

Caracterización molecular de *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* en bovinos y ovinos de Mexicali, Baja California, México

Molecular characterization of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* from sheep and cattle in Mexicali, Baja California, Mexico

Magnolia Correa Muñoz^a, Gerardo Medina Basulto^a, Tomas Rentería Evangelista^a,
Francisco Monge Navarro^a, Víctor González Vizcarra^a, Gilberto López Valencia^a

RESUMEN

Este es el primer reporte sobre aislamiento y tipificación molecular de *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* (*Map*) en ganado bovino y ovino en Mexicali-Baja California; región con antecedentes serológicos de paratuberculosis en pequeños rumiantes. Se 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 con una razón S/P (densidad óptica (DO) del suero problema sobre la DO del suero testigo positivo), superior al 70 % en tres de las muestras de ovinos y la de bovino. 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 de *Map*, mediante el ensayo de PCR IS1311 y análisis de endonucleasas de restricción (IS1311 PCR-REA). Los datos obtenidos en este estudio confirman la presencia de *Map* en la región, y contribuyen al conocimiento de su distribución en el país, así como también confirman la presencia del tipo C de *Map* en el ganado bovino y ovino; sin embargo se requiere de más estudios que incluyan una mayor cantidad de animales, así como la inclusión de técnicas que permitan la subtipificación de *Map*, para conocer acerca de la biodiversidad de esta micobacteria en Baja California.

PALABRAS CLAVE: *Mycobacterium avium*, Subespecie *paratuberculosis*, Aislamientos, Cepas tipo C.

ABSTRACT

The present study is the first report of the isolation and molecular typing of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (*Map*) in cattle and sheep in Mexicali-Baja California; region with serological history of paratuberculosis in small ruminants. In this study, 5 blood samples of sheep and 1 from cattle showing signs suggestive of paratuberculosis were analyzed; serology results showed positive reaction to the *Map* ELISA with a reason s/p greater than 70 % for all samples. Fecal culture was also performed, three isolates were obtained, two from sheep and one from cattle, all were identified as *Map* according to the PCR IS900 and f57 and typed as type C on *Map*, by testing PCR IS1311 and analysis of endonucleases of restriction (IS1311 PCR-REA). The data obtained in this study confirmed the presence of *Map* in this region and contribute to the knowledge of its distribution within the country; in addition, confirms the presence of *Map* type C in cattle and sheep. More studies involving a larger number of animals, as well as the inclusion of techniques that allow for the subtyping of *Map* are require to learn about the biodiversity of this *Mycobacterium* in Baja California.

KEY WORDS: *Mycobacterium avium*, Subespecie *paratuberculosis*, Isolates, Strains C.

Mycobacterium avium subespecie *paratuberculosis* (*Map*) es el agente etiológico de la enfermedad

Mycobacterium avium subspecies *paratuberculosis* (*Map*) is the etiological agent of Johne's disease

Recibido el 20 de septiembre de 2012. Aceptado el 8 de febrero de 2013.

^a Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias, Autónoma de Baja California México. Carretera Mexicali-San Felipe Km. 3.5 S/N Fracc. Laguna Campestre 21386. Mexicali, Baja California, México. Tel/Fax: (686)5.63.69.06. gilbertolopez@uabc.edu.mx. Correspondencia al último autor.

de Johne o paratuberculosis (Ptb), la cual ocasiona una enteritis granulomatosa crónica que causa pérdidas económicas a la industria pecuaria⁽¹⁾. Fenotípicamente los aislamientos de *Map* se distinguen por la lentitud en su crecimiento, la dependencia a la micobactina⁽²⁾ y por la pigmentación que es típica sólo de algunos aislamientos de origen ovino⁽³⁾. Para la identificación de *Map* a nivel genotípico se utiliza la secuencia de inserción IS900 (IS900)⁽⁴⁾, la cual junto con el resultado positivo de otros blancos específicos de *Map* como f57⁽⁵⁾, confirman su presencia en un aislamiento. Por otro lado, las diferencias genotípicas encontradas en las cepas de *Map*, han sido utilizadas para caracterizarlas en dos grandes grupos: Tipo bovino o Tipo "C" del inglés *cattle* y Tipo ovino o Tipo "S", del inglés *sheep*⁽⁶⁾. Aunque la técnica más utilizada para la tipificación de *Map* ha sido el ensayo de los Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción, basado en IS900 (IS900-RFLP)⁽⁷⁾. Otras técnicas como la PCR y el análisis de enzimas de restricción basado en los polimorfismos de la secuencia de inserción 1311 (IS1311 PCR-REA)^(8,9), proporciona un método fácil y rápido para distinguir entre los dos grandes grupos de las cepas de *Map*.

En México, existen pocos estudios moleculares de identificación y tipificación de *Map*; la primera identificación molecular se realizó en caprinos, por medio del ensayo IS900-RFLP en el Valle de México⁽¹⁰⁾. Este estudio reveló la presencia de *Map* del Tipo C1, uno de los tipos más diseminados a nivel mundial entre las diferentes especies de animales⁽⁷⁾. Investigaciones posteriores realizadas en muestras de leche de ganado caprino y bovino en la zona central de México, encontraron que además del Tipo C otros tipos de *Map* como el I y el S también estaban presentes en estas especies⁽¹¹⁾.

La Ptb también ha sido detectada en otras regiones del país como: San Luis Potosí, Guanajuato, Querétaro, Distrito Federal, Estado de México, Veracruz y Jalisco; en donde por medio de metodologías como cultivo

or paratuberculosis (Ptb), which causes chronic granulomatous enteritis, generating economic losses for the livestock industry⁽¹⁾. Phenotypically, *Map* isolates are characterized by their slow growth, mycobactin dependence⁽²⁾ and typical pigmentation of some goat isolates⁽³⁾. For *Map* identification at the genotype level, insertion sequence (IS900) is used⁽⁴⁾, which together with the positive result of other *Map*-specific targets, such as f57⁽⁵⁾, confirm their presence in an isolate. On the other hand, genotype differences found in *Map* strains have been used to characterize them in two big groups: type C and type S⁽⁶⁾. Although the most widely used technique for typification of *Map* has been the restriction fragment length polymorphism, based on IS900-RFLP⁽⁷⁾. Other techniques such as PCR and restriction enzyme analysis, based on insertion sequence polymorphism 1311 (IS1311 PCR-REA)^(8,9), provides an easy and rapid method for distinguishing both big groups of *Map* strains.

In Mexico, there are few molecular studies of identification and typification of *Map*; the first molecular identification was done in goats in the Valley of Mexico by the IS900-RFLP technique⁽¹⁰⁾. This study revealed the presence of *Map* type C1, one of the most worldwide-disseminated types among different animal species⁽⁷⁾. Further research carried out on goat and cattle milk samples in the central zone of Mexico, found that besides type C, other types of *Map*, such as I and S were also present in these species⁽¹¹⁾.

Ptb has also been detected in other regions of the country: San Luis Potosí, Guanajuato, Querétaro, Ciudad de México, Estado de México, Veracruz and Jalisco; where by means of methodologies, such as bacteriological cultures, IS900 PCR and IS900 nested PCR, *Map* was identified in sheep and goats^(12,13). Although typification of *Map* was not carried out in these studies, their results show that Ptb in Mexico is affecting ruminants of different species. Likewise, other report documents the presence of Ptb in cattle, sheep and goats in 16 states

bacteriológico, PCR IS900 y PCR IS900 anidada, se identificó *Map* en muestras de ovinos y caprinos^(12,13). Aunque en estos estudios no se realizó la tipificación de *Map*, sus resultados indican que la Ptb en México está afectando a rumiantes de diferentes especies. De igual manera, otro reporte documenta la presencia de la Ptb en ganado bovino, ovino y caprino en 16 estados del país⁽¹⁴⁾, indicando la amplia distribución de la enfermedad en el territorio nacional. En Baja California, estado fronterizo con los Estados Unidos no se cuenta con estudios previos sobre aislamientos y caracterización molecular de *Map*.

El objetivo del presente estudio fue evidenciar la presencia de *Map* en ganado bovino y ovino en el Municipio de Mexicali, Baja California y realizar la caracterización molecular de las cepas encontradas. Se muestrearon cinco ovejas de 2 años de edad, con crías en lactancia y con signos compatibles con la Ptb de un rebaño dedicado a la venta de pie de cría ubicado al noroeste de la ciudad de Mexicali, Baja California. El mencionado rebaño históricamente ha mostrado animales con signos compatibles con la Ptb desde el 2009. El estudio también incluyó una muestra de una vaca Holstein, gestante, de 3 años de edad, y que también presentaba signos compatibles con la Ptb. Esta última muestra se tomó de un hato dedicado a la venta de pie de cría de bovinos ubicado al oriente de la ciudad de Mexicali, Baja California.

A todos los animales se les tomaron muestras de sangre completa por punción yugular y excremento directamente del ámpula rectal, empleando guantes estériles. Las muestras fueron almacenadas a -70 °C, hasta su procesamiento. Las muestras de suero obtenidas se probaron por medio del kit comercial Pourquoier®ELISA Paratuberculosis Antiboy Screening (Institut Pourquoier, Francia). Para el desarrollo de la prueba y la interpretación de los resultados, se siguieron las instrucciones del fabricante. Los puntos de corte para cada muestra se calcularon con base en la razón de la densidad óptica (DO) del suero problema

of the country⁽¹⁴⁾, indicating wide distribution of the disease in the national territory. In Baja California, border state of the United States of America, there are no previous studies on isolations and molecular characterization of *Map*.

The objective of the present study was to prove the presence of *Map* in sheep and cattle in the municipality of Mexicali, Baja California and carry out molecular characterization of the strains found. Five, 2-yr-old sheep, with nursing lambs and with clinical signs compatible with Ptb and from a flock used as breeding stock for sale on the northwest side of the city of Mexicali, Baja California, were sampled. Since 2009, this flock has historically shown animals with signs compatible with Ptb. The study also included a sample of a pregnant, 3-yr-old, Holstein cow, which also showed signs compatible with Ptb. The latter sample was taken from cattle used as breeding stock for sale, on the east side of the city of Mexicali, Baja California.

Blood samples were obtained from all animals by jugular puncture and feces taken directly from the rectum, using sterile gloves. Samples were kept at -70 °C until processing. The serum samples obtained were tested using the commercial Pourquoier®ELISA Paratuberculosis Antiboy Screening kit (Institut Pourquoier, France). For test development and interpretation of results, the manufacturer's instructions were followed. The cut-off points for each sample were calculated on the basis of the ratio of the optical density (OD) of the test serum between the OD of the positive control serum, and expressed as S/P. A sample with an S/P ratio equal or lower than 60 % was considered negative; between 60 and 70 %, uncertain and higher than 70 %, positive. The sample obtained from the cow was processed individually, while samples from sheep were processed as two groups: group 1 contained feces from sheep 1 and 2 that showed severe emaciation; group 2 contained feces from sheep 3, 4 and 5, which at the moment of sampling showed cachexia (Table 1). For each group, 2 g of feces were weighed individually, homogenized and from

sobre la DO del suero testigo positivo, y se expresa como S/P. Una muestra con una razón S/P igual o menor al 60 % se consideró negativa, entre el 60 y 70 % dudosa y mayor al 70 % positiva. La muestra obtenida del bovino se procesó de forma individual mientras que las muestras provenientes de los ovinos se procesaron en dos grupos: el grupo 1 contenía excremento de los ovinos 1 y 2, los cuales presentaban emaciación severa: el grupo 2 contenía excremento de los ovinos 3, 4 y 5, los cuales al momento de la toma de las muestras presentaban caquexia (Cuadro 1). Para cada grupo se pesaron 2 g de excremento individualmente, se homogenizaron y de ahí se tomaron 2 g para la realización del cultivo bacteriológico, según la metodología descrita por Harris *et al.*⁽¹⁵⁾; con una modificación relacionada con la concentración del antibiótico, el cual se utilizó en una dilución de 1:2. Las muestras procesadas se sembraron por duplicado en los medios de cultivo Middlebrook 7H11 (M7H11) suplementado con yema de huevo, Lowenstein-Jensen (LJ) y Middlebrook 7H9 (M7H9); con y sin suplemento de 2 µg/ml de micobactina (Institut Pourquier). Los inóculos se incubaron a 37 °C y su crecimiento se verificó cada semana hasta la observación de colonias. Después del crecimiento primario, se aisló una colonia que se diluyó en 150 µl de agua

there, 2 g were taken for carrying out bacteriological culture, according to the methodology described by Harris *et al.*⁽¹⁵⁾; with a modification related with the antibiotic concentration, which was used in a 1:2 dilution. The processed samples were seeded by duplicate in Middlebrook 7H11 (M7H11) culture medium supplemented with egg yolk, Lowenstein-Jensen (LJ) and Middlebrook 7H9 (M7H9), with or without supplement of 2 µg/ml of mycobactin (Institut Pourquier). The inoculums were incubated at 37 °C and their growth was verified each week until colony observation. After primary growth, a colony was isolated and diluted in 150 µl of sterile distilled water and was subjected to heating and cooling cycles for the obtainment of a lysate, from which 5 µl were used for amplification reactions⁽¹⁶⁾.

Map identification was carried out using IS900 and f57 molecular markers and typification by IS1311 PCR-REA analysis. All PCR reactions were conducted at a final volume of 50 µl, using as positive control *Map* reference strain ATCC19698 and molecular biology grade water (SIGMA) as negative control. The PCR mixtures were amplified in a thermocycler iCycler (BioRad). Products were visualized in 2% agarose gel and stained with ethidium bromide at a final concentration of 0.5 µg/ml. For IS900

Cuadro 1. Signos compatibles con la paratuberculosis observados en los animales muestreados y resultados del análisis serológico

Table 1. Signs compatible with Ptb observed in animals sampled and serological analysis results

	Signs compatible with paratuberculosis				Serology S/P (%)
	Cachexia	Diarrhea	Pasty stool	Emaciation	
Sheep 1	+	-	+	+	121.16
Sheep 2	+	-	+	+	135.36
Sheep 3	+	-	-	-	13.25
Sheep 4	+	-	+	+	75.91
Sheep 5	+	-	-	-	5.41
Bovine	+	+	-	+	223.60

A serum sample was considered as positive when S/P relationship was higher than 70 %.

destilada estéril y fue sometida a ciclos seriados de enfriamiento y calentamiento para la obtención de un lisado, del cual se utilizaron 5 µl para las reacciones de amplificación⁽¹⁶⁾.

La identificación de *Map* se realizó empleando los marcadores moleculares IS900 y f57 y la tipificación por medio del análisis IS1311 PCR-REA. Todas las reacciones de PCR se hicieron a un volumen final de 50 µl utilizando como testigo positivo la cepa referencia de *Map* ATCC19698 y como testigo negativo agua grado biología molecular (SIGMA). Las mezclas de PCR se amplificaron en un termociclador iCycler (BioRad). Los productos se visualizaron en geles de agarosa al 2% y teñidos con bromuro de etidio a una concentración final de 0.5 µg/ml. Para la PCR IS900 se utilizaron los iniciadores MP10-1 (5'-ATGCGCCACGACTTGCAGCCT-3') y MP11.1 (5'-GGCACGGCTCTTGTGTAGTCG-3'); descritos por Kawaji *et al*⁽¹⁷⁾ que amplifican un fragmento de 183 pb. La mezcla consistió de: 1U de *Taq* polimerasa, 20 mM Tris-HCl, 50 mM de KCl, 2.5 mM de MgCl₂, 2.5 mM de una mezcla de dNTP's y 20 pmol de cada iniciador. Las condiciones de amplificación fueron las descritas por el autor⁽¹⁷⁾. Se llevó a cabo también un PCR para f57, para el cual se utilizaron los iniciadores F57 (5'-CCTGTCTAATTCGATCACGGACTAGA-3') y R57 (5'-TCAGCTATTGGTGTACCGAATGT-3'); descritos por Vansnick *et al*⁽⁵⁾ que amplifican un fragmento de 432 pb. La mezcla consistió de: 1 U de *Taq* polimerasa, 20 mM Tris-HCl, 50 mM de KCl, 1.6 mM de MgCl₂, 2.0 mM de una mezcla de dNTP's y 20 pmol de cada iniciador. Las condiciones de la amplificación fueron las descritas por el autor⁽⁵⁾. La tipificación de los aislados se llevó a cabo por medio de un PCR IS1311, para el cual se utilizaron los iniciadores M56 (5'-GCGTGAGGC TCTGTGGTG AA-3') y M119 (5'-ATGACGACCGCTTGGGAGAC-3'); descritos por Marsh *et al*⁽⁹⁾ que amplifican un fragmento de 608 pb. La mezcla consistió de: 2 U de *Taq* polimerasa, 20 mM Tris-HCl, 50 mM de KCl, 2.5 mM de MgCl₂, 2.0 mM de una mezcla de dNTP's y 0.8 µM de cada iniciador. Las condiciones de la amplificación fueron las

PCR, MP10-1 (5'-ATGCGCCACGACTTGCAGCCT-3') and MP11.1 (5'-GGCACGGCTCTTGTGTAGTCG-3') primers were used, described by Kawaji *et al*⁽¹⁷⁾, which amplify a 183 bp fragment. The mixture consisted of: 1U of *Taq* polymerase, 20 mM Tris-HCl, 50 mM of KCl, 2.5 mM of MgCl₂, 2.5 mM dNTP mix and 20 pmol of each primer. The amplification conditions were described by the author⁽¹⁷⁾. A PCR for f57 was also carried out, for which f57 (5'-CCTGTCTAATTCGATCACGGACTAGA-3') and R57 (5'-TCAGCTATTGGTGTACCGAATGT-3') primers were used, described by Vansnick *et al*⁽⁵⁾, which amplified a 432 bp fragment. The mixture consisted of: 1U of *Taq* polymerase, 20 mM Tris-HCl, 50 mM of KCl, 1.6 mM of MgCl₂, 2.0 mM dNTP mix and 20 pmol of each primer. The amplification conditions were described by the author⁽⁵⁾. Typification of the isolates was carried out by IS1311 PCR, for which M56 (5'-GCGTGAGGC TCTGTGGTG AA-3') and M119 (5'-ATGACGACCGCTTGGGAGAC-3') primers were used; described by Marsh *et al*⁽⁹⁾ that amplify a 608 bp fragment. The mix consisted of: 2 U of *Taq* polymerase, 20 mM Tris-HCl, 50 mM of KCl, 2.5 mM of MgCl₂, 2.0 mM of dNTP mix and 0.8 µM of each primer. The amplification conditions were the ones pointed out by the author⁽⁹⁾. The restriction enzyme analysis was carried out in a final volume of 30 µl, which consisted of 1 µl of *Hinf* I enzyme, 2.0 µl of Fermentas FastDigest® 10X, 10 µl of the IS1311 amplified and distilled sterile water. The digestion was performed at 37 °C for 1 h and fragments were visualized by electrophoresis in 3.5% agarose gel stained with ethidium bromide.

The interpretation of the results was carried out according to the reported by Marsh⁽⁹⁾, where an isolate is classified as being type C, if it shows a digestion pattern corresponding to 67, 218, 285 and 323 bp fragments. The type S strains are defined by bands of 285 and 323 bp.

All six animals analyzed in this study showed signs compatible with Ptb at the moment of

indicadas por el autor⁽⁹⁾. El análisis de restricción enzimática se realizó en un volumen final de 30 µl, el cual consistió de 1 µl de la enzima *Hinf* I, 2.0 µl del buffer *FastDigest*®10X (Fermentas), 10 µl del amplificado IS1311 y agua destilada estéril. La digestión se realizó por 1 h a 37 °C y los fragmentos se visualizaron por electroforesis en gel de agarosa al 3.5 % y tinción con bromuro de etidio.

La interpretación de los resultados se realizó según lo reportado por Marsh⁽⁹⁾, donde un aislado es clasificado como perteneciente al Tipo C, si presenta un patrón de digestión correspondiente a los fragmentos de 67, 218, 285 y 323 pb. Las cepas del tipo S son definidas por las bandas de 285 y 323 pb.

Los seis animales analizados en este estudio presentaban síntomas compatibles con la Ptb al momento de la toma de las muestras (Cuadro 1). El análisis por ELISA mostró que los ovinos 1, 2 y 4 así como el bovino, resultaron positivos con una razón S/P superior al 70 %. Los ovinos 3 y 5 fueron negativos al ELISA al mostrar una razón S/P menor al 70 %. El cultivo primario obtenido a partir del grupo 1, no creció en ninguno de los medios sólidos utilizados. Debido a lo anterior, se procedió a la identificación de *Map* por PCR a partir del cultivo líquido M7H9 suplementado con micobactina. Una vez confirmada la presencia de *Map* por PCR, se inoculó una placa de petri con medio Middlebrook 7H10 (M7H10) con y sin suplemento de micobactina, observándose un escaso crecimiento de colonias (ocho colonias) solamente en el medio que contenía micobactina, después de cinco semanas de incubación. Las colonias en este medio presentaron morfologías hemisféricas, lisas y opacas. El aislamiento obtenido a partir del grupo 2 creció únicamente en el medio M7H11 suplementado con micobactina; el tiempo de crecimiento fue de seis semanas, el número de colonias bacterianas aisladas fue escaso (12 colonias) de color semejante al medio de cultivo y con morfología similar a las observadas en el grupo 1. El aislamiento de la muestra de origen

sampling (Table 1). The ELISA test showed that sheep 1, 2 and 4, as well as the bovine, were positive with an S/P ratio higher than 70 %. Sheep 3 and 5 were negative to ELISA, since they showed an S/P ratio lower than 70 %. The primary culture obtained from group 1, did not grow in either of the solid mediums used. Thus, identification of *Map* by PCR from M7H9 liquid culture, supplemented with mycobactin, was performed. Once the presence of *Map* was confirmed by PCR, a Petri dish was inoculated with Middlebrook 7H10 (M7H10) medium with or without mycobactin and after five weeks of incubation, scarce colony growth (eight colonies) was observed only in the medium containing mycobactin. This medium showed hemispheric, smooth and opaque colonies. The isolate obtained from group 2 grew only in M7H11 medium supplemented with mycobactin; colony growth took six weeks, the number of isolated bacterial colonies was scarce (12 colonies) similar to the culture medium in color and with a similar shape to that observed in group 1. The isolate of bovine origin was only obtained in LJ medium supplemented with mycobactin, after 6 wk in culture; however, in contrast to sheep origin isolates, these colonies were translucent, brilliant, very small, hemispheric, abundant and distributed all over the medium surface.

The molecular identification of *Map* in the three isolates was performed by IS900 PCR and *f57*, from only one colony. For the case of group 1, the identification of *Map* was carried out from the primary culture in M7H9 medium, as well as from the colony obtained in the M7H10 medium supplemented with mycobactin. The results of IS900 and *f57* were positive to all cases, confirming the presence of *Map* in the three isolates (Table 2). The typification of isolates identified as *Map* was performed by IS1311 PCR-RFA, which allowed identifying the polymorphism at the characteristic nucleotide 223 of type C strains and absent in type S strains (Figure 1, Table 2)^(9,10).

The results shown in this study are the first report of isolations and typification of *Map* in

bovino, se obtuvo sólo en el medio LJ suplementado con micobactina, después de seis semanas de cultivo; sin embargo a diferencia de los aislados de origen ovino, estas colonias se observaron translúcidas, brillantes, muy pequeñas, hemisféricas, abundantes y distribuidas en toda la superficie del medio.

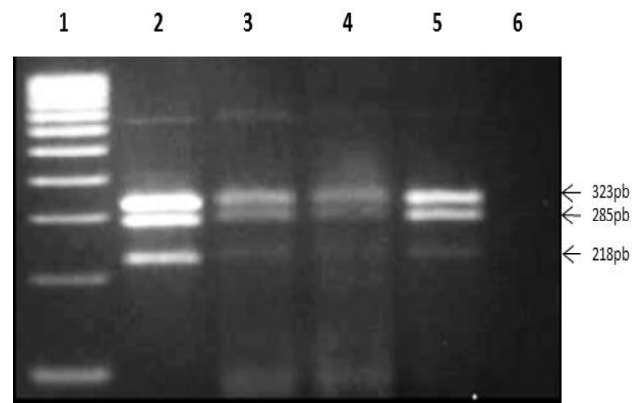
La identificación molecular de *Map* en los tres aislamientos se realizó mediante la PCR IS900 y f57, a partir de una sola colonia. Para el caso del grupo 1, la identificación de *Map* se realizó tanto del cultivo primario en medio M7H9 como de una colonia obtenida posteriormente en el medio M7H10 suplementado con micobactina. Los resultados de las PCR IS900 y f57 fueron positivos para todos los casos, confirmando la presencia de *Map* en los tres aislamientos (Cuadro 2). La tipificación de los aislamientos identificados como *Map*, se realizó por medio del ensayo IS1311 PCR-REA, el cual nos permitió identificar el polimorfismo presente en el nucleótido 223 característico de las cepas tipo C y ausente en las cepas del tipo S (Figura 1 y Cuadro 2)^(9,10).

Los resultados aquí mostrados son el primer reporte de aislamientos y tipificación de *Map* en el Municipio de Mexicali Baja California, región en donde se ha encontrado una seroprevalencia del 7.8 % en ganado ovino y del 2.5 % en ganado caprino⁽¹⁸⁾. Los animales muestreados en este estudio pertenecían a

the municipality of Mexicali, Baja California, where seroprevalence of 7.8 % in sheep and 2.5 % in goats has been found⁽¹⁸⁾. The animals sampled in this study belonged to different farms that presented risk factors for the development of *Map* infection, such as: open herds, having a history of animals with signs compatible with Ptb, poor hygiene in the

Figura 1. Análisis IS1311 PCR-REA. Los aislamientos de *Map*, fueron tipificados como Tipo C, debido a la presencia de fragmentos característicos de 218 pb, después de la digestión con *HinfI*

Figure 1. IS1311 PCR-REA analysis. *Map* isolations were typified as type C, due to the presence of characteristic 218 pb fragments, after digestion with *HinfI*



Lane 1= MPM (100bp. Bioline); Lane 2= ATCC 19698; Lane 3= sheep sample 1; Lane 4= sheep sample 2; Lane 5= bovine sample; Lane 6= negative control.

Cuadro 2. Resultados de las pruebas de cultivo bacteriológico, PCR IS900, PCR f57 y análisis IS1311 PCR-REA utilizadas para la identificación y tipificación de *Map* en las muestras de excremento de origen bovino y ovino

Table 2. Results of IS900 PCR, f57 PCR and IS1311 PCR-REA analysis of bacteriological culture tests used for identification and typification of *Map* in bovine and sheep feces samples

Isolates	<i>Map</i> identification			Typification IS 1311 PCR-REA
	Culture	IS900 PCR	f57 PCR	
Group 1	+	+	+	C
Group 2	+	+	+	C
Bovine	+	+	+	C

distintos ranchos, los cuales presentaban factores de riesgo para la infección por *Map* tales como ser hatos abiertos, tener antecedentes de animales con signos compatibles con la Ptb, malas condiciones de higiene en los corrales y la convivencia de animales enfermos con sanos dentro del mismo corral. Adicionalmente, estos animales eran hembras en las cuales estaba comprometido su estado hormonal debido a que se encontraban en estado de gestación o tenían crías en lactancia. Dichas condiciones de estrés, han sido reportadas como favorables para la aparición de los signos clínicos de la Ptb, los cuales en bovinos suelen presentarse a los 2 años mientras que para pequeños ruminantes estos síntomas pueden aparecer antes de esta edad^(19,20).

El análisis serológico, mostró resultados positivos para las muestras del bovino y tres de los cinco ovinos, con razones S/P superiores al 70 %. Los animales que presentaron los títulos más altos de anticuerpos se encontraban en avanzado estado de la enfermedad. Los ovinos que resultaron negativos al ELISA, no presentaban emaciación ni la presencia de excremento pastoso observado en los otros animales; es posible que estos animales no se encontraran infectados por *Map* y la caquexia observada pudo haber sido ocasionada por causas no determinadas; sin embargo se debe tener en cuenta la baja sensibilidad del ELISA cuando se prueban muestras de animales que están en estadio subclínico de la enfermedad, así como también la variabilidad del huésped relacionada con la producción de anticuerpos y proteínas enteropáticas en respuesta a la infección por *Map*^(21,22).

Los cultivos bacteriológicos de origen ovino presentaron mayores dificultades para lograr el aislamiento comparado con el cultivo de origen bovino. Inicialmente, no se logró obtener crecimiento alguno en los cultivos de muestras individuales de excremento ovinas. La dificultad en aislar *Map* a partir de excremento ovino ha sido reportada por otros estudios^(23,24), donde

stockyards and sick animals living together with healthy animals in the same pen. Additionally, the hormonal state of these females was compromised because they were pregnant or had nursing offspring. Such stress conditions have been reported as favorable for the onset of clinical signs of Ptb, which in cattle are usually present at 2 yr of age; while in small ruminants, these symptoms may appear before this age^(19,20).

The serological analysis showed positive results for the bovine samples and three out of five sheep, with S/P ratio higher than 70 %. The animals that showed the highest antibody titers were in advanced stages of the disease. Sheep that resulted negative to ELISA did not show emaciation or presence of pasty stool observed in the other animals. It is possible that these animals were not infected by *Map* and the cachexia observed was due to nonspecific causes; however, low sensitivity of ELISA must be considered when samples are taken from animals that are in the subclinical stage of the disease; as well as host variability in relation to antibody production and protein enteropathy in response to *Map* infection^(21,22).

The bacteriological cultures of sheep origin showed greater difficulty in achieving the isolate compared with the bovine origin culture. Initially, no growth was obtained in the individual sample cultures of sheep manure. The difficulty for isolating *Map* from sheep feces has been reported in other studies^(23,24), where factors such as: low concentrations of mycobacteria excreted, presence of dense accumulates of stool⁽²³⁾ or *Map* inactivation, during the procedure of decontamination, may interfere with the obtainment of the isolate. In search of favorable conditions for bacterial growth, the antibiotic concentration, applied to the samples during processing, was reduced by 50 % and great part of the feces were gathered in order to form groups. It is possible that these modifications could have positively influenced in the obtaining of sheep origin *Map* isolates^(25,26).

factores tales como bajas concentraciones de micobacterias excretadas, la presencia de acúmulos densos de excremento⁽²³⁾ o la inactivación de *Map*, durante el proceso de descontaminación, pueden interferir con la obtención del aislamiento. En la búsqueda de condiciones que favorecieran el crecimiento bacteriano, se redujo en un 50 % la concentración del antibiótico aplicado a las muestras durante el procesamiento de las mismas y se tomó la mayor cantidad posible de materia fecal por lo cual se conformaron grupos. Es posible que estas modificaciones pudieran haber influido positivamente en la obtención de los aislamientos de *Map* de origen ovino^(25,26).

Con respecto a los cultivos primarios de *Map*, se observó que los tres aislamientos presentaron dependencia a la micobactina. El aislamiento primario obtenido en el grupo 1 se logró solo en el medio de cultivo líquido M7H9. Este tipo de medio ha sido recomendado particularmente para muestras de origen ovino debido a que producen crecimiento más rápido con una mejor sensibilidad analítica y diagnóstica, comparado con los resultados obtenidos en medio sólido^(24,27,28). Después de identificar *Map* por PCR en el medio de cultivo líquido, realizamos una resiembra en medio 7H10, observándose crecimiento de colonias solamente en el medio suplementado con micobactina, comprobándose así la dependencia a dicho sideróforo.

El aislamiento primario obtenido a partir del grupo 2, se logró solamente en el medio de cultivo M7H11 y el aislamiento de origen bovino, en el medio LJ. En ambos casos, se detectó crecimiento de colonias a las seis semanas de incubación. Los medios de cultivo de donde se aislaron y el tiempo de crecimiento, son característicos de las cepas del tipo C de *Map*; comprobándose el hecho de que el tiempo de crecimiento de una cepa de *Map*, se correlaciona con el tipo de cepa, mas no con el origen del huésped⁽²⁹⁾. Igualmente la morfología de las colonias observadas en el medio de cultivo en donde creció cada aislamiento, coinciden con

In regard to *Map* primary cultures, it was observed that the three isolates showed mycobactin dependence. The primary isolate obtained in group 1, was only obtained in the M7H9 liquid culture medium. This type of medium has been particularly recommended for sheep origin samples, because it produces rapid growth with better analytical and diagnostic sensitivity, compared to the results obtained in solid medium^(24,27,28). After identifying *Map* by PCR in the liquid culture medium, the 7H10 medium was reseeded. Colony growth was observed only in the medium supplemented with mycobactin; thus proving the dependence of such siderophore.

The primary isolate obtained from group 2 was achieved only in M7H11 culture medium and the bovine origin isolate, in LJ medium. In both cases, colony growth was detected at six weeks of incubation. The culture mediums from which they were isolated and growth time are characteristic of *Map* C-type strains, finding that the fact that the growth time of a *Map* strain correlates with the type of strain, not with the origin of the host⁽²⁹⁾. Likewise, the morphology of the colonies observed in the culture medium where each isolate grew, coincides with the descriptions reported in other studies⁽²⁹⁾. The use of solid and liquid mediums allowed to increase the possibility for obtaining primary cultures, which concurs with the previously reported by Whittington *et al*⁽³⁰⁾, who suggested that in order to ensure the success of *Map* cultures, several types of culture mediums should be included, otherwise the diagnostic sensitivity of the same mediums would be affected.

Map identification, performed by *IS900* and *f57* PCR, was required to confirm the presence of *Map*, since similar *IS900*-like elements can be found in other mycobacteria⁽³¹⁾, which could lead to false positive results⁽⁵⁾. Likewise, the analysis of typification performed by *IS1311* PCR-REA assay, allowed to classified the three isolates as *Map* C-type strains, which have shown to have broad range of hosts. In different

las descripciones reportadas por otros estudios⁽²⁹⁾. La utilización de medios sólidos y líquidos, nos permitió aumentar la posibilidad de obtener cultivos primarios, lo cual concuerda con lo reportado anteriormente por Whintington *et al*⁽³⁰⁾, quienes propusieron que para asegurar el éxito de los cultivos de *Map* se deben incluir varios tipos de medios de cultivo, ya que de lo contrario se estaría afectando la sensibilidad diagnóstica de los mismos.

La identificación de *Map*, realizada mediante la PCR IS900 y f57, fue necesaria para confirmar la presencia de MAP, ya que se pueden encontrar elementos similares a IS900 (IS900-like) en otras micobacterias⁽³¹⁾, lo cual podría conducir a la obtención de resultados falsos positivos⁽⁵⁾. De igual manera, el análisis de tipificación realizado mediante el ensayo IS1311 PCR-REA, permitió clasificar a los tres aislamientos como tipo C de *Map*; cepa que ha mostrado tener un amplio rango de huéspedes. En distintos estudios de tipificación molecular de *Map* realizados en otras regiones de México, también se ha encontrado este tipo de cepa en ganado caprino y bovino^(10,11). En estos estudios se utilizaron metodologías de tipificación diferentes a la empleada en este trabajo, como IS900-RFLP y PCR tipo específico. El ensayo IS1311 PCR-REA permite también tipificar a las cepas de *Map*. La amplificación de un fragmento de 608 pb de IS1311 combinado con el análisis de restricción enzimática con *Hinf*I, pone de manifiesto la mutación presente en el nucleótido 223 (C/T), presente en algunas copias de IS1311 en cepas del tipo C y ausente en las del tipo S^(8,9). Aunque los tipos C y S obtenidos mediante esta técnica corresponden con los descritos por IS900-RFLP⁽⁸⁾, IS1311 PCR-REA no permite subtipificar a las cepas de *Map*. La subtipificación de *Map*, es importante ya que nos permite el rastreo del origen de un brote y su diseminación, así como otras inferencias epidemiológicas⁽⁶⁾.

Se envió DNA de los aislados al Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) en Argentina, quienes, según la metodología

studies of molecular typification of *Map* carried out in other Mexican regions, this type of strain in goat and cattle has also been found^(10,11). In these studies, typing methodologies different to the ones in this study have been used, such as IS900-RFLP and type-specific PCR. The IS1311 PCR-REA also allows typing *Map* strains. The amplification of 608 bp fragment of IS1311 combined with the enzyme restriction analysis and *Hinf*I, highlights the mutation present in 223 nucleotide (C/T), present in some copies of IS1311 type C strains and absent in type S^(8,9). Although types C and S obtained by this technique correspond to the described by IS900-RFLP⁽⁸⁾, IS1311 PCR-REA does not allow subtyping of *Map* strains. *Map* subtyping is important because it enables origin traceability of outbreak and spreading, as well as other epidemiological inferences⁽⁶⁾.

DNA obtained from the isolates were sent to the Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) in Argentine, who, according to the methodology reported by Thibault *et al*⁽³²⁾, carried out a mycobacterial interspersed repetitive unit – variable number of tandem repeats (MIRU-VNTR). As result, pattern INMV2 was obtained only for the bovine origin isolate, while for the two sheep origin isolates, there were no conclusive results, as only in one of them some loci, which the typification test contemplates, were able to amplified (A.K. Gioffré, personal communication). In Mexico, there are no studies on *Map* genotypification done by this technique; however, different reports show that it is one of the predominant patterns that circulate in several countries of Europe and Argentine^(32,33). Therefore, this result would indicate that at least one of the most frequent genotypes is present in the country.

The results shown in this study confirm the presence of *Map* type C in cattle and sheep of the region; however, the presence of other types of *Map* is not ruled out. This latter shows that it is necessary to carry out further studies with the inclusion of additional subtyping techniques, such as: IS900 RFLP or MIRU-VNTR

reportada por Thibault *et al.*⁽³²⁾ llevaron a cabo un ensayo de unidades repetitivas intercaladas micobacterianas - repeticiones en tándem de número variable (MIRU-VNTR). Como resultado se obtuvo un patrón INMV2 solamente para el aislamiento de origen bovino, mientras que para los dos aislamientos de origen ovino los resultados no fueron concluyentes, ya que solamente en uno de ellos se pudieron amplificar algunos de los locus que contempla la prueba de tipificación (A.K. Gioffré, comunicación personal). En México, no se conocen estudios de genotipificación de *Map* por medio de esta técnica; sin embargo distintos reportes muestran que es uno de los patrones predominantes que circulan en varios países de Europa y también en Argentina^(32,33). Por lo tanto este resultado indicaría que al menos, uno de los genotipos más frecuentes está presente en el país.

Los resultados presentados en este estudio confirman la presencia del tipo C de *Map* en el ganado bovino y ovino en la región; sin embargo, no se descarta la presencia de otros tipos de *Map*. Lo anterior hace necesario el desarrollo de más estudios con la inclusión de técnicas adicionales de subtipificación como IS900 RFLP o MIRU-VNTR y la incorporación de una mayor cantidad de animales tanto domésticos como silvestres, para lograr un mejor conocimiento acerca de la biodiversidad de *Map*, las dinámicas de transmisión y las fuentes de infección en esta región fronteriza.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece a la Dra. Andrea Gioffré del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) de Buenos Aires Argentina, por la realización del análisis MIRU-VNTR. Durante el desarrollo de este estudio, el primer autor fue estudiante de doctorado con beca CONACYT, correspondiente a la Convocatoria enero-junio 2009.

and the incorporation of greater number of domestic and wild animals, in order to achieve better knowledge about *Map* biodiversity, transmission dynamics and infection sources in this border region.

ACKNOWLEDGEMENTS

Special thanks to Dr. Andrea Gioffré of the Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) of Buenos Aires, Argentine for carrying out the MIRU-VNTR analysis. During the development of this study, the first author was graduate student with CONACYT scholarship, corresponding to January-July 2009.

End of english version

LITERATURA CITADA

1. Harris NB, Barletta RG. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* Veterinary Medicine. Clin Microbiol Rev 2001;14:489-512.
2. Cocito C, Gilot P, Coene M, de Kesel M, Poupart P, Vannuffel P. Paratuberculosis. Clin Microbiol Rev 1994;7(3):328-45.
3. Stevenson K, Hughes VM, de Juan L, Inglis NF, Wright F, Sharp JM. Molecular characterization of pigmented and nonpigmented isolates of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. J Clin Microbiol 2002;40:1798-1804.
4. Collins DM, Gabric DM, De Lisle GW. Identification of a repetitive DNA sequence specific to *Mycobacterium paratuberculosis*. FEMS Microbiol Letters 1989;51:175e-178.
5. Vansnick E, De Rijk P, Vercammen F, Geysen D, Rigouts L, Portaels F. Newly developed primers for the detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. Vet Microbiol 2004;100:197-204.
6. Collins DM, Gabric DM, de Lisle GW. Identification of two groups of *Mycobacterium paratuberculosis* strains by restriction endonuclease analysis and DNA hybridization. J Clin Microbiol 1990;28(7):1591-1596.
7. Pavlik I, Horvathova A, Dvorska I, Bartl J, Svastova P, de Maine R, *et al.* Standardisation of restriction fragment length polymorphism analysis for *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. J Microbiol Methods 1999;38:155-167.
8. Whittington RJ, Marsh I, Choy E, Cousins D. Polymorphisms in IS1311, an insertion sequence common to *Mycobacterium avium* and *M. avium* subsp. *paratuberculosis*, can be used to distinguish between and within these species. Mol Cell Prob 1998;12:349-358.

9. Marsh I, Whittington RJ, Cousins D. 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 Prob* 1999;13:115-126.
10. Chávez-Gris GG, Trigo-Tavera FJ, Svastova P, Pavlik I. Genetic polymorphism identification from *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in goats in Central Mexico. *Vet Mex* 2004;35:75-82.
11. Favila-Humara LC, Chávez-Gris GG, Carrillo-Casas EM, Hernández-Castro R. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* detection in Individual and bulk tank milk samples from bovine herds and caprine flocks. *Foodborne Pathog Dis* 2010;7(4):351-355.
12. Estévez-Denaives I, Hernández-Castro R, Trujillo-García AM, Chávez-Gris GG. Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* in goat and sheep flocks in Mexico. *Small Rumin Res* 2007;72:209-213.
13. Jaimes NG, Santillán MA, Hernández OA, Córdova D, Guzmán CC, Arellano B, et al. Detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* by nested-PCR of ovine fecal samples. *Vet Mex* 2008;39(4):377-386.
14. Consejo Técnico Consultivo Nacional de Salud Animal (CONASA). Plan estratégico del programa para la atención de la paratuberculosis en ganado bovino, ovino y caprino en México. 2010 [en línea] <http://www.consamexico.org.mx/conasa/pdf/>. Consultado 27 jul, 2012.
15. Harris B, Robbe-Austerman S, Dykema P, Fett K, Stuber T, Stokes K. Laboratory Methods for isolation and identification of *Mycobacterium avium* spp. *paratuberculosis* (Johnes Disease). Manual for isolation and identification of *Mycobacterium paratuberculosis*. USDA; 2009.
16. Garrido JM, Cortabarría N, Oguiza JA, Aduriz G y Juste RA. Use of a PCR method on fecal samples for diagnosis of sheep paratuberculosis. *Vet Microbiol* 2000;77:379-86.
17. Kawaji S, Taylor DL, Mori Y, Whittington RJ. Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in ovine faeces by direct quantitative PCR has similar or greater sensitivity compared to radiometric culture. *Vet Microbiol* 2007;125(1-2):36-48.
18. Correa MMM, Rodríguez CJL, López VG, Rentería ETB, Hori-Oshima S. "Seroprevalence of paratuberculosis in small ruminants in Mexicali, Baja California". VII Simposio Fronteras del Conocimiento en Tuberculosis y otras Micobacteriosis "Dr. Joseph Colston". VTTB02. Hermosillo, Sonora. 26-30 marzo, 2012.
19. Chiodini RJ, Van Kruiningen HJ, Merkal RS. Ruminant paratuberculosis (Johnes disease): The current status and future prospects. *Cornell Vet* 1984;74:218-62.
20. García-Marin JF, Pérez V, García de Jalón JA, De las Heras M, Barberá M, Fernández de Luco D, et al. Diagnóstico de casos clínicos de paratuberculosis ovina y caprina. *Med Vet* 1994;11(9):491-502.
21. Gumber S, Eamens G, Whittington RJ. 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* 2006;115(1-3):91-101.
22. Attili AR, Ngu-Ngwa V, Preziuso S, Pacifici L, Domesi A, Cuteri V. Ovine Paratuberculosis: A seroprevalence study in dairy flocks reared in the Marche Region, Italy. *Vet Med Int* 2011;2011:782-875.
23. Collins DM, Hilbink F, West DM, Hosie BD, Cooke MM, de Lisle GW. Investigation of *Mycobacterium paratuberculosis* in sheep by faecal culture, DNA characterization and the polymerase chain reaction. *Vet Rec* 1993;133:599-600.
24. Whittington RJ, Marsh I, McAllister S, Turner MJ, Marshall DJ, Fraser CA. Evaluation of modified BACTEC 12B radiometric medium and solid media for the culture of *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* from sheep. *J Clin Microbiol* 1999;37:10771083.
25. Whittington RJ, Fell S, Walker D, McAllister S, Marsh I, Sergeant E, et al. Use of pooled fecal culture for sensitive and economic detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in flocks of sheep. *J Clin Microbiol* 2000;38:2550-2556.
26. Kalis CH, Hesselink JW, Barkema HW, Collins MT. Culture of strategically pooled bovine fecal samples as a method to screen herds for paratuberculosis. *J Vet Diagn Invest* 2000;12:547-551.
27. Cousins DV, Evans RJ, Francis BR. Use of BACTEC radiometric culture method and polymerase chain reaction for the rapid screening of faeces and tissues for *Mycobacterium paratuberculosis*. *Aust Vet J* 1995;72:458-462.
28. Eamens GJ, Whittington RJ, Marsh IB, Turner MJ, Saunders V, Kemsley PD, et al. Comparative sensitivity of various faecal culture methods and ELISA in dairy cattle herds with endemic Johnes disease. *Vet Microbiol* 2000;77:357-367.
29. de Juan L, Álvarez J, 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* subsp. *paratuberculosis* strains isolated from cattle and goats. *Appl Environ Microbiol* 2006;72(9):5927-32.
30. Whittington RJ. Factors Affecting Isolation and Identification of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from fecal and tissue samples in a liquid culture system. *J Clin Microbiol* 2009;47(3):614-622.
31. Englund S, Bolske G, Johansson KE. An IS900-like sequence found in a *Mycobacterium* sp. other than *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *FEMS Microbiol Lett* 2002;209:267-271.
32. Thibault VC, Grayon M, Boschirolí ML, Hubbans C, Overduin P, Stevenson K, et al. New variable-number tandem-repeat markers for typing *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and *M. avium* strains: comparison with IS900 and IS1245 restriction fragmentlength polymorphism typing. *J Clin Microbiol* 2007;45:2404-10.
33. Gioffré A, Correa M, Alvarado-Pinedo MF, Montenegro V, Vaca J, Morsella C, et al. Exploiting multiple-locus variable number tandem repeat analysis to evaluate strain diversity of *M. avium* complex in Argentina. *Proc 11th International Colloquium on Paratuberculosis*. 2012:264.