



## Paratuberculosis

### Definición

La paratuberculosis es una enfermedad crónica granulomatosa <sup>(4)</sup>, del tracto gastrointestinal, de animales domésticos y silvestres, causada por el *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* (MAP). Se caracteriza por diarrea intermitente, reducción en la producción de leche, deshidratación y emaciación progresiva <sup>(3)</sup>.

La información acumulada hasta la fecha (2018), indica que MAP es necesaria para provocar la enfermedad en el ganado, pero no es suficiente por sí sola, dado que algunas condiciones del animal serían, también, necesarias <sup>(30)</sup>. Esta situación plantea interrogantes respecto de la necesidad de implementar medidas de erradicación o de control de la enfermedad o de las condiciones que gatillan la enfermedad.

La primera descripción registrada de la patología, figura en un texto de d'Aroval de 1826. Entre quienes la investigaron se cuentan a Nielsen, Johne, Koch, Bang <sup>(1)</sup> y una lista interminable de científicos que aportaron y siguen aportando al conocimiento de esta patología. La enfermedad fue descrita por primera vez en Chile en 1958.

Es una enfermedad de distribución mundial, qué, por ser preferentemente subclínica, se la considera subdiagnosticada, y en consecuencia con una prevalencia desconocida <sup>(5)</sup>.

El Servicio Agrícola y Ganadero (SAG), chileno la tiene incluida en el listado de enfermedades de declaración obligatoria.

### Etiología

La bacteria que causa la enfermedad actualmente se conoce como *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis*, anteriormente se la conocía como *Mycobacterium paratuberculosis*, *Mycobacterium enteritidis chronicae pseudotuberculosis bovis johne* o *Mycobacterium johnei*.

Se considera a la bacteria como uno de los miembros del Complejo *Mycobacterium avium* (MAC por su nombre en inglés), junto con las bacterias *M. avium intracellulare*, *M. avium subsp. avium*, *M. avium subsp. silvaticum* y *M. avium subsp. hominissuis* <sup>(44)</sup>, de ellos se diferencia por presentar las secuencias de inserción 900 (IS900) y 1311 (IS1311) <sup>(46)</sup>, no ser virulento para las aves, además de ser el único miembro del complejo que no presenta más serotipos que el propio MAP. En algunas investigaciones hacen referencia al complejo MAC incluyendo a todas estas bacterias, pero en algunas otras diferencian a MAP del grupo, indicándolo entonces como MACP.

La secuencia de inserción IS900 se encuentra presente, con idéntica secuencia, en MAP y algunas micobacterias catalogadas como ambientales, por lo que su detección, mediante PCR, debe ser evaluada con cautela <sup>(30)</sup>.

Es una bacteria débilmente <sup>(3)</sup> Gram positiva, facultativa<sup>a</sup> en cuanto a su dependencia del oxígeno, ácido-alcohol resistente, que crece en colonias en una red de filamentos entrelazados y que dependen de la presencia de micobactina<sup>b</sup> en el medio para su crecimiento. Las colonias son pequeñas (1 a 5 mm), firmes, brillantes, blancas, ocasionalmente surgen colonias de colores alternativos (entre amarillo y naranja). Se trata además de una bacteria patógena que es de vida intracelular obligada <sup>(7)</sup>, según algunos autores, y facultativa <sup>(15)</sup> según otros.

<sup>a</sup> Puede crecer tanto en ausencia como en presencia de oxígeno.

<sup>b</sup> Proteína utilizada por algunas bacterias para transportar hierro extracelular al citoplasma



La bacteria es un bacilo corto de pequeño tamaño ( $0,5 \times 1 \sim 2 \mu\text{m}$ <sup>(53)</sup>) y tiende a agruparse en el interior de los macrófagos, especialmente en la mucosa intestinal<sup>(15)</sup>. Sólo puede multiplicarse en sus etapas de vida intracitoplasmática, en el interior de los macrófagos, en cuyo interior puede sobrevivir gracias a la presencia de ácidos micólicos hidrofóbicos en su membrana celular<sup>(24)</sup>, los que evitan el acceso de las enzimas lisosomales a la bacteria.

Su capacidad de resistir a la acción de los ácidos y del alcohol derivan de la composición de su membrana celular, en la que existen diversos polipéptidos y grasas libres, tales como la trehalosa, el fosfatidilinositol manósido, la lipomanana y las lipoarabinomananas, las que además tienen roles importantes en su patogenicidad<sup>(3)</sup>.

Entre dichos ácidos micólicos, se cuentan los micolatos de trehalosa, que al estar acetilados constituyen parte de la trehalosa dimicolato o factor cuerda que les permite dar la forma de cuerdas, o filamentos a sus colonias.

Diferentes cepas han sido aisladas y se conservan en laboratorios con fines de investigación, ellas han sido identificadas con siglas propias de cada laboratorio. En el año 2005, el genoma completo de la cepa K-10 fue secuenciado, y ha sido usado como patrón de comparación con otras cepas<sup>(53)</sup>.

Las cepas son poblaciones de células de una misma especie, que son descendientes de una sola célula, mientras que los serotipos o serovares son poblaciones de células que comparten los mismos antígenos de superficie.

El gen que codifica la micobactina (mbtA) se encuentra truncado en MAP, y genera una versión incompleta de la lipoproteína<sup>(9-23)</sup>. Este segmento génico posee en MAP, 400 aminoácidos (aa), mientras en la micobacteria tuberculosa posee 565 aa, y en la aviar, 551<sup>(17)</sup>. A nivel genómico además se encuentran los genes para adquisición (mbt) y almacenamiento (bfrA) del hierro. Debido a la carencia de micobactina, los micobacterios de la paratuberculosis, requieren de hierro en sus medios de cultivo en concentraciones más elevadas que otras bacterias<sup>(4)</sup>.

El genoma de MAP es ligeramente más corto que el de otras micobacterias, pero en su lugar posee un total de 96 genes adicionales, distribuidos en 6 islas genómicas, también llamadas Largas (o amplias) Secuencias Polimórficas (LPS) identificadas como LSP<sup>P</sup>4, LSP<sup>P</sup>11, LSP<sup>P</sup>12, LSP<sup>P</sup>14, LSP<sup>P</sup>15 y LSP<sup>P</sup>16, como estas islas están ausentes en otras micobacterias, se ha sugerido que fueron adquiridas de forma horizontal antes de que MAP evolucionara para ser una nueva especie. En la isla LSP<sup>P</sup>14, se han detectado los códigos genéticos para una reductasa férrica extracelular y un transportador de metales inorgánicos. Se ha predicho que en la LSP<sup>P</sup>15 se codifica un transportador de casete ATP (ABC), un regulador de adquisición de metales, una proteína presumiblemente involucrada en la síntesis de cobalamina (Vitamina B<sub>12</sub>) y una proteína ribosomal. El regulador de adquisición o absorción de metales sería un transportador ABC involucrado en la absorción de sideróforos del hierro, y de iones metálicos como hierro, manganeso, cobre y zinc. Estas situaciones le permitirían a MAP subsanar, al menos en parte, su deficiencia de micobactina<sup>(48)</sup>.

Su material genético, está compuesto por ADN que forma un único cromosoma circular que contiene 4.829.781 pares de bases (pb). Se estima que podría contener 4.350 marcos abiertos de lectura<sup>c</sup>, 45 códigos para ARN de transferencia y un ARN ribosomal<sup>(17)</sup>. El 99% del genoma de MAP es idéntico al genoma de *Mycobacterium avium subsp. avium*, causante de la tuberculosis aviar, y el genoma de la porción 16S de sus ribosomas es idéntico del todo<sup>(20)</sup>, por ello la bacteria ha sido clasificada como una subespecie de *Mycobacterium avium*. La única secuencia génica que permite diferenciar *M.avium* de MAP es la secuencia de inserción<sup>d</sup> denominada IS900. Esta extrema similitud génica tiene entre sus consecuencias, que *M.avium* y

<sup>c</sup> Segmentos de ADN ubicados entre un codón de apertura y uno de cierre

<sup>d</sup> Los elementos de secuencias de inserción (IS) son segmentos de DNA que pueden moverse de una posición cromosómica a otra del mismo cromosoma o diferente. Cuando los IS aparecen en el medio de los genes, pueden interrumpir la secuencia codificante e inactivar la expresión del gen. Fueron descubiertos por primera vez en *E. Coli* en el operon gal y son los transposones más simples. Tienen entre 700 y 1500 pb y se han encontrado en eubacterias y arqueobacterias. También son frecuentes en bacteriófagos y plásmidos.



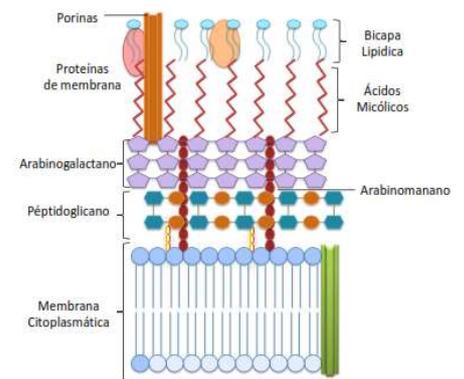
MAP presentan una gran cantidad de antígenos comunes, y en consecuencia, muchas pruebas serológicas pueden entregar resultados positivos ante ambas bacterias, indistintamente <sup>(20)</sup>. Esta respuesta cruzada también puede ocurrir en las intradermorreacciones realizadas para diagnosticar tuberculosis bovina, aun cuando existe evidencia que indica que la exposición a MAP no interfiere con la prueba intradérmica en animales infectados con *Mycobacterium bovis*, pero se traduce en falsos positivos a pruebas serológicas que pesquisan IFN- $\gamma$  y anticuerpos <sup>(51)</sup>.

El lapso entre generaciones, en condiciones óptimas de crecimiento, es superior a las 20 horas, un promedio marcadamente mayor que el de otras micobacterias, situación que podría tener su origen en la presencia de una secuencia de inserción ubicada muy cerca del punto de inicio de lectura de su único cromosoma, lo que tendría un efecto negativo sobre la replicación del cromosoma <sup>(17)</sup>.

En el genoma de MAP, se han identificado una serie de proteínas redundantes, es decir proteínas que cumplen funciones similares, pero que presentan pequeñas variaciones en su estructura aminoacídica, esta situación le permitiría a la bacteria realizar sus funciones vitales en una gama amplia de sustratos, pero con algunas limitaciones como la que es consecuencia de la ausencia del gen que codifica la ureasa, que reduce la capacidad de MAP para obtener nitrógeno desde la urea, afectando su capacidad de colonizar ciertos ambientes.

Al igual que otras micobacterias, posee una pared celular tripartita compleja y rica en polisacáridos. Basados en pruebas de PCR, se ha detectado la secuencia de inserción (IS900) que tiene 3 variantes, que han permitido diferenciar la cepa C (Cattle), la cepa S (Sheep) y una cepa intermedia (I) <sup>(15)</sup>. La cepa S sería exclusiva de ovinos y caprinos, mientras la cepa C, común en bovinos, pero también puede infectar a ovinos y caprinos. Si bien estas diferencias podrían explicar la existencia de variantes entre cursos de enfermedades en diferentes pacientes, no existe a la fecha, prueba de diferencias de patogenicidad entre cepas.

En la nutrida investigación sobre el genoma de MAP, se han encontrado algunas diferencias entre las cepas que afectan a bovinos (C) y ovinos (S), las que incluyen tres amplias deleciones que totalizan la pérdida de 29.208 pares de bases que involucran a 24 marcos abiertos de lectura <sup>(47)</sup>, las que podrían explicar diferencias en patogenicidad y la especificidad de huésped.



Esquema de la estructura de la pared celular de las micobacterias. Tomado de Moyano 2017 <sup>(23)</sup>.

Ocasionalmente se han aislado y tipificado cepas S de bovinos, así como cepas C de ovinos y pequeños rumiantes, por lo que se ha cambiado la nomenclatura de estas cepas a Cepa o Tipo I (antiguamente S), Tipo II (ex C) y Tipo III (en lugar de Intermedia). En 2009 se aisló y tipificó una cepa proveniente de visones, a la que se ha identificado como Tipo B <sup>(23)</sup>.

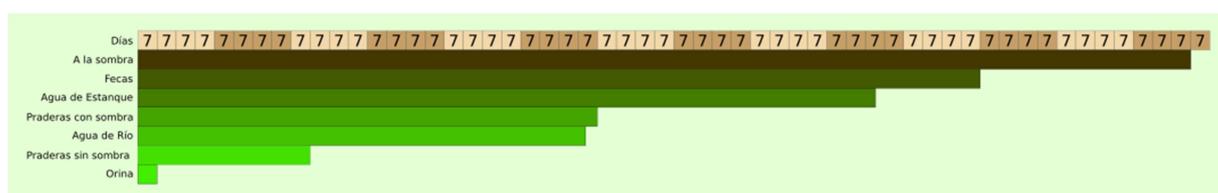
Existen diversas propuestas para dirimir entre cepas de MAP, en Francia se ha utilizado un esquema de 8 *loci*, mientras otros países y autores sugieren que 4 *loci* podrían ser suficientes <sup>(23)</sup>. Gracias a las técnicas de PCR, se ha determinado el polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción enzimática (RFLP) usando dos endonucleasas de restricción (*Pst1* y *BstE11*) con lo que se han encontrado 28 diferentes combinaciones génicas, las que han sido clasificadas como cepas <sup>(32)</sup>.

El proteoma es el conjunto de proteínas que se expresan o codifican en un determinado momento, el proteoma de MAP, al igual que el de otras bacterias, varía de acuerdo con las etapas de vida celular en que se encuentra los microorganismos, así como varían ante cambios en el ambiente en que se encuentren. Así como el pasaje por medios de cultivo hace variar la patogenicidad, la virulencia y la tasa de crecimiento de las bacterias, las cepas de MAP de laboratorio (k-10 por ejemplo) presentan diferentes proteomas que las cepas que se capturan de animales infectados (cepas con nulos o escasos pasajes por



medios de cultivo); estas variaciones del proteoma podrían explicar las diferentes respuestas a vacunas producidas con cepas cultivadas<sup>(35)</sup>.

El bacilo puede sobrevivir en el medio por periodos prolongados de tiempo: 163 días en aguas de ríos, 270 días en agua de estanque, 11 meses en la fecas, 55 semanas bajo la sombra<sup>(18)</sup>, pero sólo 7 días en la orina. En condiciones favorables se han detectado bacterias viables hasta por 55 semanas, 3 más de las que dura el año<sup>(3)</sup> y si las condiciones no le son favorables, aun cuando no puede formar esporas, es capaz de disminuir su metabolismo, adoptando un estado “durmiente”<sup>(24)</sup>. Sobrevive a la congelación (hasta los -14°C).



Sobrevivencia de MAP en diferentes condiciones ambientales.

Han sido detectadas MAP viables por hasta 24 semanas en las praderas, en la sombra, y por hasta 9 semanas en praderas sin sombra.

Para lograr una bajada en la población bacteriana, equivalente a 1 log<sub>10</sub>, con una concentración de cloro de 1mg/ml, se necesitan 28 segundos en los casos de colonias de *E. coli*, mientras que colonias de *M. avium*, requieren de 50 minutos. Hasta 2001 no existían reportes similares para MAP, pero existen evidencias que indicarían que puede ser tanto o más resistente que *M. avium* al cloro<sup>(20)</sup>.

El proceso de UHT sería efectivo sólo cuando la carga bacteriana previa al proceso no supere la 10 UFC por litro, estos números han sido obtenidos en ensayos de laboratorio que simulan los procesos industriales de ultra pasteurizado<sup>(42)</sup>. Se supone que el proceso real de UHT, tal como se realiza en la industria lechera, es más eficiente que las simulaciones de laboratorio, debido a que logra temperaturas y tiempos uniformes en todo el flujo de leche, mientras que las simulaciones, realizan el proceso en porciones de leche estáticas.

Si bien es resistente a varios desinfectantes, se le puede destruir con formalina (5%), Fenoles (1:40), Hipoclorito de calcio (1:50). La bacteria es resistente a varios factores ambientales, como la pasteurización y los desinfectantes líquidos<sup>(3)</sup>.

La micobacteria paratuberculosa puede sobrevivir en el medio, pero no sería capaz de reproducirse, y multiplicarse<sup>(50)</sup>, en el medio en estado libre, pero es probable, según algunos autores<sup>(20)</sup>, que MAP se reproduzca en el medio, en amebas de vida libre y otros protozoos, con lo que podría prolongar su supervivencia fuera de huéspedes como el bovino.

## Epidemiología

El MAP puede infectar a todos los rumiantes, diversas especies de animales silvestres, incluyendo llamas, alpacas, huemules<sup>(7)</sup>, visones, nutrias, ciervos y jabalíes<sup>(5)</sup>. Experimentalmente se han inoculado, e infectado caballos y pollos, en los cuales la bacteria se multiplica, pero no desarrolla enfermedad<sup>(1)</sup>. En laboratorio se puede trabajar esta enfermedad en ratas, gatos, conejos y pollos, además de hámsteres y otras especies.



El microorganismo ha sido aislado también de algunas aves, cuervos por ejemplo, pero sólo en uno de 60 aves examinadas mostraban lesiones concordantes con la presencia de MAP, lo que lleva a suponer que esta ave, y algunas otras podrían actuar como vectores mecánicos<sup>(32)</sup>.

En Chile, se ha comprobado que las liebres que habitan en, o cerca de predios con ganado infectado, tienen la bacteria en sus organismos, y la liberan por sus fecas<sup>(3)</sup>. Las liebres actuarían como un vehículo de diseminación de la enfermedad, sin sufrir sus efectos. Además, ha sido detectado en pudúes silvestres en la Región de Los Ríos<sup>(6)</sup>.

Si bien ha sido detectado en diferentes especies de animales silvestres, en alguno de la cuales, incluso se han observado signos y hallazgos patológicos compatibles con la presencia de la bacteria, no se ha comprobado que estas especies sean diseminadoras de la enfermedad por vía fecal<sup>(5)</sup>, salvo para el caso del pudú<sup>(6)</sup> y del huemul<sup>(7)</sup> desde cuyas fecas se ha aislado el MAP, lo que abre la posibilidad de que en las otras especies silvestres no se haya comprobado, simplemente por falta de pesquisa.

Los cérvidos silvestres son de especial preocupación desde el punto de vista epidemiológico, debido a que se ha observado que son más sensibles al MAP que otros rumiantes<sup>(7)</sup>.

La presencia de MAP en huemules, que prefieren consumir forrajes diferentes de las gramíneas, sugiere que estos se podrían infectar consumiendo aguas contaminadas por bovinos portadores de la bacteria, en lugar de hacerlo por forrajes contaminados, situación que obligaría a considerar a los flujos de agua como una vía de diseminación<sup>(7)</sup>.

En humanos con la enfermedad de Crohn se ha aislado MAP hasta en un 38% de los pacientes<sup>(42)</sup>, lo que sugiere la posibilidad de que esta enfermedad sea realmente una zoonosis<sup>(1)</sup>, o, que la micobacteria paratuberculosa sea uno de los posibles detonadores del cuadro, o bien una complicación de la enfermedad original<sup>(15)</sup>. EL hecho de que MAP pueda sobrevivir tanto a la pasteurización normal, como al proceso UHT, sugiere que los humanos podrían infectarse por esta vía. Sin embargo, como la bacteria también es resistente a la cloración, las aguas contaminadas son también una vía factible. La enfermedad de Crohn es, desde el punto de vista de los signos, parecida a la paratuberculosis bovina, y se inicia principalmente en adultos jóvenes (20 a 35 años); hasta la fecha la causa es desconocida, y se le atribuye un origen inmune o infeccioso, donde algunos microorganismos aislados no han sido cabalmente identificados, pudiendo tratarse de MAP o de una variante de MAP, o incluso de alguna de las 80 diferentes de micobacterias que, consideradas saprófitas hasta la fecha, pueden ser realmente patógenos causales de dicha enfermedad. La evidencia sugiere, además, que la enfermedad de Crohn tiene un componente genético, que mantiene la prevalencia humana en torno a un caso por cada 2.000 personas.

Existen algunos indicios que asocian a esta micobacteria con el Síndrome de Blau<sup>e</sup>, así como con la diabetes mellitus (tipo 1), pero ambos casos no han sido confirmados del todo<sup>(25)</sup>. Además, se ha investigado la relación entre MAP y la esclerosis múltiple, así como el eventual rol gatillador de MAP para el autismo. Si bien se han encontrado DNA de MAP en pacientes con Parkinson, no se sabe qué relación podría tener con dicha patología.

Considerando que la bacteria puede ser detectada en la leche y las canales de los bovinos infectados<sup>(8)</sup>, el control de la transmisión al humano debería tomar en cuenta estos alimentos.

En bovinos la infección ocurre cuando los terneros maman de sus madres, si los pezones están contaminados con el microorganismo. La infección es más común en los terneros que nacen en verano. Dada la supervivencia de MAP viables en

---

<sup>e</sup> El síndrome de Blau (BS) es una enfermedad inflamatoria sistémica poco frecuente que se caracteriza por la aparición temprana de artritis granulomatosa, uveítis y erupciones en la piel. En la actualidad, el BS se refiere tanto a la forma familiar como a la esporádica (anteriormente sarcoidosis de aparición temprana) de la misma enfermedad. El término propuesto de artritis granulomatosa pediátrica está actualmente en cuestión, ya que no representa la naturaleza sistémica de la enfermedad.



praderas, por periodos mayores al que persiste el rechazo por presencia de bostas en praderas, es posible que los animales adultos también se infecten por esta vía, pero con un riesgo menor debido a la maduración del sistema inmune.

Si bien la transmisión ocurre preferentemente en los primeros meses de edad, la enfermedad se transmite entre predios, principalmente por la compra de animales infectados, pero clínicamente sanos <sup>(12)</sup>, y considerando que los animales se hacen seropositivos al menos 2 años después de infectados, esto puede ocurrir con la compra de animales reproductivamente activos, como los toros. También puede llegar a través de vectores mecánicos como vehículos, vestimenta e instrumental, pero esta ruta representa un riesgo menor en comparación a los animales.

Si bien los animales jóvenes se infectan preferentemente con los pezones contaminados con fecas infectadas, también pueden serlo por praderas contaminadas, y estas pueden infectar a animales de diversos grupos etarios. Algunos de los animales infectados nunca desarrollan signos de enfermedad, pero diseminan al microorganismo en el rebaño.

Los animales más susceptibles son los terneros menores de 6 meses disminuyendo parcialmente la susceptibilidad después del año de edad. La colonización intestinal puede ser disminuida si se administra galio en forma profiláctica durante las fases de mayor susceptibilidad <sup>(25)</sup>.

Los animales se hacen resistentes en la medida que crecen. Se ha sugerido que los terneros son más susceptibles por: 1) la mayor permeabilidad intestinal a las inmunoglobulinas, que podría hacer de los intestinos un tejido más permeable a algunas bacterias, como la MAP, y 2) la inmadurez del sistema inmune <sup>(4)</sup>. Si bien existen indicios de que los animales se hacen paulatinamente resistentes con la edad, también existe evidencia de que los animales adultos pueden adquirir la enfermedad, dado a que la resistencia no es absoluta.

Existen sospechas de que las vacas, al menos en las etapas terminales de la enfermedad, pudieran liberar MAP directamente a la leche y el calostro, en cuyo caso, sus crías se infectarían, aun cuando los pezones de estas vacas no estuviesen contaminados con fecas <sup>(20)</sup>. De igual modo, se ha podido comprobar que la infección intrauterina ocurre en vacas infectadas con MAP, tanto en la fase subclínica, como posteriormente en la fase clínica de la enfermedad. Hasta en un 37,5% de los fetos de vacas infectadas, se ha aislado MAP <sup>(42)</sup>, teniendo mayor riesgo los fetos que son gestados por vacas aparentemente sanas, pero que son fuertes diseminadoras de MAP por vía fecal.

En un estudio australiano, la bacteria fue aislada aproximadamente un 9% de los fetos obtenidos de vacas en estado subclínico y un 39% de las que cursan un cuadro clínico <sup>(55)</sup>.

Algunos estudios sugieren que hasta un 35% de las vacas clínicamente infectadas y un 11,6% de las vacas asintomáticas presentan MAP en sus leches y calostros <sup>(42)</sup>.

La evidencia indica que el semen puede ser contaminado con MAP, pero no ha sido posible detectar vacas o crías infectadas por esta vía, lo que debe ser tomado como indicador de que esta vía es posible, pero es de bajo riesgo de infección.

MAP sobrevive a la acción de los antibióticos usados normalmente en el semen que se congela para su uso en inseminación artificial, y considerando que MAP sobrevive a la congelación, esta vía de transmisión no puede ser descartada <sup>(41)</sup>, pero la cantidad de bacterias sería demasiado baja como para lograr la infección con semen fresco, y aún menos al diluir y congelar el semen para inseminación artificial <sup>(49)</sup>, sin embargo hembras con sistemas inmunes afectados podrían ser infectadas.

Se ha detectado MAP en partículas suspendidas en el aire en galpones donde se mantiene ganado en confinamiento, así como también de nódulos linfáticos traqueobronquiales, lo que sugiere que la vía aerógena es factible como vía de transmisión de la enfermedad <sup>(28)</sup>.



La bacteria ha sido aislada de nematodos parásitos de bovinos, ovinos y otras especies, y de sus larvas, en procesos experimentales, lo que sugiere que en forma natural esta vía de transmisión es factible <sup>(29)</sup>.

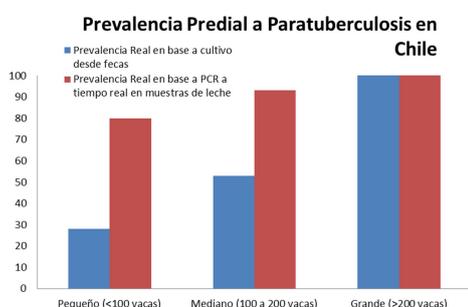
Algunas micobacterias saprófitas, así como miembros del grupo de micobacterias aviares, incluida MAP han sido aisladas de diferentes especies de moscas habituales en predios dedicados a la crianza de bóvidos, porcinos y ciervos <sup>(41 - 45)</sup>, lo que indica que estos insectos podrían servir de vectores mecánicos, o de insectos transmisores de esta enfermedad, no sólo dentro de ciertas especies animales, sino también entre especies animales, por ejemplo depositando bacterias viables en alimentos de otros animales o incluso del ser humano.

El hecho de que las micobacterias sean resistentes a los ambientes ácidos, hace posible recolectar bacterias vivas de la saliva así como de las fecas <sup>(45)</sup> de diferentes tipos de moscas, incluyendo la mosca común y las moscas de los establos,

La diferencia en prevalencia entre las diferentes razas, sugiere que existen razas o rebaños más resistentes al desarrollo de la enfermedad, sin embargo, y en consideración a que las prevalencias son proporcionales a los tamaños poblacionales de las diferentes razas, esta diferencia en prevalencia puede deberse tan sólo a diferencias en la frecuencia de encuentro entre seropositivos y seronegativos dentro de la raza, más que a una posible resistencia genética racial.

La resistencia, de origen genético, a infecciones intracelulares, se describe, al menos en parte, como relacionada con la "resistencia natural asociada a la proteína 1 de los macrófagos" (NRAMP1 por sus siglas en inglés). Este gen debería ser relevante también para el control de MAP, pero no existe a la fecha evidencia clara al respecto <sup>(20)</sup>.

Existe evidencia de que hay al menos dos nucleótidos simples, polimórficos, lo que se encuentran al interior del loci de características cuantitativas denominado BTA16, que se asociarían a mayor susceptibilidad a la enfermedad, y para los cuales se podría realizar selección a fin de reducir la susceptibilidad a la infección <sup>(4)</sup>.



Adaptado de Kruze; 2013; Herd-level prevalence of Map infection in dairy herds of southern Chile determined by culture of environmental fecal samples and bulk-tank milk qPCR; PREVET(2013)

infected, mientras los que tienen menos de 100 vacas, presentan una prevalencia predial del 28% en base a cultivo fecal, y del 80% en base a PCR a tiempo Real en muestras de leche de estanque.

Existen evidencias de que los terneros mantenidos a pastoreo con sus madres, así como los que son mantenidos en grupos dentro de galpones tienen mayor riesgo de infección que los que son mantenidos en pesebreras individuales; por otro lado, se ha detectado una mayor prevalencia en machos que en hembras <sup>(42)</sup>.

Cuando se detectan casos de paratuberculosis en un rebaño, normalmente del 38 al 42% de los animales están infectados <sup>(1)</sup>. Y la razón o proporción de casos clínicos/subclínicos se estima en 1/6 <sup>(10)</sup>. Existe escasa información de la prevalencia predial e individual en Chile, pero se ha estimado que la prevalencia predial podría encontrarse en torno al 80% <sup>(7)</sup>. Se estima que, por cada caso clínico, deben existir 1 a 2 casos clínicos más sin diagnosticar <sup>(43)</sup>, y de 16 a 25 animales infectados en diferentes fases: 4 a 8 subclínicos y 10 a 14 en fase de infección silente <sup>(23)</sup>.

Según estudios realizados entre septiembre de 2010 y septiembre de 2011, la prevalencia en Chile, demostró ser dependiente del tamaño del predio; mientras más grande el predio, mayor es la probabilidad de que este infectado, y mayor será la prevalencia animal dentro del predio <sup>(38)</sup>.

Es así como prácticamente todos los predios de más de 200 vacas están



Se han detectado correlaciones entre el estado epidemiológico de los predios y los descartes de animales por causas diferentes de la paratuberculosis, es así que, en los predios seropositivos en donde al menos 1 muestra fecal ha permitido el hallazgo de la bacteria, la frecuencia de animales eliminados por causas que requieren de sacrificio de emergencia (enfermedades metabólicas, accidentes, toxemia, peritonitis, pericarditis, infección generalizada) es mayor que en los predios seropositivos, sin muestras de fecas con MAP, y que en la población general <sup>(12)</sup>. También se han detectado correlaciones entre este, estado epidemiológico, y la presencia de mastitis y problemas reproductivos.

La asociación entre paratuberculosis y sacrificios de emergencia podría sustentarse en dos aspectos. Por un lado, la mala absorción desencadenada por la infección e inflamación intestinal, que actuaría a través de cascadas de reacciones bioquímicas alteradas por falta de materias primas, tasa de síntesis proteica reducida que disminuye las concentraciones de proteínas con actividad enzimática, y reducción en la cantidad o accesibilidad a moléculas almacenadoras de energía. Por otro lado, MAP consume mayor cantidad de hierro que otras bacterias, y este elemento forma parte de diferentes moléculas con actividad antibacteriana.

La bacteria, al entrar en contacto con el suelo, se une a las partículas de tierra; cuando se realizan cultivos bacterianos, las partículas de tierra son retiradas o tratadas y retiradas del proceso de obtención del líquido a sembrar en los medios de cultivo, y, aparentemente, esto dificulta que se logre cultivar MAP desde muestras de suelo, por lo que una de las pocas herramientas útiles para determinar sobrevivencia de MAP en muestras de suelo, no sea el cultivo bacteriano, sino la pesquisa de ADN mediante PCR <sup>(18)</sup>.

Aparentemente, las condiciones de humedad y pH del suelo afectan parcialmente la sobrevivencia de MAP, la cual sólo sería reducida al aumentar la cantidad de radiación solar que impacte el suelo. La bacteria se mantiene en las capas superiores del suelo, aún bajo condiciones de lluvia, la cual arrastra cierta cantidad de bacterias, pero no en números que reduzcan su población, en el suelo, o en las partes aéreas de las plantas que en él crecen. Sin embargo se ha comprobado que, suelos sometidos a incorporación de cal, tienen hasta diez veces menos probabilidades de sustentar animales con sintomatología, que suelos sin tratamiento, lo que sugiere tanto una relación entre la cal y la supervivencia bacteriana, como una relación entre esta y el pH del suelo <sup>(20, 42)</sup>.

El ganado mantenido en suelos alcalinos, como aquellos ricos en piedra caliza, pueden tener una mayor incidencia, pero menos casos clínicos <sup>(42)</sup>.

La principal fuente de diseminación de MAP, son los propios bovinos, pero los patrones de dispersión, liberación o expulsión de bacterias MAP, desde un animal infectado, son variables. Sólo el 7% de los animales infectados llega a ser un liberador importante de MAP, pero una vez que se tornan en diseminadores importantes, es decir que sus fecas contienen altas cargas bacterianas, más del 95% de esos animales son eliminados antes de un año <sup>(21)</sup>.

Se considera que un animal es fuerte diseminador de la enfermedad, cuando sus fecas contienen más de 50 UFC de MAP por gramo de fecas.

Los animales infectados en forma natural tienden a ser diseminadores permanentes, cuando se tornan en fuertes diseminadores de la enfermedad, mientras que, en los casos de infección experimental, los animales tienden a ser diseminadores intermitentes de MAP. Mientras los animales infectados experimentalmente toman un año para hacerse diseminadores de la enfermedad, y otro año para llegar a ser fuertes diseminadores de MAP, los animales que sufren de la infección natural demoran 3 años en iniciar la diseminación, y llegan a ser fuertes diseminadores con 5 años de edad <sup>(21)</sup>.

La mayor parte de los animales que sufren de la infección natural, nunca llegan a ser fuertes diseminadores, pero viven fases intermitentes y leves de diseminación, liberan menos de 50 UFC de MAP/Gramo de fecas. Esta intermitencia no se observa en



los animales con infección natural que son fuertes diseminadores. Por otro lado, se ha constatado que, los animales que son diseminadores leves e intermitentes de MAP, rara vez se tornan fuertes diseminadores, mientras que los fuertes diseminadores normalmente son animales que no diseminaban, o lo hacían en tasas no detectables por las pruebas estándares, y que, por factores aún no determinados, pasan de “no diseminador” a “fuertemente diseminador”.

La probabilidad de que un animal sea diseminador leve o fuerte no está afectada por la edad en que el animal se infecta.

Se ha propuesto que los animales que se mantienen como diseminadores leves e intermitentes, son aquellos animales que mantienen la infección bajo control, y no pasan a la fase clínica de la enfermedad, antes de completar su vida productiva en los planteles.

La información disponible sobre patrones de diseminación, leves e intermitentes, o persistentes y fuertes, permite usar este patrón como una herramienta de discernir entre animales. Si en las fecas de un animal se encuentran más de 50 UFC/gramo de feca, existe una alta probabilidad de que sea un diseminador fuerte y persistente, y también hay una alta probabilidad de que desarrolle a corto plazo, la forma clínica de la enfermedad, por lo que debería ser descartado del predio a la brevedad <sup>(21)</sup>.

Existe la posibilidad de que, al menos parte de los animales que son diseminadores leves e intermitentes, no estén infectados, y que sólo sean bacterias ingeridas con la dieta y que tienen “paso libre” por el tracto digestivo de esos animales, sin llegar a colonizar el intestino.

## Patogenia

Existen múltiples formas de la infección, que un animal en particular presente una forma u otra, depende de múltiples factores, entre los que destacan: forma en la que progresa la infección en el animal, resistencia y susceptibilidad genética, edad a la que el individuo se infecta y exposición previa del individuo al patógeno <sup>(30)</sup>.

La exposición continua del animal a MAP se traduce en un balance dinámico en donde algunos animales nunca se establece, o permanece bajo control por una respuesta inmune adecuada, esto ocurre en aproximadamente la mitad de los individuos, en la otra mitad, progresa hacia una infección subclínica delimitada y focalizada, y sólo en una escasa proporción de individuos, progresa hacia una forma linfocítica (con respuesta tipo Th1) o no-linfocítica (con respuesta Th2) que tarde o temprano desencadenarán la forma clínica de la enfermedad <sup>(30)</sup>.

La principal vía de infección conocida es el ingreso del microorganismo a los terneros cuando maman de ubres contaminadas con fecas de animales seropositivos <sup>(1)</sup>. En el tracto digestivo de los terneros, se rompen las gotas de lípidos en los que la bacteria se encuentra (fagolisosomas de bacterias, protozoos o amebas), para penetrar en la mucosa intestinal, especialmente en las placas de Peyer que sirven de portal de entrada, principalmente en el íleon <sup>(4)</sup>, en alguno de estos puntos los micobacterios son fagocitados por macrófagos. En el interior de los macrófagos, los bacilos se encuentran protegidos de las defensas humorales del huésped.

Las células macrófagas del intestino delgado más comúnmente infectadas son las células M, que corresponden a células epiteliales encargadas de captar microorganismos en vesículas endocrinas, y conducirlos hacia las placas de Peyer, para ser presentado a macrófagos del sistema inmune y a los linfocitos T. El tiempo que media entre la presencia de MAP en el intestino, y su arribo a los nódulos linfáticos adyacentes es de 1 hora.

La llegada de macrófagos a la zona apical de las vellosidades epiteliales del intestino, es mediada por la interleuquina 1 beta (IL1 $\beta$ ) y ocurre rápidamente ante la presencia de MAP, ya que, en tan sólo 10 minutos desde el arribo bacteriano, los macrófagos ya se encuentran en el lugar requerido <sup>(16)</sup>. Al interior de estos macrófagos, así como, de células dendríticas, el MAP es capaz de sobrevivir y replicarse gracias a que modula el ambiente intracelular. Además, modifica la presentación de



antígenos dentro de la célula y en su superficie, así como la liberación de citoquinas, permitiendo una larga presencia intracelular de MAP, y en consecuencia una infección localizada prolongada.

La respuesta humoral incluye “complejos inmunes” que tienen efectos nocivos a nivel renal, por los cuales puede producir glomerulonefritis, y ocasionalmente infartos renales en los cuadros avanzados <sup>(15)</sup>. Por su parte la respuesta celular genera un engrosamiento de las paredes intestinales, reduciendo su capacidad de absorción, mientras que el TNF $\alpha$  (factor de necrosis tumoral alfa), induce catabolismo generalizado, el cual contribuye a la emaciación.

La respuesta celular está destinada a controlar la infección al interior de las propias células, mientras la respuesta humoral está diseñada para destruir bacterias fuera de ellas <sup>(22)</sup>. Por otro lado, durante la respuesta celular se encuentran elevadas concentraciones de interferón gamma (IFN- $\gamma$ ), mientras que la respuesta humoral es precedida y contemporánea con un aumento en las concentraciones de IL-10. La respuesta humoral inhibe la respuesta celular, por lo que una sucede a la otra, actuando en conjunto sólo durante un periodo de transición entre la una y la otra. Existe evidencia de que durante la respuesta celular existen bajas tasas de diseminación de MAP por las fecas, mientras que, durante las fases humorales, el recuento de UFC de MAP en fecas aumenta.

Un indicador temprano de la enfermedad, es el aumento de la interleuquina 2 (IL-2), así como de su receptor de membrana (CD25+), en diversas subpoblaciones linfocitarias <sup>(23)</sup>; La IL-2 poseería un efecto autocrino sobre la producción del receptor CD25+, aumentando su expresión cuando aumenta IL-2.

Ganusov <sup>(22)</sup>, sugiere que la respuesta humoral es consecuencia de una fuerte diseminación, y no un factor causal de la misma. Es decir que, la respuesta celular lograría controlar la diseminación de MAP dentro del propio organismo, así como al exterior, durante un cierto periodo de tiempo, pero que, al fallar, no logra impedir la diseminación, por lo que aumenta la cantidad de micobacterias, lo que estimula al sistema inmune a desplegar la respuesta humoral.

La MAP tiene la habilidad de sobrevivir al interior de los macrófagos gracias a que previene la maduración y acidificación de las vacuolas fagocíticas <sup>(4)</sup>. Entre los principales efectos de MAP en los macrófagos y células dendríticas se cuentan: 1) evita la apoptosis auto-inducida, evitando la muerte celular prematura, que ocurre cuando la célula reconoce estar infectada y se sacrifica en favor del resto del organismo 2) interfieren con la capacidad fagolisosomal de los macrófagos, 3) evitan ser detectados, interfiriendo con la expresión génica de la célula huésped que produce citoquinas y quimioquinas y 4) reduce o detiene la maduración normal de las células dendríticas <sup>(16)</sup>.

Por otro lado, los macrófagos infectados por MAP tiene la capacidad de inhibir o destruir células inmunes T por una serie de vías, las que usa en forma simultánea o alternativa. Entre estas vías se cuentan: 1) contacto directo de macrófagos infectados y células T, liberando el ligando FasL que se une a la proteína de superficie celular Fas, que desencadena la muerte celular. 2) por medio de los moduladores solubles TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$  y Bcl-2, las tres con reacciones bioquímicas importantes en los procesos de apoptosis. 3) por medio de la secreción del antígeno ESAT-6 que inhibe directamente la respuesta de las células T <sup>(16)</sup>.

La MAP induce una menor expresión de los genes de la ferroportina<sup>f</sup> del macrófago que infecta, esta inducción le favorece pues retiene a nivel intracelular, el hierro que necesita. Los macrófagos aparentemente utilizan entonces otras vías, eventualmente menos eficientes, para liberar hierro al medio, pues de esa manera reducirían la sobrevivencia de la bacteria <sup>(9)</sup>.

Lesiones de tipo granulomatoso se desarrollan en el intestino delgado y el colon de los huéspedes. En las etapas finales de la enfermedad se produce una baja en los factores que inhiben la migración, y junto con un proceso de anergia, los macrófagos migran causando bacteriemia <sup>(1)</sup>.

<sup>f</sup> Ferroportina: enzima que regula la movilización y metabolismo del hierro dentro de las células y su exportación al plasma circundante.



Las micobacterias paratuberculosas, atraviesan la barrera del intestino por medio de las células M<sup>g</sup>, o por medio de transcitosis<sup>h</sup> en enterocitos, para ser posteriormente fagocitado por macrófagos en un entorno predominantemente tolerante o pro-inflamatorio de la lámina propia, alternativas que pueden definirse por las interrelaciones entre células dendríticas, los enterocitos y los antígenos presentes en el momento. Posteriormente el granuloma en formación se transforma en una lesión con diferentes cantidades de bacterias paratuberculosas (pluribacilar o paucibacilar). Los macrófagos mueren, ya sea a consecuencia de que su capacidad de almacenar bacterias multiplicadas en su interior sea superada (más de 20-40 UFC), o por otros factores, y al morir, liberan MAP y antígenos-MAP. Los MAP liberados, pueden ser fagocitados por otros macrófagos y células dendríticas, o ser liberados al lumen intestinal, dispersándose por las fecas. Los antígenos-MAP y los restos celulares atraen y desencadenan la liberación de sustancias inflamatorias, atrayendo macrófagos y otras células, desencadenando el desarrollo del granuloma paratuberculoso, en el que se encuentran células gigantes multinucleares. Los MAP liberados al lumen intestinal pueden colonizar otras secciones del intestino, ser llevados a los nódulos linfáticos que drenan el sector, o salir con las fecas del animal. En los nódulos linfáticos, los MAP lesionan el nódulo, y activan a los linfocitos T y B<sup>(16)</sup>. Este mecanismo les permitiría a las bacterias paratuberculosas residir en los huéspedes por largos periodos de tiempo, sobreviviendo al periodo natural de vida de los macrófagos que parasita, que en condiciones normales no supera las 4 a 6 semanas, y, además le permite ampliar el tramo intestinal colonizado, y colonizar otros huéspedes.

Los macrófagos que mueren por completar su ciclo vital, sufren apoptosis, mantienen la integridad de su membrana plasmática y forman cuerpos apoptóticos que encapsulan la bacteria<sup>(16)</sup>.

Durante la fase de bacteriemia, el bacilo se incorpora al cotiledón, provocando placentitis y ocasionalmente aborto. Hasta la fecha no se ha descrito casos clínicos de paratuberculosis en terneros infectados *in útero*, dado que normalmente no alcanzan la fase clínica.

La incubación de la enfermedad es extremadamente larga, pudiendo tomar de 2 a 15 años entre la infección y el surgimiento de los signos clínicos<sup>(4 - 24 - 42)</sup>. Los mecanismos por los cuales el paciente pasa de la fase de incubación, a la de diseminación de la bacteria no son conocidos<sup>(16)</sup>, y se encuentran en investigación por la importancia que este conocimiento tendrá para prevenir la difusión de la enfermedad.

La enfermedad no produce alteraciones bioquímicas importantes en enzimas como el glutatión peroxidasa y el superóxido dismutasa, relacionados con las reacciones de oxidación-reducción del organismo. A nivel de química sanguínea se detecta un alza en el adenosín desaminasa y el malondialdehído<sup>(8)</sup>, la primera es una enzima que participa en el desarrollo y mantenimiento del sistema inmune, y el segundo compuesto, es resultado de la peroxidación lipídica no enzimática, ambas aumentan posiblemente, como parte de algún mecanismo de defensa.

Durante la fase subclínica de la enfermedad, se producen cambios en la respuesta antigénica contra el MAP y en la respuesta inmune, que se constatan por el alza en los niveles de interferón gamma (Inf  $\gamma$ )<sup>(8)</sup>.

Inicialmente, el MAP se aloja en fagolisosomas de los macrófagos sub e intraepiteliales de la lámina propia de las Placas de Peyer, estos macrófagos presentan antígenos a los linfocitos T helper (Th), los que producen Interleuquina 2 (IL-2), la que induce la multiplicación de poblaciones de leucocitos específicos (CD4+ Th1). Estos leucocitos producen a su vez IL-2, Interferón gamma (IFN- $\gamma$ ), Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) y Factores estimuladores de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF)<sup>(11)</sup>. Estas sustancias atraen a los macrófagos a la zona donde se encuentran las células colonizadas por MAP, controlando la infección y generando granulomas.

<sup>g</sup> Células epiteliales especializadas en el transporte de antígenos particulados desde la luz intestinal hacia el tejido linfóide para su fagocitosis por células dendríticas que los presentan a células T.

<sup>h</sup> Conjunto de procesos que permite el paso de macromoléculas desde un espacio extracelular a otro, mediante la formación de vesículas.



Una vez que el organismo “percibe” que la respuesta inicial mediada por los leucocitos CD4+ Th1<sup>i</sup>, y en consecuencia denominada: respuesta Th1, ha fallado, libera la secuencia de reacciones conocida como respuesta Th2. En esta fase, los linfocitos CD4+ Th2 liberan las interleuquinas 4, 5, 6 y 10, suprimiendo la respuesta Th1 y favoreciendo la multiplicación de linfocitos B, encargados de la producción de anticuerpos. Dada la escasa efectividad de esta respuesta humoral contra MAP, esta reinicia su multiplicación, las células de la pared intestinal se reproducen, engruesan la pared del intestino y, generan un síndrome de mal-absorción, desencadenando, además, diarrea<sup>(11)</sup>.

Los linfocitos Th1 CD4+ se agotan, perdiendo sus funciones efectoras en las fases crónicas de la enfermedad, cuando estas células están “agotadas”, presentan en su superficie receptores inmunoinhibitorios conocidos como “muerte programada 1” (Programed Death 1 o PD-1) y el “gen de activación de linfocitos 3” (LAG-3). EL PD-1 se une a un ligando que le es propio (PD-ligando 1 o PD-L1) mientras que LAG-3 se une al complejo mayor de histocompatibilidad tipo II (MHC-II). Estas uniones pueden ser revertidas con anticuerpos específicos, rescatando a las células T helper de su estado de agotamiento, y reactivando funciones de proliferación, producción y actividad de citoquinas<sup>(34)</sup>.

El “agotamiento” es un proceso paulatino, que tiene entre sus efectos conocidos, una reducción en la capacidad de las células de responder ante la presencia de antígenos MAP específicos. Se ha detectado que PD-1 es activado preferentemente en células (macrófagos y linfocitos T) que se encuentran en nódulos linfáticos mesentéricos, mientras que LAG-3 es activado preferentemente en células circulantes, no se conocen del todo sus mecanismos de acción, ni la exacta relación con otros antígenos y receptores que se muestran modificaciones en los linfocitos “agotados”, como el receptor de dominio de inmunoglobulina de células T y dominio de mucina-3 (Tim-3) y el antígeno 4 de las células T citotóxicas CTLA-4)

Mientras más larga es la fase Th1, más temprano se inicia la fase de diseminación de MAP en fecas<sup>(22)</sup>.

En el primer año de infección, se observa un aumento de la subpoblación de leucocitos T  $\gamma/\delta$  (gamma/Delta), la que puede generar TNF $\alpha$ , IL-1, IL-2 e IFN- $\gamma$ , todos los cuales median la inflamación y contribuyen a la respuesta Th1. Dentro de esta subpoblación linfocitaria, se reconocen además poblaciones celulares identificadas como WC1.1<sup>+</sup>, WC1.2<sup>+</sup> e WC1.3<sup>+</sup>, las dos primeras regulan la secreción de IL10<sup>(23)</sup>.

Se ha postulado que el paso de cuadro subclínico a clínico, está relacionado con el paso de un estado en que el sistema inmune protege al organismo por medio de respuesta inmune celular, hacia un estado de respuesta inmune humoral que resulta incapaz de proteger al individuo, paso en el que estaría involucrada la interleuquina 10 (IL10), que suprimiría la respuesta celular. Durante la fase de transición se encuentra mayores niveles de IL10, el factor de crecimiento y transformación beta (TGF- $\beta$ ), y una limitada expresión del interferón gama (IFN $\gamma$ )<sup>(16)</sup>.

Las causas por las cuales el sistema inmune pasa de una respuesta celular a una respuesta humoral han sido objeto de profuso estudio. En la actualidad existen diversas hipótesis al respecto, entre ellas procesos mediados por citoquinas y sustancias propias de la bacteria, cambios hormonales relacionadas con el parto, o el estrés, sin embargo, la hipótesis con mayores posibilidades de confirmación, se relaciona con el agotamiento de las respuestas celular y humoral, lo que libera a MAP para desencadenar la fase más crítica de la infección. Esta falla de la respuesta celular y humoral sería secuencial, es decir que la respuesta celular fallaría primero<sup>(16)</sup>.

Los mecanismos exactos por los cuales MAP produce la enfermedad no son del todo conocidos, se han postulado tres hipótesis al respecto: 1) MAP interferiría con la expresión proteica del huésped, deteniendo la maduración de las vesículas, 2) interferiría

---

<sup>i</sup> Leucocitos helper tipo 1, que expresan al proteína de superficie CD 4 llamada también cúmulo de diferenciación 4, por poseer cuatro dominios de tipo inmunoglobulinas



con la expresión proteica encargada de la activación de los macrófagos y 3) utilizaría receptores específicos del macrófago, aboliendo su activación <sup>(15)</sup>.

En la fase inicial de la enfermedad, cuando no existen evidencias clínicas de patología, una serie de genes se encuentran activados, entre ellos destacan: Factor de Crecimiento de Hepatocitos (HGF por su denominación en inglés), lo cual podría ser la respuesta al proceso inflamatorio crónico que induce MAP. El gen de la lactoferrina (LTF) se encontraría activado por su efecto inhibitorio de la invasión bacteriana a las células, dado a que se une a las proteínas de membrana. Por su lado, la activación del gen de la haptoglobina (HP), podría relacionarse con su efecto inhibitorio de una serie de funciones de los neutrófilos, como la fagocitosis y la respiración celular, inhibición de una serie de citoquinas (IL-7, IFN- $\gamma$ , TNF e IL-6) con lo que actuaría como anti-inflamatorio <sup>(27)</sup>. Otro gen activado ha sido individualizado como GBP6, este gen está involucrado en la destrucción oxidativa de bacterias al interior de las células, así como de la transferencia de péptidos anti microbianos a los autofagosomas.

Del total de los terneros infectados, una pequeña proporción logra controlar la infección, pero la mayoría desarrolla una infección crónica, llegando a ser diseminadores de MAP. Aproximadamente un 10% de los animales infectados, desarrolla la forma progresiva y fatal de la enfermedad <sup>(16)</sup>.

Como consecuencia de la pesquisa por microRNA expresados en forma diferencial entre individuos no infectados, expuestos e infectados por MAP, se ha detectado que algunos de ellos están deprimidos en los individuos expuestos e infectados, o se encuentran expresados en mayor medida que en los no infectados. Estos diferentes niveles de expresión dan cuenta del uso de diferentes vías metabólicas y de defensas que se producen entre animales sanos e infectados, no establecen necesariamente relaciones de causa-efecto, pero sí de un cambio en el animal relacionado con la patología.

En los animales infectados, se reduce la expresión de microRNA relacionados con dos lipooxigenasas, la araquidonato-5-lipooxigenasa y la araquidonato-15-lipooxigenasa <sup>(36)</sup>, ellas están involucradas en la transformación de ácidos grasos en leucotrienos que además de producir contracción de la musculatura lisa, participan en los procesos de inflamación crónica. La producción de estas enzimas es inducida por la interleuquina 4 (IL-4) de monocitos y macrófagos durante la respuesta de tipo Th2. Los bajos niveles de estas enzimas han sido asociados a una menor producción de IL-2 y de interferón gamma (IFN- $\gamma$ ), y en consecuencia, esta menor expresión del microRNA se asociaría a procesos crónicos y a la larga persistencia de MAP en el animal.

Otros genes con menor expresión en los animales infectados, son el gen que codifica el receptor para la interleuquina 23 (IL23R) y el gen que codifica una proteína supresora de la señal de citoquinas 2 (SOCS2), ambos se relacionan con la respuesta inmune mediada por células; mientras IL23R es un regulador de la respuesta Th1, SOCS2 lo es de la respuesta Th2, logrando que la respuesta se reduzca a nivel humoral y se potencie a nivel intracelular.

El gen que codifica los receptores transmembrana para leptina se encuentran activados en los animales infectados por MAP, mientras que el complejo Interleuquina 12 (IL-12) y los reguladores de interleuquina 2 están deprimidos. Una serie de genes cuya expresión es modulada por sustancias del complejo IL-12 se ven reducidas en los animales infectados por MAP (GZMB, IDO1, KLRC1, KLRD1 y SOCS2). Por otro lado, el gen que codifica el Factor de Inhibición de la Migración de los Macrófagos (MIF) es deprimido por el complejo IL-12, y se expresa más en los animales infectados dado que este complejo está deprimido en estos animales. Además la IL-12 estimula a las células T CD4+ a liberar INF $\gamma$ , que activa a los macrófagos y la destrucción del patógeno. Se sabe además que la IL-12 tiene efecto sinérgico con la IL-18 que estimula la citotoxicidad de las células "asesinas naturales" (NK) y la diferenciación celular Th1. Todo ello hace pensar que la reducción en la expresión del complejo IL-12 es inducida por MAP como un mecanismo que prolonga su supervivencia en los monocitos del huésped <sup>(36)</sup>.

Los niveles de expresión de los microRNA RPS23, RPS15, RPL37, RPL26 e IGFBP7, en los animales expuestos, pero que no muestran aún signos de infección, llevan a suponer que se está activando el regulador de transcripción MYCN, éste previene la



activación de Nramp1 en los macrófagos, lo que conduce a una disminución en la destrucción de patógenos intra-fagolisosomales. Estos microRNA indican que MAP está previniendo su destrucción dentro de las células, y podría ser utilizado como un método de diagnóstico temprano.

Varias de las respuestas observadas en los microRNA, son indicativos de regulación por medio de mecanismos de interferencia sobre el RNA, y no sobre su propia transcripción<sup>(36)</sup>.

En los animales infectados por MAP se observa un aumento en la expresión de los genes TTYH3 y TTYH2, ellos están relacionados con la síntesis de proteínas de membrana dependientes de calcio y encargadas del transporte de iones cloro. Estas proteínas o canales aniónicos permiten estabilizar el potencial de membrana y regulan el volumen celular, jugando roles trascendentales en la mantención de las funciones de las células mono nucleadas circulantes, en particular de aquellas relacionadas con la respuesta inmune.

## Manifestaciones en el ganado

La forma clásica de manifestación es descrita como: “pérdida de peso a pesar de contar con una ración adecuada, y presencia de diarrea crónica intermitente”, sin embargo, el diagnóstico clínico requiere de la constatación de otros signos para incrementar la seguridad diagnóstica, la cual sólo podrá llegar a la certidumbre, con exámenes confirmatorios de laboratorio.

Entre los principales signos se cuenta: diarrea intermitente inicialmente, y continua en fases avanzadas de la enfermedad; pérdida de peso progresiva, edema submandibular. No se presenta fiebre ni pérdida del apetito<sup>(24)</sup>.

Entre los animales infectados se pueden encontrar animales clínicamente enfermos, infectados con cuadros subclínicos y animales infectados asintomáticos. Desde el punto de vista inmunológico, se encuentra animales con respuesta celular, humoral e individuos anérgicos. La infección inicial se manifiesta con respuesta inmune celular, por parte de linfocitos T ayudantes (helpers) Th1 y Th2, que forman un granuloma pequeño capaz de contener la infección, dicho granuloma es conocido como tuberculoide, pero en la medida que la enfermedad progresa, la respuesta inmune predominante es de tipo humoral, y posteriormente el animal arriba a un estado anérgico<sup>(1)</sup>, en que no es posible detectar ni inmunidad celular, ni inmunidad humoral.

La emaciación que ocurre en las fases avanzadas de la enfermedad se debería a una enteritis que provoca pérdida de proteínas. Los animales en fases de ausencia de diarrea se encuentran en estados anabólicos, mientras que durante las fases de diarrea se produce catabolismo, con un balance negativo del nitrógeno, malabsorción intestinal y obstrucción linfática. El apetito normalmente no se ve afectado, salvo en las fases finales de la enfermedad.

Solo reacciones de tipo hipersensible desencadenarían fiebre, leucopenia persistente, anemia y agregación de macrófagos. La acción de las citoquinas sería la responsable de la atrofia muscular, la emaciación, alopecia, infartos renales, anemia y leucopenia.

Usualmente las hembras muestran algún nivel de recuperación durante la gestación<sup>(1)</sup>, disminuyendo la intensidad de la diarrea, y, recuperando el aspecto general (pelaje, peso, hidratación, etc.)

Las causas por las que se reduce la producción de leche, corresponden más bien a consecuencias de la afección del estado general, y de la mala absorción de proteínas, más que a un efecto directo del MAP sobre el tejido mamario. Además de una reducción en la producción, se ha observado que las vacas seropositivas a ELISA, presentan mayores recuentos de células somáticas en sus leches<sup>(43)</sup>.



Las hembras bovinas enfermas, en estado subclínico y clínico, ven afectadas sus producciones de leche en porcentajes que oscilan entre el 15 y 19,5% y que pueden corresponder a 5,4 a 7,2 kg/día<sup>(54)</sup>. En algunos casos se han estimado las bajas productivas a nivel de rebaño, en predios con casos clínicos, y en dichos casos se han detectado bajas de hasta un 24%<sup>(28)</sup>. En los animales que aún no evidencian signos clínicos pero son seropositivos a los test de ELISA se han detectado descensos en la producción de leche de aproximadamente 2 kg/día<sup>(54)</sup>. Al comparar la producción de leche de vacas sanas, seronegativas, de predios infectados y de predios diagnosticados como libres de paratuberculosis, se ha detectado una leve merma en la producción en los rebaños infectados, esto hace suponer que las hembras, aún seronegativas, ya presentan alguna baja productiva, debido a que las pruebas diagnósticas arrojan falsos negativos, o son incapaces de detectar casos recientes.

La baja en la fertilidad que se observa en los animales afectados de paratuberculosis parece ser un efecto secundario, derivado de las alteraciones digestivas y la disponibilidad de nutrientes para ese fin.

El cuadro más frecuente en los animales corresponde a una diarrea intermitente, que no responde a los tratamientos habituales, donde las fases sin diarrea pueden durar inicialmente, semanas o meses, pero que paulatinamente se van acortando en la misma medida en que las fases de diarrea se van intensificando. Durante las fases de diarrea se observa emaciación, pelaje opaco, seco e hirsuto, puede ocurrir cambio de la coloración del pelaje, debido a retiro de caroteno (vitamina A) desde el pelaje hacia otras rutas y necesidades metabólicas.

El curso de la enfermedad, desde el inicio de los síntomas, puede durar un mínimo de 3 meses<sup>(1)</sup>, hasta el arribo de la muerte, antes de la cual se observa diarrea persistente, fecas sanguinolentas, edema ventral y debilitamiento progresivo.

Con fines de estudio se ha diferenciado la evolución de la enfermedad en estados o fases. El **estado I**, llamado también de infección silente, o fase de eclipse, se caracteriza por la ausencia total de signos clínicos, la diseminación paulatina de la enfermedad en el intestino, las placas de Peyer y los nódulos linfáticos adyacentes. Normalmente dura un mínimo de 2 años, durante los cuales los animales son seronegativos y si bien podrían presentar MAP en sus fecas, estas se encuentran en concentraciones que no son detectables con las técnicas disponibles.

El **estado II**, de progreso de la infección, se caracteriza por el surgimiento de los cambios granulomatosos a nivel intestinal, pero sin los signos clínicos característicos de diarrea o emaciación. Los animales pueden aparecer seropositivos, debido a un aumento en la respuesta por anticuerpos, así como por un aumento en las concentraciones de interferón gamma (ITF $\gamma$ ) producido por células T sensibilizadas por mitógenos específicos y anticuerpos contra el MAP. Además de progresar a nivel intestinal y local, el MAP puede colonizar, durante este estado, otros órganos, como el útero y la glándula mamaria<sup>(4)</sup>, lo que induciría una menor producción de leche y fertilidad que se observa en animales en este estado de la enfermedad.

El **estado III** de la enfermedad, es aquel en que se observan los signos clínicos característicos de la paratuberculosis. Inicialmente se observa pérdida de peso y del apetito, la producción de leche y la fertilidad se ven afectados. La capacidad de absorción intestinal se ve afectada, desencadenando en diarrea, pérdida de proteínas y de peso. La bacteria coloniza otros tejidos del animal, y los animales se tornan en diseminadores muy importantes de la infección.

El **estado IV** de la enfermedad, corresponde al estado de signos clínicos avanzados, en la que se observa diarrea profusa, emaciación, debilidad, edema submandibular. La muerte ocurre por deshidratación y caquexia, salvo que el animal sea sacrificado antes.

Si bien estos "estados", permitirían una mejor comprensión de la patogenia de la enfermedad, su correlación con hallazgos histológicos y patológicos (necropsia), son débiles, así como las correlaciones son poco claras con la viabilidad y carga bacteriana de tejidos y deposiciones, ello ha dado pie a que se proponga una nueva clasificación epidemio-patológica que subdivide los casos en sólo dos categorías: latentes y patentes. Los animales en fase **latente** son aquellos con lesiones



granulomas focales, escasa respuesta humoral y tasas moderadas de MAP viables, indicativos de un estado quiescente de la patogenicidad. Por el contrario, los casos en fase **patente**, serían aquellos con estados inflamatorios más activos, procesos multifocales y difusos, linfoplasmacíticos, asociados con mayores tasas de seroactividad y detección bacteriana, sugerentes de una infección más activa desde el punto de vista patológico y epidemiológico <sup>(10)</sup>.

Los estudios realizados en búsqueda de relaciones entre la cantidad de bacterias liberadas por los huéspedes, y su estado inmunitario, muestran que la tasa de diseminación bacteriana y las respuestas medidas del sistema inmune siguen patrones independientes <sup>(16)</sup>.

La enfermedad en ovinos y caprinos es normalmente asintomática, pero también pueden observarse fecas aglomeradas, pérdida progresiva de peso, y apatía generalizada. El curso de la enfermedad suele ser más breve en ovejas que en cabras.

## Diagnóstico

En los cuadros avanzados el diagnóstico clínico es relativamente simple, existe un historial de un animal de más de 4 años de edad, que después de algún periodo relativamente estresante (parto, inicio de lactancia, periodo de encaste en toros, etc.), aparece con diarrea crónica, refractaria a tratamiento, emaciación progresiva sin pérdida de apetito, donde las deposiciones tienden a ser de color normal, con formación de espuma (debido a las proteínas perdidas). Sin embargo, para un diagnóstico definitivo se deberá recurrir a confirmación de necropsia y laboratorio.

A nivel de necropsia se buscarán las placas de Peyer, en el intestino delgado, donde se espera encontrar engrosamiento, caseificación y calcificación. Los nódulos linfáticos aumentados de tamaño (hasta 3 veces el normal), con los vasos linfáticos engrosados <sup>(15)</sup>.

El método estándar, estándar dorado o prueba recomendada, es el cultivo bacteriano <sup>(25)</sup>, aun cuando puede ser lento, sigue siendo uno de los pocos métodos con bajísimo nivel de falsos positivos, y que detecta bacterias viables, toda vez que son capaces de formar colonias.

La bacteria puede ser aislada de biopsias testiculares, del semen, glándulas bulbouretrales, próstata y vesículas seminales, glándula mamaria y útero, así como del feto. Se la encuentra también en las fecas y raspajes del intestino grueso, así como en la leche de animales seropositivos. Los granulomas intestinales son similares a los granulomas lepromatosos observados en humanos, por lo que se les clasifica como granulomas tipo II, en ellos, desde el punto de vista histológico, se detectan, muy escasos o ningún granulocito polimorfonuclear, situación que apunta al tipo de infección presente en el paciente <sup>(16)</sup>.

Los análisis diagnósticos se subdividen en exámenes inmunológicos, y aislamiento bacteriano. Entre las pruebas inmunológicas se cuentan: fijación del complemento, inmunodifusión en agar gel y Test de Elisa, de las cuales el Elisa es el más sensible y específico.

Debido a que el tiempo entre infección e inicio de la respuesta humoral es relativamente largo (como mínimo 10 a 17 meses, pero normalmente 2 años), las pruebas serológicas arrojan resultados negativos durante ese plazo, reduciendo su utilidad. En ensayos experimentales ha sido posible detectar respuesta antigénica específica y respuesta de células T, tan temprano como a los 3 a 6 meses post-infección <sup>(16)</sup>.

Moyano <sup>(23)</sup>, encontró respuesta humoral (IgG total MAP-específica) en animales de tan solo 8 meses de edad, y sugiere que la pesquisa de esta respuesta puede ser utilizada en predios con alta prevalencia, pero teniendo en cuenta que parte

IgG	Prevalencia de Células T helper	Tipo de Respuesta Inmune	Citoquinas predominantes	Fase de la Paratuberculosis
IgG2	Th1	Celular (LT CD4+)	IFN- $\gamma$ IL-2 TNF- $\alpha$	Fase asintomática; MAP controlada
IgG1	Th2	Humoral	IL-4 IL-5 IL-6 IL-10	Fase subclínica o clínica; MAP no controlada



de los animales reaccionantes, podrían estar respondiendo debido a la presencia de anticuerpos calostrales.

La respuesta a IgG total puede disgregarse en IgG1 e IgG2. Los títulos altos de IgG1 presentan correlación positiva con la presencia de linfocitos T Helper del tipo 2, y una respuesta de tipo humoral típica de fases avanzadas de la enfermedad. Por su parte, los títulos altos de IgG2, se correlacionan con respuesta Th1 que se relacionan con la respuesta celular típica de las fases iniciales de la enfermedad.

Los test de Elisa, así como otras pruebas inmunológicas pueden ser tan poco sensibles como para detectar sólo el 15% de los animales infectados en las fases asintomáticas, y llegar al 90% en los casos clínicos. Considerando que los animales sólo diseminan la bacteria en las fases avanzadas de la enfermedad, un animal seropositivo a pruebas de ELISA, es un animal en alto riesgo de liberar MAP al medio.

En la actualidad existen kits comerciales de ELISA <sup>(14)</sup>, tanto para muestras de sueros, leche o ambos, el uso de estos puede ser una herramienta útil para detectar a los diseminadores de la enfermedad, pero inútil para detectar a todos los animales portadores, dado a que en la fase asintomática, el sistema inmune de los pacientes, mantiene activas las defensas celulares, mientras los mecanismos humorales sólo se activan en fases más avanzadas.

Las pruebas de aislamiento o identificación bacteriana, incluyen el cultivo bacteriano de muestras de fecas, o tejidos, así como la detección del DNA bacteriano en fecas o muestras de tejidos. Los métodos que pesquisan ADN tienen la ventaja de permitir un diagnóstico más temprano, la identificación infalible de la MAP, y la identificación temprana de animales diseminadores de la infección. El cultivo bacteriano requiere muestras seriadas y puede tomar un mínimo de 8 semanas, y un máximo de 6 meses <sup>(15)</sup> de cultivo para luego realizar la individualización bacteriana necesaria para la emisión del diagnóstico, mientras que las pruebas de PCR son de mayor costo, y requieren una interpretación cuidadosa, debido a que no son indicativos de la presencia de bacterias viables, por lo que se recomiendan PCR cuantitativos.

Si bien las pruebas de cultivos bacteriano en fecas, se realiza preferentemente en animales de edad avanzada, la evidencia de terreno indica que todos los animales infectados liberarían MAP por las deposiciones, pero la cantidad liberada varía, y serían liberadas en forma esporádica e intermitente, acorde con el desarrollo y ruptura de los granulomas a nivel intestinal. La cantidad de bacterias y la proporción de terneros menores de 2 años liberando MAP, dependerá de la prevalencia preñal y de la carga infectante inicial <sup>(16)</sup>.

Considerando cada prueba en forma individual, la posibilidad de diagnosticar, infaliblemente, a un animal como portador de MAP, es relativamente complejo, sin embargo, el uso simultáneo de Elisa y cultivo bacteriológico en base a muestras fecales, parece ser la forma más eficiente y rápida para identificar animales portadores de MAP en un rebaño <sup>(13)</sup>. El proceso de combinación de pruebas con mejores resultados consiste en aplicar primero una prueba en pool de muestras sanguíneas para inmunodifusión en gel, o eventualmente ELISA (5 animales por muestra), y luego, cultivos en base a muestras fecales de los animales incluidos en pools con resultado positivo <sup>(15)</sup>.

Todo resultado positivo debe considerarse como una confirmación del diagnóstico, mientras que todo resultado negativo deberá ser tomado con mesura, debido a que puede indicar simplemente, que al momento del muestreo el animal no estaba liberando MAP por esa muestra en particular. Por otro lado, todo animal positivo a una prueba serológica, realizada en animales sin signos clínicos de paratuberculosis, debe ser considerado como un animal que tuvo contacto con MAP, pero no de un animal necesariamente diseminador de MAP, ni aún menos como una indicación de que ese animal presentará la forma clínica de la enfermedad antes de su descarte <sup>(33)</sup>.



Los animales infectados con MAP, suelen provocar reacción cruzada a la prueba anocaudal para detectar tuberculosis, pero al realizar a la prueba comparada (MAP y *M. avium*) la respuesta parece indicar presencia de *M. avium*; este hecho puede ser utilizado como método para determinar que animales muestrear específicamente para MAP.

El PPD aviar, conocido también como Jhonina, permite el diagnóstico de animales infectados por micobacterias del grupo aviar, que incluye a MAP, pero que no es específica para esta bacteria. Cuando esta prueba es realizada a vacas que han sido hipersensibilizadas por semen contaminado con MAP o durante la monta con toros que presentan MAP en sus genitales, es posible que ocurran abortos <sup>(42)</sup>. La prueba es similar a la aplicación de tuberculina, en el sentido de que se aplica por inoculación intradérmica y se lee 24 a 72 horas después, en pesquiza de un aumento de volumen superior a 4 milímetros. Sin embargo la prueba no es recomendada como estándar, debido a su falta de especificidad – también reacciona con otras micobacterias aviares – y por su escasa correlación con el estado de la infección en el animal <sup>(42)</sup>.

La presencia de enfermedades, desencadena la expresión génica en el huésped, de aquellos genes que le permitirían controlar la patología o sus efectos. MAP también desencadena esta expresión génica, y en consecuencia, la producción de RNA y de microRNA. Los microRNA son RNA pequeños no codificantes que regulan la traducción de RNA mensajeros <sup>(37)</sup>. En la actualidad se están buscando aquellos microRNA específicos de MAP que podrían permitir un diagnóstico temprano, para detectar a aquellos animales que han sido infectados, que se encuentran en la fase subclínica, pero aún no se transforman en diseminadores de la enfermedad, para retirarlos del circuito en forma oportuna <sup>(36)</sup>.

Es posible identificar animales portadores de la infección, mediante el test de detección del interferón gamma (IFN- $\gamma$ ); este test se realiza *in vitro*, sin embargo los resultados de este ensayo requieren de una interpretación cautelosa, debido a que también arrojan resultados positivos ante reacciones inespecíficas.

Diferentes micobacterias pueden dar resultados positivos a las diferentes pruebas usadas para detectar infección por MAP, entre ellas se cuentan las micobacterias que pertenecen al complejo aviar (MAC), así como algunas micobacterias ambientales no patógenas <sup>(46)</sup>.

## Prevención y Control

Establecer medidas de control se torna complejo, cuando al momento de discutir esta posibilidad con el agricultor, éste no tiene forma de conocer la prevalencia predial, ni el efecto económico, ni se vislumbran cambios en los precios percibidos por sus productos, como ocurre con brucelosis en Chile. Los argumentos que deberá esgrimir el profesional son, que la enfermedad provoca casos clínicos, que, aun cuando son escasos, no tienen tratamiento y sólo conducen a la muerte de un animal que difícilmente puede ser vendido en condiciones que rescaten, ni tan sólo su propio costo. Por otro lado, se puede destacar que la presencia de un caso clínico implica que más de 12 animales adicionales en el rebaño están infectados, que ellos no pueden ser identificados con certeza, y que ellos, al tener un sistema inmune comprometido, son nicho adecuado para el desarrollo de otras enfermedades que reducen su vida productiva, obligando de forma solapada, a una eliminación temprana, y en consecuencia aumentando los costos de reposición. Finalmente se puede indicar a los ganaderos que, si se llega a confirmar que esta bacteria es también la causante de la Enfermedad de Crohn en humanos, la venta de productos lácteos en general disminuirá en forma importante, salvo para aquellos que demuestren estar libres de MAP.

Las vacunas no son del todo confiables, los animales vacunados pueden diseminar la enfermedad, e incluso desarrollarla a pesar de estar vacunados y, además, son indistinguibles de los animales infectados naturalmente <sup>(1)</sup>. En algunos países la vacuna ha sido prohibida por generar reacciones cruzadas a la prueba de intradermorreacción para la detección de tuberculosis <sup>(15)</sup>. Una vacuna desarrollada en Australia (Silirum<sup>®</sup>) ha demostrado que la reacción cruzada con la prueba anocaudal con tuberculina se produce en menos del 0,5% de los casos <sup>(30)</sup>.



Se recomienda aplicar las vacunas contra paratuberculosis a muy corta edad, con el objeto de prevenir la infección mientras se alimentan con leche materna <sup>(30)</sup>. Se ha estimado que un programa de control/erradicación de la paratuberculosis que combine vacunación y “chequeo/eliminación” de animales se justifica sólo si la prevalencia es igual o superior al 5%.

Debido al largo periodo de incubación y al carácter crónico de la enfermedad, así como al hecho de que, hasta el presente, 2018, en Chile no existen programas de control o erradicación obligatorios de la enfermedad, es poco práctico pretender erradicar la enfermedad de un predio en particular, sin embargo algunas medidas que se pueden adoptar para reducir el riesgo de diseminación de la enfermedad incluyen <sup>(1)</sup>: 1) Chequear y eliminar a los animales positivos. 2) Eliminación inmediata de animales diagnosticados con paratuberculosis clínica. 3) Limpiar galpones con desinfectantes, halla o no animales con signología a paratuberculosis. 4) Enfardar pastos que se dejen secar al menos 24 horas a la luz solar. 5) Cercar todas las aguas estancadas. 6) Destetar tempranamente a los terneros y alimentarlos con calostro pasteurizado. 7) Alimentar a los terneros sólo con leche pasteurizada. 8) Mantener a los terneros en praderas que no hayan sido usadas por ganado adulto. 9) Evitar el paso de fecas u otros elementos contaminados entre las áreas de animales adultos y jóvenes. 10) Juntar los animales jóvenes después de los 6 meses de edad <sup>(42)</sup>, o idealmente después del año de edad con los adultos.

El pasaje de los purines por filtros de zeolita, reduce la diseminación de la enfermedad en predios que manejan los purines como fertilizante <sup>(2)</sup>, sin embargo, el diseño utilizado no permite, actualmente un uso práctico a nivel de terreno. El proceso de filtraje pone en contacto el agua contenida en el purín con la zeolita, lo que inicia una reacción exotérmica que alcanza temperaturas de 50°C, lo que podría inactivar al MAP. El fermentado que se produce en la biodigestión para producir gas, alcanza temperaturas similares, y el producto biodigestado es igualmente muy pobre, sino totalmente libre de bacterias como el MAP.

No es aconsejable retener vacas seropositivas que estén gestando, en la espera de que nazca la cría, debido a que la vaca sigue diseminando la enfermedad por sus fecas, y las crías de vacas seropositivas tienen mayor riesgo de contraer la enfermedad por vía transplacentaria, o al momento de consumir calostro desde pezones con contaminación fecal <sup>(4)</sup>.

El uso de calostro conservado, así como el uso de leche de descarte, de vacas seropositivas parece ser una forma eficiente de diseminación de la enfermedad dentro de los rebaños.

Los restos de alimentos concentrados, que quedan en comederos de animales adultos, son capaces de transmitir la enfermedad, cuando se ofrecen a vaquillas o terneros.

Cuando vaquillas u otros piños de animales jóvenes, pastorean praderas recientemente talajeadas con animales mayores (vacas), el riesgo de transmisión de la enfermedad aumenta. Si bien estos animales se infectan a una edad relativamente más avanzada que los terneros lactantes, es probable que estas vaquillas no lleguen a desarrollar signos de enfermedad antes de ser eliminados del predio, sin embargo, los efectos subclínicos en producción y reproducción pueden ser las causas de una eliminación temprana, y sin lugar a dudas, de una menor eficiencia productiva del predio.

El impacto económico de la enfermedad, debería ser estimado tomando en cuenta: 1) Reducción en la producción de leche, 2) Alteraciones en la calidad de la leche que impactan negativamente en el precio, 3) Reducción en la ganancia de peso de las crías de vacas infectadas, y de los animales infectados, 4) Eliminación prematura de animales, 5) Aumento de la mortalidad, 6) Aumento del costo de reposición, 7) Aumento de la predisposición a otras enfermedades, 8) Costos de diagnósticos, 9) Costos de consultas Veterinarias y 10) Cambios en los precios por limitaciones de mercado impuestas por la presencia de la enfermedad en un predio.



Para controlar la enfermedad deben tomarse medidas que: 1) tiendan a reducir la presión de infección, eliminando a los infectados, 2) impedir que las rutas de transmisión se completen y, 3) reducir el riesgo de infección en animales susceptibles, por ejemplo usando vacunas.

Los mejores mecanismos de control de la enfermedad, incluyen al menos dos herramientas, que pueden ser: pesquisa y eliminación, por un lado e, imposición de medidas de bioseguridad, por otro. Estas combinaciones deben contemplar en todos los casos, sistemas de registro que permitan verificar que las medidas son sostenidas en el tiempo, y que la frecuencia de aplicación es constante. Una forma de hacer muestreo para cultivo bacteriano en fecas, es tomar muestras aleatorias de fecas frescas en potreros y callejones de tránsito animal.

Un modelo que incluya sólo el chequeo y eliminación, tendrá una relación de costo/beneficio a largo plazo menos favorable que un modelo que incluya medidas de mejoramiento del manejo animal en términos de higiene y sanidad, y además tendrá menor impacto en la prevalencia predial <sup>(28)</sup>.

Curiosamente, la práctica de limpiar ubres y piernas antes del parto ha sido asociada con la infección MAP <sup>(28)</sup>, aun cuando la lógica indicaría que limpiar las ubres debería retirar la contaminación de ellas, y en consecuencia reducir la infección de los neonatos.

En Dinamarca se inició un programa dirigido por la Federación Lechera de Dinamarca que es una agrupación de productores que incluye a varias organizaciones de tipo gremial, este programa es voluntario y en ella los agricultores o predios que se inscriban, deben cancelar sólo el valor del procedimiento en los laboratorios para detectar, mediante ELISA, animales reactivos en las muestras de leche del control lechero. En base a esos resultados se proponen medidas de control del riesgo de contagio entre animales del predio, dichas medidas pueden incluir la eliminación de los reaccionantes, o sólo la segregación de los animales o su leche para alimentación de terneros <sup>(39)</sup>. La información disponible indica que a los agricultores les interesa ingresar al programa, aun cuando, en la información disponible, no existen resultados concretos y sólo una expectativa de mejora en un plazo de 6 a 8 años desde el ingreso de los predios a la "Operación Paratuberculosis".

El Servicio Agrícola y Ganadero (SAG) en Chile ha establecido una Norma Técnica, que clasifica los casos como **sospechoso**: cuando hay evidencias clínicas sin diagnóstico de laboratorio; **probables**: cuando hay una prueba serológica positiva y hallazgos de necropsia concordantes con la patología, y **confirmado**, cuando se ha aislado MAP o una bacteria concordante con MAP. En base a exámenes prediales, los predios son calificados como **infectados**, cuando hay uno o más animales con sintomatología, lesiones típicas y se ha aislado MAP, o se ha detectado su presencia por medio de PCR. Los predios son considerados como **probablemente infectados**, cuando hay uno o más animales seropositivos a ELISA, y se les considera **no infectados**, cuando el 100% de las muestras dan resultados negativos a cultivo bacteriano <sup>(40)</sup>.

Los predios, en Chile, pueden ingresar a un sistema de seguimiento y control voluntario de paratuberculosis, en la que, los predios **no infectados** pueden pasar por niveles (del 1 al 4) si anualmente mantienen su condición de **no infectados**.

Los predios que incorporan animales de otros predios (vaquillas de reemplazo y toros principalmente), tienen mayor riesgo de infectarse con MAP, y también mayor riesgo de infección concomitante con *M. bovis* (causante de la tuberculosis); de igual manera, los machos tienen un mayor riesgo de coinfección (MAP-*M. bovis*) por su mayor longevidad y tener contacto con mayor número de animales (todas las hembras en edad reproductiva del predio). La higiene de bebederos y camas son factores de transmisión de estas enfermedades en el rebaño, al igual que el uso de leche de descarte o la mezcla de calostro de varias hembras para la alimentación de terneros <sup>(52)</sup>.



## Tratamiento

El tratamiento es poco eficaz. Si bien la bacteria es sensible a algunos antibióticos, los animales tratados pueden presentar una mejora en su condición, o incluso una remisión total de los síntomas, pero siguen diseminando la bacteria de por vida <sup>(42)</sup>, y como la bacteria persiste al interior de los macrófagos; teniendo en cuenta el prolongado del curso de la enfermedad, tarde o temprano la bacteria se multiplica y los signos recrudescen.

Se ha descrito sensibilidad ante: neotetrazolio clorhidrato, estreptomina y rifampicina <sup>(1)</sup>.

## Bibliografía

1. Chiodini, R. 1984. Ruminant paratuberculosis (Johne's disease): The current status and future prospects. The Cornell veterinarian. Vol 74 1984 p 218-262
2. Avilez, C. 2016. Effectiveness of Clinoptilolite Zeolite for Mycobacterium avium subsp. Paratuberculosis (MAP) Control in Dairy Slurry. Mycobact Dis 6:226. doi:10.4172/2161-1068.1000226
3. Espescht, I. 2017. Paratuberculosis in Latin America a systematic review. DOI 10.1007/s11250-017-1385-6
4. Fecteau, M. 2017. Paratuberculosis in cattle. Vet Clin Food Anim (2017). <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2017.10.011>
5. Leao, C. 2015. Paratuberculosis asymptomatic cattle as spillovers of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis consequences for disease control. RPCV (2015) 110 (593-594) 69-73
6. Salgado, M. 2015. Detection of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in a cattle/pudu interface. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., v.67, n.5, p.1205-1209, 2015
7. Salgado, M. 2017. Evidence of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis (MAP) infection in huemul deer (Hippocamelus bisulcus) in patagonian fjords. Austral J Vet Sci 49, 135-137 (2017)
8. Cenesiz, M. Evaluation of Oxidant and Antioxidant Capacity in Paratuberculosis Positive Cattle. Pakistan J. Zool., vol. 48(5), pp. 1603-1606, 2016.
9. Landeros, B. 2016. El Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis disminuye la regulación de la expresión del ARNm de la ferroportina 1 en los macrófagos inducidos con hierro. Veterinaria Mexico OA. Vol. 3 No. 1 Enero-Marzo 2016
10. Vasquez, P. 2014. Latent infections are the most frequent form of paratuberculosis in slaughtered Friesian cattle. Spanish Journal of Agricultural Research 2014: 12(4) 1049-1060
11. Rivera, J. 2015. Paratuberculosis caprina: una revisión con especial énfasis en su interferencia con el diagnóstico de la tuberculosis. AN. VET. (MURCIA) 30: 63-76 (2014).
12. Arrazuria, R. 2014. Asociación entre la infección por Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis y las causas de eliminación en rebaños de ganado lechero. Arch Med Vet 46, 39-44 (2014)
13. Soto, J. 2002. Comparación de tres métodos de diagnóstico de Paratuberculosis bovina en rebaños lecheros infectados. Arch. med. vet. v.34 n.2 Valdivia 2002
14. Narang, D. 2017. Milk ELISA in Diagnosing Paratuberculosis in Cattle and Buffaloes. Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci (2017) 6(11):3470-3477
15. Gutierrez, X. 2005. Detección de mycobacterium avium subsp. Paratuberculosis en caprinos de la Región Metropolitana. Tesis de Grado. Universidad de Chile
16. Koets, A. 2015. The within host dynamics of Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis infection in cattle: where time and place matter. Veterinary Research (2015) 46:61
17. Li, L. 2005. The complete genome sequence of Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis. PNAS. 30 Agosto 2005. Vol 102. N 35. Pag 12344 12349
18. Whittington, R. 2004. Survival and Dormancy of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in the Environment. APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, May 2004, p. 2989-3004
19. Salgado, M. Fate of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis after Application of Contaminated Dairy Cattle Manure to Agricultural Soils. APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, Mar. 2011, p. 2122-2129
20. Manning, E. Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis pathogen, pathogenesis and diagnosis. Rev. sci. tech. Off. int. Epiz, 2001,20 (1), 133-150
21. Mitcheli, R. 2015. Differences in intermittent and continuous fecal shedding patterns between natural and experimental Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis infections in cattle. Veterinary Research (2015) 46:66
22. Ganusov; 2015. Evaluating contribution of the cellular and humoral immune responses to the control of shedding of Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis in cattle. Veterinary Research (2015) 46-62
23. Moyano, 2017, Tesis Doctoral: Estudio de la infección natural por Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis en bovinos nacidos en rodeos con paratuberculosis. Universidad de la Plata.
24. Pinedo, 2015, Tesis Doctoral Posibilidades diagnósticas de la PPD Aviar en la Paratuberculosis Bovina en animales jóvenes. Universidad Nacional de la Plata.
25. Dziejzinska, 2017. Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis – An Overview of the Publications from 2011 to 2016. Curr Clin Micro Rpt. DOI 10.1007/s40588-017-0054-x



26. Fernandez-Silva. 2014. Systematic review of the prevalence of paratuberculosis in cattle, sheep, and goats in Latin America and the Caribbean. *Trop Anim Health Prod* (2014) 46:1321–1340
27. Hyun-Eui; 2015; Gene expression profiles of putative biomarker candidates in *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis-infected cattle; *Pathogens and Disease*, 2016, Vol. 74, No. 4
28. Garcia; 2015. The economic impact and control of paratuberculosis in cattle. *J. Dairy Sci.* 98:1–21
29. Lloyd; 2001; Presence of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis in suspensions of ovine trichostrongylid larvae produced in faecal cultures artificially contaminated with the bacterium.; *Vet. Rec.* 148:261–263
30. Bastidas; 2011; Paratuberculosis control: a review with a focus on vaccination; *Journal of Immune Based Therapies and Vaccines* 2011, 9:8
31. Balfour; 2005; Does *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis cause Crohn's disease?; *Gut* 2005;54:896–898.
32. Manning; 2001; *Mycobacterium avium* Subspecies Paratuberculosis: A review of current Knowledge; *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 32(3): 293–304, 2001
33. Huges; 2017; Gamma interferon responses to proteome-determined specific recombinant proteins in cattle experimentally- and naturallyinfected with paratuberculosis; *Research in Veterinary Science* (2017)
34. Okagawa; 2015; Bovine Immunoinhibitory Receptors Contribute to Suppression of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis-Specific T-Cell Responses; *Infect Immun* 84:77–89.
35. Radosevich; 2006; Proteome and Differential Expression Analysis of Membrane and Cytosolic Proteins from *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis Strains K-10 and 187; *Journal of Bacteriology*, Feb. 2007, p. 1109–1117
36. Malvisi; 2016; Responses of Bovine Innate Immunity to *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis Infection Revealed by Changes in Gene Expression and Levels of MicroRNA; *PLoS ONE* 11(10): e0164461
37. Lamadrid-Romero; 2014; Los microRNA: una herramienta que podría ser usada como biomarcadores de la corticogénesis fetal; *Perinatol. Reprod. Hum.* vol.28 no.3 México jul./sep. 2014
38. Kruze; 2013; Herd-level prevalence of Map infection in dairy herds of southern Chile determined by culture of environmental fecal samples and bulk-tank milk qPCR; *PREVET*(2013)
39. Nielsen; 2007; Control programme for paratuberculosis in Denmark; *Bulletin of the International Dairy Federation* 410/2007
40. Instructivo De Norma Técnica De Clasificación Sanitaria De Rebaños En Paratuberculosis Bovina O Enfermedad De Johne; Ministerio De Agricultura Servicio Agrícola Y Ganadero; Enero 2011
41. Hernandez-Marin; 2014; Riesgo de transmisión de *Mycobacterium avium* subespecie paratuberculosis (Map) en especies domésticas y silvestres; *Agroproductividad*; año 7, vol 7, n 5, 65-70
42. Ayele; 2001; The transmission and impact of paratuberculosis infection in domestic and wild ruminants; *Vet. Med. – Czech*, 46, 2001 (7–8): 205–224
43. National Institute For Animal Agriculture; The Cost of Johne's Disease to Dairy Producers; <https://datcp.wi.gov/Documents/CostJohnesDisease.pdf>
44. Mackintosh; 2004; Mycobacterial diseases of deer; *New Zealand Veterinary Journal* 52(4), 163-174, 2004
45. Fisher; 2001; Diptera as vectors of mycobacterial infections in cattle and pigs; *Medical and Veterinary Entomology* (2001) 15, 208-211
46. Paustian; 2004; Comparative Genomic Hybridizations Reveal Genetic Regions within the *Mycobacterium avium* Complex That Are Divergent from *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis Isolates; *Journal of Bacteriology*, Apr. 2005, p. 2406–2415
47. Marsh; 2006; Genomic Comparison of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis Sheep and Cattle Strains by Microarray Hybridization; *Journal of Bacteriology*, Mar. 2006, p. 2290–2293
48. Wang; 2016; Iron Acquisition in *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis; *Journal of Bacteriology*; 2016 vol 198 n5 p 857-866
49. Philpott; 1993; the dangers of disease transmission by artificial insemination and embryo transfer; *Br. vet.J.* (1993). 149, 339
50. Robertson; 2017; Review of the controversy over whether or not *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis poses a food safety risk with pasteurised dairy products, *International Dairy Journal* (2017), doi: 10.1016/j.idairyj.2017.04.009.
51. Roupie; 2018; Evaluation of mycobacteria-specific gamma interferon and antibody responses before and after a single intradermal skin test in cattle naturally exposed to *M. avium* subsp. paratuberculosis and experimentally infected with *M. bovis*; *Veterinary Immunology and Immunopathology* 196 (2018) 35–47
52. Steuer; 2015; Risk factors for *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis (MAP) and *Mycobacterium bovis* coinfection at individual animal level in southern Chile cattle populations; *Trop Anim Health Prod* July 2015
53. Mon; 2015; Tesis doctoral Nuevas estrategias para el diagnóstico de la tuberculosis y paratuberculosis bovina; Biblioteca Digital de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales - Universidad de Buenos Aires
54. Beaudreau; 2007; Reduction in milk yield associated with *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis (Map) infection in dairy cows; *Vet. Res.* 38 (2007) 625–634
55. Whittington; 2009; In utero infection of cattle with *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis: A critical review and meta-analysis; *The Veterinary Journal* 179 (2009) 60–69