

Revisiones



Paratuberculosis bovina: ¿conocemos la situación real de la enfermedad en la ganadería colombiana?[†]

Revista
Colombiana de
Ciencias
Pecuarias

Bovine paratuberculosis: ¿Do we know the real situation of this disease in Colombian cattle?

Paratuberculose bovina: Não sabemos a real situação da doença no gado colombiano?

Margarita M Zapata Restrepo^{*,} MV; Juan D Rodas González^{1,} MV, MS, PhD; Juan G Maldonado Estrada^{2,} MVZ, MS, PhD.

¹Grupo de Investigación en Ciencias Veterinarias Centauro, Escuela de Medicina Veterinaria, Facultad de Ciencias Agrarias, y Sede de Investigación Universitaria (SIU, Laboratorio 233). Universidad de Antioquia. Carrera 75 N° 65-87. Medellín, Colombia.

(Recibido: 14 agosto, 2006; aceptado: 29 agosto, 2008).

Resumen

El Mycobacterium avium subespecies paratuberculosis (Map) es el agente etiológico causante de una gastroenteritis granulomatosa severa en rumiantes, conocida como paratuberculosis bovina o enfermedad de Johne, caracterizada por la presentación de diarrea persistente y emaciación progresiva, que causan finalmente la muerte. Los animales menores de 6 meses de edad son los más susceptibles a contraer la infección por medio de la ingestión del bacilo a través de la leche o el pasto contaminado, o por vía transplacentaria y a pesar de que excretan el agente en las heces, no presentan signos clínicos antes de 2 a 5 años, tiempo que dura el periodo de incubación. Debido a la falta de tratamiento, cualquier medida de control debe estar enfocada en la identificación de los animales infectados mediante pruebas diagnósticas confiables, que permitan detectar el agente antes del inicio de los signos clínicos para evitar la diseminación de la infección a los animales del mismo hato o a otros, en caso de la venta de animales asintomáticos. La infección es de distribución mundial y es responsable de importantes pérdidas económicas en la industria de la producción bovina. En nuestro medio, se ha documentado la enfermedad en hatos lecheros del municipio de San Pedro de los Milagros (Antioquia), pero se cree que hay muchas otras zonas infectadas, por lo que se requiere el desarrollo de métodos eficientes de detección, diagnóstico y control de la enfermedad. En la presente revisión, se tratarán los aspectos concernientes a la paratuberculosis bovina y finalmente se destacan algunas perspectivas de investigación en esta enfermedad.

Palabras clave: enteritis crónica en ruminantes, Mycobacterium avium paratuberculosis

[†] Para citar este artículo: Zapata Restrepo MM, Rodas González JD, Maldonado Estrada JG. Paratuberculosis bovina: ¿conocemos la situación real de la enfermedad en la ganadería colombiana? Rev Colomb Cienc Pecu 2008; 21:420-435.

* Autor para el envío de la correspondencia y la solicitud de separatas: Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad de Antioquia Ciudadela de Robledo. Carrera 75 No. 67-85, oficina 46-225. E. mail: zapatamar@gmail.com Tel (+574) 2199125, Fax (+574) 2199160. Medellín, Colombia. Este trabajo fue financiado por la Universidad de Antioquia (Proyecto CODI E01113). Los autores Manifiestan que no hay conflicto de interés con la entidad financiadora.

Summary

Mycobacterium avium subspecies *paratuberculosis* (Map) is the etiologic agent of a severe granulomatous gastroenteritis in ruminants, known as bovine paratuberculosis or Johne's disease and characterized by persistent diarrhea and progressive emaciation that finally cause death. Calves under 6 months of age are the most susceptible to this bacterial infection by transplacental route, milk consumption or grassland contaminated feeding and although, they do not show clinical signs until they are 2 to 5 years old (incubation period), they commonly spread Map through their feces. A remarkable difficulty concerning Johne's disease is its lack of appropriate treatment; therefore any control scheme must be focused in identification of infected animals by reliable diagnostic tests before the appearance of clinical manifestations, in order to avoid dissemination of the infection to animals of the same or different herd, particularly when marketing possible asymptomatic animals. The infection has a worldwide distribution and it is responsible of important economic losses in cattle industry. Bear to us, the disease has been reported in dairy herds of the municipality of San Pedro de los Milagros (Antioquia), but it is thought that there are many other infected regions, which makes more prominent the need of efficient methods for Map detection for rapid diagnosis and efficient control of the dissemination of the infection. In this review, we highlight some important features of bovine paratuberculosis and provide some insight regarding probable research perspectives of this disease.

Key words: chronic enteritis in ruminants, *Mycobacterium avium paratuberculosis*

Resumo

O *Mycobacterium avium* subespécie *paratuberculose* (Map) é o agente que provoca uma severa gastroenterite granulomatosa em ruminantes, conhecida como doença de Johne ou paratuberculose bovina, caracterizada pela apresentação de diarreia persistente e caquexia progressivo, acabou provocando a morte ss animais com menos de 6 meses são os mais suscetíveis a contrair a infecção por tuberculose através da ingestão de leite contaminado ou erva ou via a transmissão e não obstante o facto de o agente excretada nas fezes, não há sinais clínicos antes de 2 a 5 anos, enquanto que o período de incubação dura. Devido à falta de tratamento, qualquer medida de controle deve estar centrada na identificação de animais infectados através de testes de diagnóstico fiável, para identificar o agente antes do início dos sinais clínicos para evitar a disseminação da infecção para os animais do mesmo rebanho ou outros, se a venda de animais assintomáticos. A infecção é distribuída em todo o mundo e é responsável por grandes perdas económicas para a produção da indústria bovina. Na nossa área, tem documentado a doença em rebanhos leiteiros no município de San Pedro de los Milagros (Antioquia), mas cree que existem muitas outras áreas infectadas, aquilo que é exigido pelo desenvolvimento de métodos eficazes de detecção, diagnóstico e controle de doenças. Nesta revisão, vai tratar dos aspectos relativos à paratuberculose bovina e, finalmente, destaca algumas perspectivas de investigação sobre esta doença.

Palavras chave: enterite crónica em ruminates, *Mycobacterium avium paratuberculose*

Introducción

La paratuberculosis, también conocida como enfermedad de Johne, es una inflamación crónica granulomatosa del tracto digestivo que afecta principalmente a los rumiantes domésticos y es causada por el microorganismo *Mycobacterium avium*, subespecie *paratuberculosis* (Map) (60). La enfermedad de Johne fue descrita por primera vez en Alemania, en 1884 por Johne y Frothingham, mientras que en 1910, Trowt logró el crecimiento del Map en el laboratorio y la reproducción de la enfermedad en vacas infectadas bajo condiciones experimentales (37). La paratuberculosis es una enfermedad mediada y causada por la respuesta

inmune que se produce en el animal infectado contra el agente, más que por toxinas u otras sustancias liberadas por el Map y como resultado, la enfermedad fluctúa entre periodos de exacerbación y de remisión (64).

La paratuberculosis causa grandes pérdidas económicas: en Estados Unidos por ejemplo, los productores tienen pérdidas anuales, cercanas a 1.5 billones de dólares (58) y en modelos de regresión de la enfermedad se han estimado pérdidas entre 40 y 227 dólares/ animal/año, basados en el porcentaje de vacas eliminadas con signos clínicos, las pérdidas en producción de leche, las bajas en la eficiencia reproductiva, y las pérdidas en el valor de venta de

la canal (17, 18, 35). Otro estudio indica que las vacas afectadas con esta enfermedad presentan una reducción en la producción entre el 5 y el 15% (64). La paratuberculosis bovina tiene distribución mundial, principalmente en países de temperaturas templadas (8), pero también se ha reportado en países latinoamericanos (1, 49, 62).

En Colombia fue diagnosticado por primera vez en 1924, en la hacienda el Hato en Usme. Posteriormente el Instituto Colombiano Agropecuario (ICA) reportó casos entre 1986 y 1993 en el departamento del Meta (31). En Antioquia se han informado casos en el Municipio de San Pedro de los Milagros, en una de las fincas lecheras del departamento (55). Sin embargo, hasta la fecha no se tiene ningún estudio epidemiológico sobre la prevalencia o incidencia de la enfermedad, en el hato bovino nacional.

Agente etiológico de la Paratuberculosis bovina

El *Mycobacterium avium* subespecies *paratuberculosis* (*Map*) a pesar de no estar incluido en la clasificación Gram, da tinción gram+; es un bacilo ácido-alcohol resistente, con mucha similitud al *M. avium* (45, 66); sin embargo, difiere de éste en varias características: el tiempo en crecimiento en los medios de cultivo, la ruta de infección (pulmonar vs digestiva), el tropismo tisular (pulmón vs intestino), y la patogenicidad y especificidad de especies. Por su conformación antigénica, está estrechamente relacionado con el *M. avium*, *M. intracellulare* y *M. scrofulaceum*, y su diferencia genética más evidente con respecto a las demás Micobacterias es la presencia de 14 a 18 copias de la secuencia de inserción 900, denominada IS900, la cual es usada en el diagnóstico por la prueba reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (5, 19, 27). Un rasgo específico de especie del *Map* es su dependencia de la micobactina para el crecimiento, un componente de la pared celular, quelante del hierro y producido por la mayoría de otras micobacterias, con excepción del *Map* (67). El *Map* puede conservar su capacidad infectante en pastos contaminados hasta por un año. Es susceptible a pH elevado en suelo y a elevadas concentraciones de calcio (17).

Antígenos y factores de virulencia del *Map*

Las micobacterias poseen dos características que explican su eficacia para sobrevivir y multiplicarse en los macrófagos: 1) la pared de la célula micobacteriana y su resistencia a la destrucción, y 2) factores generados por la micobacteria que pueden neutralizar los productos antibacteriales producidos por los macrófagos (59, 68). El lipoarabinomannan (LAM), considerado como el mayor antígeno de superficie de las Micobacterias (32), es un lípido asociado con la intervención en la maduración del fagosoma y con la inhibición de la apoptosis del macrófago (28, 74). El bloqueo de la fusión que se da entre el fagosoma que contiene la micobacteria, con el endosoma tardío, está relacionado con el receptor de transferrina (2, 26, 74). El *Map* también evita la activación de la bomba protón ATPasa y así interfiere en el proceso de acidificación del fagosoma necesario para la maduración del mismo y posterior unión en el lisosoma para la destrucción intracelular de la bacteria (26, 68).

A pesar de que no se han caracterizado otros lípidos y glicolípidos con carácter antigénico en el *Map*, se cree que las micobacterias comparten diferentes características antigénicas, entre las que se incluyen: las proteínas GroES y GroEL, altamente antigénicas; la proteína 34-kDa, inductora de la respuesta inmune humoral; la bacterioferritina, conocida como antígeno D; y las proteínas reductasa alquil hidroperoxidasas AhpC y AhpD, involucradas en la detoxificación de los intermediarios del nitrógeno reactivo (32). Otro antígeno específico de *Map* es la proteína HspX, la cual está implicada en la unión celular y en la estimulación de la fagocitosis y se ha encontrado incluso expresada por el *Map* dentro de macrófagos (32). El elemento de inserción IS900, específico del *Map* codifica para proteínas como la proteína de expresión dependiente de hospedero (Hed, de las siglas en inglés *Host expression dependent*) con funciones de inducción de la respuesta inmune (32).

Respecto de los factores de virulencia del *Map*, la proteína de unión a fibronectina (FAP-P) es la responsable de la unión e internalización del *Map* en la mucosa intestinal (32, 60). La fibronectina se une a las integrinas presentes en el borde apical de

las células M del intestino y por medio de las FAP-P el *Map* se une a dichas células (60), lo cual explica en parte la preferencia del *Map* por las regiones donde están presentes las células M, más que por epitelio de absorción del intestino. La proteína de membrana 35-kDa también juega un papel importante en la invasión a las células epiteliales (32). Las proteínas de superficie celular del *Map* PE/PPE, ricas en glicina son identificadas por sus dominios específicos: Pro-Pro-Glu y Pro-Glu, respectivamente, son importantes desde el punto de vista antigénico: proveen una variación antigénica que induce la respuesta inmunológica del hospedero dependiente del tipo de proteína PE/PEP que se exprese en el *Map* (46).

Características de comportamiento en cultivo del Map

El *Map* es de crecimiento lento, generalmente de entre 8 a 12 semanas y forma colonias rugosas, no pigmentadas (67). Esta situación dificulta la implementación del cultivo bacteriológico como prueba de detección para el diagnóstico del *Map*. Los medios de cultivo más utilizados son: el medio de Herrold con yema de huevo con micobactina (HEYM), los medios Middlebrook 7H9, 7H10 y 7H11 con micobactina, el medio Lowenstein-Jensen con micobactina y medios basados en suero, tales como el Dubos modificado (24, 62, 67). A pesar de ser el cultivo bacteriológico considerada la prueba estándar para el diagnóstico del *Map*, su sensibilidad es baja —aproximadamente un 50%, lo cual depende en esencia del medio de cultivo seleccionado (19), las técnicas empleadas para descontaminar la muestra fecal, del método empleado para concentrar selectivamente el agente en la muestra, y de la cepa de *Map* a identificar (24, 62).

Con base en las características del cultivo y en la caracterización molecular por PFGE (electroforesis en gel en campo pulsante), las cepas del *Map* se han clasificado en tres tipos I, II y III: las cepas tipo II, fueron las primeras cepas de *Map* de crecimiento lento en cultivo que se aislaron de vacas; y las cepas tipos I y III, fueron aisladas inicialmente en ovejas y con poca frecuencia se han aislado en cabras o vacas. Estas dos últimas se caracterizan por su cultivo difícil y extremadamente lento (35, 62). Durante el cultivo es

muy frecuente la contaminación, especialmente por hongos, debido a la baja concentración del agente en las muestras de heces, lo que hace necesario la utilización de sustancias descontaminantes como la formalina, el ácido oxálico, el hidróxido de sodio, el cloruro de hexadecilpiridinio (HCP), entre otros. Algunos autores han obtenido buenos resultados de descontaminación utilizando una solución al 0.9% de cloruro de hexadecilpiridinio (HCP), amfotericina B, vancomicina ó ácido nalidíxico (62).

Para facilitar el aislamiento del *Map* es importante concentrar el agente previo al cultivo. Según algunos resultados, las muestras se pueden centrifugar a 1700xg antes de hacer el cultivo, con buenos resultados; también se recomienda utilizar 1 gramo de heces por muestra como cantidad suficiente para obtener una tasa alta de aislamiento, sin embargo esto también puede aumentar el grado de contaminación (62).

Patogénesis de la infección por el Map

La principal vía de infección es la fecal-oral, a través de la ingestión de alimento, ya sea pasto o leche contaminados con materia fecal que contiene el *Map* (67). Sin embargo, a pesar de que se ha reportado la transmisión intrauterina durante los últimos estadios de gestación y se ha aislado el bacilo del endometrio de hembras gestantes y no gestantes en animales con forma clínica o subclínica de la infección (8) y de fetos provenientes de vacas infectadas (67), no se han reportado hasta el momento abortos debidos a esta enfermedad (17). Los animales más susceptibles de contraer la infección son los jóvenes, especialmente antes de los seis meses de edad, pero las manifestaciones clínicas aparecen a la edad de dos a cinco años (35). El estado nutricional y hormonal también puede influenciar la susceptibilidad a la infección por *Map*; en estudios realizados en ratones se demostró que la dieta con reducción del calcio protegió a los animales contra la infección y que por el contrario un incremento en vitamina D en la dieta revertió el efecto protector del calcio. Durante el periodo del parto y la lactancia las hormonas prolactina y de crecimiento se incrementan lo cual favorece la multiplicación intracelular del *Map*

en los macrófagos del bovino (37). Otros factores inherentes al animal que influyen en la diseminación de la infección son la edad, el volumen de la dosis infectiva, el estrés y los agentes inmunosupresores, como es el caso de la infección concomitante con el virus de la diarrea viral bovina (14). La expulsión del agente puede ocurrir en cualquier momento durante el curso de la enfermedad, pero la bacteria es raramente detectada antes de los dos años de edad (35). Durante la fase clínica de la infección, la expulsión de microorganismo en las heces es alta y puede exceder 10^{10} organismos/g de heces (10).

Una vez que el *Map* llega al intestino del animal, se une a las proteínas y glicoproteínas presentes en la mucosa y luego es fagocitada por las células M de las placas de Peyer, las cuales se la presentan a los macrófagos de la zona del manto, en cuyo interior se multiplica el *Map* (39, 58, 67). Las primeras lesiones granulomatosas se observan en las regiones interfoliculares de las placas de Peyer y los nódulos linfáticos mesentéricos, tres meses después de la infección. En necropsias realizadas a animales infectados naturalmente, se ha observado lesiones severas típicas de enteritis crónica. También se pueden observar lesiones leves, moderadas y severas todas con presencia de diferentes cantidades de macrófagos (67). Los hallazgos de *Map* en células mononucleares de sangre periférica y tejido, sugieren que los macrófagos infectados pueden funcionar como vehículos en la diseminación de los organismos desde los sitios infectados (20, 48).

La Infección con *Map* afecta la respuesta mediada por linfocitos T, especialmente durante los estados avanzados de la enfermedad. Durante los estados subclínicos de la infección, el *Map* induce la respuesta inmune mediada por células del hospedero, induciendo la proliferación de linfocitos y producción de citoquinas. A medida que progresa la infección hacia un estado clínico, la respuesta inmune mediada por células declina y se da una respuesta fuerte de tipo humoral. Durante los estados finales de la enfermedad, la falta de respuesta inmune mediada por células específicas de antígeno puede desencadenar una rápida diseminación de la infección en el hato. Por otro lado, en los estados tempranos de la infección, las lesiones del tipo tuberculoide están asociadas con la secreción

de IFN- γ , a una fuerte respuesta dominada por linfocitos T CD4⁺, mientras que la respuesta celular de linfocitos CD8⁺ está asociada con los estados tardíos donde predominan las lesiones tipo lepromatosa, o con estados susceptibles del animal infectado, lo cual indica que existe una fuerte correlación entre el estado de la enfermedad, la susceptibilidad o resistencia del animal y la respuesta inmune especialmente mediada por células (63).

Signos clínicos de la enfermedad de Johne

La enfermedad de Johne cursa con cuatro categorías o estados definidos en concordancia con la severidad de los signos clínicos, la eliminación potencial de organismos en el ambiente, y la probabilidad de detectar la enfermedad usando métodos corrientes de laboratorio. Por cada animal con enfermedad avanzada puede haber 25 animales infectados en una granja. La presentación clínica de la enfermedad tiene forma de iceberg (véase Tabla 1) (72).

Estados de la enfermedad de Johne

Infección silente (Estado I). En este estado se encuentran animales de hasta dos años de edad que no presentan ningún signo clínico y aparentemente son iguales al resto de los animales, la infección sólo es detectable en sus tejidos por cultivo o examen histopatológico y, aunque eliminan el agente por vía fecal, las cantidades de microorganismos están por debajo del umbral de detección por las pruebas de rutina (72).

Tabla 1. Estados clínicos de la enfermedad de Johne.

Estado	Tipo de animal afectado	Animales afectados (n)
IV	Enfermedad clínica avanzada: adultos	1*
III	Enfermedad clínica: adultos	1-2
II	Enfermedad subclínica: portadores adultos	4-8
I	Infección silenciosa: terneros, animales jóvenes y adultos	10-14
	Total de cabezas de ganado afectadas	15-25*

* Algunos cálculos indican que por cada 15 a 25 animales afectados, sólo un animal se detectará con la enfermedad avanzada (Adaptado de la referencia 72).

Enfermedad subclínica (Estado II). Adultos portadores. Los animales con infección subclínica por *Map* no presentan diarrea u otros signos de enfermedad de Johne, pero pueden tener niveles detectables de anticuerpos contra *Map*, alteración

de la respuesta inmune celular y estar afectados por otras enfermedades como infertilidad o mastitis; eliminan el agente por heces pero sólo 15 a 25% son detectados por los medios de cultivo. La mayoría de ellos no son detectados por las técnicas usadas corrientemente y algunos avanzan al estado III de la afección mientras que otros son eliminados por causas no relacionadas con la enfermedad de Johne (72).

Enfermedad clínica (Estado III). Se presenta después de un periodo de incubación que dura entre 2 a 10 años, incluye la pérdida gradual de peso (a pesar de un apetito normal o en ocasiones aumentado). Durante un periodo de pocas semanas la consistencia de la materia fecal es más fluida y esto concuerda con la pérdida de peso, la diarrea puede ser intermitente al comienzo con periodos de consistencia normal de la materia fecal. Usualmente el animal incrementa el consumo de líquido. Los signos vitales como frecuencia cardiaca, respiratoria y temperatura son normales. Los animales raras veces permanecen en este estado por más de 3 ó 4 meses sin progresar al estado IV y unos pocos casos regresan al estado II, en el que permanece por un periodo indeterminado (72).

La disminución de la concentración de proteínas totales, albúmina, triglicéridos y colesterol en el plasma, son hallazgos típicos, en la medida que progresa la enfermedad, no obstante, aunque estos cambios en suero y plasma están asociados con la paratuberculosis, se consideran predictivos y característicos del estado clínico de la enfermedad, pero no son específicos para ser usados como prueba diagnóstica de la misma. Las enzimas musculares pueden estar aumentadas como resultado del desgaste muscular. En algunos casos raros la diarrea comienza de repente con una defecación acuosa, mientras que en otros la defecación puede estar normal al comienzo. Muchos animales en este estado pueden ser detectados por las pruebas comerciales de Elisa e inmunodifusión en gel de agar (AGID) (72).

Enfermedad clínica avanzada (Estado IV). A medida que la enfermedad progresa se incrementa en el animal infectado la letargia, debilidad y emaciación. El edema intermandibular debido a la hipoproteínemia es típico en enfermos avanzados.

La caquexia y la diarrea caracterizan los estados terminales de la enfermedad. Muchos animales son eliminados del hato antes de este estado debido a la disminución de la producción de leche, pérdida severa de peso o ambos. Los animales pueden progresar de estado II a estado IV en unas pocas semanas. Una vez la diarrea se hace profusa y la hipoproteínemia severa con edema submandibular, la condición del animal se deteriora rápidamente, a veces en cuestión de días. Los animales destinados a sacrificio muchas veces no son aprobados para consumo. Otras veces la muerte ocurre como resultado de la deshidratación y la caquexia (72).

Características de la respuesta inmune contra el *Map*

Desde el momento en que el *Map* cruza la barrera epitelial de la mucosa intestinal, la bacteria es fagocitada por los macrófagos subepiteliales, por mecanismo de receptores de superficie (48, 60). Los macrófagos representan la primera línea celular de defensa contra la invasión bacteriana, son presentadores de antígenos a través del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH) de clase I y clase II y secretan citoquinas desencadenantes de la respuesta inflamatoria, como el Factor de Necrosis tumoral alfa (TNF α), y algunas interleuquinas como IL-1, IL-6 (60, 72). Sin embargo, el *Map* tiene la habilidad de evadir estos mecanismos de defensa y es capaz de sobrevivir y replicarse dentro del macrófago (36). Los receptores del complemento CR1, CR3, CR4, se consideran importantes para reconocer y unirse a ligandos en micobacterias, así mismo el receptor de las inmunoglobulinas (FcR), el receptor de manosa (MR), el receptor de unión a lipopolisacáridos (CD14), los receptores de transferrina, los receptores barredores de radicales libres de oxígeno y el receptor de la proteína surfactante A (41, 60).

El receptor de unión al *Map* parece ser el CR3 y está implicado en la inhibición de la activación de la explosión respiratoria por parte del macrófago cuando entra en contacto con el respectivo ligando de la micobacteria (60). El principal tipo de células involucradas en la respuesta inmune son los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ que secretan citoquinas como el IFN gamma (IFN- γ) e interleuquinas,

importantes activadores de macrófagos para eliminar el *Map* (53).

Bajo condiciones normales en un animal resistente a la infección, el *Map* es mantenido dentro del fagosoma del macrófago (3, 26, 63), el cual sufre un proceso de maduración y acidificación mediante la fusión con vesículas de endosomas y la interacción con el aparato de Golgi y el retículo endoplasmático rugoso (59) y por último se forma la organela digestiva, el fagolisosoma, que tiene la habilidad de degradar la pared bacteriana y proteínas y algunas veces eliminar el microorganismo (2, 28, 60). La fagocitosis también implica la unión a complejos de oxidasa de NADPH en la membrana del fagosoma que cataliza la producción de derivados tóxicos del oxígeno con efectos bactericidas como el óxido nítrico (38). Trabajos realizados *in vitro* en modelos de líneas celulares de macrófagos para tratar de explicar el fenómeno de la evasión de la respuesta inmune por parte del *Map* (33, 34, 72), han descubierto una serie de estrategias que induce el bacilo en su célula hospedera, implicadas en su éxito en la colonización, entre los que se describen los siguientes: 1) el *Map* puede interferir con la expresión proteica y su tráfico intracelular en el macrófago, para interferir con la fusión de la vacuola fagocítica y el lisosoma; 2) el *Map* puede expresar proteínas que interfieren de manera directa con la activación del macrófago; y 3) el *Map* puede interferir en la activación de los macrófagos a través del bloqueo de la activación de los receptores tipo Toll (*Toll-like receptors*) (65).

Aunque la producción de óxido nítrico por el macrófago parece ser limitado (72) y se podría pensar que esto puede favorecer la permanencia del *Map* en su interior, se ha observado que el tratamiento de los macrófagos con IFN- γ incrementa la producción de óxido nítrico pero no se genera el efecto tóxico suficiente para eliminar el *Map* (36), lo que indica que ésta sustancia no es la única estrategia que aprovecha la micobacteria para evadir la respuesta inmune. Por otra parte, el macrófago dispone de una gran variedad de mecanismos para lograr activar una respuesta eficiente contra el *Map*, que incluye la activación de varios genes implicados en procesos metabólicos y de activación del macrófago (69); asimismo, en modelos

celulares producidos a partir de monocitos para el estudio de la interrelación entre el macrófago y el *Map*, importantes mecanismos de respuesta a la micobacteria, que pueden diferir en relación con su estudio en macrófagos derivados de monocitos o en líneas celulares de macrófagos (70, 75). Estas diferencias deben ser tenidas en cuenta al momento de diseñar estudios *in vitro* sobre la interrelación entre el macrófago y el *Map*.

Los linfocitos Th1 secretan citoquinas como IL-2, TNF- β , e IFN- γ que regulan la respuesta inmune celular, mientras que los linfocitos Th2 secretan citoquinas como la IL-4, y la IL-10 las cuales inducen la respuesta inmune humoral (6, 60, 63). La respuesta celular está dominada por una subpoblación de linfocitos CD4⁺ en las lesiones tuberculoides que se observan en los estadios tempranos de la infección, mientras que las lesiones lepromatosas que se observan en los estadios tardíos corresponden a predominancia de linfocitos CD8⁺, ambos regulados por la respuesta de las células Th2 (6, 60). En los macrófagos bovinos infectados con *Map* disminuye la expresión de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) clase I y clase II durante las primeras 12 a 24 horas postinfección (72) lo cual resulta en una deficiente capacidad del macrófago para presentar los antígenos del *Map* a los linfocitos T en la fase de activación de la respuesta inmune (29, 40).

Métodos para el diagnóstico de la enfermedad de Johne

El diagnóstico de la paratuberculosis puede realizarse de varias maneras: 1) la detección del *Map* o su ADN; ó 2) por la identificación de anticuerpos contra el microorganismo. Existen ocho pruebas diferentes para el diagnóstico de paratuberculosis; tres métodos para la detección del agente etiológico, cuatro pruebas para la detección de anticuerpos séricos y una prueba para la inmunidad mediada por células (12). Para hallar anticuerpos, se ha usado ampliamente variantes de la prueba de ELISA como la INF- γ ELISA y la ELISA-LAM, las cuales tienen alta especificidad pero muy baja sensibilidad para detectar animales con infección subclínica (32, 55).

El cultivo bacteriano a partir de heces de animales que presenten excreción fecal, sigue siendo una prueba contundente para confirmar el diagnóstico dada su alta sensibilidad (23), sin embargo el lento crecimiento —de 12 a 16 semanas, ó 4 a 7 con el método BACTEC, representa un inconveniente para dar un diagnóstico rápido y oportuno (20). La sensibilidad de las pruebas puede verse baja en comparación con otras pruebas, básicamente porque la infección por *Map* progresa lentamente, por lo tanto puede haber una proporción significativa de animales en estados tempranos de infección que son clínicamente normales y no tienen una respuesta inmune o están excretando la bacteria (39). En consecuencia, las pruebas realizadas en estos animales pueden no detectar la infección. Lo contrario ocurre cuando las pruebas para la paratuberculosis son aplicadas a animales con signos clínicos de la enfermedad de Johne donde las pruebas pueden ser eficientes para dar un diagnóstico más confiable (12, 22, 61). Por otra parte, en animales infectados el *Map* puede ser aislado de heces y de ganglios linfáticos asociados con diferentes órganos, sin importar el tipo de animal afectado —tipo leche, carne o doble propósito (54).

Pruebas diagnósticas basadas en genética molecular

Estas pruebas permiten la identificación de una secuencia de ADN específica del *Map*. La prueba de PCR es la técnica más usada en la actualidad para detectar específicamente el elemento de inserción IS900, específico del *Map* (12, 32, 37), aunque también se han descrito los genes 16S rRNA y el HspX (12, 37). La prueba de ADN ofrece la ventaja de ser rápida, teniendo en cuenta que un animal es excretor fecal en sólo 3 días, por lo tanto no es necesario esperar de 4 a 7 semanas requeridas por el cultivo por el sistema BACTEC o las 12 a 19 semanas requeridas para el cultivo convencional. Además presenta la ventaja de no requerir pruebas adicionales para confirmar la identidad del organismo detectado en una muestra clínica. Sin embargo, en comparación con el cultivo, la prueba de PCR tiene un costo más alto teniendo en cuenta los gastos de laboratorio y mano de obra. Por otro lado, pueden darse resultados falsos positivos debido a la contaminación de las muestras

por productos genéticos creados en el laboratorio durante el desarrollo la prueba (12). No obstante, estas contaminaciones pueden ser detectadas usando los controles negativos apropiados.

Pruebas para la detección de anticuerpos contra el Map

A partir del suero de animales infectados, se pueden obtener anticuerpos contra *Map*. Entre las pruebas más utilizadas se conocen: la fijación del complemento (FC), inmunodifusión en gel de agar (AGID) y el ensayo inmunoenzimático (ELISA). Sin embargo, estas pruebas ofrecen la desventaja de que la respuesta de anticuerpos ocurre en el curso tardío de la infección casi siempre antes del inicio de los signos clínicos y de esta manera, la sensibilidad de la técnica de ELISA, dependerá de la cantidad de microorganismo excretado en las heces (12).

Pruebas para evaluar inmunidad mediada por células

La primera respuesta inmune del hospedero ante un microorganismo intracelular como el *Map*, es mediada por células, específicamente linfocitos T, de ahí que sea este tipo de respuesta la que se trata de evaluar para ofrecer un diagnóstico. Para ello existen pruebas para medir la hipersensibilidad de tipo retardada después de la inyección intradérmica de antígenos, conocida como pruebas cutáneas (12). Sin embargo, este tipo de pruebas tienen la desventaja de presentar reacción cruzada con otras micobacterias ambientales y por lo tanto son bastante inespecíficas (35). Otra prueba para evaluar la respuesta inmune celular, es la medición *in vitro* de citoquinas, a partir de sangre periférica de animales infectados o previamente expuestos (36).

Examen histopatológico y examen microscópico directo de heces

El examen microscópico de tejidos y ganglios linfáticos intestinales o materia fecal puede ser usado para realizar un diagnóstico presuntivo de paratuberculosis. Las lesiones en el tejido y en los nódulos linfáticos tienden a acumular los macrófagos y células epitelioides para formar nidos similares a los de la lepra (35). Algunos autores han clasificado estas lesiones como tuberculoideas

leprosas con granulomas bien demarcados y como lesiones leprosas lepromatoides sin buena definición de los granulomas. Por eso es recomendable realizar cultivo de los tejidos que manifiestan las lesiones para confirmar el diagnóstico (35).

Hallazgos de necropsia en la enfermedad de Johne

Las lesiones de la enfermedad de Johne usualmente se observan en la última región del intestino delgado, en ciego y colon. En casos severos las lesiones se extienden desde el duodeno hasta el recto (52). La mucosa intestinal se observa engrosada y corrugada especialmente en el íleon; la válvula ileocecal se observa con edema y engrosamiento severo (44). Los ganglios linfáticos ileocecales y mesentéricos se observan edematizados y aumentados de tamaño (9, 44, 52). En estado clínico, las lesiones macroscópicas en la pared intestinal pueden no ser tan severas, pero al microscopio son significativamente importantes con la presencia de linfangitis de vasos intestinales (44). En algunos animales se puede presentar arteriosclerosis (52). Las lesiones inflamatorias se observan dispersas a lo largo de todo el tracto intestinal, pero hay mayor predominancia en el tejido linfoide asociado a mucosas, especialmente las placas de Peyer con infiltrado de macrófagos, neutrófilos y linfocitos (60). La inflamación se encuentra principalmente en los ganglios linfáticos de las placas de Peyer del yeyuno y del íleon, pero también se encuentran en las áreas interfoliculares de la mucosa intestinal (44).

Epizootiología de la enfermedad de Johne

La enfermedad de Johne afecta a rumiantes domésticos y silvestres de todo el mundo (9, 56, 63), y se encuentra en la lista de enfermedades de declaración obligatoria (Organización Internacional de Epizootias). La mayor fuente de contaminación con el *Map* son las heces de animales infectados (47), principalmente en el área de partos donde puede contaminar la ubre de las madres, que luego servirá como fuente de infección para el ternero; también actúan como fuente de contaminación la leche y el calostro de vacas en estados avanzados

de infección (8, 47). La prevalencia en Europa de animales infectados por la paratuberculosis bovina oscila entre un 7 y un 55%. En los Estados Unidos existe una correlación con el tamaño de los hatos: un 40% de los hatos de más de 300 cabezas tiene alta probabilidad de estar infectados. Se ha reportado una prevalencia de algunos estados como Pennsylvania del 7.2%, 18% en New England, 9% en California y 10.8% en Wisconsin. En Australia, las tasas de infección declarada entre rebaños lecheros oscilan entre un 9 y un 22% (64). En Colombia no se conoce la prevalencia de la enfermedad de Johne en el ganado bovino. En un estudio realizado en la hacienda La Montaña, de la Universidad de Antioquia, ubicada en el municipio, San Pedro de Los Milagros, en el año 2001, se detectaron de 77 bovinos, cuatro positivos a paratuberculosis confirmados por hallazgos histopatológicos (47).

Reservorios naturales del Map

Los Rumiantes domésticos y salvajes son el tipo de animal más comúnmente afectado, incluyendo: las ovejas, las cabras, los ciervos, el alce, el antílope, el bisonte, los camellos, y las llamas; existen también los informes infrecuentes de infecciones de *Map* en especies no rumiantes como caballos, cerdos, pollos, conejos, zorro, primates no humanos y humanos (8). Por otra parte, en sitios específicos de Escocia se ha caracterizado focos de infección de poblaciones de conejos por el *Map*, en donde se halló una prevalencia de 39.7%, con variaciones de 55.4 y 19.4%, para primavera y verano, respectivamente (42). Estos hallazgos abren la posibilidad de una fuente adicional de contaminación para los pastos, en especial en aquellas regiones en donde los conejos silvestres sean abundantes y estén en proximidad a regiones de producción ganadera.

Distribución del Map en el mundo

La bacteria *Map* se encuentra ampliamente distribuida en todos los países de clima templado (8). Por su dependencia a la micobactina, la cual sólo puede obtener de sus células hospederas en el animal, la bacteria no es capaz de crecer y multiplicarse en el ambiente extracelular, lo que la convierte en un patógeno intracelular obligatorio (21). Por lo anterior, el citoplasma o las

organelas de las células de los animales infectados son los únicos lugares en la naturaleza donde el *Map* puede crecer y multiplicarse. Sin embargo, después de que la materia fecal es expulsada por los animales infectados, es posible encontrarla en pastos y en agua, siendo éstas dos importantes vías de transmisión (21). El aislamiento del *Map* de lombrices de tierra, dípteros y cucarachas ha sugerido que éstos invertebrados podrían también participar en la dispersión de la paratuberculosis (49).

Control y manejo de la enfermedad de Johne

Para realizar un adecuado control de la paratuberculosis, lo primero que se hace necesario realizar es la identificación del estado de la infección en el hato, las potenciales fuentes de infección y las posibles rutas de transmisión que se puedan presentar (37, 49). Dado que el *Map* puede sobrevivir por más de 250 días en agua, y en heces, los pastos contaminados con heces que contengan el *Map* es la principal fuente de transmisión. También es importante identificar y separar las madres infectadas del resto de los animales, dado que la transmisión también se puede dar por vía transplacentaria. Los nacimientos deben realizarse en un ambiente limpio y seco con mínima contaminación con materia fecal (37). El control de la paratuberculosis también incluye estrategias que permitan evitar nuevas infecciones, la identificación de los reservorios naturales, ya que el *Map* puede infectar a otras especies animales rumiantes y no rumiantes como ovejas (25), cerdos y conejos (40), que pueden ser potenciales excretores del bacilo y por lo tanto, fuente de contaminación (37).

El manejo adecuado de los animales en el hato, y el uso de vacunas, son también medidas de control indicadas (37, 44, 48). Se deben retirar del hato los animales que sean identificados positivos para el *Map* con pruebas moleculares como la prueba PCR o con cultivo bacteriológico, para evitar la diseminación de la enfermedad a los demás animales sanos (48, 49, 51). Algunas de las medidas de control y prevención incluyen: cultivos de materia fecal de los animales del hato a intervalos de seis meses, aislamiento de los animales que presenten sintomatología compatible con la enfermedad de

Johne para realizarle pruebas diagnósticas, mantener los utensilios e implementos de ordeño limpios y desinfectados, separar las madres de los jóvenes por lo menos durante el primer año de vida y eliminar los animales positivos (27).

Uso de vacunas

La primera vacunación contra paratuberculosis fue descrita en 1926. Una vacuna efectiva contra la enfermedad de Johne, debe tener la capacidad de inducir la respuesta mediada por células de manera que inhiba la implantación del bacilo en la puerta de entrada del intestino (64). La vacunación se recomienda como una medida para reducir la enfermedad en los hatos en los que las prácticas de manejo no se pueden implementar y en muchos países el uso de las vacunas se restringe a los hatos infectados. Sin embargo, a pesar de que la vacunación reduce el número de animales que desarrollan la enfermedad clínica, reduce el número de animales que excretan cantidades detectables de *Map*, y reduce el número de animales con infección intestinal detectable, no es completamente efectiva para prevenir la enfermedad (7, 64). Después de la vacuna, los niveles de anticuerpos aparecen entre dos semanas y seis meses, y una vez vacunados, mantienen estos niveles por uno a tres años (37).

Las vacunas varían de organismos muertos a vivos atenuados, con o sin adyuvante, principalmente aceite mineral; el uso de adyuvantes fuertes como mezcla líquida de parafina, aceite de oliva y polvo pómez, generalmente dejan lesiones en el sitio de vacunación (19). La vacunación a terneros menores de un mes de edad se reporta como eficaz para reducir la incidencia de la enfermedad, pero no lo es para eliminar la infección (19, 27). De otro lado la sensibilización que produce las vacunas puede interferir con pruebas inmunológicas usadas para el diagnóstico de infecciones naturales por *Map* y por tuberculosis, (infección por *M bovis*), por el alto grado de reacción antigénica cruzada entre los antígenos de la vacuna con otras micobacterias (7). Algunos autores han desarrollado subunidades vacunales y vacunas con DNA recombinante con resultados promisorios, y con la posibilidad de diferenciar animales naturalmente infectados de animales vacunados (11, 37).

Controversia sobre el comportamiento del *Map* como agente causante de zoonosis

La discusión sobre si el *Map* es el agente causal o no de la enfermedad de Crohn en humanos está dividida entre dos grupos de científicos. Uno de ellos apoya la hipótesis de que es el *Map* el organismo causante (4, 43), mientras que el otro grupo se apoya en que la enfermedad se puede presentar en ausencia del microorganismo lo cual cuestionaría su papel como agente causal de la enfermedad (50). Para los investigadores del primer grupo, son importantes las evidencias del asilamiento del *Map* a partir de muestras de tejido intestinal de pacientes humanos con la enfermedad de Crohn y se relaciona con el consumo de leche contaminada con el microorganismo, pues al parecer el bacilo puede sobrevivir al proceso de pasteurización de la leche (30, 33). Para los investigadores del segundo grupo, el descubrimiento de la asociación entre el defecto congénito en el cromosoma 16 que codifica para una proteína designada como NOD2 en la enfermedad de Crohn, y su predisposición a infecciones por bacterias intracelulares (16, 56) puede favorecer la posibilidad de que haya infección por *Map* en pacientes que ya presenten la enfermedad de Crohn, lo cual ubicaría el *Map* más como un agente oportunista secundario (16, 67).

Evidencias de Map en pacientes con enfermedad de Crohn (EC)

Estudios en los que se ha aislado el *Map* en pacientes con EC se han realizado (13) pero también algunos estudios en los que el agente no ha sido aislado y por lo tanto no aportan evidencia sobre la asociación entre *Map* y EC (16, 33, 40). Los grupos de científicos que están en contra de la teoría del *Map* como agente causal dicen que, el hecho de detectar el *Map* por PCR, cultivo o hibridación *in situ*, no significa necesariamente que éste sea el causante de la EC; además, sostienen que existe más una relación de asociación (es decir, que el *Map* está presente en el mismo momento y en el mismo paciente que padece la EC), que de causalidad (es decir, que el *Map* inicia la EC en el paciente) (16, 33). Las posibles explicaciones para esta teoría indican que puede ser que el *Map* llegue de manera circunstancial a intestino y cause una infección

secundaria en el paciente que ya padece la EC, debido al daño en la mucosa; también podría ser que el *Map* sea el agente que inicia la infección y cause la EC (33, 73). Una revisión más detallada sobre las posibles asociaciones entre el *Map* y la enfermedad inflamatoria del intestino, se puede consultar en la referencia 15.

Dado que el calostro o la leche puede ser fuente de contaminación para los terneros por parte de su madre, se piensa que, de esta forma, el humano también se podría infectar: estudios de pasteurización de leche contaminada con *Map* se han realizado y se ha reportado el *Map* viable después del proceso; de otro lado, los quesos suelen fabricarse con leche cruda, lo que indica que esta puede ser una fuente de mayor probabilidad en la transmisión del *Map* (33). También se ha sugerido que, si una vaca ha sido sacrificada porque presenta signos de la enfermedad de Johne, es probable que la infección por *Map* esté diseminada por todo el animal, incluyendo músculos, nódulos linfáticos y sangre, como lo evidenció un estudio publicado en el año 2001 en el que se examinaron tres plantas de sacrificio en Estados Unidos para buscar la infección por el *Map* mediante el cultivo de heces, intestino y nódulos linfáticos, cuyo resultado reveló que el 34% del ganado de leche y en el 3% en ganado de carne (57) eran positivos al *Map*.

El agua también puede representar un vehículo potencial para la transmisión del *Map* hacia humanos; los animales con la enfermedad de Johne excretan el *Map* en las heces y de esta manera contaminan el ambiente. Algunos estudios han demostrado la sobrevivencia del *Map* en fuentes de agua, lo que puede llevar a sustentar la hipótesis del agua como fuente de infección (71).

Estado de la enfermedad de Johne en Colombia

En Colombia no se tienen estudios epidemiológicos ni estudios clínicos completos que permitan tener una idea clara sobre la prevalencia de la enfermedad en el país. Los únicos estudios realizados se han hecho en casos clínicos aislados, en los que se ha trabajado sobre la base del aislamiento de los bacilos ácido-alcohol resistentes (AAR). En la hacienda la Montaña (San Pedro de los Milagros, Antioquia),

en donde se trabaja con el ganado lechero (vacas Holstein y cruces de toro blanco orejinegro (BON) x vacas holstein) se han descrito casos clínicos de la enfermedad (55) sustentando el hallazgo en el diagnóstico histopatológico y la presencia de los bacilos AAR en las muestras evaluadas, además de los hallazgos al examen clínico en los animales vivos y los hallazgos *post mortem*. Este hecho motivó la declaratoria de cierre del hato lechero, en tanto se implementaban medidas de detección, control y prevención de la enfermedad, objeto de estudio de nuestro grupo de investigación. No obstante lo anterior, el diagnóstico de la enfermedad de Johne debe estar sustentado en el crecimiento en cultivo de la cepa de Map causante, la amplificación de su genoma mediante prueba de PCR y, en el mejor de los casos, mediante la tipificación de la cepa por enzimas de restricción. En el mes de mayo de 2008, murió en la hacienda una vaca que presentó toda la sintomatología compatible con la enfermedad de Johne, pero al realizar el examen histopatológico el diagnóstico fue enteritis proliferativa de tipo eosinofílica; esta situación sugiere la implementación de medidas precisas para el diagnóstico de la enfermedad en los hatos bovinos en Colombia.

La ausencia de una información consolidada en Colombia que permita conocer la prevalencia y la epidemiología de la paratuberculosis bovina, puede ser debida a la dificultad en diagnosticar los animales portadores y diseminadores de la enfermedad, pues se requiere de pruebas diagnósticas suficientemente sensibles y específicas para detectar los animales infectados en los estados iniciales de la enfermedad, para erradicarla del hato afectado, lo que exigen políticas gubernamentales que implican un alto costo económico y un elevado costo social en potencia. La paratuberculosis es una enfermedad contagiosa que afecta el ganado y otros ruminantes en la gran mayoría de países del mundo, y representa grandes pérdidas económicas a la industria ganadera. Sin embargo, el impacto económico de la enfermedad de Johne en un hato o en una región es difícil de cuantificar debido a los diversos factores de la producción que se afectan como la producción láctea, la condición corporal, la fertilidad, la pérdida de animales del hato, etc. y principalmente debido a la naturaleza

de la enfermedad al ser, en la mayoría de los casos, una infección silenciosa e invisible. Los factores que afectan la susceptibilidad del hospedero tales como la edad, la genética, el estado nutricional, el estado inmune, entre otros, han sido pobremente documentados y se requiere de mayor investigación, dado que esta información permite desarrollar medidas de control y prevención más eficaces en los hatos.

En este orden de ideas, es común encontrar en la mayoría de hatos lecheros del país vacas con sintomatología compatible con la infección por el Map, pero la falta de reglamentación sobre su diagnóstico, manejo y control, han impedido la financiación de trabajos para realizar estudios epidemiológicos enfocados a definir su comportamiento en el país. En conversaciones realizadas con veterinarios responsables de la inspección sanitaria en plantas de faenado, se informa que en las salas de recuperación de la víscera blanca es frecuente ver viscerados con lesiones compatibles con la enfermedad de Johne (José Fernando Castrillón, Médico veterinario, Central de Faenado de Medellín, Colombia; comunicación personal). Por lo tanto, se deben diseñar estudios descriptivos para definir la prevalencia de las lesiones compatibles con la enfermedad de Johne en las plantas de faenado del país; luego se debe determinar la frecuencia de aislamiento de Map mediante cultivo y confirmación mediante amplificación del genoma del Map por pruebas de PCR; posteriormente, se debe identificar las regiones de procedencia de los animales infectados para diseñar estudios epidemiológicos enfocados a definir las prevalencias y los factores de riesgo, así como las medidas de prevención y control de diseminación de la enfermedad en el hato bovino nacional.

Debido a la asociación que existe entre el consumo de leche cruda o sus derivados contaminados con Map y la enfermedad de Crohn en humanos, además de los cuidados y la aplicación de medidas sanitarias, las investigaciones deben estar orientadas a realizar el diagnóstico confiable para conocer la situación real con respecto a la enfermedad en nuestros hatos. De otro lado, en varios países se han realizado estudios

epidemiológicos que evalúan la incidencia de la enfermedad de Crohn asociada a poblaciones humanas susceptibles tales como trabajadores del sector agropecuario, campesinos y demás individuos que se encuentren en contacto con animales infectados; sin embargo, la escasa información reportada sobre estudios de este tipo en Colombia reflejan la necesidad de realizar investigaciones que indiquen la situación real de esta enfermedad como una posible zoonosis de importancia para las poblaciones en riesgo.

Conclusión

La enfermedad de Johne no es un problema solo del hato, de un departamento o de un país, sino un problema mundial y las soluciones deben estar enfocadas desde un contexto global. Se debe comprender la complejidad de la inmunología de esta enfermedad y reconocer las limitaciones impuestas por el diagnóstico y el control de la misma. En la medida en que se gane conocimiento y entendimiento de la inmunología celular específica para la paratuberculosis, se estará más cerca de

encontrar las repuestas que hasta el momento no han sido aclaradas y al mismo tiempo se generarán nuevos interrogantes. La literatura internacional indica algunos países ni siquiera han pensado en tomar en serio la legislación para confrontar la realidad de la enfermedad, a pesar de disponer de suficientes estudios de prevalencia que dan una idea de la presencia de la enfermedad en sus hatos bovinos. Al parecer, esto obedece al impacto económico potencial de la enfermedad de Johne en la ganadería, al momento de tomar decisiones sobre su prevención y control.

Agradecimientos

Las actividades de investigación del grupo Centauro fueron financiadas parcialmente por la estrategia de Sostenibilidad 2005-2006 para grupos de excelencia (Comité para el Desarrollo de la Investigación, CODI), de la Universidad de Antioquia. Las actividades de investigación de Margarita M. Zapata R. fueron financiadas por el proyecto CODI E01113.

Referencias

1. Abalos P. Actualidad en paratuberculosis. *Tecnol Vet* 2001; 7:9-11.
2. Amer AO, Swanson MS. A phagosome of one's own: a microbial guide to life in the macrophage. *Curr Opin Microbiol* 2002; 5:56-61.
3. Astarie-Dequeker C, N'Diaye E-N, Le Cabec V, Rittig MG, Prandi J, et al. The mannose receptor mediates uptake of pathogenic and nonpathogenic mycobacteria and bypasses bactericidal responses in human macrophages. *Infect Immun* 1999; 67:469-477.
4. Aylward WL. Update on paratuberculosis: Epidemiology of Johne's disease and the biology of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Irish Vet J* 2003; 56:565-574.
5. Bannantine JP, Stabel JR. Killing of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* within macrophages. *BMC Microbiol* 2002; 2:1471-2180.
6. Begara-McGorum I, Wildblood LA, Clarke CJ, Connor KM, Stevenson K, et al. Early immunopathological events in experimental ovine paratuberculosis. *Vet Immunol Immunopathol* 1998; 63:265-287.
7. Begg DJ, Griffin JFT. Vaccination of sheep against *M. paratuberculosis*: immune parameters and protective efficacy. *Vaccine* 2005; 23:4999-5008.
8. Bielanski A, Algire J, Randall GCB, Surujballi O. Risk of transmission of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* by embryo transfer of in vivo and in vitro fertilized bovine embryos. *Theriogenology*. 2006; 66:260-266.
9. Blood DC. Diseases caused by mycobacterium spp. Diseases caused by bacteria IV. In: *Pocket companion to veterinary medicine*. London: Baillere Tindall; 1999. p330-31.
10. Bögli-Stuber K, Kohler C, Seitert G, Glanemann B, Antognoli MC, et al. Detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in Swiss dairy cattle by real-time PCR and culture: a comparison of the two assays. *J Appl Microbiol* 2005; 99:587-597.
11. Bull TJ, Gilbert SC, Sridhar S, Linedale R, Dierkes N, et al. A novel multi-antigen virally vectored vaccine against *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *PLoS ONE* 2000; 2:e1229.

12. Bull TJ, Hermon-Taylor J, Pavlik I, El-Zaatari F, Tizard M. Characterization of IS900 loci in *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and development of multiplex PCR typing. *Microbiology* 2000; 146:2185-2197.
13. Bull TJ, McMinn EJ, Sidi-Boumedine K, Skull A, Durkin D, et al. Detection and verification of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in fresh ileocolonic mucosal biopsy specimens from individuals with and without Crohn's disease. *J Clin Microbiol* 2003; 41:2915-2923.
14. Cernicchiaro N, Wells SJ, Janagama H, Sreevatsan S. Influence of type of culture medium on characterization of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* subtypes. *J Clin Microbiol* 2008; 46:145-149.
15. Chacón O, Bermúdez LE, Barletta RG. Johne's disease, inflammatory bowel disease, and mycobacterium paratuberculosis. *Annu Rev Microbiol* 2004; 58:329-63.
16. Chamberlin WM, Naser SA. Integrating theories of the etiology of Crohn's disease on the etiology of Crohn's disease: questioning the hypotheses. *Med Sci Monit* 2006; 12:RA27-33.
17. Chi J, VanLeeuwen JA, Weersink A, Keefe GP. Direct production losses and treatment costs from bovine viral diarrhoea virus, bovine leucosis virus, *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*, and *Neospora caninum*. *Prev Vet Med* 2002; 55:137-153.
18. Chi J, VanLeeuwen JA, Weersink A, Keefe GP. Management factors related to seroprevalences to bovine viral diarrhoea virus, bovine-leukosis virus, *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*, and *Neospora caninum* in dairy herds in the Canadian Maritimes. *Prev Vet Med* 2002; 55:57-68.
19. Clarence MF. Paratuberculosis. Enfermedad de Johne. En: *El manual Merck de veterinaria*. 4ª ed. New Jersey: Merck & Co. 1993. p.462-63.
20. Clarke CJ. The pathology and pathogenesis of paratuberculosis in ruminants and other species. *J Comp Pathol* 1997; 116:217-261.
21. Collins M, Manning E. Biology. Johne's Information Center. University of Wisconsin. School of Veterinary Medicine. [citado 20 Abril 2006], URL: <http://www.johnes.org/biology/general.html#1>
22. Collins M. Diagnosis of paratuberculosis. *Vet Clin North Am* 1996; 12:357-71.
23. Crossley BM, Zagmutt-Vergara FJ, Fyock TL, Whitlock RH, Gardner IA. Fecal shedding of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* by dairy cows. *Vet Microbiol* 2005; 107:257-263.
24. De Juan J, Álvarez J, Romero B, Bezoz B, Castellanos E, 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; 72:5927-5932.
25. Ellingson LEJ, Cheville CJ, Brees D, Miller MJ, Cheville NF. Absence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* components from Crohn's disease intestinal biopsy tissues. *Clin Med Res* 2003; 1:217-226.
26. Ernst JD. Macrophage receptors for *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 1998; 66:1277-1281.
27. Faries CF, Roussel AJ, Jordan E, Strokes SR, Magee DD. Paratuberculosis of dairy cattle. A wasting condition, commonly called Johne's disease. Texas Agricultural extension Service. Texas A&M University system. L-5243. 2-99.
28. Finlay BB, Falkow S. Common themes in microbial pathogenicity revisited. *Microbiol. Mol Biol Rev* 1997; 61:136-169.
29. Fischer OA, Matlova L, Dvorska L, Svastova P, Peral DL, et al. Beetles as possible vectors of infections caused by *Mycobacterium avium* species. *Vet Microbiol* 2004; 102:247-255.
30. Fouad AK El-Zaatari, Michael SO, David YG. Etiology of Crohn's disease: the role of *Mycobacterium avium paratuberculosis*. *Trends Mol Med* 2001; 7:247-252.
31. Góngora OA, Villamil JC. La paratuberculosis bovina desde la óptica de la salud pública. *Holstein Colomb* 1999; 147:44-48.
32. González J, Guijo MV, García-Pariente C, Verna A, Corpa JM, et al. Histopathological classification of lesions associated with natural paratuberculosis infection in cattle. *J Comp Path* 2005; 133:184-196.
33. Grant IR, Popea CM, O'Riordana LM, Ballb HJ, Rowe MT. Improved detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk by immunomagnetic PCR. *Vet Microbiol* 2000; 77:369-378.
34. Grant IR. Zoonotic potential of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*: the current position. *J Appl Microbiol* 2005; 98:1282-1293.
35. Griffiths TA, Rioux K, De Buck J. Sequence polymorphisms in a surface PPE protein distinguish types I, II, and III of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *J Clin Microbiol* 2008; 46:1207-1212.
36. Harish KJ, Kwang IJ, Vivek K, Paul C, Srinand S. Cytokine responses of bovine macrophages to diverse clinical *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* strains. [Published online 2006 February 14] [citado 25 Abril 2006] URL: <http://www.biomedcentral.com/1471-2180/6/10> doi: 10.1186/1471-2180-6-10
37. Harris NB, Barletta RG. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Veterinary Medicine. *Clin Microbiol Rev* 2001; 4:489-512.
38. Hostetter J, Steadham E, Haynes J, Bailey T, Cheville N. Phagosomal maturation and intracellular survival of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in J774 cells. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2003; 26:269-283.

39. Huda A, Jensen HE. Comparison of histopathology, cultivation of tissues and rectal contents, and Interferon-gamma and serum antibody responses for the diagnosis of bovine paratuberculosis. *J Comp Pathol* 2003; 129:259-267.
40. Jay L.E. Ellingson, John C. Cheville, Dominique Brees, Janice M. Miller, et al. Absence of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis Components from Crohn's disease intestinal biopsy tissues. *Clin Med Res* 2003; 1:217-226.
41. Joel DE. Macrophage receptors for *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 1998; 66:1277-1281.
42. Judge J, Kyriazakis I, Greig A, Allcroft DJ, Hutchings MR. Clustering of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in rabbits and the environment: how hot is a hot spot? *Appl Environ Microbiol* 2005; 71:6033-6038.
43. Käferstein FK. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* a human pathogen? The arguments pro and contra. *Food Control* 2001; 12:1.
44. Khare S, Ficht TA, Santos RL, Romano J, Ficht AR, et al. Rapid and sensitive detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in bovine milk and feces by a combination of Immunomagnetic Bead Separation-Conventional PCR and Real-Time. *J Clin Microbiol* 2004; 42:1075-1081.
45. Kunze ZM, Portaels F, Mcfadden JJ. Biologically distinct subtypes of *Mycobacterium avium* differ in possession. *J Clin Microbiol* 1992; 30:2366-2372.
46. Li Lingling, Bannantine JP, Zhang Q, Amonsin A, May BJ, et al. The complete genome sequence of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis. *Proc Nat Acad Sci USA* 2005; 102:12344-12349.
47. Manning EJB, Collins MT. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: el patógeno, su patogenia y su diagnóstico. *Rev Sci Tech Off Int Epiz* 2001; 20:133-150.
48. McKenna SL, Keefe GP, Tiwari A, VanLeeuwen J, Barkema HW. *Johne's disease in Canada part II: disease impacts, risk factors, and control programs for dairy producers*. *Can Vet J* 2006; 47:1089-1099.
49. Mercado M, Cicuta DS, Boehringer ME, Silvia I. Paratuberculosis en el Ganado lechero de corrientes. Cátedra de microbiología. Facultad de Ciencias veterinarias UNNE. En línea. [citado 3 mayo 2006] URL <http://www1.unne.edu.ar/cyt/veterinarias/v-049.pdf>
50. Mishina D, Katsel P, Brown ST, Gilberts EC, Greenstein RJ. On the etiology of Crohn disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93:9816-9820.
51. Muskensa J, Bakkerb D, De Boera J, Van Keulen L. Paratuberculosis in sheep: its possible role in the epidemiology of paratuberculosis in cattle. *Vet Microbiol* 2001; 78:101-109.
52. Palucka K, Banchereau J. How dendritic cells and microbes interact to elicit or subvert protective immune responses. *Curr Opin Immunol* 2002; 14:420-431.
53. Paustial LM, Zhu X, Sreevatsan S, Robbe-Austerman S, Kapur V, Bannantine JP. Comparative genomic analysis of *Mycobacterium avium* subspecies obtained from multiple host species. *BMC Genomics* 2008; 9:135, URL: <http://www.biomedcentral.com/1471-2164/9/135>
54. Pavlik I, Matlova L, Bartl J, Svastovaa P, Dvorska L. et al. Parallel faecal and organ *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* culture of different productivity types of cattle. *Vet Microbiol* 2000; 77:309-324.
55. Ramírez VN, Gaviria BG, Restrepo BLF, Gómez NC. Diagnóstico epidemiológico referente a varias patologías de bovinos en tres haciendas de la universidad de Antioquia. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad de Antioquia. En línea. [citado 1 mayo 2006]. URL: http://kogi.udea.edu.co/articulos/Med_Bovina/proyecto%20diagn%F3stico.pdf
56. Robert JG, Michael TC. Emerging pathogens: is *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* zoonotic? *www.thelancet.com* 2004; 364:396-397 [online]. [citado 23 Abril 2006]. URL: www.thelancet.com
57. Rossiter CJ, Henning WR. Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from thin market cows at slaughter. *J Anim Sci* 2001; 79:113.
58. Schleg PM, Buergelt CD, Davis JK, Williams E, Monif GR, et al. Attachment of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* to bovine intestinal organ cultures: Method development and strain differences. *Vet Microbiol* 2005; 108:271-279.
59. Schorey JS, Cooper AM. Macrophage signaling upon micobacterial infection: the MAP kinases lead the way. *Cell Microbiol* 2003; 5:133-142.
60. Sigurðardottir OG, Valheim M, Press CM. Establishment of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in the intestine of ruminants. *Adv Drug Deliv Rev* 2004; 56:819-834.
61. Sockett DC, Carr DJ, Collins MT. Evaluation of conventional and radiometric fecal culture and a commercial DNA probe for diagnosis of *Mycobacterium paratuberculosis* infections in cattle. *Can J Vet Res* 1992; 56:148-153.
62. Soto JP, Kruze J, Leiva S. Aislamiento de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* de fecas en rebaños lecheros infectados mediante el Método de Cornell modificado. *Arch med vet* [online]. 2002; 34: 275-282. [citado 20 Abril 2006]. URL: http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0301-732X2002000200013&lng=es&nrm=iso
63. Stabel JR. Transitions in immune responses to *Mycobacterium paratuberculosis*. *Vet Microbiol* 2000; 77:465-473.
64. Sweeney RW. Paratuberculosis (Johne's Disease). *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 1996; 12:305-471.
65. Tooker BC, Burton JL, Coussen PM. Survival tactics of *M paratuberculosis* in bovine macrophages cells. *Vet Immunol Immunopathol* 2002; 87:429-437.

66. Turenne CY, Collins DM, Alexander DC, Behr MA. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and *M. avium* subsp. *avium* are independently evolved pathogenic clones of a much broader group of *M. avium* organisms. *J Bacteriol* 2008; 190:2479-2487.
67. Valentin WP, Goethe R. Pathogenesis of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infections in ruminants: still more questions than answers. *Microbes Infect* 1999; 1:1121-1127.
68. Vieira OV, Botelho RJ, Grinstein S. Phagosome maturation: aging gracefully, *Biochem J* 2002; 366:689-704.
69. Weiss DJ, Evanson OA, Deng M, Abrahamsen MS. Gene expression and antimicrobial activity of bovine macrophages in response to *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis*. *Vet Pathol* 2004; 41:326-337.
70. Weiss DJ, Evanson OA, Moritz A, Deng MQ, Abrahamsen MS. Differential responses of bovine macrophages to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and *Mycobacterium avium* subsp. *Avium*. *Infect Immun* 2002; 70:5556-5561.
71. Whan L, Grant IR, Ball HJ, Scott R, Rowe MT. Bactericidal effect of chlorine on *Mycobacterium paratuberculosis* in drinking water. *Lett Appl Microbiol* 2001; 33:227-231.
72. Whitlock R, Buergelt C. Preclinical and clinical manifestations of paratuberculosis *Vet Clin North Am* 1996; 12:345-56.
73. William MC, Saleh AN. Integrating theories of the etiology of Crohn's disease on the etiology of Crohn's disease: questioning the hypotheses. *Med Sci Monit* 2006; 12: RA27-33
74. Woo SR, Czuprynski CJ. Tactics of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* for intracellular survival in mononuclear phagocytes. *J Vet Sci* 2008; 9:1-8.
75. Woo SR, Sotos J, Hart AP, Barletta RG, Czuprynski CJ. Bovine monocytes and a macrophage cell line differ in their ability to phagocytose and support the intracellular survival of *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis*. *Vet Immunol Immunopathol* 2006; 110:109-120.