

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA**  
**COLEGIO EN CIENCIAS AGROPECUARIAS**  
**MAESTRÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS**



**TESIS:**

**CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* A PARTIR DEL GEN IS900, EN OVINOS DE CULIACÁN, SINALOA**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS AGROPECUARIAS**

**PRESENTA:**

**MVZ. JORGE LUIS MIRANDA CAMACHO**

**DIRECTORA DE TESIS:**

**DRA. IDALIA ENRÍQUEZ VERDUGO**

**CO-DIRECTOR DE TESIS:**

**MC. HÉCTOR MANUEL LÓPEZ PÉREZ**

**ASESORES:**

**DRA. SOILA MARIBEL GAXIOLA CAMACHO**

**DR. RUBÉN BARAJAS CRUZ**

**CULIACÁN ROSALES, SINALOA MÉXICO, A AGOSTO DEL 2015**

ESTA TESIS FUE REALIZADA POR **JORGE LUIS MIRANDA CAMACHO**, BAJO LA DIRECCIÓN DEL CONSEJO PARTICULAR QUE SE INDICA, Y HA SIDO APROBADA POR EL MISMO, COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRO EN CIENCIAS AGROPECUARIAS**

CONSEJO PARTICULAR

DIRECTORA

\_\_\_\_\_  
DRA. IDALIA ENRÍQUEZ VERDUGO

CO-DIRECTOR

\_\_\_\_\_  
MC. HÉCTOR MANUEL LÓPEZ PÉREZ

ASESORA

\_\_\_\_\_  
DRA. SOILA MARIBEL GAXIOLA CAMACHO

ASESOR

\_\_\_\_\_  
DR. RUBÉN BARAJAS CRUZ

CULIACÁN ROSALES, SINALOA, AGOSTO DEL 2015

## **DEDICATORIA.**

A mis madre, María Herminia Camacho correa por darme la vida, apoyarme en todo momento, por enseñarme a luchar por lo que quiero y a trabajar para conseguirlo, gracias Mamá por estar a mi lado y darme su cariño, gracias Papá por guiarme desde el cielo.

A mi abuela María del Santos Correa, por apoyarme en todo momento, cuidarme, guiarme en el camino al paso del tiempo y orar para que siempre salgan las cosas lo mejor posible, con nada le pago sus consejos y todo el amor que me ha dado.

A mi novia Selene avilés Villarreal por darme tu amor, comprensión y apoyo en todas las decisiones de mi vida.

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios por permitirme cumplir una meta más en mi vida

A la Dra. Idalia Enríquez Verdugo por trasmitirme sus conocimientos, por su paciencia, por su comprensión y ayudarme en todo momento a la elaboración de esta tesis.

A la Dra. Soila Maribel Gaxiola Camacho por su amistad, por creer en mí, por trasmitirme sus conocimientos, por su confianza, por la oportunidad que me brindó de crecer profesionalmente y por su apoyo en todas las fases de mi formación.

Al MC. Héctor López por su amistad y su ayuda durante la realización de esta tesis, además de su paciencia y consejos durante esta etapa.

A la MC. Nohemí Castro Del Campo por sus enseñanzas, su amistad y por la ayuda a la realización de esta tesis.

A CONACYT y a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia por darme la oportunidad y las facilidades de estudiar un posgrado.

A todos los maestros que contribuyeron a mi formación durante este posgrado.

A todo el personal del laboratorio de parasitología por estar siempre apoyándome y dándome ánimos para seguir adelante en especial a la MC. Silvia del Carmen Cota Guajardo, MVZ Claudia Leonor Barraza Tizoc y MVZ Jesús Daniel Solís Carrasco.

A todos los compañeros de maestría y estudiantes de licenciatura que me brindaron su amistad y su ayuda desinteresadamente.

A todo el personal administrativo de la FMVZ que estuvieron siempre para brindarme su amistad y ayuda durante todo este tiempo.

CONTENIDO	PÁGINA
ÍNDICE DE CUADROS.....	VII
ÍNDICE DE FIGURAS.....	VIII
RESUMEN.....	IX
ABSTRACT.....	X
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. ANTECEDENTES.....	2
2.1. <i>Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis</i> ....	2
2.2. Paratuberculosis.....	3
2.3. Signos clínicos.....	3
2.4. Trasmisión y diseminación.....	4
2.5. Epidemiología y distribución.....	4
2.6. Importancia económica de la paratuberculosis...	6
2.7. Genoma Map.....	7
2.8. Genotipos.....	7
2.9. Caracterización genética de Map.....	7
2.10. Antecedentes directos.....	11
2.11. Secuencia de inserción 900.....	12
III. HIPÓTESIS.....	14
IV. OBJETIVOS.....	15
4.1. Objetivo general.....	15
4.2. Objetivos específicos.....	15
V. MATERIAL Y MÉTODOS.....	16
5.1. Ubicación.....	16
5.2. Tamaño de muestra.....	16
5.3. Criterio de inclusión.....	16
5.4. Extracción de ADN de heces.....	16
5.5. PCR del 16S ARNr.....	17
5.6. PCR anidado (IS900).....	17
5.7. PCR para secuenciación (IS900).....	17
7.8. Caracterización genética.....	18

<b>VI.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>19</b>
<b>6.1.</b>	<b>ADN.....</b>	<b>19</b>
<b>6.2.</b>	<b>PCR del gen 16S ARNr.....</b>	<b>19</b>
<b>6.3.</b>	<b>PCRn IS900.....</b>	<b>20</b>
<b>6.4.</b>	<b>PCR IS900.....</b>	<b>21</b>
<b>6.5.</b>	<b>Caracterización genética de Map.....</b>	<b>22</b>
<b>VII.</b>	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>23</b>
<b>VIII.</b>	<b>LITERATURA CITADA.....</b>	<b>24</b>

## **ÍNDICE DE CUADROS**

<b>CONTENIDO</b>	<b>PÁGINA</b>
Cuadro 1: Clasificación de Map con diferentes técnicas de caracterización molecular.....	10
Cuadro 2: Distribución de los tipos de cepas de Map por hospedador y regiones.....	10
Cuadro 3: Caracterización genética de Map en México.....	12
Cuadro 4: Polimorfismos de nucleótidos únicos y específicos de las diferentes cepas de Map.....	13

## **ÍNDICE DE FIGURAS**

<b>CONTENIDO</b>	<b>PÁGINA</b>
Figura 1: Micrografía de Map obtenida con microscopio electrónico de barrido en la Universidad de Wisconsin.....	2
Figura 2: Gel de Agarosa al 1%. Carril: 1 al 10, ADN de heces de ovino.....	19
Figura 3: Gel de agarosa 1%, carril 1 y 11 marcador de tamaño de 1 kb, carril 12 amplificación del gen 16S ARNr de <i>Mycobacterium spp.</i> .....	20
Figura 4: Gel de agarosa 1%, carril 1 y 11 marcador de tamaño de 50 pb, carril 12 y 13 amplificación del gen IS900 de <i>Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis.</i> .....	21
Figura 5: Gel de agarosa 1%, carril 1 marcador de tamaño de 1 kb, carril 4 y 6 amplificación del gen IS900 de <i>Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis.</i>	22
Figura 6: Identidad de la secuencia obtenida de Map, entre las 121 y 270 pb de la secuencia ya reportada.....	22



**CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* A PARTIR DEL GEN IS900, EN OVINOS DE CULIACÁN, SINALOA**

**JORGE LUIS MIRANDA CAMACHO**

**RESUMEN**

El agente causal de la paratuberculosis, *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* (Map), es una bacteria Gram positiva, ácido alcohol resistente, posee un tamaño aproximado de 1-2  $\mu\text{m}$  de longitud por 0.5  $\mu\text{m}$  de ancho, perteneciente al género *Mycobacterium*. Map está clasificada en tres grupos, debido a las diferencias genotípicas y fenotípicas encontradas por múltiples estudios de caracterización molecular aplicando diversas técnicas; tipo bovino o tipo "C, tipo ovino o tipo "S" y tipo "I". La técnica de caracterización genética más utilizada es el análisis de los polimorfismos de longitud de restricción (RFLP) por medio de sondas específicas del gen IS900, tras la digestión del ADN cromosómico con diferentes enzimas (IS900-RFLP). El gen IS900 es un segmento 1451 pb y se repite de 15 a 20 veces en el genoma de Map aproximadamente, debido a que ciertas regiones de las secuencias IS900 se consideran en general muy conservadas, la secuenciación y análisis de polimorfismos únicos y específicos se realiza para cada una de las cepas de Map. El objetivo del presente trabajo es caracterizar el gen IS900 de *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* en los ovinos de Culiacán, Sinaloa, para esto se extrajo ADN de heces de 50 ovinos en ranchos con antecedentes serológicos de la enfermedad, la identificación del gen 16S ARNr de *M. spp* se realizó por PCR, posteriormente por PCRn se amplificó el gen IS900, para caracterizar se realizó PCR del gen IS900 y se secuenció, por último se realizó el análisis *in silico* mediante el paquete BLASTn con las secuencias ya descritas en el GenBank®. La parte del gen IS900 secuenciado posee un 100% de identidad con los ya descritos. Indicando que en la posición 169 pb hay una citosina y en la 216 pb una guanidina, esto nos sugiere que en Culiacán, Sinaloa se encuentra la cepa tipo S (I).

**Palabras claves:** Map, Ovinos, ADN, PCR, Secuenciación.

## I. INTRODUCCIÓN

El agente causal de la paratuberculosis o enfermedad de Johne, *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* (Map), es una bacteria Gram positiva, ácido alcohol resistente, posee un tamaño aproximado de 1-2  $\mu\text{m}$  de longitud por 0.5  $\mu\text{m}$  de ancho, perteneciente al género *Mycobacterium*. La enfermedad se presenta principalmente en animales adultos de dos a tres años de edad y se caracteriza por una enteritis granulomatosa, lo que ocasiona una mala absorción de los nutrientes y por lo tanto una pérdida progresiva de la condición corporal. Map está clasificada en tres grupos, debido a las diferencias genotípicas encontradas por múltiples estudios de caracterización molecular aplicando diversas técnicas; tipo bovino o tipo "C" del inglés cattle, tipo ovino o tipo "S" del inglés sheep y tipo "I" de inglés intermediale. La determinación del tipo de cepa de un aislado determinado tiene gran importancia, ya que los tres grupos se diferencian por sus características genotípicas y fenotípicas. La técnica de caracterización genética más utilizada es el análisis de los polimorfismos de longitud de restricción (RFLP) por medio de sondas específicas del gen IS900, tras la digestión del ADN cromosómico con diferentes enzimas (IS900-RFLP). El gen IS900 es un segmento 1451 pb y se repite de 15 a 20 veces en el genoma de Map aproximadamente, debido a que ciertas regiones de las secuencias IS900 se consideran en general ser muy conservadas, se revisó y secuenció, para la detección de polimorfismos únicos y específicos para cada una de las cepas de Map. En México, el primer reporte de caracterización molecular de Map fue descrito por Chávez *et al.*, 2004, en caprinos, el cual corresponde al C, sin embargo también se han descrito el tipo I y S en la región centro de México; posteriormente, Correa *et al.*, 2013, en Mexicali, analizaron cinco muestras de ovino y uno de bovino, los cuales fueron identificados como tipo C. El objetivo del presente trabajo es caracterizar el gen IS900 de *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* en ovinos de Culiacán, Sinaloa.

## II. ANTECEDENTES

## 2.1. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*

El agente causal de la paratuberculosis o enfermedad de Johne, *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (Alfaro *et al.*, 2006), es una bacteria perteneciente al género *Mycobacterium*, el cual debe su denominación al aspecto fungoide de las colonias de *M. tuberculosis* (Sevilla, 2007). Johne y Frothingam fueron los primeros en describir la enfermedad, en 1895, tras demostrar la presencia del bacilo en el tejido intestinal infectado de bovinos mediante microscopía (Johne y Frothingam, 1895). En la actualidad hay descritas 147 especies dentro de este género, que a su vez se clasifica dentro de la familia *Mycobacteriaceae*, orden *Actinomycetales*, clase *Actinomycetes* (Castellanos *et al.*, 2009). Map es una bacteria aerobia, inmóvil, Gram positiva, ácido alcohol resistente (Bauerfeind *et al.*, 2009), posee un tamaño aproximado de 1-2  $\mu\text{m}$  de longitud por 0.5  $\mu\text{m}$  de ancho, presenta un alto porcentaje en lípidos respecto a la masa celular total (40%), lo que podría explicar su crecimiento en forma de agregados bacterianos y también la propiedad de ácido-alcohol resistencia, además contiene del 61 al 71% de Guanina y Citosina en su genoma (Sevilla, 2007).

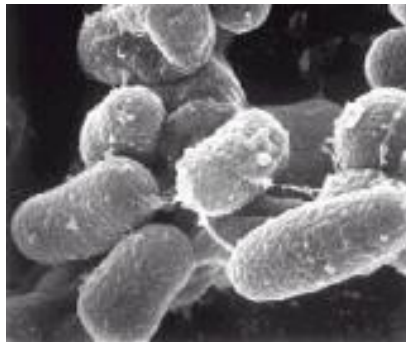


Figura 1: Micrografía de Map obtenida con microscopio electrónico de barrido en la Universidad de Wisconsin (Collins *et al.*, 1990).

## 2.2. Paratuberculosis

La Paratuberculosis es una enfermedad infecciosa de curso crónico, que afecta a los rumiantes domésticos y silvestres (Mancipe *et al.*, 2009), adquiriendo mayor importancia en las especies bovina (*Bos taurus*), ovina (*Ovis aries*) y caprina (*Capra hircus*) debido a los intereses adquiridos por el ser humano sobre estas (Sevilla, 2007), aunque ha sido aislado de muchas especies no rumiantes como caballos, cerdos, conejos, gatos, zorros, armiños, osos, comadreas, mapaches, armadillos, zarigüeyas, aves carroñeras, roedores, primates (Holzmann *et al.*, 2004). Además existen evidencias clínicas y experimentales que relacionan a Map con la enfermedad de Crohn en el humano la cual provoca una inflamación crónica del intestino, su presencia se ha confirmado mediante PCR y por aislamiento en cultivo a partir de biopsias de órganos, de leche materna y de sangre de pacientes afectados (Cirone *et al.*, 2007). La enfermedad se presenta principalmente en animales adultos de dos a tres años de edad y se caracteriza por una enteritis granulomatosa, lo que ocasiona una mala absorción de los nutrientes y por lo tanto una pérdida progresiva de la condición corporal y edemas en la región submandibular, encontrando lesiones localizadas en la mucosa del íleon, válvula ileocecal, ciego, colon proximal y linfonodos mesentéricos (Palmer *et al.*, 2005; Jaimes *et al.*, 2008). Esta enfermedad se encuentra distribuida en el ámbito mundial (Chávez *et al.*, 2004).

### **2.3. Signos clínicos**

En ovinos la paratuberculosis se caracteriza principalmente por la pérdida progresiva de la condición corporal (Sánchez *et al.*, 2009), y se manifiesta en la edad adulta (Cirone *et al.*, 2007), después de un periodo de incubación de alrededor de 1 a 2 años. Inicialmente se observa una disminución en índices reproductivos y de la producción de leche y carne, seguido de edema submandibular, pudiéndose encontrar edemas en párpados y labio superior, además los animales presentan pelo hirsuto, mucosas pálidas debido a la anemia, emaciación, fiebre y hasta la muerte (Hughes *et al.*, 2008). Puede aparecer diarrea acuosa y sin esfuerzo, de color verde oscuro (Tejedor, 1993), pero este signo no es frecuente, encontrándose en el 10 al 20% de los casos clínicos en las etapas terminales (Stehman *et al.*, 2002). La enfermedad clínica puede considerarse como el estado terminal de una infección crónica subclínica (Cirone *et*

*al.*, 2007) y solo el 3 al 10% de los animales infectados presentan signos clínicos (Hughes *et al.*, 2007), esto puede atribuirse a que se ha demostrado en diferentes estudios que la cepa tipo C es más patógena, mientras que la cepa tipo I y S pueden estar presentes en el animal durante todo su vida sin presentar algún signo característico de la paratuberculosis (Magnolia *et al.*, 2013).

#### **2.4. Trasmisión y diseminación**

La paratuberculosis es transmitida principalmente en animales jóvenes durante los primeros días de vida, a través de la vía fecal-oral, por la ingestión de alimento y agua contaminada con heces de animales infectados, además de la trasmisión intrauterina, calostro y leche contaminada (Mancipe *et al.*, 2009). Luego de la ingestión, la micobacteria penetra por endocitosis en las células de las placas de Peyer en el íleon y son transportadas en vacuolas dentro de los macrófagos (Juste *et al.*, 2000), invadiendo progresivamente la mucosa de íleon terminal, válvula ileocecal, ciego, colon proximal, ganglios mesentéricos y posteriormente todo el organismo a través de los vasos sanguíneos y linfáticos (Sevilla, 2007). La enfermedad cursa principalmente en forma subclínica, con un largo período de incubación y los signos clínicos son sólo una manifestación terminal de la infección. La bacteria es eliminada contaminando praderas e instalaciones ganaderas, siendo muy resistente a condiciones ambientales pudiendo permanecer viable de 270 días en charcos y hasta 47 meses en el suelo (Abalos, 2001). En la especie ovina, la cantidad de bacterias eliminadas en heces parece estar directamente relacionada con el tipo de lesiones, las ovejas con lesiones multibacilares excretarían los bacilos de manera constante, mientras que con otro tipo de lesiones la excreción sería intermitente, eliminando al día más de  $10^8$  CFU por gramo de heces (Sevilla, 2007).

#### **2.5. Epidemiología y distribución**

El intento por controlar la enfermedad mediante la vacunación, la quimioprofilaxis y el diagnóstico ha demostrado ser extremadamente difícil, sobre todo debido al largo periodo de incubación ya que los animales muestran signos cuando la enfermedad es crónica (Juste *et al.*, 2000), aun así se han establecido programas de control en países

como Australia, Noruega, Islandia, Japón, Países Bajos y Estados Unidos (OIE, 2007). La epidemiología de la enfermedad está ligada a las características biológicas del microorganismo, siendo de lento desarrollo, parasitismo obligado, alta resistencia ambiental, posibilidad de infección congénita y transmisión a través de la leche (Cirone *et al.*, 2007).

La paratuberculosis está distribuida a nivel mundial, en pequeños rumiantes se han registrado investigaciones sobre la prevalencia en Europa, Islandia, Gran Bretaña, Sudáfrica, Nueva Zelanda y Australia, donde estos sectores son relativamente más importante que en América del Norte (Stehman *et al.*, 2002). En México existen diversos estudios de infección por Map en diferentes especies de rumiantes, en caprinos de los alrededores de la ciudad de México se reveló una seroprevalencia del 6.73% (Chávez *et al.*, 2004). Jaimes *et al.*, 2008, trabajaron 204 muestras de heces y sueros de ovinos mayores de dos años, provenientes de explotaciones ubicadas en Guanajuato, Jalisco y Estado de México, determinando un 44.6% de positividad por medio de ELISA (91 sueros positivos), además realizaron 17 aislamientos de Map, presentando una 8.33% de positividad y al realizar el PCR se visualizó una banda amplificada en 210 pb que corresponde a la IS900 de Map, presentándose un 29.90% positivos (61 heces). Es importante mencionar que aunque la enfermedad se encuentra difundida a nivel mundial, en México, esta no se diagnostica en la mayoría de los casos o su diagnóstico no se realiza adecuadamente, por lo tanto la presencia de la enfermedad es relativa con respecto al número de casos detectados, subestimándose en muchas ocasiones (Romo *et al.*, 2010), otros estudios epidemiológicos en el País, indican que Cedillo *et al.*, 2010, encontraron una frecuencia baja (1.33%) de ovinos positivos a paratuberculosis en 5 hatos localizados en Sonora, mientras que Martínez *et al.*, 2010, demostraron que si existe seropositividad en la región centro occidente de México, siendo positivas el 27.6% (398/1442) de las muestras evaluadas con la prueba de ELISA, de estas el 12.2% en el ganado lechero resultó positivo, el 1.1% de bovinos de engorda, el 1.3% de ganado de lidia y el 12.8% en ovinos. Ponce, en el 2011, realizó el diagnóstico de paratuberculosis, utilizando 230 muestras del intestino de la región ileocecal de animales sacrificados en el rastro municipal del estado de Sinaloa, de las cuales 80

(34.78%) fueron de bovinos, 80 (34.78%) ovinos y 70 (30.43%) caprinos, obteniendo un total de 5 (2.17%) muestras positivas por la técnica Ziehl-neelsen de bovinos, sin embargo fue negativo para las muestras de ovinos y caprinos. Cuén, en el 2012, muestreó 381 animales en explotaciones ovinas de Culiacán, Sinaloa se encontraron 10 ovinos positivos a Paratuberculosis mediante la prueba de ELISA, lo cual corresponde al 2.6% del total de las muestras y 12 sospechosos lo que representa el 3.15% del muestreo.

## **2.6. Importancia económica de la paratuberculosis**

La paratuberculosis es responsable de generar importantes pérdidas económicas para la industria de la carne, leche y las relacionadas en todo el mundo (Hughes *et al.*, 2007), debido a que solo en algunas ocasiones existen manifestaciones clínicas de la enfermedad, escaso diagnóstico, así como un déficit en su control, siendo una enfermedad subestimada en nuestro País (Coromoto *et al.*, 2006; Chávez *et al.*, 2004). Las pérdidas pueden ser clasificadas como directas, indirectas o inaparentes (Abalos, 2001; Sevilla, 2007), dentro de los costos directos entrarían las pérdidas derivadas de la reducción de la producción de carne y leche de los animales, los costos derivados del control de la enfermedad como la contratación de médico veterinario, pruebas diagnósticas y sacrificio de animales. Se puede considerar como costos indirectos a la restricción del mercado, aumento del costo del manejo y mantenimiento del estatus sanitario (Abalos, 2001).

En pequeños rumiantes no se cuenta con mucha información sobre el impacto económico de esta enfermedad, sin embargo se ha establecido que los animales infectados producen un 15-16% menos leche (OIE, 2007). El impacto económico de la Paratuberculosis en México, es incierto, dado que no se tienen estudios del impacto económico de la enfermedad en ovinos (Miranda *et al.*, 2005). Se estima que aproximadamente el 22% del total ganado vacuno lechero y el 8% de todos los hatos de carne en los Estados Unidos han presentado la enfermedad de Johne, causando una pérdida anual de más de 200 millones de dólares solamente a la industria láctea (Eda *et al.*, 2006).

## 2.7. Genoma Map

La primera secuenciación del genoma completo Map, se llevó a cabo en el 2004 y depositado en la base de datos GenBank (Acceso: AE16958), donde el análisis mostró que Map tiene una única secuencia circular de 4, 829 781 pares de bases, con un contenido de G + C del 69.3%, el análisis también identificó 17 copias de la secuencia de inserción IS900, siete copias de IS1311 y tres copias de ISMav2 (Li *et al.*, 2005). Posteriormente, en el 2009 el mapeo óptico de Map se describió un tamaño de genoma de 4839 Kb en comparación con el Map previamente secuenciado que es de 4830 Kb., revelando la existencia de dos genomas de Map (Wu *et al.*, 2009).

## 2.8. Genotipos

Map está clasificada en tres grupos, debido a las diferencias genotípicas encontradas por múltiples estudios de caracterización molecular aplicando diversas técnicas; tipo bovino o tipo “C” del inglés cattle, tipo ovino o tipo “S” del inglés sheep y tipo “I” de inglés intermediale (Magnolia *et al.*, 2013). La determinación del tipo de cepa de un aislado determinado tiene gran importancia, ya que los tres grupos se diferencian por sus características genotípicas y fenotípicas, la cepa tipo ovino, está caracterizada por un crecimiento extremadamente lento y en su mayoría pigmentada, la cepa tipo bovino se caracteriza por un crecimiento lento no pigmentado y se han descrito como la más patógena y zoonótica, la cepa tipo intermedio, comprende cepas no pigmentadas con un tiempo de crecimiento entre la cepa tipo ovino y bovino (De Juan *et al.*, 2006)

## 2.9. Caracterización genética de Map

En el caso de *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis*, la técnica de tipado genético más utilizada es el análisis de los polimorfismos de longitud de restricción (RFLP) por medio de sondas específicas de IS900 y tras la digestión del ADN cromosómico con diferentes enzimas (IS900-RFLP) (Sevilla, 2007), que permite clasificar a Map en tres grupos: tipo “C” del inglés cattle, tipo “S”, del inglés sheep y tipo “I” de inglés intermediale (Chávez *et al.*, 2004). Llamados así por primera vez en 1990 por Collins *et al.*, donde analizaron 29 aislamientos de Map obtenidos de ovejas,



cabras y vacas procedentes de Nueva Zelanda, Australia, Canadá, Islas Feroe y Noruega. Tras digerir el ADN micobacteriano con la endonucleasa *BstEII*, obtuvieron 10 patrones de hibridación diferentes que fueron clasificados en tres grupos, debido a su predominancia en esas especies hospedadoras e intermedio (I), ya que dos ovejas procedentes de Canadá, estaban infectadas por otro tipo de cepa cuyo perfil de restricción estaba más próximo al de tipo ovino que al de tipo bovino. Posteriormente, en otro estudio, la aplicación del IS900-RFLP en cinco aislados de Map de ovejas obtenidas de Sudáfrica agrupó a todos los aislados dentro del perfil intermedio (Lisle *et al.*, 1992). El análisis IS900-RFLP con la enzima PvuII de aislamientos procedentes de 16 cabras de Noruega, 5 vacas y 2 ciervos de Dinamarca, una oveja de Grecia, y una oveja de las Islas Feroe, demostró que todos ellos eran similares entre sí, exceptuando el de la oveja de las Islas Feroe, que era marcadamente diferente (Thoresen *et al.*, 1994). Pavlik *et al.*, 1995, detectaron 3 grupos de patrones IS900-RFLP con la enzima PstI, consistentes con los descritos hasta el momento con otras enzimas, al estudiar 84 cultivos aislados de 70 animales (56 vacas, 13 ovejas y una cabra) procedentes de Europa (principalmente Eslovaquia y República Checa), uno de un paciente de Crohn estadounidense, y 5 de vacas australianas. En otro trabajo, fueron tipados y clasificados 28 aislamientos ovinos procedentes de África (26 de Marruecos y 2 de Sudáfrica), 7 caprinos, 9 bovinos de Alemania y 12 bovinos de Marruecos y EEUU, en base a la velocidad de crecimiento y el análisis IS900-RFLP con la enzima PvuII (Bauerfeind *et al.*, 1996), los cinco patrones diferentes hallados fueron clasificados en dos grupos: los denominados 1, 2 y 3, sólo fueron detectados en ovejas y fenotípicamente eran de crecimiento lento; contrariamente, todos los cultivos bovinos y caprinos fueron de crecimiento rápido, y todos compartían el mismo patrón de hibridación, a excepción de uno. En el año 2000, se llevaron a cabo dos importantes trabajos sobre epidemiología molecular en Australia y ambos subrayaron la restringida diversidad de cepas observada (Cuadro 2) (Cousins *et al.*, 2000; Whittington *et al.*, 2000).

Un grupo de investigación australiano desarrolló en 1999 una técnica rápida y sencilla (IS1311 PCR-REA) que permite diferenciar las cepas C y S de Map basada en la detección de mutaciones puntuales en la secuencia IS1311 (Marsh *et al.*, 1999). En un

trabajo posterior se pudo observar que existía un cuarto polimorfismo en la IS1311 en aislados de Map obtenidos de bisontes de EEUU (Whittington *et al.*, 2001), que denominaron tipo B (“bison type”, B). Las cepas tipo B dan patrones de RFLP agrupables con las de tipo C. Otra técnica prometedora para realizar el tipado genético de esta bacteria, es la electroforesis en gel de campo pulsado del genoma digerido. Tal y como se ha revisado anteriormente, el PFGE (Pulsed-field gel electrophoresis) ha sido de gran utilidad para el tipado de otras importantes micobacterias como *M. avium* y *M. tuberculosis*. En el primer trabajo publicado de tipado de Map por medio de PFGE, fueron comparados los patrones de restricción de 35 aislamientos (27 bovinos, 5 de alpacas, 2 ovinos y uno caprino) con varias endonucleasas (Feizabadi *et al.*, 1997). No se detectó ninguna variabilidad con Dral, sin embargo, XbaI y SpeI diferenciaron los cultivos en dos grupos muy similares entre sí.

En un intento de estandarizar el PFGE para el tipado de cepas de Map, Stevenson *et al.*, 2002, llevaron a cabo la caracterización molecular de 5 aislamientos pigmentados (todos ovinos) y 88 no pigmentados (18 ovinos y el resto procedentes de vacas, conejos, cabras, ciervos y otras especies silvestres) por el método PFGE (Stevenson *et al.*, 2002). Los enzimas elegidos para PFGE fueron *SnaBI* y *SpeI*, y los patrones distintos con cada enzima se designaron con un número, lo que da como resultado un perfil múltiple de campo pulsado con dos números para cada aislado. De ese modo, en esa muestra fueron descritos 16 perfiles múltiples que se agrupaban en dos grandes grupos o tipos (Tipo I y II). Las cepas comprendidas en el Tipo I, son de crecimiento más lento, con una fuerte preferencia de hospedador por la especie ovina, y aparentemente más virulenta para este tipo de hospedador. Las cepas comprendidas en el Tipo II son de crecimiento más rápido, y son comúnmente aisladas de vacas, cabras, ciervos y otras especies, incluyendo la humana. El tipado por medio de PFGE con enzimas *SnaBI* y *SpeI* de 44 nuevos aislamientos procedentes de cabras de España, Escocia, y Noruega (30, 11 y 3, respectivamente), reveló 10 nuevos perfiles múltiples. Uno de ellos fue hallado sólo en dos cabras españolas, y al diferir de los comprendidos en los Tipos I y II, fue descrito el Tipo III, un tipo intermedio considerado más cercano al Tipo I. Así, el Tipo I se podía considerar comparable al tipo S, el Tipo II al C, y el Tipo III al I (De Juan *et al.*, 2005). Recientemente se han observado por

medio de PCR cepas de Tipo I/III o IS1311-S infectando tanto a la especie ovina como a la caprina y a la bovina en España (De Juan *et al.*, 2006).

Cuadro 1: Clasificación de Map con diferentes técnicas de caracterización molecular.

IS900–RFLP <sup>1</sup>	IS1311PCR-REA <sup>2</sup>	PFGE <sup>3</sup>	RDA-PCR <sup>4</sup>
Bovino (C)	Bovino, Bisonte (C, B)	Tipo II	Tipo II
Ovino (S)		Tipo I	
Intermedio (I)	Ovino (S)	Tipo III	Tipo I

1 Clasificación inicial descrita por Collins *et al.*, 1990. 2 Clasificación según Whittington *et al.*, 2001. 3 Descripción de Stevenson *et al.*, 2002. 4 Clasificación según el trabajo publicado por Dohmann *et al.*, 2003.

Cuadro 2: Distribución de los tipos de cepas de Map por hospedador y regiones.

Especie	Cepa tipo C		Cepa tipo S e I	
	Autor	País	Autor	País
ovino	(Collins <i>et al.</i> , 1990; Thoresen <i>et al.</i> , 1994; Pavlik <i>et al.</i> , 1995; Stevenson <i>et al.</i> , 2002)	Canadá, EEUU, República Checa, Francia, Grecia, Australia, España y Reino Unido	(Collins <i>et al.</i> , 1990; Lisle <i>et al.</i> , 1992; Thoresen <i>et al.</i> , 1994; Bauerfeind <i>et al.</i> , 1996; Cousins <i>et al.</i> , 2000; Whittington <i>et al.</i> , 2000; Whittington <i>et al.</i> , 2001; Stevenson <i>et al.</i> , 2002; De Juan <i>et al.</i> , 2006)	Canadá, Nueva Zelanda, Islas Feroe, Sudáfrica, Marruecos, Australia, Islandia, Noruega, Reino Unido, EEUU y España
Caprino	(Collins <i>et al.</i> , 1990; Thoresen <i>et al.</i> , 1994; Bauerfeind <i>et al.</i> , 1996; Pavlik <i>et al.</i> , 1999; Cousins <i>et al.</i> , 2000; De Juan <i>et al.</i> , 2005; De	Nueva Zelanda, Noruega, Argentina, Alemania, Dinamarca, Italia, Reino Unido, Australia,	(Collins <i>et al.</i> , 1990; Pavlik <i>et al.</i> , 1995; De Juan <i>et al.</i> , 2005; De Juan <i>et al.</i> , 2006)	Nueva Zelanda, República Checa, y España

Bovino	Juan <i>et al.</i> , 2006) (Collins <i>et al.</i> , 1990; Thoresen <i>et al.</i> , 1994; Pavlik <i>et al.</i> , 1995; Bauerfeind <i>et al.</i> , 1996; Cousins <i>et al.</i> , 2000; Whittington <i>et al.</i> , 2000)	EEUU, y España Nueva Zelanda, Australia, EEUU, Dinamarca, República Checa, Eslovaquia, Hungría, Alemania, Francia, Marruecos, Reino Unido, Austria, Italia, Países Bajos, Eslovenia, España, Suecia, Argentina y Noruega	(Whittington <i>et al.</i> , 2001; De Juan <i>et al.</i> , 2006)	Australia, Islandia y España
humano	(Collins <i>et al.</i> , 1990; Pavlik <i>et al.</i> , 1999; Whittington <i>et al.</i> , 2000)	EEUU, República Checa y Australia		

---

## 2.10. Antecedentes directos

En México el primer reporte sobre caracterización genética de *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis*, fue descrito por Chávez *et al.*, 2004, en dos aislamientos de origen caprino del centro de México, mediante la técnica de RFLP empleando la sonda IS900 y la enzima de restricción *BstEII*, teniendo como resultado que el tipo de Map correspondía al C1, posteriormente Humara *et al.*, 2010, en muestras de leche provenientes de bovinos y caprinos del centro de México, mediante RFLP-IS900, encontraron los 3 tipos C, I y S. Magnolia *et al.*, 2013, en Mexicali, Baja California, analizaron cinco muestras de ovinos y uno de bovino provenientes de animales que presentaban signos compatibles con

paratuberculosis, los resultados de serología mostraron reacción positiva al ELISA y mediante el cultivo bacteriológico se obtuvieron tres aislamientos, dos de origen ovino y uno de origen bovino, los cuales fueron identificados como Map según la PCR IS900 y f57 y tipificados como Tipo C, mediante el ensayo de PCR IS1311 y análisis de endonucleasas de restricción (IS1311 PCR-REA).

Cuadro 3: Caracterización genética de Map en México.

Autor	Lugar	Especie	Técnica	Resultado
(Chávez <i>et al.</i> , 2004)	Centro de México	Caprinos	RFLP-IS900	“C”
(Humara <i>et al.</i> , 2010)	Centro de México	Caprinos y bovinos	RFLP-IS900	“C, I y S”
(Magnolia <i>et al.</i> , 2013)	Mexicali, Baja California	Ovinos y bovinos	IS1311PCR-REA	“C”

### 2.11. Secuencia de inserción (IS900)

El gen IS900 es un segmento 1451 pb y se repite de 15 a 20 veces en el genoma de MAP aproximadamente (Vansnick *et al.*, 2004). Una secuencia de inserción (IS) son unidades móviles de ADN que suelen ser capaces de incorporarse de un locus genético a otro. Este gen codifica para una transposas putativa 399 AA, p43 (Tizard *et al.*, 1992) y una proteína de funciones desconocidas Hed, (Doran *et al.*, 1994).

Dado que ciertas regiones de las secuencias IS900 se consideran en general ser muy conservadas, se revisó y secuenció, para la detección de polimorfismos únicos y específicos para cada una de las cepas de Map (Castellanos *et al.*, 2009; Semret *et al.*, 2006).

El primer reporte que describe la sustitución de una sola base fue publicado por Whittington *et al.*, 2001, donde encontró un polimorfismo en la posición 216 pb (G por A) en dicha secuencia. Posteriormente se observaron los mismos intercambios de nucleótidos en los aislamientos obtenidos a partir de agua de los ríos en el Reino Unido

(Pickup *et al.*, 2005; Pickup *et al.*, 2006). Semret *et al.*, 2006, revisaron la secuencia de inserción IS900 en 23 aislamientos de diferentes especies (incluyendo aislamiento de origen humano), encontrando el mismo polimorfismo en la posición 216 pb (G por A), mas sin embargo en este estudio se encontró un polimorfismo en la posición 169 pb (T por C) de esta secuencia. Pero no fue hasta en el 2009 donde Castellanos *et al.*, a partir de 23 cepas (I, II y III) de diferentes regiones geográficas de España, Escocia y Dinamarca, relacionaron estas sustituciones o cambios de bases con las diferentes cepas de Map, teniendo como resultado que existen polimorfismos de nucleótidos específicos y únicos para cada tipo de Map. En este estudio para la cepa tipo I se observó en la posición 169 y 216 pb una C y G respectivamente (no. FJ775181), cepa tipo II se encontró igualmente una C en la posición 169, mientras que en la posición 216 se observó una A (no. FJ775182), y para la cepa tipo III se observó un polimorfismo en la posición 169 pb de una C por T y la posición 216 se encontró una G.

Cuadro 4: Polimorfismos de nucleótidos únicos y específicos de las diferentes cepas de MAP.

Tipo de Map	Polimorfismos únicos de nucleótidos (Posición)	
	169 pb	216 pb
I (Ovino)	C	G
II (Bovino)	C	G/A
III (Intermedia)	C/T	A/G

### III. HIPÓTESIS

La cepa tipo S de *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* está presente en los ovinos de Culiacán, Sinaloa.

#### **IV. OBJETIVOS**

#### **4.1. Objetivo general**

Caracterizar el gen IS900 de *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* en los ovinos de Culiacán, Sinaloa.

#### **4.2. Objetivos específicos**

- Obtención de ADN de heces de ovinos.
- Detección del gen 16S ARNr de *Mycobacterium* spp por PCR.
- Identificación del gen IS900 de *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* por PCR anidado.
- Secuenciar el gen IS900 de *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* en ovinos.
- Analizar *in silico* el gen IS900 de Map.

## **V. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **5.1. Ubicación**



El presente trabajo se realizó en el laboratorio de parasitología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Sinaloa (FMVZ-UAS), en el municipio de Culiacán, Sinaloa, que se localiza a 24° 48´ latitud norte y 107° 23´ longitud oeste, con una altitud de 60 m sobre el nivel del mar. El clima es de tipo BS1 (h´) que corresponde al clima, semiseco muy cálido, con una temperatura anual promedio de 25.4° C y una precipitación pluvial media de 670.9 mm (INEGI, 2011).

## **5.2. Tamaño de muestra**

Se determinó mediante “selección intencionada o muestreo por conveniencia” siendo esta una técnica de muestro no probabilístico, quedando el tamaño de la muestra en manos del investigador (Thrusfield, 1990).

## **5.3. Criterio de inclusión**

Se tomaron muestras de heces de ovinos mayores de un año de edad, en ranchos con antecedentes de Map detectado por ELISA (Cuen, 2012). Las muestras se tomaron directamente del ano de los animales, en guantes de látex, las cuales fueron trasladadas al laboratorio de Parasitología de la FMVZ-UAS y se conservaron en refrigeración hasta su procesamiento.

## **5.4. Extracción de ADN de heces**

Para la extracción de ADN se tomaron 2 g de heces de cada muestra, se disolvieron en 50 ml de cloruro de N-cetylpiridinio (HCP) a 0.75% y se agitaron durante una hora en el agitador orbital a 250 rpm, después se dejó en reposo toda la noche a temperatura ambiente. Al día siguiente se tomaron 10 ml de sobrenadante (2.5 ml parte superior, 5 ml de la fase intermedia, 2.5 ml de la fase inferior) y se centrifugaron a 2,500 rpm/10 min, a la pastilla obtenida se le realizaron tres lavados con 5 ml de PBS estéril, posteriormente la pastilla fue sometida a los reactivos y columnas del kit comercial de extracción Quick-gDNA.

## **5.5. PCR del 16S ARNr**

Para la amplificación del gen 16S ARNr de *Mycobacterium* spp, se utilizaron 3 µl de cada ADN obtenido, la muestra se amplió a 25 µl (mezcla de reacción) que contiene dNTPs, buffer 10X, cloruro de magnesio, Taq polimerasa, Agua miliQ y los oligonucleótidos (D: 5' TGA TCT GGA CAA TGA CGG TTA CGG A 3') y (I: 5'CGC GGC ACG GCT CTT GTT 3') con los que se obtiene un producto de amplificación de 563 pb (Jaimes *et al.*, 2008). La mezcla de reacción se sometió a una temperatura inicial 94°C durante 5 min y 35 ciclos sucesivos, de desnaturalización a 94°C durante 1 min, hibridación 65°C durante 1 min, y elongación a 72°C durante 1 min, y posteriormente fueron observados en gel de agarosa al 1%, en cámara de luz ultravioleta (Sambrook *et al.*, 1989).

#### **5.6. PCR anidado (IS900)**

Para la segunda amplificación, 3 µL de la primera amplificación positiva a *Mycobacterium* spp fueron transferidos a microtubos de PCR con la misma cantidad y concentración de reactivos descritos anteriormente y los iniciadores (D: 5' GCC GCG CTG CTG GAG TTA A 3') y (I: 5' AGC GTC TTT GGC GTC GGT CTT G 3') con los que se obtiene un producto de amplificación del gen IS900 de 210 pb correspondiente a *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* (Jaimes *et al.*, 2008). Se utilizó el programa del termociclador anteriormente descrito y posteriormente fueron observados en gel de agarosa al 1%, en cámara de luz ultravioleta (Sambrook *et al.*, 1989).

#### **5.7. PCR para secuenciación (IS900)**

Una vez obtenidas las muestras positivas a *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis*, se tomaron 3 µL de la amplificación y fueron transferidos a microtubos de PCR que tendrán la misma cantidad y concentración de reactivos descritos anteriormente, con los iniciadores (5CCTTTCTTGAAGGGTGTTCG3) y (5CCACCAGATCGGAACGTC 3) que amplifican una región de 666 pb del gen IS900 donde se encuentran los polimorfismos únicos y específicos de cada tipo de cepa . Se utilizó el programa del termociclador anteriormente descrito con una modificación en la temperatura de hibridación a 58 °C durante 42 seg (Castellanos *et al.*, 2009).

### **5.8. Secuenciación molecular**

Los productos de PCR se observaron por electroforesis en gel de agarosa al 1%, una vez obtenidas las muestras positivas al PCR para secuenciar, se tomaron 25  $\mu$ L de cada reacción y 20  $\mu$ L de cada oligonucleótidos, posteriormente se mandó a secuenciar a la empresa MacroGen Corporation 1330 Piccard Dr. STE 205 Rockville, MD 20850 USA.

### **5.9. Análisis *in silico***

El análisis *In Silico* se realizó al contar con la secuenciación y comparar estas en el software BLASTn con las ya descritas en el GenBank®.

## **VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **6.1. ADN**

Se obtuvo ADN a partir de las 50 muestras de heces de ovinos, el cual se observó integro al ser observado en luz ultravioleta en el gel de agarosa al 1%, esto coincide con lo descrito por Maturrano *et al.*, 2012, donde evaluaron el mismo método de extracción de ADN, concluyendo que el protocolo de extracción comercial (QIAGEN) modificado permitió ADN en suficiente cantidad y calidad óptimo para PCR.

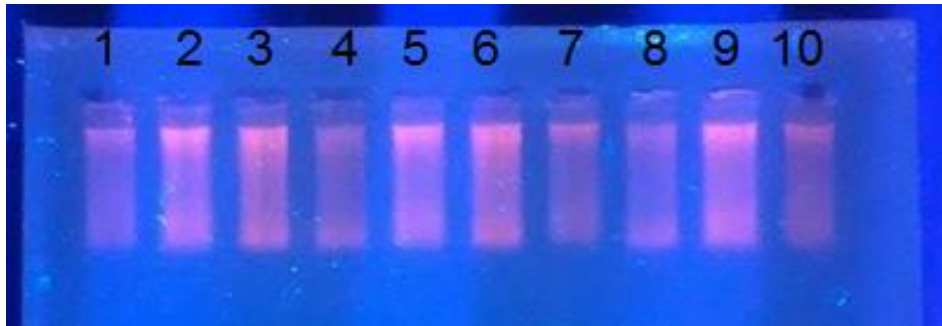


Figura 2: Gel de Agarosa al 1%. Carril: 1 al 10, ADN de heces de ovino.

## 6.2. PCR del gen 16S ARNr

El ADN purificado, se utilizó para la identificación del gen 16S ARNr de *Mycobacterium* spp por PCR, las amplificaciones se visualizaron aproximadamente en bandas de 560 pb en 6 de las 50 muestras (12%), al ser observadas en gel de agarosa al 1% con luz Ultravioleta y comparadas con marcadores de tamaño de 1 Kb DNA ladder como se muestra en la figura 3, lo que coincide con lo descrito por Jaimes *et al.*, 2008, para el gen 16S ARNr, donde ellos amplifican la misma región del 16S ARNr a 563 pb utilizando los mismo oligonucleótidos.

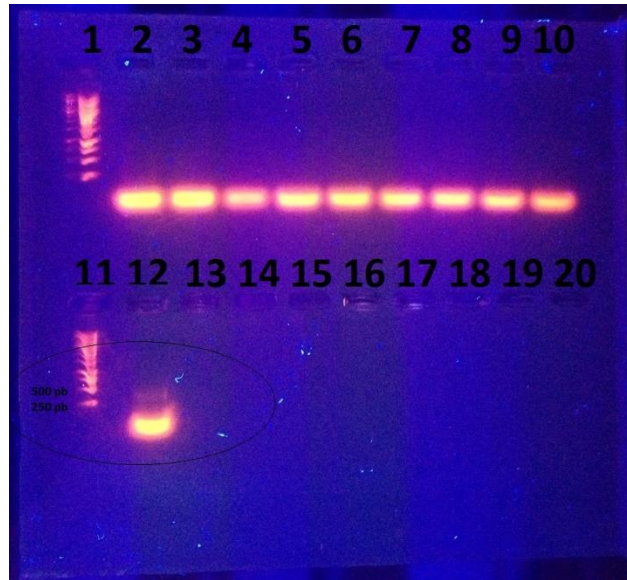


Figura 3: Gel de agarosa 1%, carril 1 y 11 marcador de tamaño de 1 kb, carril 12 amplificación del gen 16S ARNr de *Mycobacterium* spp.

### 6.3. PCRn (IS900)

Una vez obtenidas las muestras positivas a *Mycobacterium* spp se les realizó el PCR anidado, amplificando una región de 210 pb en 3 de la 6 muestras (6%), al ser observadas en gel de agarosa al 1% con luz Ultravioleta y comparadas con marcadores de tamaño de 50 pb DNA ladder como se muestra en la figura 4, estos resultados son similares a los descritos por Jaimes *et al.*, 2008, donde se visualiza una banda amplificada en 210 pb que corresponde a la IS900 de Map al utilizarlos mismos oligonucleótidos.

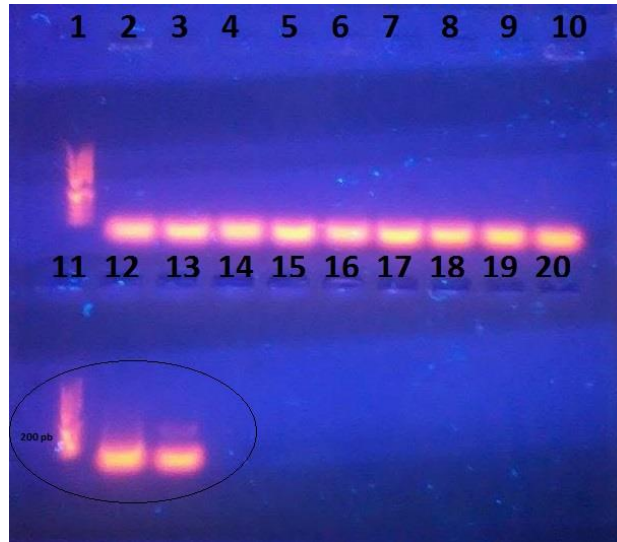


Figura 4. Gel de agarosa 1%, carril 1 y 11 marcador de tamaño de 50 pb, carril 12 y 13 amplificación del gen IS900 de *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis*.

#### 6.4. PCR IS900

Las muestras positivas a *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* se les realizó un PCR para secuenciación obteniendo un producto de amplificación de 666 pb en las 3 muestras, al ser observados en luz ultravioleta en gel de agarosa al 1% y comparadas con marcador de tamaño de 1kb DNA ladder, esto es similar a lo obtenido por Castellanos *et al.*, 2009 donde amplificó la misma región utilizando los mismos oligonucleótidos, con la finalidad de encontrar los polimorfismos únicos y específicos de cada cepa de Map anteriormente mencionados (Figura 5).

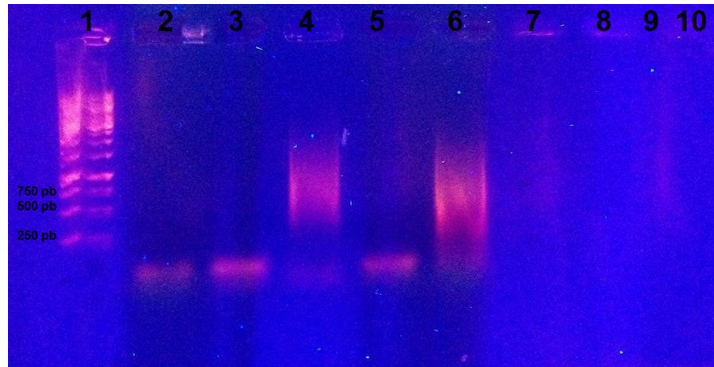


Figura 5: Gel de agarosa 1%, carril 1 marcador de tamaño de 1 kb, carril 4 y 6 amplificación del gen IS900 de *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis*.

### 6.5. Caracterización genética de Map

Se obtuvo la secuenciación del gen IS900 de *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* de una de las tres muestras positivas, mostró el 100% de identidad a la cepa tipo ovino (I) reportada por Catellanos *et al.*, 2009, con el número de acceso: FJ775181.1. Encontrando en la posición 169 pb una Citosina y en la 216 pb una Guanidina (Figura 6). En México esta cepa también fue identificada por Humara *et al.*, 2010, en muestras de leche provenientes de bovinos y caprinos del centro de México, mediante RFLP-IS900.

```

51  ACCGCTAATTGAGAGATGCGATTGGATCGCTGTGTAAGGACACGTCGGCGTGGTCGTCTG  110
|||||
121  ACCGCTAATTGAGAGATGCGATTGGATCGCTGTGTAAGGACACGTCGGCGTGGTCGTCTG  180

111  CTGGGTTGATCTGGACGATGACGGTTACGGAGGTGGTTGTGGCACAACCTGTCTGGGCGG  170
|||||
181  CTGGGTTGATCTGGACGATGACGGTTACGGAGGTGGTTGTGGCACAACCTGTCTGGGCGG  240

171  GCGTGGACGCCGGTAAGGCCGACCATTACT  200
|||||
241  GCGTGGACGCCGGTAAGGCCGACCATTACT  27

```

Figura 6: Identidad de la secuencia obtenida de Map, entre de las 121 y 270 pb de la secuencia ya reportada.

## VII. CONCLUSIÓN

De acuerdo con los resultados encontrados para el gen IS900, la cepa tipo ovino (I) de *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* está presente en los ovinos de Culiacán, Sinaloa. Encontrándose en la posición 169 pb una Citosina y en la 216 pb una Guanidina, nucleótidos únicos y específicos en esta región genómica para esta cepa, lo que indica que es un gen conservado.



## VIII. LITERATURA CITADA

- Abalos, P. 2001. Actualidad de la paratuberculosis. Departamento de medicina preventiva animal. Facultad de ciencias veterinarias y pecuarias de Chile.
- Alfaro, C., Rolo M., Clavijo, A. y Valle, A. 2006. Caracterización de la paratuberculosis bovina en ganado doble propósito de los llanos de Monagas, Venezuela. Rev. Zootecnia Trop. 24 (3):321-332.
- Bauerfeind, R., Benazzi, S., Weiss, R., Schliesser, T., Willems, H. y Baljer, G. 2009. Molecular Characterization of *Mycobacterium paratuberculosis* Isolates from Sheep, Goats, and Cattle by Hybridization with a DNA Probe to Insertion Element IS900. Journal of Clinical Microbiology. 34 (7):1617–1621.
- Bauerfeind, R., Benazzi, S., Weiss, R., Schliesser, T., Willems, H. y Baljer, G. 1996. Molecular characterization of *Mycobacterium paratuberculosis* isolates from sheep, goats and cattle by hybridization with a DNA probe to insertion element IS900. J.Clin.Microbiol. 34(7):1617-21.
- Castellanos, E., Aranaz, A., Juan, L., Alvarez, J., Rodríguez, S., Romero, B., Bezos, J. y Stevenson, K. 2009. Single Nucleotide Polymorphisms in the IS900 Sequence of *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* Are Strain Type Specific. Journal of Clinical Microbiology. Universidad Complutense de Madrid. España. 47(7): 2260-2263.
- Cedillo, Rivera, Molina, Munguía. 2010. Frecuencia de parásitos gastrointestinales en ovinos del sur de Sonora. Departamento de ciencias agronómicas y veterinarias, instituto tecnológico de sonora, Ciudad Obregón, Cajeme, Sonora.
- Chávez, G., Trigo, F., Svastova, P. y Pavlik, I. 2004. Identificación del polimorfismo genético de aislamientos de *Mycobacterium avium subespecie paratuberculosis* de caprinos del centro de México. Rev. Vet. Mex. 35 (1):1-7.

- Cirone, K., Morsella, C., Romano, M. y Paolicchi., F. 2007. *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis*: presencia en los alimentos y su relación con la enfermedad de Crohn. Rev. Argentina de Microbiología. 39:57-68.
- Collins, D., Gabric D. y Geoffrey W. 1990. Identification of Two Groups of *Mycobacterium paratuberculosis* Strains by Restriction Endonuclease Analysis and DNA Hybridization. Journal of Clinical Microbiology. 28, (7): 1591-1596.
- Coromoto, A., Morela, R. y Alberto, V. 2006. Caracterización de la paratuberculosis bovina en el ganado de doble propósito de los llanos de Mangas, Venezuela, Zootecnia tropical. 24(3):321-332.
- Cousins, D., Williams, S., Hope, A. y Eamens, G. 2000. DNA fingerprinting of Australian isolates of *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* using IS900 RFLP. Aust.Vet.J., 78(3):184-90.
- Cuén, B. 2012. Identificación de *Mycobacterium avium subsp. Paratuberculosis* en ovinos de Culiacán Sinaloa. Universidad autónoma de Sinaloa. Facultad de medicina veterinaria y zootecnia. Tesis de maestría.
- De Juan, L. Paratuberculosis caprina. Aportaciones a su diagnóstico, epidemiología molecular y control. 2005. Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid. Tesis Doctoral.
- De Juan, L., Álvarez, J., Aranaz, A., Rodríguez, A., Romero, B., Bezos, J., Mateos, A., y Domínguez, L. 2006. Molecular epidemiology of Types I/III strains of *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis* isolated from goats and cattle. Vet.Microbiol. 115, 102-110.
- Dohmann, K., Strommenger, B., Stevenson, K., de Juan, L., Stratmann, J., Kapur, V., Bull, T. y Gerlach, G. 2003. Characterization of genetic differences between *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* type I and type II isolates. J.Clin.Microbiol. 41, 5215-5223.

- Doran, T., Davies, J., Radford, A. y Hodgson, A. 1994. Putative functional domain within ORF2 on the *Mycobacterium* insertion sequences IS900 and IS902. Immunol. Cell Biol. 72; 427-434.
- Eda, S., Bannantine, J., Waters, W., Mori, Y., Whitlock, R., Scott M. y Speer C. 2006. A highly sensitive and subspecies-specific surface antigen enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of Johne's disease. Clin. Vaccine Immunol., 13(8):837-44.
- Feizabadi, M., Robertson, I., Cousins, D., Dawson, D. y Hampson, D. 1997. Use of multilocus enzyme electrophoresis to examine genetic relationships amongst isolates of *Mycobacterium intracellulare* and related species. Microbiology, 143(Pt4):1461-9.
- Holzmann, C., Jorge, M., Traversa, M., Schettino, D., Medina, L. y Bernardelli, A. 2004. Estudio del comportamiento epidemiológico de la paratuberculosis bovina mediante series cronológicas en Tandil, provincia de Buenos Aires, Argentina. Rev. sci. tech. Off. int. Epiz. 23 (3):791-799.
- Hughes, V., Bannantine, J., Denham, S., Smith, S. y Jill, S. 2008. Immunogenicity of proteome-determined *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis*-specific proteins in sheep with paratuberculosis. Clinical and vaccine immunologyvol. 12:1824–1833.
- Hughes, V., Stuart, S., Alfredo, G., Jill, S. y Stevenson, K. 2007. Proteomic comparison of *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis* grown in vitro and isolated from clinical cases of ovine paratuberculosis.
- Humara, F., Carrillo, C., Chavez, G. y Hernandez C. 2010. *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* detection in individual and bulk tank milk samples from bovine herds and caprine flocks. Foodborne Pathog Dis 7(4):351-355.
- INEGI. 2011. <http://www.inegi.org.mx/sistemas/mexicocifras/default.aspx?ent=25> consultado el 14 de Agosto de 2014.

- Jaimes, N., Santillán, M., Hernández, O., Cordova, D., Guzman, C., Arellano, B., Díaz, E., Tenorio, V. y Cuellar, A. 2008. Detección de *Mycobacterium avium subespecie paratuberculosis*, por medio de PCR-anidada a partir de muestras de heces de ovinos. Rev. Vet. Méx. 47(7): 2260–2264
- Johne, H. y Frothingham, L. 1895. Ein eigen thumlicher Fall von Tuberculose beim Rind. Deut.Zeits. Tiermed. Vergl. Pathol. 21, 438-454.
- Juste, R., Garrido, J. y Anduriz, G. 2000. Un siglo de controversia sobre la paratuberculosis: la situación actual del conocimiento de la infección. Rev. Med Vet. 17(5):88–101.
- Li, L., Bannantine, J., Zhang, Q., Amonsin, A., May, B., Alt D., Banerji, N., Kanjilal, S. y Kapur V. (2005). The complete genome sequence of *Mycobacterium avium subespecies paratuberculosis*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 102(35):12344-9.
- Lisle, G., Collins, D. y Huchzermeyer, H. 1992. Characterization of ovine strains of *Mycobacterium paratuberculosis* by restriction endonuclease analysis and DNA hybridization. Onderstepoort J.Vet.Res. 59, 163-165.
- Magnolia, C., Gerardo M. y Tomas R. 2013. Caracterización molecular de *Mycobacterium avium subespecie paratuberculosis* en bovinos y ovinos de Mexicali, Baja California, México. Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias, Autónoma de Baja California México. Rev. Mex. Cienc. Pecu. (4): 489-500.
- Mancipe, J., Sánchez, C. y Rodríguez, M. 2009. Estudio de la paratuberculosis en un rebaño de ovinos de la sabana de Bogotá mediante la utilización de tres técnicas diagnósticas. Revista de medicina veterinaria.18.
- Marsh, I., Whittington, R. y Cousins, D. 1999. PCR-restriction endonuclease analysis for identification and strain typing of *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* and *Mycobacterium avium subsp. avium* based on polymorphisms in IS1311. Mol. Cell. Probes, 13(2):115-26.

- Martínez, Romo, Guardiola, Ávila. 2010. Presencia de seropositividad a paratuberculosis en bovinos y ovinos de la región centro occidente de México.
- Maturrano, L., Aguilar, M., Krüger, P., Chávez, J., Rosadio, J. y Wheeler, J. 2012. Optimización de una técnica para la extracción de ADN de heces de vicuña (*Vicugna vicugna mensalis*). *Rev Inv Vet Perú*. 23 (3): 369-376.
- Miranda, B. 2005. Evaluación del impacto económico de la Paratuberculosis en ganado bovino lechero (sistema intensivo), en el Complejo Agropecuario Industrial Tizayuca, Hidalgo, México. (Tesis de Maestría), México D.F. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Clínica de bovinos. Universidad Nacional Autónoma de México.
- OIE, 2007. Paratuberculosis jhone´s disease. <http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/paratuberculosis.pdf>. Consultado el 20 de septiembre de 2014.
- Palmer, M., Stoffregen, W., Carpenter, J. y Stabel, J. 2005. Isolation of *Mycobacterium avium subsp paratuberculosis* (Map) from Feral Cats on a Dairy Farm with Map-infected Cattle. *Journal of Wildlife Diseases*. 41(3):629–635.
- Pavlik, I., Bejckova, L., Pavlas, M., Rozsypalova, Z. y Koskova, S. 1995. Characterization by restriction endonuclease analysis and DNA hybridization using IS900 of bovine, ovine, caprine and human dependent strains of *Mycobacterium paratuberculosis* isolated in various localities. *Vet. Microbiol*. 45, 311-318.
- Pickup, R., Rhodes, G., Bull, T., Arnott, S., Sidi-Boumedine, K., Hurley, M. y 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
- Pickup, R., Rhodes, G., Arnott, S., Sidi-Boumedine, K., Bull, T. J., Weightman, A., Hurley, M. y Hermon-Taylor, J. 2005. *Mycobacterium avium subsp.*

- paratuberculosis* in the catchment area and water of the River Taff in South Wales, United Kingdom, and its potential relationship to clustering of Crohn's disease cases in the city of Cardiff. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 2130-2139.
- Ponce, B. 2011. Frecuencia de paratuberculosis en intestinos de rumiantes domésticos sacrificados en un rastro de Culiacán, Sinaloa. Universidad autónoma de Sinaloa. Facultad de medicina veterinaria y zootecnia.
- Romo, M., Martínez R., Guardiola T. y Ávila F. 2010. Presencia de seropositividad a paratuberculosis en la región centro occidente de México. Memorias del VII congreso universitario de ciencias veterinarias. Pto. Vallarta, Jalisco.
- Sambrook, J, fritsch, E. y Maniatis, T. 1989. En: *Molecular cloning. Laboratory manual.* 2da. Edition. Cold spring harbor laboratory press.
- Sánchez, V., Arreiz, R., Becerra, R., Faria, N., Montero, M. y Oviedo, B. 2009. *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* Infection in a Criollo Limonero Herd Unidad de Investigaciones Clínicas, Facultad de Ciencias Veterinarias, Programa Regional de Control de Tuberculosis, Revista Científica, FCV-LUZ / XIX (6):555 – 565.
- Semret, M., Turenne, C. Y. y Behr, M. 2006. Insertion Sequence IS900 Revisited. *J. Clin. Microbiol.* 44, 1081-1083.
- Sevilla, A. 2007. Caracterización Molecular, Detección y Resistencia de *Mycobacterium avium subespecie paratuberculosis*. Memoria del trabajo realizado en Neiker-Tecnalia presentado por Iker Sevilla Agirregomokorta para optar al grado de Doctor en Biología por la Universidad del País Vasco.
- Stehman, S., Shulaw, W. 2002. Paratuberculosis (johnes disease) in sheep and goats. United States Animal Health Association.  
<http://www.usaha.org/reports/reports97/shgojd96.html>

- Stevenson K, Hughes VM, de Juan L, Inglis NF, Wright F y Sharp JM. 2002. Molecular characterization of pigmented and nonpigmented isolates of *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis*. J. Clin. Microbiol., 40(5):1798-804.
- Tejedor, M. 1993. Estudio epidemiológico de la paratuberculosis ovina en la provincia de Segovia. Departamento de patología animal, Madrid.
- Thoresen, O., Falk, K. y Evensen, O. 1994. Comparison of immunohistochemistry, acid-fast staining, and cultivation for detection of *Mycobacterium paratuberculosis* in goats. J. Vet. Diagn. Invest., 6(2):195-9.
- Thursfield, M. 1990. Epidemiologia veterinaria. ACRIBA, S. A. Zaragoza, España. 192-193.
- Tizard, M., Moss, M., Sanderson, J., Austen, B. y Hermon-Taylor, J. 1992. p43, the protein product of the atypical insertion sequence IS900, is expressed in *Mycobacterium paratuberculosis*. J. Gen. Microbiol. 138 (8): 1729-1736.
- Vansnick, E., De Rijk, P., Vercammen, F., Geysen, D., Rigouts, L. y Portaels, F. 2004. Newly developed primers for the detection of *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis*. Vet. Microbiol. 100, 197-204.
- Whittington, R., Hope, A., Marshall D., Taragel, C. y Marsh, I. 2000. 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(9):3240-8.
- Whittington, R., Lloyd, J. y Reddacliff, L. 2001. Recovery of *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* from nematode larvae cultured from the faeces of sheep with Johne's disease. Vet. Microbiol., 81(3):273-9.
- Wu, C., Glasner, J., Collins, M., Naser, S. y Talaat, A. 2009. Whole-genome plasticity among *Mycobacterium avium subspecies*: insights from comparative genomic hybridizations. J. Bacteriol. 188, 711-723.