

Veterinaria México

Volumen 35
Volume

Número 1
Number

Enero-Marzo 2004
January-March

Artículo:

Identificación del polimorfismo genético de aislamientos de *Mycobacterium avium* subespecie paratuberculosis de caprinos del centro de México

Derechos reservados, Copyright © 2004:
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM

Otras secciones de
este sitio:

- 👉 Índice de este número
- 👉 Más revistas
- 👉 Búsqueda

*Others sections in
this web site:*

- 👉 *Contents of this number*
- 👉 *More journals*
- 👉 *Search*



Medigraphic.com

Identificación del polimorfismo genético de aislamientos de *Mycobacterium avium* subespecie paratuberculosis de caprinos del centro de México

Genetic polymorphism identification from *Mycobacterium avium* subespecie paratuberculosis in goats in Central Mexico

Gilberto Chávez Gris**
Francisco J. Trigo Tavera**
Petra Svastova***
Ivo Pavlik***

Abstract

Genetic polymorphism of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis (Map) from a goat flock located in central Mexico, with clinical-pathological, serological and bacteriological antecedents was determined. For this, the IS900 probe and BstEII restriction enzyme were employed. The Map type identified belonged to the C1 type, which is the most wide-spread Map type in the world, both in domestic and wild animals. This is the first study indicating the Map type found in Mexico and this technique is suggested as an important tool for the epidemiological study and control of paratuberculosis Johne's disease in Mexico.

Key words: PARATUBERCULOSIS, RFLP, RESTRICTION ENZYME, GOATS.

Resumen

Se realizó la identificación del polimorfismo genético de aislamientos de *Mycobacterium avium*, subespecie paratuberculosis (Map), de un rebaño ubicado en el centro de México, con antecedentes clínico-patológicos, serológicos y bacteriológicos. Para su detección se utilizó el análisis de RFLP empleando la sonda la IS900 y la enzima de restricción BstEII, revelando que el tipo de Map correspondió al tipo C1, que es uno de los más diseminados en el ámbito mundial entre las diferentes especies domésticas y silvestres. Este es el primer estudio que indica el tipo de Map en México y se sugiere la utilización de esta técnica como una herramienta para el estudio epidemiológico y control de la paratuberculosis o enfermedad de Johne en México.

Palabras clave: PARATUBERCULOSIS, RFLP, ENZIMAS DE RESTRICCIÓN, CABRAS.

* Trabajo financiado por el Proyecto DGAPA-PAPIIT: IN221999. UNAM.

**Departamento de Patología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, D. F., Teléfono: 5622-5888, Fax 5616-6795. E-mail: gris@servidor.unam.mx

***Unit of Mycobacteriology, Veterinary Research Institute, Hudcova 70, 62132, Brno, Czech Republic.

Introduction

Mycobacterium avium subespecie paratuberculosis (Map) is an acid-fast, Gram-positive bacillus which causes paratuberculosis or Johne's disease mainly in ruminants. It is possible that this bacterium is also implicated in Crohn's disease in humans.¹⁻³ Paratuberculosis is a chronic process with a long incubation period that causes poor body condition and profuse diarrhea which does not respond to treatment. This produces granulomatous enteritis with the presence of acid-fast bacillus that are spread through feces. Animals are mainly infected at an early age, during lactation, when the mammary gland is contaminated with feces that contain mycobacteria. Other way of acquiring the disease is by eating contaminated forage. There are cases of intra-uterine infection.

Paratuberculosis has a world-wide distribution; it is responsible for great economic losses. Because of the scarce clinical signs, its real importance has been underestimated.^{4, 5}

Map identification, in a classic way, has been made by growing the bacteria in mediums added with micobactina.⁴ Even though it is impossible to identify different Map strains by biochemical test, some molecular methods, such as endonuclease restriction analysis, have been used to identify its genotype, but results have not been clear enough to establish differences between strains.^{6,7} By the use of Map specific insertion sequence, named as 900 insertion (IS900), applied to the polymorphism analysis to the restriction fragments (RFLP), differences between strains were established suggesting a three pattern classification: C (cattle), S (sheep) and I (intermediate).⁸ In the beginning it was suggested that this methodology would be useful for the identification of the animal source of the Map strains. It has been established that a same pattern can be found in strains from different animals; because of that, it could be useful as an epidemiological tool to know the distribution of the strains, source of infection and inter-species infections, in different geographical regions, in domestic and wild animals.⁸⁻¹⁵

Serologic and bacteriological evidences of Map infection in different ruminant species exist in Mexico. Nevertheless, studies on genetic polymorphism of Map isolation do not exist.^{16, 17} The objective of this study was to identify Map isolations from goats in the Valley of Mexico by RFLP using IS900 as probe.

This study was carried out in a goat flock with clinical, anatomic-pathological and bacteriological antecedents of paratuberculosis, at Mexico City outskirts. Agar gel immunodiffusion test (AGID) was made according to Chávez¹⁸ using the PPA-3* proptoplasmic antigen in 120 adult goats, from 1.5 to 5 years old; a seroprevalence of 6.73% was found. Necropsies were made in 27 rejected or naturally dead goats during

Introducción

Mycobacterium avium subespecie paratuberculosis (Map) es un bacilo ácido-alcohol resistente, grampositivo que produce paratuberculosis o enfermedad de Johne, principalmente en los rumiantes, posiblemente también se encuentre asociado con la enfermedad de Crohn en los humanos.¹⁻³

La paratuberculosis es un proceso crónico con largo periodo de incubación que provoca mala condición corporal, así como diarrea profusa que no responde a tratamiento médico, generando enteritis granulomatosa con presencia de bacilos ácido-alcohol resistentes que son eliminados a través de heces. Los animales se infectan principalmente durante las primeras etapas de su vida, durante la lactancia, a partir de la contaminación de la glándula mamaria con heces conteniendo micobacterias o bien al consumir forraje contaminado por micobacterias. Sin embargo, existen casos de infección a nivel intrauterino. Esta enfermedad se encuentra distribuida en el ámbito mundial y es responsable de generar pérdidas económicas importantes, debido a que sólo en algunas ocasiones existen manifestaciones clínicas su importancia real ha sido subvalorada.^{4, 5}

La identificación de Map de manera clásica ha sido realizada mediante su crecimiento en medios de cultivo a los que se adiciona micobactina.⁴ Aunque no es posible diferenciar cepas de Map mediante estudios bioquímicos, se han empleado diferentes métodos moleculares de genotipificación para su diferenciación, como el análisis de restricción de endonucleasas. No obstante, mediante este último procedimiento los resultados fueron poco claros para establecer una diferenciación de cepas.^{6,7} Por medio de la utilización de la secuencia de inserción específica de Map, denominada secuencia de inserción 900 (IS900) aplicada en el análisis de polimorfismos en los fragmentos de restricción (RFLP), se establecieron diferencias entre cepas, sugiriendo entonces una clasificación de tres diferentes patrones, denominándose C (de la palabra inglesa cattle), S (de sheep) e I (intermedia), cada uno de éstos con diferentes tipos de patrones.⁸ Si bien de manera inicial se sugirió que esta metodología sería útil para la identificación del origen animal de las cepas de Map, se ha determinado que un mismo patrón puede encontrarse en cepas de diferente origen animal, por lo cual se plantea como una herramienta de utilidad epidemiológica para conocer la distribución de estas cepas, posible origen de infección e infecciones interespecie en diferentes regiones geográficas, tanto entre animales domésticos como silvestres.⁸⁻¹⁵

En México existen evidencias serológicas y bacteriológicas de infección por Map en diferentes especies de rumiantes; sin embargo, no existen estudios de polimorfismo genético de aislamientos de Map.^{16, 17} El objetivo del presente trabajo fue identificar

a period of two years. Macroscopic and microscopic lesions associated to paratuberculosis were identified. (Table 1) (Figure 1, 2). At the same time, samples from different intestinal sections and mesenteric lymph nodes were taken for mycobacterial isolation in Löwestein-Jensen** medium added with J micobactine* (0.2 g/ml) and without this siderophore; these were incubated at 37°C. The first bacterial colonies were observed after eight to 14 weeks exclusively in the mediums added with J micobactine (Table 2). For a better colony development, mediums were kept for 50 weeks. After this, molecular Map identification took place by the polymerase chain reaction test (PCR) using as primers: 5'-TGG ACA ATG AGC GTT ACG GAG GTG G-3' y 5'-GAT CGG AAC GTC GGC TGG TCA GGA T-3'. Primers were designed from the IS900 insertion sequence. Cycle conditions were kept as follows: 94°C/3 min; 94°C/1 min; 65°C/1 min; 72°C/1 min initial denaturalization 30 times, and a final extension at 72°C for 3 min. Amplified products were run in a 2% agarose gel. Final amplified products consisted in 453 pairs of bases (Figure 3).

In order to carry out RFLP over the obtained isolations, first DNA were obtained from the Map colonies in the growing mediums; these were washed with a pre-lyses solution (Tris-HCl*** 50mM pH 8, EDTA*** 10mM pH 8) according to the methodology described by other authors.^{9,19} Mycobacteria were put at 80°C during 20 min to inactivate them. Afterwards 50 µl of lisozyme* solution were added to a final concentration of 10 mg/ml, shaking strongly and incubated at 37°C the whole night. After this, 75 µl of SDS** 10%/proteinase K (10 g/ml) solution were added shaking strongly followed by an incubation at 65°C/10 min. At the end of this, 1 ml of NaCl** 5M solution, 100 µl of CTAB/NaCl** previously heated (5 min/65°C) were added and incubated at 65°C/10 min. A chloroform:isoamilic** alcohol (24:1) solution was added and it was centrifuged at 12 000 g/8 min. Supernatant was recuperated and DNA was precipitated adding isopropanol** in a 0.6 proportion, mixing the phases carefully, continuing its centrifugation at 12 000 g/15 min. DNA was washed with 1 ml of 70% ethanol** and re-suspended in 30 µl of TE** 1X for its incubation during the whole night at 37°C. An electrophoresis in 0.8% agarose was made according to Van Soolingen et al.¹⁹ to determine DNA concentration. Not all the isolations were used since only two of them developed plentiful bacterial colonies, from which 4.5 µg of DNA concentration were obtained to carry out digestion by the BstEII*** restriction enzyme using 1 µl (10 UI/µl) for each sample, incubating it for 4h at 37°C. DNA fragments were separated by electrophoresis in 0.8% agarose gel. Afterwards DNA fragments were transferred into nylon membranes using a vacuum method.¹⁹ DNA was fixed by UV light and hybridization was made with IS900 probe marked with peroxidase. ECL Direct Labelling Kit. System† were used for hybridization

mediante RFLP, aislamientos de Map procedentes de caprinos del valle de México, utilizando como sonda la IS900.

Este estudio se realizó en un rebaño caprino ubicado en los alrededores de la ciudad de México, en donde existían antecedentes clínicos, anatomopatológicos y bacteriológicos de paratuberculosis o enfermedad de Johne. Se realizó la prueba de inmunodifusión en gel de agar (IDGA), de acuerdo con lo descrito por Chávez¹⁸ empleando el antígeno protoplasmático PPA-3* a 120 caprinos adultos, cuyas edades oscilaron entre los 1.5 y 5 años de edad, presentándose seroprevalencia del 6.73%. A partir del desecho y mortalidad en un periodo de dos años se realizó la necropsia de 27 caprinos, identificándose tanto macroscópica como microscópicamente lesiones asociadas a paratuberculosis (Cuadro 1) (Figuras 1 y 2). Paralelamente se tomaron muestras de diferentes secciones de intestino y linfonodos mesentéricos para realizar el aislamiento micobacteriano, empleando el medio de Löwestein-Jensen** adicionado con micobactina J* (0.2 g/ml) y sin este sideróforo, incubándose a 37°C, observándose las primeras colonias bacterianas entre las ocho y 14 semanas únicamente en los medios adicionados con micobactina J (Cuadro 2). Para un mayor desarrollo de colonias, los medios se mantuvieron hasta las 50 semanas. Posteriormente se procedió a la identificación molecular de Map, utilizando la prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) empleando los siguientes iniciadores: 5'-TGG ACA ATG AGC GTT ACG GAG GTG G-3' y 5'-GAT CGG AAC GTC GGC TGG TCA GGA T-3', que fueron diseñados a partir de la secuencia de inserción IS900. Las condiciones de los ciclos fueron las que se indican a continuación: desnaturalización inicial 94°C/3 min; 94°C/1 min; 65°C/1 min; 72°C/1 min, durante 30 veces, y una extensión final a 72°C, por 3 min. Los productos amplificados se corrieron en un gel de agarosa al 2%, siendo el producto final amplificado de 453 pares de bases (Figura 3). Para la realización del RFLP de los aislamientos obtenidos, se procedió a la obtención del ADN, a partir de las colonias de Map contenidas de los medios de cultivo que fueron lavadas en solución de pre-lisis (Tris-HCl*** 50mM pH 8, EDTA*** 10mM pH 8) de acuerdo con la metodología descrita en otros trabajos.^{9,19} Para inactivar a las micobacterias se sometieron a 80°C durante 20 min. Posteriormente se adicionó 50 µl de solución de lisozima* a una concentración final de 10 mg/ml, agitándose vigorosamente e incubando durante toda la noche a 37°C. Seguidamente se agregaron 75 µl de solución SDS** al 10%/proteinasa K (10 g/ml), agitando vigorosamente seguido de incubación a 65°C/10 min, después se añadieron 100 µl de solución de NaCl** 5M, 100 µl de CTAB/NaCl** previamente precalentado (5 min/65°C) y se incubó a

*Allied, Mo, USA.

**Difco, USA.

***J.T. Baker, México.

Cuadro 1

PROPORCIÓN DE LOS HALLAZGOS ANATOMOPATOLÓGICOS ASOCIADOS A PARATUBERCULOSIS Y OTROS PROCESOS EN LOS 27 CAPRINOS

ANATOMIC-PATHOLOGICAL FINDING PROPORTIONS ASSOCIATED TO PARATUBERCULOSIS AND OTHER PROCESSES IN 27 GOATS

<i>INTESTINE</i>						
<i>Macroscopic</i>		<i>Microscopic</i>			<i>Other findings</i>	
SDT	dge/++	mge/+	dge/-	fge/-	*	
10/27	10/27	2/27	2/27	1/27	12/27	

SDT: Serious Diffuse Thickened; dge/++: Diffuse Granulomatous Enteritis with plenty of mycobacteria; mge/+ : Multifocal granulomatous enteritis with moderate quantity of mycobacteria; dge/-: Diffuse granulomatous enteritis without presence of mycobacteria; fge/- : Focal granulomatous enteritis without presence of mycobacteria; *: Intestinal parasitosis, pneumonia, mastitis, arthritis, peritonitis.

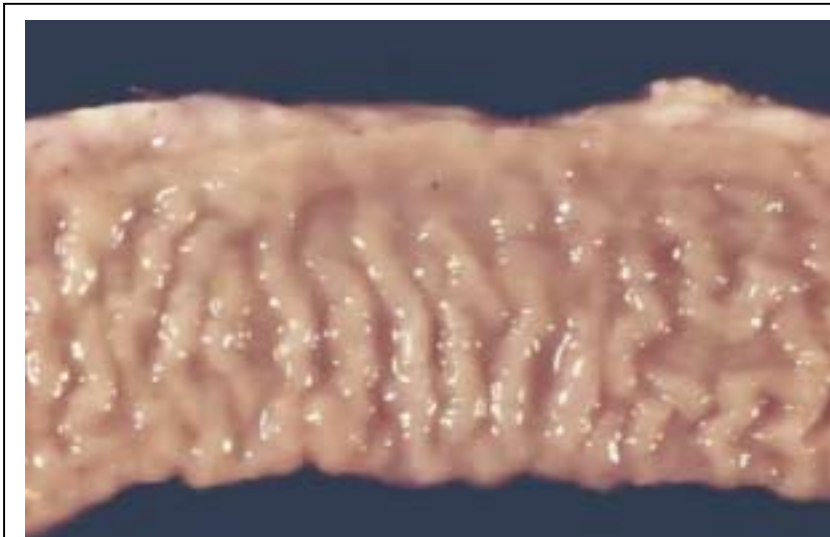


Figura 1. Engrosamiento difuso grave asociado a paratuberculosis en un caprino. Sección de yeyuno. Serious diffuse thickened associated to paratuberculosis in a goat. Jejunum section.

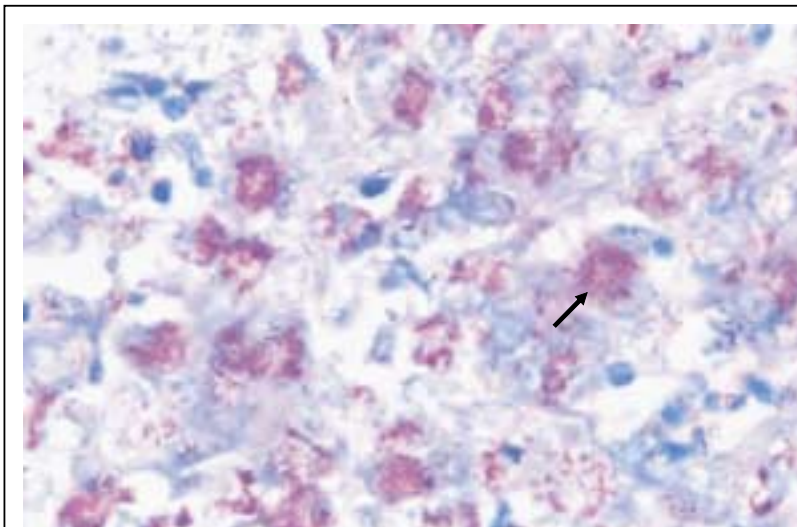


Figura 2. Presencia de abundantes estructuras ácido alcohol resistentes en el interior de macrófagos (flecha) a nivel de la lamina propia intestinal. Yeyuno. 600X. Tinción de Ziehl-Neelsen. Presence of many acid-fast structures inside macrophage (arrow) at the intestinal lamina propria level. Jejunum. 600X. Ziehl-Neelsen dye.

Cuadro 2

AISLAMIENTOS DE *Mycobacterium avium* SUBSP. *paratuberculosis* EN MEDIO DE LÖWESTEIN-JENSEN CON MICOBACTINA EN CAPRINOS CON DIFERENTES TIPOS DE ENTERITIS GRANULOMATOSA

***Mycobacterium avium* SUBSP. *Paratuberculosis* ISOLATIONS IN LÖWESTEIN-JENSEN MEDIUM ADDED WITH MICOBACTINE FROM GOATS WITH DIFFERENT GRANULOMATOUS ENTERITIS TYPES**

<i>Num. of cases</i>	<i>Type of lesion</i>	<i>Observation of the first colonies (weeks)</i>
10	DGE/++	8 - 14 weeks
2	Mge/+	8 - 12 weeks
2	DGE/-	Negative
1	Fge/-	Negative

DST: Diffuse Serious Thickened; Dge/++: Diffuse Granulomatous Enteritis with plenty of mycobacteria; Mge/+ : Multifocal Granulomatous Enteritis with moderate quantity of mycobacteria; Dge/-: Diffuse Granulomatous Enteritis without mycobacteria; Fge/- : Focal Granulomatous Enteritis without presence of mycobacteria.

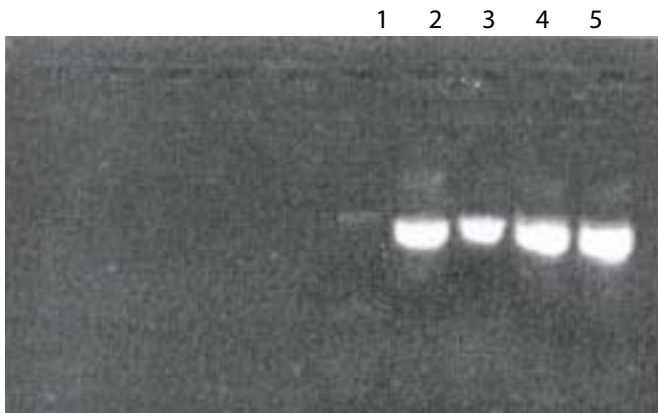


Figura 3. Amplificación de un producto de 453 pb. Carril 1: Testigo negativo; Carril 2: Testigo positivo; Carril 3: aislamiento de Map del Veterinary Research Institute, Rep. Checa; Carriles 4 y 5: Aislamientos de Map de cabras mexicanas. Técnica de PCR.

453 pb product amplification. Lane 1: negative control; Lane 2: positive control; Lane 3: Map isolation from The Veterinary Research Institute, Czech Rep.; Lanes 4 y 5: Map isolations from Mexican goats. PCR technique.

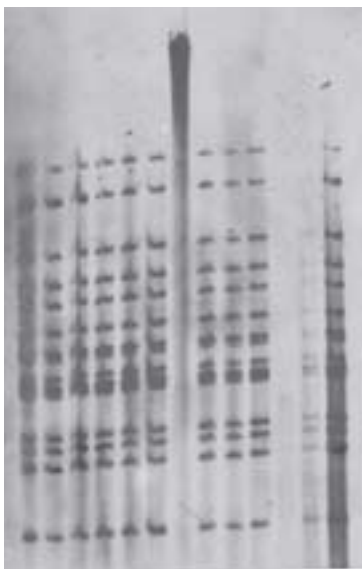


Figura 4. Tipos de polimorfismo genético después de la digestión con endonucleasa de restricción BstEII. Carriles 1 y 2 pertenecientes a aislamientos de cabras mexicanas. Carriles 3-6, 8 y 10, 12 y 13 corresponden a cepas control del Veterinary Research Institute, Rep. Checa. Carril 7: muestra sin la adición de la enzima de restricción. Carril 11, testigo negativo.

Genetic polymorphism types after BstEII restriction endonuclease digestion. Lanes 1 and 2 belong to isolations form Mexican goats. Lanes 3-6, 8 and 10, 12 and 13 correspond to control strains form The Veterinary Research Institute, Czech Rep. Lane 7: sample without restriction enzyme. Lane 11, negative control.

and detection. When RFLP profiles of the samples from goats in the Valley of Mexico were compared to control strains used as positive controls, it was determined that both belonged to C1 type (Figure 4). This type is the most common (74%) of the studied isolations in Europe as well as those from USA, where the mayor strain heterogeneity (C1, C3, C11 y C18) have been observed.⁹ Even though some characteristics, like time required for growth by different strains, have not been associated clearly to the pattern showed by RFLP, it has been suggested that the different patterns provably could explain the variation in the development of the disease among different affected flocks.^{9,10, 20} In this study, genetic polymorphism only could be carried out in two cases which corresponded to serious multi-bacillar granulomatous enteritis. Nevertheless, it can not be stated that this Map type is the only responsible for these kinds of lesions because other factors can be implicated in the host, such as its immunological state and resistance genes among others. The possibility of the existence of other types of Map can not be ruled out, neither in goats nor in other animal species that are affected by paratuberculosis in Mexico, especially considering the close association between species sheering meadows. Another problem is presented in animal importation (cattle, sheep, goats) from USA, Australia and New Zealand, where this infection is present with a diversity of Map types according to genetic polymorphism studies. The risk of the income of sub-clinical infected animals from other countries exist since in Mexico there are no official importation requirements related to paratuberculosis.^{9,10, 20, 21} This is the first study aimed to identified the genetic pattern of Map isolations in Mexico and it is necessary to carry out more extensive studies through out the country on different animal species susceptible to mycobacteriosis with the intention of settle down the necessary epidemiologic strategies for the control of this disease.

References

1. I. Thorel M, Krichevsky M, Levy-Frebault V. Numerical taxonomy of mycobactin-dependent mycobacteria, emended description of *Mycobacterium avium*, and description of *Mycobacterium avium* subsp. *avium* subsp. nov. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* subsp. nov., and *Mycobacterium avium* subsp. *silvaticum* subsp. nov.. *Int J Syst Bacteriol* 1990; 40:254-260.
2. Chiodini R, Van Kruiningen H, Thayer W, Couto J. Spheroplastic phase of mycobacteria isolated from patients with Crohn's disease. *J Clin Microbiol* 1986; 24:357-633.
3. Sanderson JD, Moss MT, Tizard MLV, Hermon-Taylor J. *Mycobacterium paratuberculosis* DNA in Crohn's disease tissue. *Gut* 1992; 33:890-896.
4. Chiodini RJ, Van Kruiningen HJ, Merkal RS. Ruminant paratuberculosis (John's Disease). The

65°C/10 min; por último, se adicionó una solución de cloroformo:alcohol isoamílico** (24:1), y se centrifugó a 12 000 g/8 min. El sobrenadante fue recuperado y el ADN se precipitó agregando isopropanol** a una proporción de 0.6, mezclando las fases cuidadosamente, continuando su centrifugación a 12 000 g/15 min. El ADN se lavó con 1 ml de etanol** al 70% y se resuspendió en 30 l de TE** 1X para su incubación toda la noche a 37°C. Para determinar la concentración del ADN, se realizó una electroforesis en agarosa al 0.8% de acuerdo con lo establecido por Van Soolingen et al.¹⁹ De esta manera, no se trabajó con todos los aislamientos ya que sólo dos de éstos desarrollaron abundantes colonias bacterianas, de los cuales se obtuvieron concentraciones de 4.5 g de ADN para realizar la digestión mediante la enzima de restricción BstEII*** utilizando 1 l (10 UI/ l) por muestra e incubándose por cuatro horas a 37°C, los fragmentos de ADN fueron separados mediante electroforesis en un gel de agarosa al 0.8%. Posteriormente fueron transferidos a membranas de nylon por método de vacío.¹⁹ El ADN se fijó con luz UV y se realizó la hibridación con la sonda IS900 marcada con peroxidasa. Para la hibridación y detección se empleó el sistema ECL Direct Labelling Kit.† Al comparar el perfil del RFLP de las muestras procedentes de caprinos del valle de México y contrastarlos con las cepas testigo empleadas como testigo positivo, se determinó que ambas pertenecían al tipo C1 (Figura 4). Este es el tipo más común (74%) de los aislamientos estudiados tanto de origen europeo como de los Estados Unidos de América; en ese país se ha observado la mayor heterogeneidad de cepas (C1, C3, C11 y C18).⁹ Si bien algunas características como tiempo requerido para el crecimiento de diferentes cepas no se ha asociado de manera clara con el patrón mostrado mediante RFLP, se ha sugerido que probablemente los diferentes patrones pudieran explicar la variación en la progresión de la enfermedad entre los diferentes hatos afectados.^{9,10, 20} En el presente trabajo el estudio de polimorfismo genético sólo pudo realizarse a partir de dos casos, los cuales correspondieron a enteritis granulomatosa grave y multi-bacilar; sin embargo, no puede afirmarse que este tipo de Map sea el único responsable de generar este tipo de lesiones, ya que otros factores pueden estar implicados en el huésped, como son su estado inmunológico y genes de resistencia, entre otros. Tampoco puede descartarse que pudieran existir otros tipos de Map, tanto entre caprinos como en otras especies animales que presentan la paratuberculosis en México, por la estrecha asociación que ocurre entre estas especies, al compartir praderas o bien por la importación de bovinos, ovinos y caprinos de Estados Unidos, Australia y Nueva Zelanda, en donde se presenta esta infección con diversidad de tipos de Map, de acuerdo con estudios de polimorfismo genético. Si se considera que al no existir al momento una exigencia oficial para importar animales libres de paratuberculosis a México, se tiene el riesgo de

- current status and future prospects. *Cornell Vet* 1984; 74:218-262.
5. Juste RA. Paratuberculosis: Una revisión. *Med Vet* 1984; 1:197-210.
 6. Collins DM, De Lisle GW. Restriction endonuclease analysis of various strains of *Mycobacterium paratuberculosis* isolated from cattle. *Am J Vet Res* 1986; 47:2226-2229.
 7. Whipple D, Le Febre RB, Andrews Jr RE, Thiermann AB. Isolation and analysis of restriction endonuclease digestive patterns of chromosomal DNA from *Mycobacterium paratuberculosis* and other *Mycobacterium* species. *J Clin Microbiol* 1987; 25:1511-1515.
 8. 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; 28:1591-1596.
 9. Pavlik I, Horvathova A, Dvorska L, Bartl J, Svastova P, Du Maine R, et al. Standardization of restriction fragment length polymorphism analysis for *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *J Microbiol Methods* 1999; 38:155-167.
 10. Whittington RJ, Taragel CA, Ottaway S, Marsh I, Seaman J, Fridrissdottir V. Molecular epidemiological confirmation and circumstances of occurrence of sheep (*S*) strains of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in cases of paratuberculosis in cattle in Australia, and sheep and cattle in Iceland. *Vet Microbiol* 2001; 79:311-322.
 11. Pavlik I, Bartl J, Dvorska L, Svastova P, du Maine R, Machacova M, et al. Epidemiology of paratuberculosis in wild ruminants studied by restriction fragment length polymorphism in the Czech Republic during 1995-1998. *Vet Microbiol* 2000; 77:231-251.
 12. Greig A, Stevenson K, Henderson D, Pérez V, Hughes V, Pavlik I, et al. Epidemiological study of paratuberculosis in wild rabbits in Scotland. *J Clin Microbiol* 1999; 37:1746-1751.
 13. Moreira AR, Paolicchi F, Morsella C, Zumárraga M, Cataldi A, Fabiano B, et al. Distribution of IS900 restriction fragment length polymorphism types among *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolates from Argentina and Europe. *Vet Microbiol* 1999; 70:251-259.
 14. Cousin DV, Williams SN, Hope A, Eamens GJ. DNA fingerprinting of Australian isolates of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* using IS900 RFLP. *Aust Vet J* 2000; 78:184-190.
 15. Bauerfind R, Benazzi S, Weiss R, Schliesser T, Willems H, Balger G. Molecular characterization of *Mycobacterium paratuberculosis* isolates from sheep, goats and cattle by hybridization with a DNA Probe to insertion element IS900. *J Clin Microbiol* 1996; 34:1617-1621.
 16. Vélez-Hernández M, Domínguez-Punaro M, Del Río-Alfaro J, Trigo FJ, Suárez-Güemes F, Chávez-Gris G. Control of paratuberculosis in two goat flocks. Proceedings of the 6th International Colloquium on Paratuberculosis; 14-18 February 1999, Melbourne, Australia. Madison, Wisconsin, USA. Manning EJB, Collins MT. 1999:121-125.
 17. Domínguez-Punaro MC, Del Río-Alfaro J, Cervantes-Olivares RA, Suárez-Güemes F, Trigo JF, Chávez-Gris G. Immune response, pathological features and bacteriological findings after vaccination of a goat flock. Proceedings of the 7th International Colloquium on Paratuberculosis, 2002 11-14 June, Bilbao, España, Juste RA, Geijo MV, Garrido J. 2003:114-117.
 18. Chávez GG. Estudio comparativo de las lesiones y de la respuesta inmunológica observadas en corderos infectados experimentalmente con *Mycobacterium paratuberculosis* y *Mycobacterium avium* subsp. *silvaticum* (tesis doctoral). Zaragoza (Aragón) España: Univ de Zaragoza, 1993.
 19. Van Sooling D, Herman PWM, De Haas PEW, Soll DR, Van Embden JDA. The occurrence and stability of insertion sequences in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains evaluation of IS-dependent DNA polymorphism as a toll in the epidemiology of tuberculosis. *J Clin Microbiol* 1991; 29:2578-2586.
 20. Whipple D, Kapke P, Vary C. Identification of restriction fragment length polymorphisms in DNA from *Mycobacterium paratuberculosis*. *J Clin Microbiol* 1990; 28:2561-2564.
 21. Chávez-Gris G. Control de la paratuberculosis en ovinos y caprinos. Memorias de la 9ª. Reunión Anual de CONASA; 2000 octubre 24-26; Puebla (Puebla) México: Consejo Nacional de Sanidad Animal, 2001:88-93.