

ARTÍCULO ORIGINAL

## Detección de *Mycobacterium avium paratuberculosis* en caprinos ubicados en una zona semi-árida en el municipio de Tecozautla Hidalgo

Estela Teresita Méndez Olvera, Ingrid Nerina Ramírez Lorenzo, Nora Rojas Serranía, Javier Lorenzo Olivares Orozco, Daniel Martínez Gómez

Laboratorio de Microbiología Agropecuaria, Departamento de Producción Agrícola y Animal, Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco. Calzada del Hueso 1100 Colonia Villaquietud CP 04960 México D.F.  
Correo electrónico: [dmartin@correo.xoc.uam.mx](mailto:dmartin@correo.xoc.uam.mx)

**RESUMEN:** La paratuberculosis o «Enfermedad de Johne» es una enfermedad infecciosa que afecta a los rumiantes domésticos principalmente ovinos, bovinos y caprinos. El agente etiológico de dicha enfermedad es *Mycobacterium avium paratuberculosis* (*Map*) y los principales signos de esta enfermedad son pérdida de peso y diarrea crónica, ocasionados como consecuencia de la enteritis granulomatosa producida por *Map*. Esta enfermedad ocasiona grandes pérdidas económicas en el sector pecuario. En Estados Unidos se estimó para el 2001, una pérdida anual de 150,000 millones de dólares; en México no hay estudios económicos de las pérdidas ocasionadas por esta enfermedad y son pocos los trabajos sobre la presencia del agente etiológico en distintas áreas. El objetivo de este trabajo fue identificar la presencia de *Map* en heces y muestras de suero de caprinos, utilizando técnicas de diagnóstico como PCR, ELISA y Tinción Ziehl-Neelsen (ZN). Se analizaron 139 muestras de heces y suero de diferentes hatos para la identificación de *Map*. Para la detección de *Map* por PCR se utilizaron dos pares de cebadores que detectan un segmento de la IS900, específica para *Map*. De las 139 muestras analizadas, siete de ellas fueron positivas por PCR, seis fueron positivas por la tinción ZN. En la prueba de ELISA cinco muestras resultaron positivas. Este trabajo es el primer reporte de la presencia de *Map* en Tecozautla Hidalgo y muestra la utilidad de las pruebas de diagnóstico molecular para establecer la presencia de agentes infecciosos que afectan la producción. También propone una nueva metodología de extracción de ADN de heces, la cual es compatible con métodos de detección basados en la técnica de PCR.

**Palabras clave:** *Mycobacterium avium paratuberculosis*, cabras, diagnóstico, PCR.

---

### Detection of *Mycobacterium avium paratuberculosis* in goats from a semi-arid region in Tecozautla Hidalgo municipality

**ABSTRACT:** Paratuberculosis or «Johne's disease» is an infectious disease that affects domestic ruminants mainly sheep, cattle and goats. The etiologic agent of this disease is *Mycobacterium avium paratuberculosis* (*Map*). The main signs of this disease include weight loss and chronic diarrhea caused as a result of granulomatous enteritis caused by *Map*. This disease causes severe economic losses in the livestock sector. In the United States it was estimated for 2001, an annual loss of 150.000 million dollars; in Mexico, there are no economic studies of the losses caused by this disease and there are few studies on the presence of the etiologic agent in different areas. The aim of this study was to identify the presence of *Map* in feces and serum samples from goats, using diagnostic techniques such as PCR, ELISA and Ziehl-Neelsen stain (ZN). One hundred-thirty nine samples of feces and serum from different herds were analyzed to identify *Map*. For the detection of *Map* by PCR, two primer pairs detecting a segment of the IS900-specific *Map* were used. From the 139 samples tested, seven of them were positive by PCR and six by ZN staining. In the ELISA test, five were positive. This work is the first report about the presence of *Map* in Tecozautla Hidalgo, and shows the utility of molecular diagnostic tests to establish the presence of infectious agents affecting production. It also proposes a new methodology for extracting DNA from feces, which is compatible with detection methods based on PCR.

**Key words:** *Mycobacterium avium paratuberculosis*, goats, diagnostic, PCR.

---

## INTRODUCCIÓN

La paratuberculosis (PTB) o «Enfermedad de Johne», es una enfermedad bacteriana producida por *Mycobacterium avium paratuberculosis* (*Map*), que afecta a ruminantes domésticos y salvajes, principalmente bovinos, ovinos y caprinos. El género *Mycobacterium* agrupa bacilos ácido alcohol resistentes, aeróbicos, no esporulados, no móviles y desprovistos de cápsula (1). *Mycobacterium avium paratuberculosis* causa enteritis y linfadenitis granulomatosa. La formación de granulomas se observa principalmente en nódulos linfáticos, pulmones, hígado, intestinos, bazo, pleura y peritoneo (1). La característica principal de la PTB es la pérdida de peso progresiva y la presencia de diarrea crónica (1,2).

La paratuberculosis tiene una distribución mundial y actualmente se considera una enfermedad emergente a pesar de su reconocimiento desde hace más de un siglo (3, 4, 5, 6,7). Esta enfermedad produce grandes pérdidas económicas, pero debido a que sólo en algunas ocasiones existen manifestaciones clínicas, su importancia ha sido subvalorada (1,4). En México existen reportes de paratuberculosis en ganado vacuno en el estado de Veracruz con un 13% de incidencia. En el caso de ganado caprino se han reportado casos en distintos estados de la República, incluso se ha calculado una seroprevalencia de 4.33% para el estado de Guanajuato, un 12% para Querétaro y un 15% para el estado de México (8). No obstante, en varias zonas rurales no existen reportes epidemiológicos, específicamente para la zona de estudio de este trabajo.

Las lesiones intestinales presentes en la paratuberculosis ovina y caprina se han clasificado en varios tipos, con base en la distribución de los granulomas y los grupos celulares encontrados, de esta forma se describen tres subtipos (9).

El diagnóstico de la paratuberculosis está basado en la identificación de *Map* en muestras clínicas. De manera clásica el aislamiento se realiza en medios de cultivo a los que se adiciona micobactina; sin embargo, en pocos casos se logra el aislamiento del microorganismo (10). También se han empleado diferentes métodos moleculares, los cuales ponen en evidencia la presencia de ADN del microorganismo (11,12). En el diagnóstico molecular de la paratuberculosis se han empleado diferentes técnicas basadas en la amplificación de la secuencia de inserción 900 (IS900) por medio de la técnica de PCR, exitosa en la detección de *Mycobacterium avium paratuberculosis* (13,14,15,16). Otra prueba

diagnóstica para la paratuberculosis, es la prueba de ELISA para la detección de anticuerpos (13).

No obstante, el desarrollo de un gran número de sistemas de diagnóstico los datos epidemiológicos siguen siendo insuficientes. En este trabajo se emplearon las pruebas de ELISA y PCR, así como la tinción de Ziehl Neelsen para establecer la presencia de *Map* en distintos hatos de caprinos ubicados en una zona caprinocultora del estado de Hidalgo.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Cepas

Se empleó una cepa de campo de *Mycobacterium avium paratuberculosis*, donada por el Dr. Marco Antonio Santillán del CENID Microbiología INIFAP, esta cepa fue utilizada como control positivo en el ensayo de PCR.

### Muestras

A finales del año 2008, se colectaron 139 muestras de heces y sangre de caprinos de 1 a 3.5 años de edad en la comunidad La Mesilla, en el municipio de Tecozautla. Este municipio se ubica en el Estado de Hidalgo, entre los paralelos 20° 48' de latitud, -99° 67' de longitud, a una altitud de 1,890 msnm. En esta zona se ubican productores de tipo rural con producciones con un bajo nivel de tecnificación con escasas prácticas de medicina preventiva y la producción caprina es de tipo extensivo. Se trabajaron con 8 hatos diferentes, todos sospechosos a *Map*. Las heces fueron colocadas en bolsas y las muestras de sangre en tubos con vacío sin anticoagulante. Después de colectadas, las muestras fueron colocadas en un termo con hielo para su conservación y posterior análisis en el Laboratorio de Microbiología Agropecuaria de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco.

### Tinción Ziehl-Neelsen (ZN)

Todas las muestras de heces fueron analizadas por medio de la tinción especial para ácido alcohol resistente (17), la cual básicamente pone en evidencia la presencia de bacilos ácidos alcohol-resistente, compatibles con *Map*.

### Extracción de ADN de muestras de heces

En un microtubo se mezclaron cada una de las muestras de heces (200 mg), con 800 µl de solución amortiguadora de fosfatos (1.9 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 8.1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 154 mM NaCl) y se centrifugaron a 11 200 g durante 2 minutos. Los sobrenadantes fueron transferidos a tubos nuevos y se les adicionó 500 µl de solución de lisis (5M Tiocianato de Guanidina, 10%

Sarkosyl), dejando reposar la mezcla 15 minutos en hielo. Transcurrido este tiempo se adicionó 500 µl de cloroformo y se mezcló por inversión varias veces. Posteriormente, los tubos fueron centrifugados a 11 200 g por 2 minutos y el sobrenadante fue transferido a un tubo nuevo. A este sobrenadante se le agregó 10 µl de poliacrilamida al 0.25% (0.25% poliacrilamida, 40 mM Tris HCl pH 8.0, 20 mM Acetato de sodio, 1 mM EDTA pH 8.0) y 400 µl de isopropanol puro, el cual se mezcló por inversión siete veces. Los tubos fueron colocados en hielo durante 5 minutos y después se centrifugaron a 4°C a 12 200 g durante 10 minutos. Finalmente el sobrenadante fue retirado y la pastilla obtenida se secó en una incubadora a 37°C, para agregar posteriormente 15 µl de solución TE (10mM Tris HCl pH 8.0, 1 mM EDTA). El ADN obtenido fue visualizado por medio de electroforesis en geles de agarosa al 0.8% teñidos con bromuro de etidio (0.5 µg/ml) y documentado mediante fotografía.

#### PCR anidado para la detección de *Map*

Para la primer amplificación se emplearon los iniciadores externos IS 900-F (5' TGATCTGGA CAATGACGGTTACGGA 3') e IS 900- R (5' CGCGGCACGGCTCTTGTT 3'), los cuales amplifican un producto de 563 pb (18). La reacción de PCR contenía: 45 µl de mezcla para PCR (22mM Tris-HCl pH 8.4, 1.65 mM MgCl<sub>2</sub>, 220 µM dGTP, 220 µM dATP, 220 µM dCTP, 220µM dTTP, 2 U de *Taq* polimerasa (Promega) 300 pM del primer IS900-F, 300 pM del primer IS900-R y 2 µl de muestra de ADN. Las condiciones de los ciclos de la PCR fueron: desnaturalización inicial de 94° C por 3 minutos, para continuar después con 35 ciclos de 94° C por 1 minuto, 56° C por 1 minuto y 72°C por 1 minuto. Para la segunda amplificación (PCR anidado) se tomaron 5 µl del producto amplificado y se agregaron a una nueva reacción de PCR, ahora con los iniciadores internos IS 900-I-F (5' GCCGCGCTGCTGGAGTTGA 3') e IS 900-I-R (5' AGCGTCTTTGGCGTTCGGTCTTG 3'), los cuales generan un producto de 210 pb, las condiciones de este ciclo de PCR fueron las mismas. Los productos obtenidos de esta segunda amplificación fueron visualizados mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% teñidos en bromuro de etidio (18).

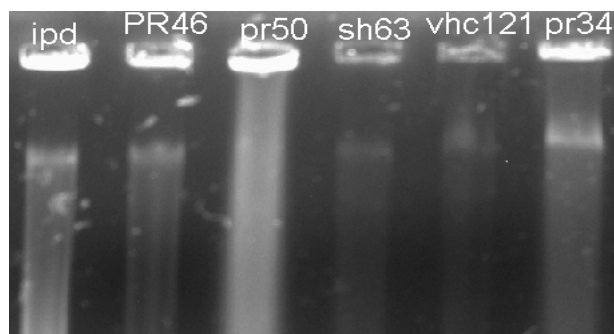
#### ELISA

Solo se utilizaron los sueros de los animales pertenecientes al hato con amplificaciones positivas para *Map*. Se empleó un sistema comercial «Paratuberculosis Screening Ab kit» (IDEXX Laboratories, Inc., Westbrook, ME) (19) siguiendo las especificaciones del fabricante, para la realización de la técnica.

## RESULTADOS

### Extracción de ADN de muestras de heces

Se realizó el procedimiento de extracción y visualización de ADN a las 139 muestras. De estas muestras, solo en 54 hubo presencia clara de ADN. En la (Figura 1) se observa el ADN extraído de algunas muestras, como se aprecia en esta figura, el ADN obtenido muestra una ligera degradación, la cual no afectó el desarrollo de la técnica de PCR, también se logró apreciar en algunas muestras la presencia de ARN, lo cual es normal dado el protocolo de extracción empleado.



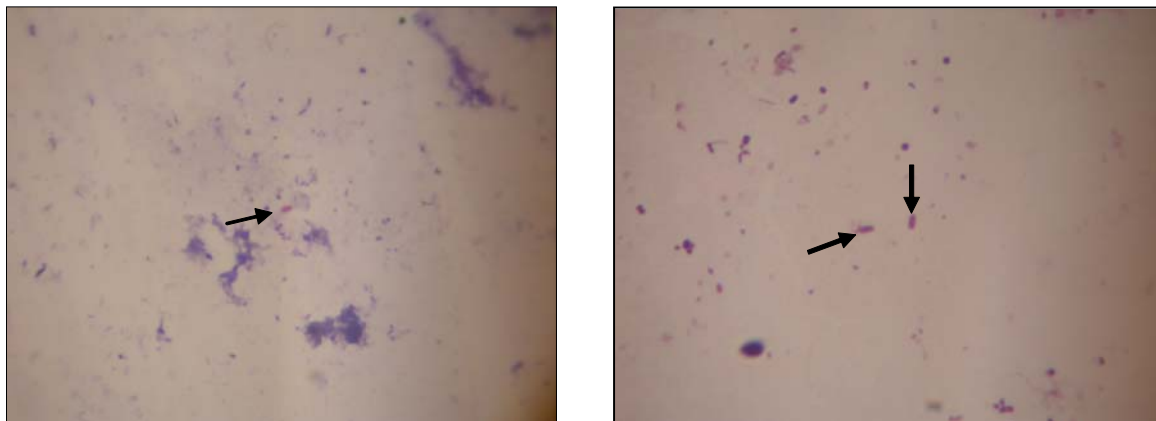
**FIGURA 1.** Gel de agarosa al 0.8% teñido con bromuro de etidio. ADN obtenido de las muestras de heces: Líneas ipd, sh63 y vhc121: muestras correspondientes al hato D; líneal PR46: muestra del hato F; línea pr50: muestra del hato E; línea pr34: muestra del hato G./ *Agarose gel 0.8% stained with ethidium bromide. DNA obtained from fecal samples: Lines ipd, SH63 and vhc121: samples corresponding to herd D, line PR46: herd sample F; line PR50: herd sample E; line PR34: herd sample G.*

### Tinción Ziehl-Neelsen (ZN)

En el análisis de las muestras por la tinción ZN, de las 139 muestras analizadas 6 fueron positivas a la tinción, es decir se apreciaron bacilos ácido alcohol-resistentes compatibles con *Map* (Figura 2, Tabla 1). Para el hato A, las 4 muestras positivas representan el 20%, mientras que para el hato D se observó el 4% de muestras positivas a la tinción, y por último en el hato H se obtuvo una muestra positiva a la tinción, lo que representa el 8.3% del total del hato.

### PCR anidado

Previo a su empleo con las muestras, la técnica de PCR fue estandarizada empleando ADN de una cepa de *Map*. Este ADN fue empleado en todos los análisis como control positivo. De todas las muestras analizadas, en 7 se obtuvieron resultados positivos en la PCR anidado (Figura 3). Es de señalar que estas 7 muestras fueron del hato A, coincidiendo con



**FIGURA 2.** Resultados obtenidos en la tinción de ZN. Las flechas indican la presencia de Bacilos ácido alcohol-resistentes sugerentes de la presencia de *Map*./ *Results obtained in ZN staining. The arrows indicate the presence of acid-alcohol resistant bacilli, suggesting the presence of Map.*

**TABLA 1.** Detección directa e indirecta de *Map* en muestras de heces, por PCR anidado, tinción ZN y ELISA respectivamente./ *Direct and indirect detection of Map in feces samples by nested PCR, ZN staining and ELISA, respectively.*

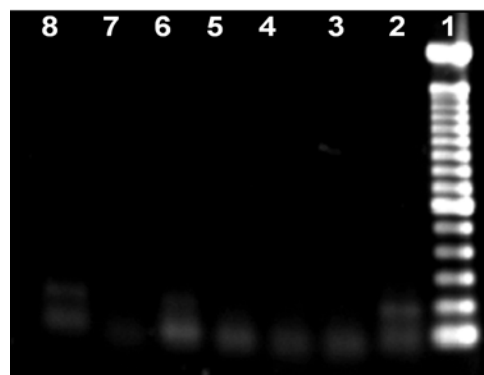
# Hato	No. muestras	Tinción ZN +	PCR Anidado	ELISA positivos
A	17	4	7	5
B	14	0	0	nd
C	3	0	0	nd
D	25	1	0	nd
E	13	0	0	nd
F	22	0	0	nd
G	30	0	0	nd
H	12	1	0	nd
<b>TOTAL</b>	<b>136</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>5</b>
<b>Porcentaje</b>		<b>8.16 %</b>	<b>9.52%</b>	<b>6.8%</b>

nd: no determinado

tres muestras positivas a la tinción ZN y cinco a ELISA (Tabla 1). Estas siete muestras representan el 5.03% del total de las muestras; y el 35% del total de muestras del hato 1, donde hubo una mayor frecuencia de muestras positivas a *Map*.

#### Análisis de los sueros por ELISA

Sólo se analizaron los sueros de los hatos positivos a *Map* por PCR y tinción de ZN, los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 2, donde se incluyen valores de referencia negativos y positivos. Utilizando estos datos se estableció un punto de corte de 0.438, de acuerdo a lo propuesto por Kurstak (20). Considerando este valor, las muestras A3, A18, A8,



**FIGURA 3.** Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. Amplificaciones obtenidos en muestras positivas por PCR anidado. Línea 1: marcador de peso molecular de 100 pb; línea 2: muestra A1; línea 3: muestra A2; línea 4: muestra A6; línea5: muestra A11; línea 6: muestra A13; línea 7: muestra A18; línea 8: control Positivo./ *Agarose gel 1% stained with ethidium bromide. Amplifications obtained by nested PCR from positive samples. Line 1: molecular weight marker 100 bp, line 2: sample A1, line 3 shows A2, line 4 sample A6; línea5: sample A11, line 6 sample A13, line 7 sample A18; line 8: Positive Control.*

A11 y A16 fueron positivas. Para el caso de las muestras A11 y A18 los resultados coinciden con los obtenidos en la prueba de PCR.

## DISCUSIÓN

La paratuberculosis es una enfermedad infecciosa de distribución mundial que afecta negativamente a la producción pecuaria. En México la situación sobre la incidencia de esta enfermedad es desconocida y son

**TABLA 2.** Valores de  $A_{405}$  obtenidos en la prueba de ELISA indirecto con los sueros de los animales de los hatos positivos a *Map* por PCR /  $A_{405}$  values obtained in indirect ELISA test using animal sera from positive herds to *Map* by PCR.

	Muestra	☒	DS
	c+	1,739	0,074
	c-	0,354	0,042
<b>1</b>	<b>a3*</b>	<b>0,517</b>	<b>0,034</b>
2	a4	0,374	0,007
3	a1	0,391	0,014
4	a7	0,397	0,018
5	a10	0,427	0,081
<b>6</b>	<b>a18*</b>	<b>0,570</b>	<b>0,006</b>
7	a9	0,319	0,078
8	a6	0,344	0,011
<b>9</b>	<b>a8*</b>	<b>0,494</b>	<b>0,024</b>
10	a12	0,399	0,027
<b>11</b>	<b>a11*</b>	<b>0,542</b>	<b>0,052</b>
12	a14	0,334	0,009
13	a13	0,390	0,070
14	a19	0,249	0,004
15	a17	0,356	0,023
<b>16</b>	<b>a16*</b>	<b>0,475</b>	<b>0,001</b>
17	a15	0,395	0,069

\*animales considerados como positivos

pocos los reportes que se tienen en pequeños rumiantes. En este trabajo se reporta la presencia de *Map* en un hato caprino en Tecozautla, Hidalgo, siendo el primer reporte de *Map* en esta área. Previamente Chávez *et al.* (8) realizaron una búsqueda de este microorganismo utilizando diferentes metodologías en un hato caprino localizado en el valle de México. Este trabajo de conjunto con el anterior constituyen los primeros reportes de *Map* en caprinos.

Para la determinación de la presencia de un agente infeccioso en una población se han diseñado distintas metodologías, lógicamente la primera de ellas es el aislamiento; sin embargo, para muchos microorganismos patógenos, especialmente los del género *Mycobacterium* spp., el aislamiento es difícil y representa un riesgo pues algunas especies dentro de este género son consideradas zoonóticas (10,18). En este trabajo se utilizaron métodos directos e indirectos, en el primer caso se decidió utilizar un método molecular basado en la técnica de PCR el cual pone en evidencia la presencia de ADN en muestras clínicas. Este método tiene la ventaja además de que al no trabajar directamente con el agente es un método seguro. Con esta metodología se lograron identificar siete muestras positivas, de un total

de 139. Las muestras positivas eran de animales pertenecientes al mismo hato, donde se estudiaron 20 muestras. Chávez *et al.* (8) trabajando con un solo hato de 27 animales, lograron el aislamiento en 4 casos y tardaron aproximadamente 14 semanas; en nuestro caso, la identificación de animales positivos solo requirió dos días.

En este trabajo también se presenta un nuevo protocolo de extracción de ADN a partir de muestras de heces, este procedimiento utiliza Isotiocianato de guanidina y permite extraer eficientemente ácidos nucleicos. Este método no había sido utilizado antes, pues en varios de los trabajos donde se emplean como muestras heces se utilizan sistemas comerciales que incrementan el costo del análisis (21,22); sin embargo, en este caso el método desarrollado tiene un bajo costo.

La observación directa en muestras clínicas de microorganismos del género *Mycobacterium* (baciloscopia) es otro método de identificación, el cual aprovecha la capacidad de estas bacterias para retener el colorante primario, aún después de la decoloración con alcohol ácido, situación que solo los organismos ácido alcohol resistentes (AAR) pueden mostrar, descartando otros géneros bacterianos presentes en heces, como bacilos gran negativos o positivos. Zimmer *et al.* (23) reportaron en el año 1999, que la prueba de tinción de Ziehl-Neelsen tiene una sensibilidad del 49,3% en animales con signos clínicos y del 19,3% en animales subclínicos. Cabe aclarar en este punto que esta misma prueba en cortes histológicos ha servido para establecer de manera contundente la relación de *Mycobacterium* spp. con el desarrollo de lesiones granulomatosas en el intestino.

Por otra parte Tripathi *et al.* (16) trabajando con muestras de intestino de cabras lograron establecer una correlación del 80% en muestras de intestino con lesiones e histología sugerentes a *Map* y amplificación de la IS900 en la prueba de PCR. En este trabajo se mostró la presencia de bacilos AAR en 6 muestras de heces, considerando los datos anteriores podría decirse que estos animales eran positivos a *Map*. De manera similar a otros trabajos, los resultados obtenidos en la baciloscopia se correlacionan con los resultados obtenidos en la PCR.

Whittington *et al.* (24) reportaron que *Mycobacterium avium paratuberculosis* no puede ser detectado mediante técnicas de aislamiento en animales con menos de dos años de edad que están infectados con la bacteria, ya que eliminan niveles mínimos de *Mycobacterium avium paratuberculosis*. En este aspecto en el presente trabajo se obtuvieron siete muestras positivas a *Mycobacterium* por la técnica de PCR

en muestras de animales menores de tres años, estableciendo que esta técnica podría utilizarse en animales jóvenes, para diagnosticar la paratuberculosis.

Finalmente, en lo referente a los datos obtenidos en el ELISA, solo se analizó el hato positivo por PCR; en este hato la incidencia de paratuberculosis fue del 25%. Sin embargo, existieron animales muy cercanos al punto de corte (20), los cuales fueron negativos en este trabajo, por lo que el valor de incidencia podría ser más alto. En este aspecto si bien la prueba serológica ELISA tiene una sensibilidad más alta, es importante aclarar que existen también distintos factores que interfieren en ella, como el estado del animal. Tripathi *et al.* (16) estudiaron, mediante PCR y ELISA animales infectados, y encontraron que para algunos casos, no hubo presencia de títulos altos, incluso algunos eran negativos, lo que coincide con los resultados vistos en este trabajo.

## CONCLUSIONES

Se demostró la presencia de *Mycobacterium avium paratuberculosis* con la prueba de diagnóstico de PCR basada en la detección de la secuencia de inserción IS900, la tinción de ZN y el ELISA, en un hato caprino en Tecozautla, Hidalgo. Es necesario que se realicen más estudios en diferentes áreas de México para descartar o confirmar la presencia de *Map*, ya que no existe la suficiente información con respecto a *Map* en cabras.

## REFERENCIAS

- Harris NB, Barletta RG. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Veterinary Medicine. Clin Microbiol Rev. 2001;14(3):489-512.
- Villarino MA, Scott HM, Jordan ER. Influence of parity at time of detection of serologic antibodies to *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* on reduction in daily and lifetime milk production in Holstein cows. J Anim Sci. 2011;89:267-276.
- Weigand PV, Goethe R. Pathogenesis of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infections in ruminants: still more questions than answers. Microb Infect. 1999;1(13):1121-1127.
- Carslake D, Grant W, Green Laura E, Cave J, Greaves J, Keeling M, et al. Endemic cattle diseases: comparative epidemiology and governance. Phil Trans R Soc B. 2011;366:1975-1986.
- Fiorentino MA, Gioffré A, Cirone K, Morsella C, Alonso B, Delgado F, et al. First isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in a dairy goat in Argentina: Pathology and molecular characterization. Small Rum Res. 2012;108(1-3):133-136.
- Maheshwari A, Fakhruddin F, Tanwar RK, Chahar A, Singh AP. Seroprevalence of paratuberculosis in goats in Bikaner. Vet Pract. 2012;13(1):28-29.
- Medeiros L, Junior FG, Almeida AP, Lucena EA, Riet-Correa F. Paratuberculosis in goats and sheep in the state of Paraíba. Pesquisa Veterinaria Brasileira. 2012;32(2):111-115.
- Chávez GG, Trigo TF, Svastova P, Pavlik I. Identificación del polimorfismo genético de aislamientos de *Mycobacterium avium paratuberculosis* de caprinos del centro de México. Vet Mex. 2004;35(1):72-82.
- Preziuso S, Magi GE, Renzoni G. Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in intestinal and mammary tissues and in lymph nodes of sheep with different techniques and its relationship with enteric lesions. Small Rum Res. 2012;105:295-299.
- De Juan LÁJ, Romero B, Bezos J, Castellanos E, Aranaz A, et al. Comparison of Four Different Culture Media for Isolation and Growth of Type II and Type I/III *Mycobacterium avium paratuberculosis* Strains Isolated from Cattle and Goats. Env Microb. 2006;72 (9):5927-5932.
- Hailat N, Fayyad A, Ababneh M, Hananeh W, Rezig FE, Jaradat S. PCR- restriction endonuclease analysis of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolates from goats, sheep and cattle in Jordan. Comp Clin Pathol. 2012;21(5):755-760.
- Forde T, Kutz S, de Buck J, Warren A, Ruckstuhl K, Pybus M, et al. Occurrence, diagnosis, and strain typing of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection in rocky mountain bighorn sheep (*Ovis canadensis canadensis*) in southwestern Alberta. J Wildlife Dis. 2012;48(1):1-11.

13. Díaz FO, Banda VR, Jaramillo LM, Arriaga CD, González DS, Estrada C. Identificación de bovinos portadores de *Mycobacterium bovis* aplicando técnicas inmunológicas y moleculares. *Vet Mex.* 2003;34(1):13-26.
14. Stanley EC, Mole RJ, Smith RJ, Glenn SM, Barer MR, et al. Development of a New, Combined Rapid Method Using Phage and PCR for Detection and Identification of Viable *Mycobacterium paratuberculosis* Bacteria within 48 Hours. *Appl Envir Microb.* 2007;73(6):1851-1857.
15. Collins DM, May De Zoete, Cavaignac SM. *Mycobacterium avium paratuberculosis* Strains from Cattle and Sheep Can Be Distinguished by a PCR Test Based on a Novel DNA Sequence Difference. *J Clin Microb.* 2002;40(12):4760-4762.
16. Tripathi BN, Periasamy S, Paliwal OP, Singh N. Comparison of IS900 tissue PCR, bacterial culture, johnin and serological tests for diagnosis of naturally occurring paratuberculosis in goats. *Vet Microb.* 2006;116:129-137.
17. Carter GR. Diagnostic procedures in veterinary bacteriology and mycology. 1984; 4th Edition, Charles C Thomas Publisher, EUA.
18. Erume J, Spersger J, Rosengarten R. Rapid detection of *Mycobacterium avium paratuberculosis* from cattle and zoo animals by Nested PCR. *African Health Sci.* 2001;1(2):83-89.
19. Collins MT, Scott JW, Petrini KR, Collins JE, Schultz RD, Whitlock RH. Evaluation of Five Antibody Detection Tests for Diagnosis of Bovine Paratuberculosis. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2005;12(6): 685-692.
20. Kurstak E. Enzyme Immunodiagnosis. 1986. Canada, Academic Press.
21. Wells SJ, Collins MT, Faaberg KS, Wees C, Tavornpanich S, Petrini KR, et al. Evaluation of a Rapid Fecal PCR Test for Detection of *Mycobacterium avium paratuberculosis* in Dairy Cattle. *Clinic Vac Immunol.* 2006;13(10):1125-1130.
22. Stabel JR, Bannantine JP. Development of a Nested PCR Method Targeting a Unique Multicopy Element, ISMap02, for Detection of *Mycobacterium avium paratuberculosis* in Fecal Samples. *J Clin Microb.* 2005;43(9):4744-4750.
23. Zimmer K, Dräger KG, Klawonn W, Hess RG. Contribution to the diagnosis of Johne's disease in cattle. Comparative studies on the validity of Ziehl-Neelsen staining, faecal culture and a commercially available DNA-Probe test in detecting *Mycobacterium paratuberculosis* in faeces from cattle. *Zentralbl Vet Med B.* 1999;46(2):137-40.
24. Whittington RJ, Ian BM, Vanessa S, Grant IR, Juste R, Sevilla IA, et al. Culture Phenotypes of Genomically and Geographically Diverse *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* Isolates from Different Hosts. *Clin Microbiol.* 2011;49(5):1822-1830.

Recibido: 4-5-2012.

Aceptado: 17-1-2013.