crías, costos de tratamiento y por reemplazo de animales eliminados (Dhand *et al.*, 2007).

Las pérdidas atribuidas a enfermedades infecciosas continúan impidiendo la industria ganadera, a pesar del amplio uso de fármacos, vacunas y cuarentenas. Una alternativa para el control de estas infecciones zoonóticas es la resistencia genética a la enfermedad, la cual es la capacidad inherente del animal para resistir un desafío virulento (Adams y Templeton, 1998). El propósito fundamental de la genética, es encontrar la asociación entre genotipo y fenotipo. La variación genética es la base de la biodiversidad y la evolución, y esta variación puede ser la base de características como susceptibilidad a enfermedades, debido al potencial efecto sobre la expresión y/o regulación del gen y por lo tanto, la función de las proteínas.

El gen (NRAMP1) proteína natural de macrófagos asociada a la resistencia juega un papel importante en la protección contra varios patógenos intracelulares y se identificó primero en ratones por clonación posicional (Vidal *et al.* 1993). Anteriormente nombrado como el locus *Bcg / Lsh / Ity* por su papel en la resistencia / susceptibilidad por infecciones a *Mycobacterium bovis* cepa *Bacilo Callmette-Guerin (Bcg)*, *Leishmania donovani (Lsh)* y *Salmonella typhimurium (Ity)* (Skamene, 1994). El gen NRAMP1, en base a su función como un antiportador divalente catión-proton, se ha renombrado como portador de solutos miembro de la familia 11 a 1 (SLC11A1), (Goswami *et al.*, 2001). Esto, en virtud de los efectos pleiotrópicos sobre la activación de macrófagos, que tiene potencial para las defensas antimicrobianas (incluyendo antiviral), defensas anti-tumor y la autoinmunidad (Blackwell *et al.*, 2000).

La resistencia a las enfermedades es a menudo influida por los factores genéticos y susceptibilidad del huésped. Nuevas investigaciones se han dirigido a detectar

asociaciones genéticas, entre las diferencias de susceptibilidad y polimorfismos de un gen o genes candidatos, por observaciones de incidencia de paratuberculosis en diferentes razas de bovinos y ovinos (Reddacliff *et al.*, 2005). En particular, la participación del gen SLC11A1 se ha demostrado en ratones, humanos y varias especies de animales domésticos (Gazouli *et al.*, 2008). Recientemente, se ha establecido una fuerte influencia del gen SLC11A1, sobre la susceptibilidad innata del ratón a la infección con *Map* (Roupie *et al.*, 2008). En ganado se ha descrito una asociación entre los microsatélites de la región 3'UTR del gen y la infección a *Brucella abortus* (Adams y Templeton, 1998). En la misma región del gen, Estonba *et al.* (2005) analizaron un fragmento anteriormente descrito por Horín *et al.* (1999), el cual incluía los microsatélites de Adams y Templeton (1998) y otros microsatélites adyacentes.

Por su parte, Pinedo *et al.* (2009) estudiaron polimorfismos de genes candidatos como factores de riesgo para la infección de paratuberculosis en ganado, postulando que diferentes arreglos de alelos en tres genes candidatos, predominarían en casos comparados contra controles; resultando cinco diferentes alelos del análisis de los microsatélites. El análisis estadístico indicó una asociación entre la infección y los alelos del SLC11A1. La función de gen SLC11A1 en coordinación con la inmunidad contra bacterias, sugiere una participación en la variación de la susceptibilidad de la paratuberculosis.

Los reportes de microsatélites en 3'UTR del gen SLC11a1 comenzaron con Pitel *et al.* (1996), quienes describen dos microsatélites polimórficos, cerca de gen ovino SLC11A1, alelos GT 23 y GT 14. Posteriormente, Matthews y Crawford (1998) confirman estos hallazgos, tanto en ovinos como en venados, localizando siete alelos que contenían microsatélites GT9 a GT16. Así mismo, Horín *et al.* (1999) encontraron un microsatélite dentro de la región 3 no traducida (3'UTR) del gen bovino Nramp1. Se ha estudiado la importancia de la función del gen y su asociación con la resistencia a la enfermedad, identificándose dos secuencias dentro del gen bovino NRAMP1. Estas

secuencias están localizadas en la región 3'UTR, las cuales muestran un patrón complejo de mutación, consistiendo en una sustitución de T a G en la posición 1782 y una variación en el número de dinucleótidos repetidos (GT) en la posición 1907 (Horín *et al.*, 1999).

Las enfermedades infecciosas permanecen entre las más importantes cargas sobre la salud animal y humana a pesar de la terapia antibiótica e inmunización que han contribuido a su control substancial. La identificación en bases moleculares de la resistencia del huésped a patógenos ofrece la posibilidad de mejorar la resistencia a la enfermedad a través de la selección asistida por marcadores. De esta manera, los objetivos del presente estudio fueron detectar polimorfismos en la región 3'UTR del gen SLC11A1 en ovinos, y estimar su relación con los resultados de diagnóstico serológico y fecal a la paratuberculosis.

3.4. Materiales y Métodos

3.4.1. Muestras

Se tomó un total de 142 muestras sanguíneas y fecales de tres rebaños ovinos para ser clasificados como infectados (casos) o sanos (controles) al ser diagnosticados positivos o negativos a las pruebas serológicas (IDGA) y fecales (PCR-anidada); considerando solo aquellos animales que coincidieron los resultados (positivos o negativos) en ambas pruebas. Se muestrearon cinco mL de sangre por animal de la vena yugular y se colocaron en tubos de plástico para suero de 13 x 100 mm x 5,0 mL (BD Vacutainer®, tapón rojo Hemogard™, EUA) adicionados con activador de coagulación y cubierta interior de silicón, que fueron procesados para separar el suero, el cual se almacenó en un ultra congelador (Thermo Scientific, Forma 7000 modelo 7320A, EUA) a -20°C, para ser procesados posteriormente mediante la prueba de inmunodifusión en gel de agar (IDGA) (Sergeant *et al.* 2003). Las muestras fecales se obtuvieron del recto del animal con la ayuda de un guante de plástico, las cuales se conservaron en

congelación a -20°C hasta ser analizadas por medio de la PCR-anidada, según la técnica descrita por Jaimes *et al.* (2008).

3.4.2. Clasificación de los Rebaños

Rebaño negativo: se tomaron 97 muestras de dos rebaños para ser clasificados como muestras negativas al no reaccionar a ninguna de las pruebas diagnósticas. Un rebaño de la Facultad de Agronomía y Veterinaria de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí cuenta con 190 ovinos de la raza Rambouillet de donde se obtuvieron 19 muestras de suero y heces y el otro rebaño propiedad del Centro Estatal de Mejoramiento Genético Caprino de San Luis Potosí, el cual tiene un inventario de 120 ovinos de raza Rambouillet, de donde se extrajeron 78 muestras de heces y sangre para su diagnóstico. En estos rebaños no se tienen antecedentes ni presentan signos clínicos de infección de la enfermedad. *Rebaño positivo:* El Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Animal en Altiplano CEIEPAA, Tequisquiapan, Querétaro, de la Universidad Autónoma de México, colaboró con 24 muestras sanguíneas y fecales de ovinos, de su lote experimental de animales infectados con *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, las cuales fueron confirmadas ser positivas al diagnóstico por ambas pruebas. *Rebaño negativo en contacto con positivos:* Los ovinos se obtuvieron de rebaños en donde se reportó una prevalencia de 7.58% (Morón *et al* 2013). Se consideraron 21 muestras de 69 muestras de rebaños en donde se había detectado al menos un animal positivo, así fueron 21 muestras confirmadas como negativas por ambas pruebas.

3.4.3. Extracción y cuantificación de ADN

Un total de 142 muestras de sangre procedentes de ovinos con estatus negativo o positivo confirmado, fueron consideradas para el análisis molecular. La extracción de DNA se realizó con el kit BD tract™ (Maxim Biotech, Inc. E. U. A.) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Se transfirieron 2 mL de sangre total con anticoagulante

ACD o EDTA a un tubo cónico de 15 mL, se agregaron 2 mL de la solución BD-1, para lisar las células o el conjunto membrana citoplasmática de la sangre, se mezcló por agitación y se centrifugó a 764 x g por 10 min, se removió el sobrenadante con la ayuda de una pipeta de plástico. A los tubos se agregó 2 mL de la solución BD-2 para lavar las células rojas del botón celular, se mezcló con una pipeta de plástico y se centrifugó a 764 x g por 10 min, posteriormente, se desechó el sobrenadante. Para lisar las células nucleadas se resuspendió el botón celular con 0.6 mL de la solución de detergente aniónico BD-3, se mezcló varias veces y se incubó a 65 °C por 30 min. Se pasó el contenido del tubo de 1.5 mL con ayuda de una pipeta de plástico y se agregó 0.2 mL del reactivo BD-4, utilizado para precipitar la proteína, se mezcló bien invirtiendo el tubo y se centrifugó a 29000 x g por 10 min. El sobrenadante se transfirió a un tubo Eppendorf de 1.5 mL con 0.6 mL de isopropanol, la muestra se mezcló por inversión hasta la precipitación del DNA, a continuación se centrifugó a 29000 x g por 10 min. El sobrenadante se desechó y la pastilla se resuspendió con 1 mL de etanol al 70 % frío, posteriormente se centrifugó a 30 x g por 5 min. La pastilla de DNA se secó a temperatura ambiente y el DNA se resuspendió en 0.1 mL de agua destilada estéril. Los tubos se mantuvieron a 4 °C hasta el momento de la cuantificación. La cuantificación del DNA, se determinó mediante la técnica de espectrofotometría en un Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, USA).

3.4.4. Análisis de polimorfismos

Para la amplificación de la región del SLC11A1 se utilizaron los iniciadores SLC11A1F (5'-ACCTGGTCTGGACCTGTCTCATCA-3') e SLC11A1R (5'-CATTGCAAGGTAGGTGTCCCAT-3') (Liandris *et al.*, 2009), que amplifica un fragmento aproximado de 373 pares de bases (bp). La mezcla de reacción para PCR se preparó en un volumen final de 25 µL conteniendo buffer de la enzima 1 x *Taq* DNA polimerasa, 0.8 mM deoxinucleosido trifosfatos (0.2 mM cada uno), 100 ng ADN, 20 pmol de cada iniciador y 2 unidades (Una unidad se define como la cantidad de enzima requerida para catalizar la incorporación de 10 nmoles de dNTP en un material insoluble en ácido

por 30 minutos a 74° C.) de *GoTaq* DNA (Promega, USA). Las amplificaciones se realizaron con un ciclo inicial de desnaturalización a 94 °C por 5 min; 35 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 45 s, alineamiento a 56 °C por 45 s, y una extensión a 72 °C por 45 s; finalmente un ciclo de extensión final a 72°C por 5 min. Todas las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un termociclador Peltier Thermal Cycler PTC-200 (BIORAD, México). Las amplificaciones se verificaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1.2% preparado con 1x TAE buffer (Tris Acetate-EDTA) y corrido a 87 V cm³ durante 1 h. El gel se tiñó con Gel red (Biotium, USA) y las bandas se visualizaron en un transiluminador (Infinity 3000 Vilber Lourmat, Germany). Para la reacción de secuenciación se limpiaron los productos de PCR con el kit de purificación Wizard SV gel and PCR clean up system (Promega, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. La reacción de secuenciación se realizó usando el Bigdye terminator v. 3.1 (Applied Biosystem, USA), los productos de PCR se secuenciaron en ambas direcciones para asegurar que no hubiera lecturas de nucleótidos incorrectas. Los fragmentos correspondientes al gen se resolvieron por electroforesis capilar en un Applied Biosystems modelo 3130XL (Applied BioSystems, USA).

3.4.5. Análisis Bioinformático

Para obtener las secuencias consenso se ensamblaron ambas hebras mediante la opción CAP contig del software Bioedit versión 7.2.5 (12/11/2013) (Hall, 1999). Estas secuencias se compararon mediante la opción BLSTN con las depositadas en la base de datos de GenBank-NCBI.

Para observar los alelos polimórficos, las secuencias consenso se alinearon con la opción BioEdit Sequence Alignment. Se determinó el número de repeticiones GT en cada uno de las muestras secuenciadas.

3.4.6. Análisis Estadístico

Para el análisis estadístico se utilizó el programa estadístico SPSS para Windows (versión 15.0) Para determinar la relación entre los polimorfismos encontrados del gen SLC11A1 con la presencia de *Map*, por la prueba serológica y fecal, se utilizó la prueba de Chi cuadrada.

3.5. Resultados y Discusión

3.5.1. Resultados positivos y negativos a la detección de *Map* por las pruebas IDGA y PCR

En total se obtuvieron 24 muestras positivas y 118 negativas que fueron diagnosticadas por ambas pruebas. El número casos y controles en cada grupo de ovinos se muestra en el Cuadro 5. Los animales se agruparon por su clasificación como susceptibles, por la presencia de anticuerpos anti *Mycobacterium avium* subs *paratuberculosis* que indica que son animales persistentemente infectados (positivos); o resistentes, por su capacidad para controlar la replicación bacteriana intrafagosomal (negativos).

El problema más importante de las investigaciones en resistencia o susceptibilidad genética de la paratuberculosis, es la dificultad para identificar con precisión los animales fenotípicamente infectados. La clasificación fenotípica debe poder distinguir entre grupos genéticamente diferentes. Los métodos más sensibles y específicos para poder diagnosticar la paratuberculosis están basados en el cultivo y la histopatología (Reddacliff *et al.*, 2005), no pudiendo hacerse en animales vivos. La precisión de un diagnóstico eficiente debe hacerse con múltiples pruebas; por lo que en este estudio,

se utilizaron los resultados de dos pruebas de laboratorio como criterios de clasificación para evitar fallas en la clasificación de los grupos.

3.5.2. Frecuencias de los alelos polimórficos detectados en el gen SLC11A1

El estudio de los polimorfismos de la región 3 no traducida (3'UTR) de alelos del gen SLC11A1 que se basó en el análisis de secuencia de las 142 muestras de sangre total, mencionadas anteriormente. De acuerdo a los iniciadores de Liandris *et al.*, (2009), quienes reportaron dos regiones polimórficas A y B; en este estudio solamente se identificó la región A de acuerdo al número de repeticiones GT utilizados, en la cual se observaron siete microsatélites polimórficos por secuenciación (Cuadro 6). En la genotipificación de los 142 animales de la población en estudio, se determinaron siete diferentes alelos para SLC11A1 (A19, A20, A21, A22, A23, A24 y A25). Los alelos A19 y A25 se detectaron solamente en un muy bajo número de animales (1 y 2 respectivamente). Los alelos que más frecuentemente se encontraron en ambas poblaciones fueron A22, A23 y A24 y conforman el 78.9% del total de alelos encontrados (Cuadro 6).

La importancia funcional de estos polimorfismo no es conocido. Sin embargo, se han reportado asociaciones de la región 3'UTR con la susceptibilidad a la tuberculosis en los seres humanos (Bellamy *et al.*, 1999) y con la susceptibilidad a la brucelosis en el ganado bovino (Adams y Templeton, 1998). Estos resultados justifican la búsqueda de asociación de marcadores para ganado y patógenos intracelulares, como *Mycobacterium sp*; encontrar tales polimorfismos podría ser útil tanto teórica como prácticamente.

Los resultados de este estudio indican una posible asociación de polimorfismos encontrados dentro de la región 3'UTR del gen, con la resistencia a la paratuberculosis en ovinos. Teniendo en cuenta que esto no implica un significado funcional de las

diferencias entre los alelos microsatélites encontrados, ya únicamente actúan como marcadores de asociación con la enfermedad.

3.5.3. Asociación de resultados positivos y negativos a *Map* con los alelos polimórficos de la región A

Se comparó la frecuencia de las repeticiones polimórficas en los tres grupos experimentales, dando diferencias significativas en el número de repeticiones para positivos y negativos en cada uno de los alelos polimórficos (Cuadro 7). Cuando los animales se agruparon por su clasificación, se encontró en los catalogados como resistentes, una alta frecuencia de los alelos A22, A23 y A24 y muy baja frecuencia de los alelos A19, A20, A21 y A25. La prueba Chi cuadrada realizada en el programa SPSS mostró una diferencia en cómo se presentaron los distintos alelos en los tres grupos experimentales. Se encontraron diferencias significativas ($p < 0.001$) entre las frecuencias alélicas encontradas en los animales en los tres grupos experimentales basada en una prueba de Chi cuadrada (Cuadro 7).

En ambos grupos (positivo y negativo) hubo evidencia de la presencia de los polimorfismos encontrados, pero los microsatélites GT con mayor número de repeticiones se encontraron en mayor frecuencia con los animales negativos a la paratuberculosis ovina, sugiriendo que estas repeticiones le pueden proporcionar cierto grado de resistencia a la enfermedad. Así las ovejas con bajo número de repeticiones del microsatélites GT pudieron haber sucumbido a una edad temprana a Ptb o a otras enfermedades infecciosas intracelulares.

Dos secuencias, dentro del gen bovino NRAMP1, están localizadas en la región 3'UTR, mostrando un patrón complejo de mutación, consistiendo en una sustitución de T a G en la posición 1782 y una variación en el número de dinucleótidos repetidos (GT) en la posición 1907 (Horín *et al.*, 1999). La variación del largo de los microsatélites fue de (GT)13 a (GT)16, mostrando una asociación significativa con la resistencia

a la brucelosis bovina. El impacto de la función de la secuencia (GT) en la posición 1907 del gen fue estudiado y se reportó que el polimorfismo dentro del microsatélite en la región 3'UTR afecta la expresión del gen bovino NRAMP1, controlando la replicación *in vitro* de *Brucella abortus*, no así, de *Salmonella dublin*. El papel del microsatélite en la regulación de la expresión del gen es mediada a través de cambios en la estructura alfa hélice, de la transcripción de los dominios de unión del ADN. Estos dominios de unión, flanquean las secuencias repetidas y se encuentran en un lugar específico a lo largo de la alfa hélice, que permite su transcripción unidos al ADN en una forma cooperativa. Cualquier alteración en la longitud de estas secuencias repetidas puede afectar la unión cooperativa de los factores de transcripción necesarios para una óptima expresión del gen. Estas observaciones sugieren que la resistencia a la infección por *Brucella* en bovinos puede ser atribuido al proceso de regulación de transcripción del gen NRAMP1, mediado a través de la longitud de los poli (GT) repetidos en la 3'UTR (Caron *et al.*, 2004).

3.5.4. Asociación entre cada uno de los microsatélites polimórficos de la región A con los resultados a la infección con *Mycobacterium avium* subs. *paratuberculosis* (Map).

Para determinar cuál alelo influyó en el diagnóstico de la infección se realizaron pruebas de Chi cuadrada en un 2 x 2 entre pares de alelos y así determinar en donde existió significancia (Cuadro 8). La prueba de Chi cuadrada realizada, provee evidencia de una asociación estadística de los microsatélites polimórficos A23 y A24 con los resultados negativos de las muestras. No encontrando asociación entre los resultados con los alelos A19, A20, A21, A22 y A25.

El alelo (GT) 13 del 3'UTR del gen SLC11A1 en el ganado vacuno se ha mostrado conferir resistencia a la infección por *Brucella abortus*, mientras que los alelos (GT) 14, (GT) 15 y (GT) 16 fueron asociados con la susceptibilidad (Adams y Temple-

ton, 1998; Barthel *et al.*, 2000). Sin embargo el alelo GT13 aun en condición homocigótica se encontró que es incapaz de proteger al ganado cebú y sus cruzas con *Bos taurus* contra brucelosis (Kumar *et al.*, 2005). También al estudiar polimorfismos del gen humano NRAMP1 en 65 pacientes con brucelosis y 89 controles sanos, no se encontró diferencias significativas en los alelos estudiados. Por lo tanto, las variantes de gen NRAMP1 no parecen afectar a la susceptibilidad o protección en humanos (Bravo *et al.*, 2006).

Mientras tanto, Reddacliff *et al.* (2005) registraron una asociación similar en ovejas con la correlación de la resistencia a paratuberculosis con alelos polimórficos del gen SLC11A1. Este estudio en Merino australiano rebeló la posible asociación de los alelos 162 y 170 bp del microsatélite OVINRA1 dentro del gen, con la susceptibilidad resistencia respectivamente a la paratuberculosis clínica. Es cierto que no todos los resultados están de acuerdo con lo anterior; ya que según Paixáo *et al.* (2007), quienes investigaron una asociación entre la infección por *B. abortus* de los bovinos y la expresión de la gen NARMP1, no encontrando ninguna correlación, con la susceptibilidad resistencia a la paratuberculosis.

Finalmente es necesario realizar más estudios en otras poblaciones ovinas para buscar la misma región polimórfica, y de esta forma confirmar los resultados encontrados en este estudio.

3.6. Conclusiones

En conclusión, los alelos GT 22, 23, y 24 se encuentran con mayor frecuencia en animales negativos en ambas pruebas de diagnóstico, utilizadas en este estudio, lo que sugiere que podría ser un marcador para asociar la resistencia a la paratuberculosis ovina de una región polimórfica. En este estudio se encontró que estos alelos pueden estar asociados con la resistencia a la enfermedad, ya que eran más a menudo en ovejas sanas, lo que confirma que también se encontraron en animales sanos que

estaban en contacto con los animales positivos, siendo capaces de infectarse fácilmente. Serán necesarios análisis adicionales en bases moleculares para corroborar este efecto.

Sin embargo, los resultados pueden contribuir a los conocimientos actuales sobre la susceptibilidad / resistencia a la paratuberculosis y conducir a la investigación con los estudios completos, con mayores muestras de población.

Por último, no se espera que la cría de animales con un cierto grado de resistencia natural pueda ser una manera completa para prevenir enfermedades infecciosas. Sin embargo, el aumento de la resistencia natural, a través de la cría selectiva, se espera que sea una forma de disminuir la morbilidad y las pérdidas económicas causadas por enfermedades infecciosas, como es el caso de la paratuberculosis.

3.7. Agradecimientos

Esta investigación fue financiada con recursos provenientes del Colegio de Postgraduados, campus San Luis Potosí; del Fideicomiso para la Investigación Científica y Desarrollo Tecnológico del Colegio de Postgraduados (Modalidad financiamiento a proyectos de investigación de tesis 2011) y de la Línea Prioritaria de Investigación número 5 (LPI-5): Biotecnología Microbiana, Vegetal y Animal. Los autores desean agradecer al Maestro en Ciencias, César Ramiro Martínez-González, del Laboratorio de Semillas del Instituto de Recursos Genéticos y Productividad -Ganadería, del Colegio de Postgraduados, México; por su excelente asistencia técnica.

Cuadro 5. Distribución de ovinos negativos y positivos por las pruebas diagnósticas de IDAG y PCR en tres rebaños.

	NEGATIVOS	POSITIVOS	TOTAL
<i>Rebaño negativo</i>	97	0	97
<i>Rebaño positivo</i>	21	0	21
<i>Rebaño negativo en contacto con positivos</i>	0	24	24
TOTAL	118	24	142

Cuadro 6. Frecuencias de alelos polimórficos detectados en la región 3'UTR de gen ovino SLC11A1.

Región A	Frecuencia
A19: AAGG(GT)19 GCACGC	1(0.70%)
A20: AAGG(GT)20 GCACGC	6 (4.23%)
A21: AAGG(GT)21 GCACGC	21 (14.79%)
A22: AAGG(GT)22 GCACGC	35 (24.65%)
A23: AAGG(GT)23 GCACGC	55 (38.73%)
A24: AAGG(GT)24 GCACGC	22 (15.49%)
A25:AAGG(GT)25 GCACGC	2 (1.41%)

Cuadro 7. Asociación de los resultados de las pruebas de Inmunodifusión en Gel de Agar (IDGA) y de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) con la frecuencia polimórfica identificada en la región A, en los grupos: negativo, negativo en contacto con positivo y positivo.

	Rebaño negativo	Rebaño negativo en contacto con positivo	Rebaño positivo	TOTAL
A19	1	0	0	1
A20	5	0	1	6
A21	10	7	4	21
A22	28	4	3	35
A23	41	8	6	55
A24	10	2	10	22
A25	2	0	0	2
TOTAL	97 ^a	21 ^b	24 ^c	142

Diferentes literales en la misma línea son diferentes ($p < 0.001$; Chi cuadrada)

Cuadro 8. Asociación entre cada uno de los microsatélites polimórficos de la región A con los resultados a la infección con *Mycobacterium avium* subs. *paratuberculosis* (Map).

Alelo	Negativos	Positivos	<i>p</i>
A19	1	N.O.	0.852
A20	5	1	0.793
A21	17	4	0.180
A22	32	3	0.077
A23	49	6	0.000
A24	12	10	0.000
A25	2	N.O.	0.748

3.8. Literatura Citada

- Adams, L.G. and Templeton J.W. 1998. Genetic resistance to bacterial diseases of animals. *Rev. Sci. Tech.* 17:200–219.
- Barthel, R., Piedrahita J.A.; McMurray D.N.; Payeur J.; Baca D.; Suarez Guemes F.; Perumaalla V.S.; Ficht T.A.; Templeton J.W.; Adams L.G.. 2000. Pathologic findings and association of *Mycobacterium bovis* infection with the bovine NRAMP1 gene in cattle from herds with naturally occurring tuberculosis. *Am J Vet Res* 61: 1140-1144.
- Bellamy, R. 1999. The natural resistance-associated macrophage protein and susceptibility to intracellular pathogens. *Microbes and Infection* 1: 23–27.
- Blackwell, J.M.; Searle S.; Goswami T.; Miller E.N. 2000. Understanding the multiple functions of Nramp1. *Microbes and Infection* 2: 317–321.
- Caron, J.; Malo D.; Schutta C.; Templeton J.W.; Adams L.G. 2004. Genetic susceptibility to infectious diseases linked to NRAMP1 gene in farm animal. *In: The Nramp Family*. Ed. Mathieu Cellier, Philippe Gros. USA. Pp16-28.
- Chiodini, R.J.; Van Kruiningen H.J.; Thayer W.R.; Merkal R.S.; Coutu J.A. 1984. Possible role of mycobacteria in inflammatory bowel disease. An unclassified Mycobacterium species isolated from patients with Crohn's disease. *Dig. Dis. Sci.*, 29: 1073–1079.
- Erume, J.; Spargser J.; Rosengarten R. 2001. Rapid detection of Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis from cattle and zoo animals by Nested PCR. *Afr Health Sci.*, 1: 83-89.
- Gazouli, M.; Atsaves V.; Mantzaris G.; Economow M.; Nasioulas G.; Evangelou K.; Archimandritis A. J.; Anagnow N.P.. 2008. Role of functional polymorphisms of NRAMP1 gene for the development of Crohn's disease. *Inflamm. Bowel Dis.* 14 1323-1330.
- Goswami, T.; Bhattacharjee A.; Babal P.; Searle S.; Moore E.; Li M.; Blackwell J.M. 2001. Natural-resistance-associated macrophage protein 1 is an H1/bivalent cation antiporter. *Biochemical Journal* 354: 511–519.
- Horín, P., Rychlík I.; Templeton J.W.; Adams L.G. 1999. A complex pattern of microsatellite polymorphism with the bovine NRAMP1 gene. *Eur. J. Immunogenet.* 26 311-313.

- Jaimes, G. N., Santillán M. A.; Hernández O. A.; Córdova D.; Guzmán C.C.; Arellano B.; Díaz E.; Tenorio V. R.; Cuéllar A. 2008. Detección de *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* por medio de PCR-anidada a partir de muestras de heces de ovinos. *Vet. Méx.* 39 (4): 377-386.
- Kumar, N.; Mitra A.; Ganguly I.; Singh R.; Deb S.M.; Srivastava S.K.; Sharma A. 2005. Lack of association of brucellosis resistance with (GT)(13) microsatellite allele at 3'UTR of NRAMP1 gene in Indian zebu (*Bos indicus*) and crossbred (*Bos indicus* x *Bos taurus*) cattle. *Veterinary Microbiology* 111:139–143.
- Liandris, E.; Gazouli M.; Ikonopoulou J. 2009. Characterization of the caprine (*Capra hircus*) SLC11A1 gene: innate resistance to paratuberculosis. *Online J. Vet. Res.* 13(1): 41–52.
- Morón-Cedillo, F. J., Cortez-Romero C.; Gallegos-Sánchez J.; Figueroa-Sandoval B.; Aquino-Pérez G.; Amante-Orozco A. 2013. Prevalencia de la infección por *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* en rebaños de ovinos de dos municipios de San Luis Potosí, México. *Revista Científica, FCV-LUZ* Vol. XXIII, Nº 4, 293 - 299
- Koets, A.; Santema W.; Mertens H.; Oosternrijk D.; Keestra M.; Overdijk M.; Labouriau R.; Franken P.; Frijters A.; Nielen M.; Rutten V. 2010. Susceptibility to paratuberculosis infection in cattle is associated with single nucleotide polymorphisms in Toll-like receptor 2 which modulate immune responses against *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Prev Vet Med* 93; 305-315.
- Dhand, N. K.; Eppleston J.; Whittington R. J.; Toribio J-A.L.M.L. 2007. Risk factors for ovine Johne's disease in infected sheep flocks in Aust. *Prev Vet Med.* 82:51–71.
- Estonba, A.; Iriondo M.; Oyanguren O.; Garrido J.M.; Geijo M.V.; Sevilla I.; Juste R.A. 2005. Bovine 3'-UTR (GT11) variant of the NRAMP1 gene under represented among paratuberculosis seropositive cattle. P. 46-49 in Proc. 8th. Intl. Colloq. On Paratuberculosis, The Royal Veterinary and Agricultural University, Copenhagen, Denmark. Manning E.J.B. and Nielsen S.S., ed. Frederiksberg, Denmark.
- Matthews, G.D. and Crawford A.M. 1998. Cloning, sequencing and linkage mapping of the NRAMP1 gene of sheep and deer. *Animal Genetics* 29: 1–6.
- Paixão, T. A.; Poester F.P.; Carvalho A.V.; Borges A.; Lage A.P.; Santos R.L. 2007. NRAMP1 3'untranslated region polymorphisms are not associated with natural resistance to *Brucella abortus* in cattle. *Infection and Immunity*, 75(5) 2493-2499.

- Pinedo, P.J.; Buergelt C. D.; Donovan G. A.; Melendez P.; Morel L.; Wu R.; Langae T.Y. Rae D.O. 2009. Candidate gene polymorphism (BoING, TLR4, SLC11A1) as risk factor for paratuberculosis infection in cattle. *Prev Vet Med* 91 189-196.
- Pitel, F.; Lantier I.; Gellin J.; Elsen J.M.; Lantier F. 1996. Two polymorphic microsatellite markers close to the ovine NRAMP gene. *Animal Genetics* 27: 60–61.
- Reddacliff, L.A.; Beh K.; McGregor H.; Whittington R.J. 2005. A preliminary study of possible genetic influences on the susceptibility of sheep to Johne's disease. *Aust Vet J.* Volume 83, No 7
- Roupie, V.; Rosseels V.; Piersoel V.; Zinniel D.K.; Barletta R.G.; Huygen K. 2008. Genetic resistance of mice to *Mycobacterium paratuberculosis* is influenced by *Sc111a1* at the early but not at the late stage of infection. *Infect. Immun.* 76:2099-2105.
- Sergeant, E.S.G.; Marshall D.J.; Eamensc G.J.; Kearns C.; Whittington R.J. 2003. Evaluation of an absorbed ELISA and an agar-gel immuno-diffusion test for ovine paratuberculosis in sheep in Australia. *Prev. Vet. Med.* 61: 235-248.
- Skamene, E. 1994. The Bcg gene story. *Immunobiology* 191:451–460.
- Vidal, S.; Malo D.; Vogan K.; Skamene E.; Gross P. 1993. Natural restance to infection with intracellular parasites: Isolation of a candidate for Bcg. *Cell.* 73 469-485.

III. CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS

En el ganado ovino del Altiplano Potosino, de acuerdo a los resultados de esta investigación, la paratuberculosis representa un problema sanitario y económico muy importante. Este hecho debería traducirse en la aplicación real de un programa de prevención, control y erradicación.

La enfermedad de Johne es una enfermedad en el ganado, es responsable de una pérdida considerable en la leche, así como la industria de carne, ocasionando pérdidas económicas importantes. Por lo tanto, es necesario un programa de control y para esto, primero, se tiene que diagnosticar la enfermedad. Se ha encontrado que no hay una sola prueba que tenga 100 por ciento de sensibilidad y especificidad. Por tanto, para el diagnóstico de la paratuberculosis ovina recomendamos que al menos se hagan dos pruebas diagnósticas. En esta primera etapa del estudio para estimar la prevalencia del *Map*, se utilizó la prueba molecular de PCR, detectando un 7.58 % de ovinos infectados; y también una prueba serológica, IDAG, la cual detectó un 9.48 % de prevalencia; siendo esta última la de menor precio comparadas con otras que incluyen equipo de laboratorio más sofisticado. Si bien los resultados encontrados en este estudio muestran que no existe diferencia entre los métodos de diagnóstico usados, se sugiere el método de inmunodifusión en agar gel (IDAG) por ser una técnica que no requiere equipos costosos de laboratorio para su uso.

Por lo tanto, el control de la enfermedad mediante la eliminación de reactores positivos depende de la realización de pruebas a la mitad del año o anual. Los factores que influyen sobre la presencia de la paratuberculosis sugieren que en cuanto más grande sea el total de animales en el predio, mayor será la seroprevalencia, y también que en cuanto más intensivo sea el manejo, es posible que exista más riesgo de Ptb, por el contagio fecal-oral propio de esta enfermedad. Las variaciones de Ptb entre rebaños, nos llevó a especular que el manejo es un factor que influye en la expresión de la Ptb y que las recomendaciones sobre este tema pueden mejorar en el rebaño el

control de la enfermedad en áreas con características similares a esta investigación. Confirmándose la naturaleza multifactorial de la paratuberculosis ovina. Pero dentro de un rebaño sin cambio en el manejo de la higiene del ganado, tales procedimientos no tienen éxito en la reducción de la transmisión de la infección. Varios estudios han demostrado que la vacunación es la mejor estrategia para el control de la paratuberculosis. Programas de vacunas sugieren fuertemente que la vacunación tiene más un efecto terapéutico que preventivo.

En el análisis de las secuencias de la región 3'UTR del gen SLC11A1 y su relación con la susceptibilidad / resistencia a la paratuberculosis, demuestran que los polimorfismos encontrados en el gen, presentes para cada tipo de estatus de infección a *Map* de los ovinos, son el reflejo a pequeña escala de la existencia de diferencias genéticas entre ellos, por la presencia ó ausencia de los fragmentos polimórficos específicos y relacionados con el estadio de la enfermedad. Los polimorfismos en cuanto al número de repeticiones en la 3'UTR, observados en los diferentes ovinos, podrían estar involucrados en los diferentes mecanismos de patogenia y virulencia descritos previamente en la literatura. Los alelos GT 22, 23, y 24 se encuentran con mayor frecuencia en animales negativos, lo que sugiere que podría ser un marcador para asociar la resistencia a la paratuberculosis ovina. En este estudio se encontró que estos alelos pueden estar asociados con la resistencia a la enfermedad, ya que estuvieron más frecuentes en ovejas sanas, y además también se encontraron en animales sanos que estuvieron en contacto con animales positivos, que pudieron ser capaces de infectarse fácilmente.

En México, las autoridades sanitarias tienen otras enfermedades prioritarias como la tuberculosis y la brucelosis. El conocimiento de la paratuberculosis no está bien establecido, debiéndose realizar más estudios para conocer su presencia en nuestro país. Uno de los problemas más graves con esta enfermedad es que la infección permanece en la explotación durante un prolongado periodo de tiempo, antes de que se observen signos clínicos y estos se pueden confundir con otras enfermedades.

Los propietarios de las explotaciones no comunican los casos de paratuberculosis, ya que una vez que no responden a tratamientos convencionales con desparasitantes y vitaminas, optan por vender sus animales antes que lleguen a la muerte.

Quizás en un futuro no muy lejano, la enfermedad pueda ser erradicada de las poblaciones domésticas mediante selección, con apoyo de las herramientas moleculares y génicas, de animales resistentes, tal como ya se está realizando para el caso de scrapie, considerando la alta dependencia de las enfermedades por micobacterias a la condición genética del individuo afectado.

Debido al número limitado de muestras de este trabajo será recomendable realizar otras investigaciones con un número mayor de individuos y de esta forma confirmar lo reportado aquí. Por otro lado, se deberán hacer campañas para difundir la importancia de la paratuberculosis y los daños que causa, para que así los productores puedan obtener las ganancias adecuadas a sus posibilidades dentro de los ámbitos inocuos de producción de alimentos.