

**PATOGÉNESIS DE LA PARATUBERCULOSIS Y LA ENFERMEDAD DE  
CROHN ¿EXISTE VÍNCULO ETIOLÓGICO?**

**MIGUEL ÁNGEL PERDOMO BEDOYA**



**UNIVERSIDAD DE LOS LLANOS  
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES  
ESCUELA DE CIENCIAS ANIMALES  
VILLAVICENCIO**

**2019.**

**PATOGÉNESIS DE LA PARATUBERCULOSIS Y LA ENFERMEDAD DE  
CROHN ¿EXISTE VÍNCULO ETIOLÓGICO?**

**Proyecto de monografía presentado como requisito parcial para optar al título de  
médico veterinario zootecnista**

**MIGUEL ÁNGEL PERDOMO BEDOYA**  
**Código estudiantil: 121002725**

**Director: GUSTAVO GONZÁLEZ PAYA**  
**MV, Esp en Anatomopatología veterinaria**

**Área de profundización patología veterinaria**  
**(Fisiopatología)**

**UNIVERSIDAD DE LOS LLANOS**  
**FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES**  
**ESCUELA DE CIENCIAS ANIMALES**  
**VILLAVICENCIO**

**2019.**

## ***Agradecimientos***

*Mi gratitud a la Universidad de los Llanos por la oportunidad de formarme profesionalmente como Médico Veterinario Zootecnista, a cada maestro que contribuyó de manera positiva en mi crecimiento académico y personal, por la enseñanza de valores, la transferencia de conocimientos, sus experiencias y apoyo durante esta etapa formativa.*

*Agradezco a mi padre, madre y a mi hermana por su esfuerzo, ayuda incondicional y acompañamiento en este camino de vida. A mi querida Lea por su apoyo, afecto y paciencia.*

*A todos ustedes, mi mayor reconocimiento y gratitud.*

## TABLA DE CONTENIDO

---

RESUMEN .....	1
1. INTRODUCCIÓN .....	2
2. JUSTIFICACIÓN.....	3
3. OBJETIVOS.....	5
3.1. GENERAL.....	5
3.2. ESPECÍFICOS.....	5
4. MARCO TEÓRICO .....	6
4.1. GENERALIDADES .....	6
4.2. CARACTERÍSTICAS DEL <i>Mycobacterium avium</i> subespecie <i>paratuberculosis</i> . 7	
4.2.1. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA .....	7
4.2.2. CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS .....	8
4.2.3. CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS .....	11
4.2.4. CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS .....	12
4.2.5. GENOTIPIFICACIÓN.....	13
4.2.6. FACTORES DE VIRULENCIA <i>Mycobacterium avium</i> subespecie <i>paratuberculosis</i> 15	
4.3. VÍAS DE TRANSMISIÓN DEL <i>Mycobacterium avium</i> subespecie <i>paratuberculosis</i> .....	17
4.3.1. TRANSMISIÓN HORIZONTAL (FECAL-ORAL) .....	17
4.3.2. TRANSMISIÓN HORIZONTAL (CONTACTO SEXUAL).....	19
4.3.3. TRANSMISIÓN VERTICAL.....	20
4.3.4. TRANSMISIÓN VERTICAL (FETAL).....	22
4.4. FISIOPATOLOGÍA DE LA PARATUBERCULOSIS .....	23
4.4.1. ETAPAS DE LA INFECCION POR <i>Mycobacterium avium</i> subespecie <i>paratuberculosis</i> .....	25
4.4.2. RESPUESTA INFLAMATORIA .....	27
4.4.3. MECANISMO DE SUPERVIVENCIA INTRACELULAR DEL <i>Mycobacterium</i> <i>avium</i> subespecie <i>paratuberculosis</i> .....	36
4.5. FISIOPATOLOGÍA DE LA ENFERMEDAD DE CROHN .....	39
4.5.1. FACTORES GENÉTICOS .....	40
4.5.2. FACTORES INMUNOLÓGICOS.....	43
4.5.3. ALTERACIÓN DE LA MICROBIOTA INTESTINAL .....	45

5.5.4.	ALTERACIÓN DEL TEJIDO ADIPOSO .....	46
4.6.	SIGNOS CLÍNICOS.....	47
4.6.1.	SIGNOS CLÍNICOS DE LA PARATUBERCULOSIS .....	47
4.6.2.	SIGNOS CLÍNICOS DE LA ENFERMEDAD DE CROHN .....	49
4.7.	LESIONES MACROSCÓPICAS .....	51
5.7.1.	LESIONES MACROSCÓPICAS DE LA PARATUBERCULOSIS .....	51
5.7.2.	LESIONES MACROSCOPICAS DE LA ENFERMEDAD DE CROHN .....	54
4.8.	LESIONES MICROSCÓPICAS .....	55
4.8.1.	LESIONES MICROSCÓPICAS DE LA PARATUBERCULOSIS .....	55
4.8.2.	LESIONES MICROSCÓPICAS DE LA ENFERMEDAD DE CROHN .....	58
4.9.	EPIDEMIOLOGÍA .....	62
4.9.1.	SITUACIÓN MUNDIAL DE LA PARATUBERCULOSIS.....	62
4.9.2.	SITUACIÓN DE LA PARATUBERCULOSIS EN COLOMBIA .....	64
4.10.	CONTROL DE LA PARATUBERCULOSIS .....	66
4.11.	ENSAYOS DIAGNÓSTICOS EN LOS ÚLTIMOS 5 AÑOS (2015-2019).....	69
4.12.	CRONOLOGÍA DE LA ENFERMEDAD DE JOHNE .....	73
6.	DISCUSIÓN.....	78
7.	CONCLUSIONES .....	81
8.	RECOMENDACIONES .....	83
9.	REFERENCIA BIBLIOGRAFÍA .....	85

## TABLA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Morfología de las micobacterias (Pared celular). .....	9
<b>Figura 2.</b> Principal vía de transmisión de <i>Mycobacterium avium</i> subespecie <i>paratuberculosis</i> en terneros (ruta fecal-oral). .....	17
<b>Figura 3.</b> Ingreso de <i>Mycobacterium avium</i> subespecie <i>paratuberculosis</i> en células M y estructura de las células M.....	24
<b>Figura 4.</b> Inmunopatología de la paratuberculosis A.....	29
<b>Figura 5.</b> Inmunopatología de la paratuberculosis B.....	31
<b>Figura 6.</b> Estructura inflamatoria del granuloma.....	33
<b>Figura 7:</b> Formación del granuloma .....	35
<b>Figura 8.</b> Mecanismos de supervivencia intracelular del <i>Mycobacterium avium</i> subespecie <i>paratuberculosis</i> .....	38
<b>Figura 9.</b> Alteración de las uniones estrechas de las células epiteliales intestinales.....	44
<b>Figura 10 .</b> Signos clínicos de la paratuberculosis en un bovino.....	48
<b>Figura 11.</b> Ilustración de las lesiones macroscópicas de la paratuberculosis en mucosa de ileón en bovino. ....	52
<b>Figura 12.</b> Ilustración de las lesiones macroscópicas de la paratuberculosis en mucosa de ileón en un bovino .....	53
<b>Figura 13.</b> Ilustración de la distribución mundial de la paratuberculosis.....	62

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Estados clínicos de la Enfermedad de Johne (El efecto Iceberg) .....	25
<b>Tabla 2.</b> Características clínicas de la Enfermedad de Crohn y la Enfermedad de Johne... 50	
<b>Tabla 3.</b> Características patológicas de la Enfermedad de Crohn y la Enfermedad de Johne .....	60
<b>Tabla 4.</b> Resumen de ensayos de diagnóstico para <i>Mycobacterium avium</i> subespecie <i>paratuberculosis</i> con Enfermedad de Crohn (2015-2019). .....	71
<b>Tabla 5.</b> Pruebas a favor y en contra de la hipótesis del <i>Mycobacterium avium</i> subespecie <i>paratuberculosis</i> como agente etiológico en la Enfermedad de Crohn.....	79

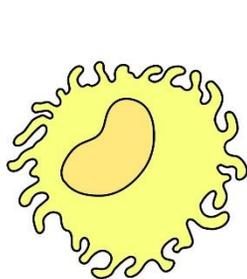
## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>Bcl-2</b>	B-cell lymphoma 2
<b>BL</b>	Balsa lipídica
<b>CARD15:</b>	Dominio reclutador de caspasa 15
<b>CD4</b>	Células Th. Cúmulo de diferenciación 4
<b>CMH-I:</b>	Complejo mayor de histocompatibilidad de clase I
<b>CMH-II:</b>	Complejo mayor de histocompatibilidad de clase II
<b>COL</b>	Colesterol
<b>EC:</b>	Enfermedad de Crohn
<b>EJ:</b>	Enfermedad de Johne
<b>EL</b>	Endositosis lipídica
<b>ELISA:</b>	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
<b>FA</b>	Vacuola fagocítica
<b>FA-C</b>	Fagosoma corrugado
<b>FA-SO</b>	Fagosomas sociales
<b>FA-LIS</b>	Fagolisosoma
<b>GPL:</b>	Glucopéptidolípidos
<b>GTPasa M:</b>	Guanosín trifosfato M
<b>HSP70:</b>	Proteína de choque térmico 70
<b>EII:</b>	Enfermedad inflamatoria intestinal
<b>ICA:</b>	Instituto Colombiano Agropecuario
<b>IFN-<math>\gamma</math>:</b>	Interferón gamma
<b>IgA</b>	Inmunoglobulina A
<b>IL:</b>	Interleucina
<b>IRGM:</b>	Inmunidad - relacionado con proteína de la familia GTPasa M
<b>KDa:</b>	KiloDaltón
<b>LDL</b>	lipoproteínas de baja densidad
<b>LDL-R</b>	Receptor de lipoproteínas de baja densidad
<b>LIS</b>	Lisosoma

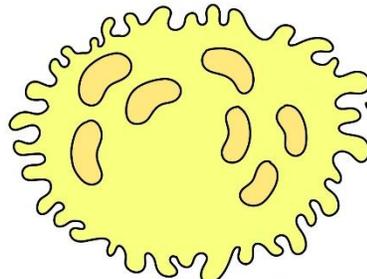
<b>LPS</b>	Lipopolisacárido bacteriano
<b>LRR</b>	Leucina C-terminal
<b>MAH:</b>	<i>Mycobacterium avium</i> subespecie <i>hominissuis</i>
<b>MAPK</b>	PRoteína quinasa activada por mitógeno
<b>Mce:</b>	Proteína de entrada de células de mamífero
<b>MDP</b>	Muramil-dipéptido
<b>mL:</b>	Mililitro
<b>mm:</b>	Milímetro
<b>MPI:</b>	Mes post infección
<b>MTB:</b>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
<b>M1</b>	Macrófago M1 clásicamente activado
<b>M2</b>	Macrófago M2 activados alternativamente
<b>Nf-Kb:</b>	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
<b>NLRP3:</b>	NOD-like receptor family pyrin domain-containing 3
<b>NK</b>	Natural Killer
<b>NOD1</b>	Dominio de oligomerización por unión de nucleótidos que contiene la proteína 1
<b>NOD2:</b>	Dominio de oligomerización por unión de nucleótidos que contiene la proteína 2
<b>OIE:</b>	Organización Mundial de Sanidad Animal
<b>OMS:</b>	Organización mundial de la Salud
<b>PAMPs</b>	Patrones moleculares asociados a patógenos
<b>PCR:</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>PCR-REA:</b>	Reacción en cadena de la polimerasa y análisis de restricción de endonucleasas
<b>PE:</b>	Prolina-ácido glutámico
<b>PGRS:</b>	Secuencias polimórficas repetitivas
<b>PPE:</b>	Prolina-prolina-ácido glutámico
<b>PTB:</b>	Paratuberculosis
<b>qPCR:</b>	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real

<b><i>Sigh:</i></b>	Factor sigma alternativo
<b>SQSTM1</b>	Sequestosoma-proteina humana codificada por el gen SQSTM1
<b>SNP:</b>	Polimorfismos de un solo nucleótido
<b>Th1</b>	Linfocito T helper 1
<b>Th2:</b>	Linfocito T helper 2
<b>TLR9</b>	Receptor 9 tipo Toll
<b>TNF</b>	Factor de necrosis tumoral
<b>UFC:</b>	Unidad formadora de colonia
<b>USDA:</b>	Departamento de Agricultura de Estados Unidos

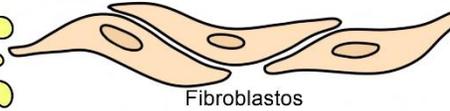
## ICONOS DE FIGURAS



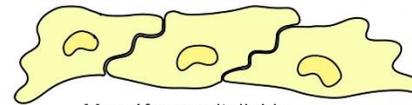
Macrófago



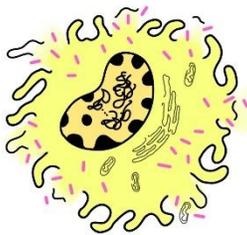
Célula gigante  
Multinucleada



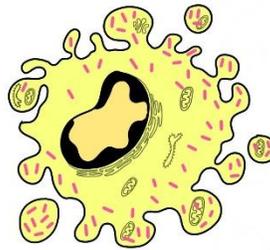
Fibroblastos



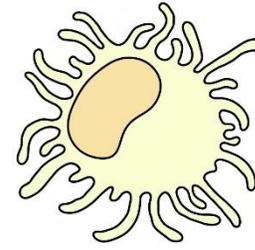
Macrófago epitelioid



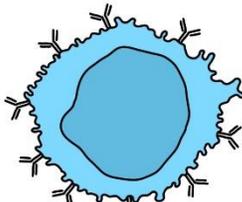
Macrófago infectado  
Necrótico



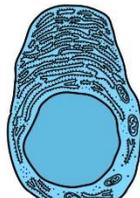
Macrófago infectado  
Apoptótico



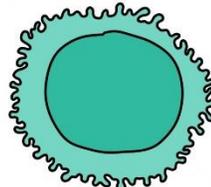
Célula dendrítica



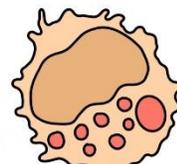
Linfocito B



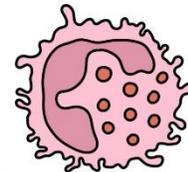
Célula  
Plasmática



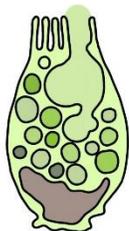
Linfocito TH



Célula NK



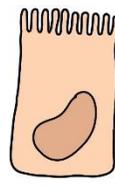
Neutrófilo



Célula caliciforme



Célula de Paneth



Enterocito



Célula M



MAP

## RESUMEN

El *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* (MAP) es el agente causal de la enfermedad de Johne en rumiantes, una enteritis granulomatosa crónica y se ha sugerido desde hace más de un siglo el posible vínculo zoonótico del MAP como agente etiologico de la Enfermedad de Crohn (EC) en humanos, debido, a las similitudes histopatológicas de las dos enfermedades, sin embargo, aún no se ha establecido un vínculo etiológico del MAP en la patogénesis de la Enfermedad de Crohn, con una etiología que puede ser multifactorial, las complicadas pruebas disganosticas y la dificultad del aislamiento por cultivo del MAP no ha permitido dilucidar la asociación causal del MAP y humanos con Enfermedad de Crohn. Buscando dar respuesta a la pregunta ¿Existe un vínculo etiológico entre la paratuberculosis y la Enfermedad de Crohn?, se realizó una investigación documental crítica y actualizada de las evidencias científicas expuestas en los últimos cinco años sobre lo hallazgos más representativos del posible vínculo de MAP en la etiopatogenia de la Enfermedad de Crohn, se encontró en algunos reportes de casos e investigaciones realizadas en este periodo de tiempo la presencia de MAP en tejidos de pacientes con EC mediante distintas técnicas diagnósticas confirmando la posibilidad que el MAP es un patógeno zoonótico.

## 1. INTRODUCCIÓN

La comunidad científica ha debatido por más de un siglo el papel del *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* en la Enfermedad de Crohn en humanos, descrita como un proceso inflamatorio crónico del tracto gastrointestinal, la controversia obedece a la similitud de las lesiones anatómo-histopatológicas en animales infectados con la micobacteria, la cual produce paratuberculosis en rumiantes, reportado también en otros animales domésticos y silvestres y en humanos con Enfermedad de Crohn.

Algunos investigadores han sugerido que el MAP es un agente zoonótico y que puede causar una inflamación intestinal crónica en bovinos como en humanos, sin embargo, no existen pruebas diagnósticas sensibles que confirmen o descarten la asociación de MAP con enfermedad en humanos, la prueba oro para la detección de *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* se realiza por aislamiento de tejidos y posterior cultivo, debido a la dificultad en el cultivo y al lento crecimiento de la micobacteria (Bosca *et al.*, 2015).

Otros autores han sugerido que en la Enfermedad de Crohn median eventos autoinmunes y no correlaciona el MAP como el agente causal, esta opinión que difiere de los microbiólogos que argumentan que el *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* es un invasor secundario en lugar de ser factor causal, no obstante, hay una creciente preocupación en la comunidad médica humana y veterinaria, ya que en la última década han aumentado los casos de humanos con Enfermedad de Crohn principalmente en países desarrollados, la posibilidad de identificar al MAP como agente zoonótico obligaría a la implementación de medidas sanitarias enfocadas a la protección de la salud pública.

## 2. JUSTIFICACIÓN

La paratuberculosis (PTB), conocida también como Enfermedad de Johne, es una patología de origen infeccioso, de curso crónico e incurable, causada por el *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* que coloniza al tracto gastrointestinal de diferentes especies silvestres y domésticas principalmente en bovinos, se caracteriza por signos clínicos como la diarrea persistente, emaciación progresiva y muerte (Sergeant *et al.*, 2019). En muchos países, la paratuberculosis es considerada endémica, está inscrita en la lista del Código Sanitario para Animales Terrestres de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE), su identificación en los hatos es de reporte obligatorio y de notificación a la OIE, esta enfermedad ocasiona grandes pérdidas económicas en los sistemas de producción bovina siendo de mayor prevalencia en sistemas especializados de producción lechera. (OIE, 2018).

Las lesiones anatomo-histopatológicas fueron descritas por primera vez en 1895 como una gastroenteritis granulomatosa crónica en bovinos, en 1913 se describieron lesiones similares en intestinos humanos (Garvey, 2018) debido a estas similitudes clínicas e histopatológicas se ha relacionado el agente etiológico de la paratuberculosis como el agente causal de la Enfermedad de Crohn, generando controversia en la comunidad científica al sugerir una transmisión inter-especies, se ha llevado a cabo en los últimos años investigaciones y meta-análisis de la literatura científica sobre el posible vínculo zoonótico del MAP en humanos, sin embargo, varios autores han manifestado limitaciones experimentales para establecer la relación del MAP como agente zoonótico ya que las evidencias disponibles han sido inconclusas para validar o refutar esta hipótesis, requiriendo mayor investigación (Sechi y Dow, 2015).

Esta monografía realizó una investigación documental crítica y actualizada de las evidencias científicas expuestas en los últimos cinco años de los hallazgos más representativos sobre el posible vínculo del MAP en la etiopatogenia de la Enfermedad de Crohn, asimismo, se discutió sobre la situación actual de la paratuberculosis en Colombia y se ilustró desde el

punto de vista del autor la respuesta inmunitaria local y la fisiopatología de la paratuberculosis en bovinos.

La preocupación del potencial zoonótico en la salud pública, ha llevado a numerosos estudios con el fin de mejorar las pruebas de laboratorio para la identificación del agente etiológico en tejidos humanos, la creación de nuevos tratamientos farmacológicos, vacunas; programas de control y mejoramiento de la resistencia a la enfermedad en el ganado (Whittington *et al.*, 2017).

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. GENERAL**

- Compilar información crítica y actualizada sobre las similitudes fisiopatológicas de la paratuberculosis y la Enfermedad de Crohn y su posible relación zoonótica.

#### **3.2. ESPECÍFICOS**

- Ilustrar la fisiopatología de la paratuberculosis y la Enfermedad de Crohn basado en la síntesis personal de la revisión de literatura.
- Contribuir a la comprensión detallada de la interacción huésped-patógeno en la paratuberculosis bovina.

## 4. MARCO TEÓRICO

### 4.1. GENERALIDADES

La Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) define la paratuberculosis o Enfermedad de Johne, como una infección de origen bacteriano que afecta el tracto gastrointestinal causando una enteritis granulomatosa crónica, proliferativa y contagiosa, con pérdida de proteínas llevando a caquexia, emaciación y muerte (Sergeant *et al.*, 2019), afecta principalmente a rumiantes domésticos como bovinos, ovinos y caprinos, se ha descrito también en otras especies como equinos, porcinos, lagomorfos, mustélidos, primates, camélidos y carnívoros salvajes (Fawzy *et al.*, 2018). Su agente causal es la bacteria *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* (MAP) y está en la lista del Código Sanitario para los Animales Terrestres OIE, su identificación es de declaración obligatoria y notificación a la OIE (OIE, 2018).

Es de importancia en los hatos lecheros ya que la ocasiona pérdidas económicas porque compromete el bienestar animal, causa disminución en la producción láctea, genera restricción comercial en la industria ganadera en distintos países llevando a pérdidas del valor comercial de los animales infectados y a sacrificios prematuros (Raizman *et al.*, 2009 citado en Tracey *et al.*, 2017). La comunidad científica ha sugerido una asociación causal del MAP con la Enfermedad de Crohn, debido a las similitudes fisiopatológicas entre las dos enfermedades (Garvey, 2018). Se ha demostrado la capacidad del MAP de sobrevivir a la pasteurización de la leche, a condiciones medio ambientales, al tratamiento de agua y a la digestión anaeróbica, esto hace del MAP una bacteria ubicua en producciones ganaderas donde se establece la infección (Pritchard *et al.*, 2017).

Johne y Frothingham (1894) realizaron la primera descripción de las lesiones anatómo-histopatológicas de la Enfermedad de Johne, mientras, Twort en 1910 cultivó, aisló e identificó el microorganismo en laboratorio e inoculó la bacteria en vacas logrando establecer la enfermedad en condiciones experimentales cumpliendo así con éxito los postulados de Koch (Twort *et al.*, 1912 citado en Kuenstner *et al.*, 2017).

En 1913 se describió las características patológicas de la Enfermedad de Crohn. (Dalziel, 1913).

## **4.2. CARACTERÍSTICAS DEL *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis***

### **4.2.1. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA**

El agente etiológico *Mycobacterium avium subesp paratuberculosis* se clasifica taxonómicamente en Bergey *et al.*, (1923) (Thorel *et al.*, 1990 citados en NCBI taxonomy, 2019):

Dominio: *Bacteria*

Phyllum: *Actinobacteria*

Clase: *Actinobacteria*

Subclase: *Actinobacteridae*

Orden: *Actinomycetales*

Suborden: *Corynebacterineae*

Familia *Mycobacteriaceae*

Género *Mycobacterium*

Subgénero: *Mycobacterium avium*

Especie *Mycobacterium avium subesp paratuberculosis*

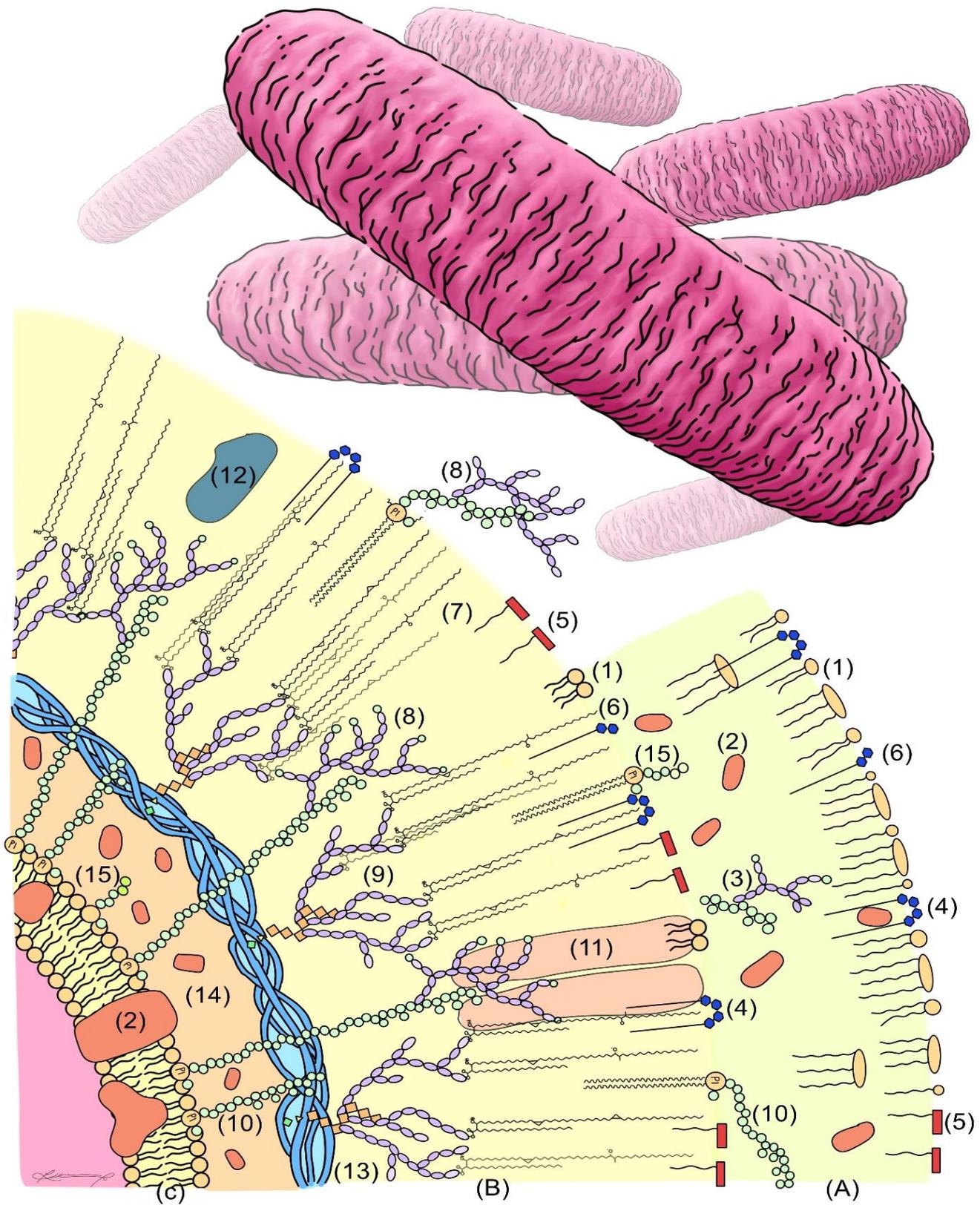
La familia *Mycobacteriaceae* incluyen las bacterias patógenas que causan la tuberculosis (*Mycobacterium tuberculosis*) y la lepra (*Mycobacterium leprae*) en humanos, el *Mycobacterium bovis* causante de la tuberculosis bovina; el *Mycobacterium ulcerans* causante de la ulcera Buruli y el *Mycobacterium avium* que produce infección en pacientes inmunosuprimidos (Calderón y Góngora, 2008), el MAP es incluido en el complejo *Mycobacterium avium*, junto con *M. avium* y *M. intracellulare* (McNees *et al.*, 2015).

A nivel de subespecie el *M. paratuberculosis* puede diferenciarse fenotípicamente de *M. avium* y *M. silvaticum* por su dependencia de micobactina y genotípicamente por la presencia de múltiples copias de un elemento de inserción específico de la especie (IS 900) en su genoma y se ha utilizado para la detección específica de este patógeno mediante ensayos de reacción en cadena de la polimerasa o *in situ* (McNees *et al.*, 2015).

#### **4.2.2. CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS**

El *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* mide aproximadamente ( $0,5 \times 1,5$   $\mu\text{m}$ ), posee una pared celular gruesa, serosa e hidrofóbica constituida por una capa interna y externa que rodean a una membrana plasmática (Castellanos, 2010).

La capa externa está formada por lípidos que se asocian libremente con la pared celular, con algunos ácidos grasos de cadena corta y larga que complementan las cadenas cortas y largas de la capa interna, los polisacáridos ligados a los lípidos asociados con la pared celular externa consisten en lipoarabinomanano, lipomanano, lípidos como ftiocerol dimicocerosato, dimicolil-trealosa (Hett y Rubin, 2008), la bicapa de fosfolípidos de la membrana interna está compuesta por tres componentes principales: un polímero reticulado de peptidoglicano, un polisacárido de arabinogalactano altamente ramificado y ácidos micólicos de cadena larga que forman un complejo y se extiende desde la membrana plasmática hacia afuera en capas comenzando con un peptidoglicano y terminando con un ácido micólico, este complejo le da la característica insoluble a la pared celular de las micobacterias (Figura 1), (Hett y Rubin, 2008; Abrahams y Besra, 2018).



Perdomo, 2019

**Figura 1.** Morfología de las micobacterias (Pared celular).

## Descripción:

- (A) *capa externa está constituida principalmente por: proteínas (2) con pequeñas cantidades de carbohidratos como glucopeptidolipidos (5) y solo una pequeña cantidad de lípidos fosfolípidos (1) y triacilgliceridos Arabinomanano (3) dimlicolatos de trehalosa (4) Monomilatos de trehalosa (6).*
- (B) *Micomembrana: la parte externa de la micomembrana está presumiblemente compuesta de lípidos extraíbles con solventes orgánicos, que incluyen fosfolípidos (1), dimlicolatos de trehalosa (4) Monomilatos de trehalosa (6), glucopéptidos (5) y lipoglucanos. Lipoarabinomananos (8), lipomanano (10), fosfatidil-mio-inositol-manosidos (15), antígeno 85 (12) y porinas (11). La parte interna de la micomembrana contiene ácidos grasos de cadena muy larga ácidos micólicos (7) que se esterifican al arabinogalactano (9), que a su vez está unido covalentemente a peptidoglicano (13). Un espacio periplásmico (14) compuesto por proteínas que separa el peptidoglicano y la micomembrana de la bicapa lipídica (C) compuesta por fosfolípidos (1) y proteínas (2) en la cual se encuentran los lipoarabinomananos (8), lipomanano (10) y fosfatidil-mio-inositol-manosidos (15).*

Basado en: (Chiaradia, *et al.*, 2017; Abrahams y Besra, 2018).

El peptidoglicano de las micobacterias es el componente principal de la pared celular y está formado por residuos de N- acetilglucosamina y ácido N- acetilmurámico a través de enlaces  $\beta$  (1  $\rightarrow$  4) con cadenas laterales de aminoácidos entrecruzados por puentes, amidación de los ácidos carboxílicos y residuos de glicina o serina, (Mahapatra *et al.*, 2005), proporciona forma y rigidez, contrarrestando la presión de la turgencia osmótica siendo esencial para el crecimiento y la supervivencia (Abrahams y Besra, 2018).

El arabinogalactano esta compuesto por residuos de galactosa y azúcar de arabinosa en forma de anillo de furanosa, éste se une al peptidoglicano a través de una sola unidad, los extremos no reductores de las cadenas de arabinano actúan como un sitio de unión para los restos de ácidos micólicos, succinilo y galactosamina (Abrahams y Besra, 2018).

Los ácidos micólicos son el componente distintivo final de la pared celular de las micobacterias, son ácidos grasos  $\alpha$  de cadena larga  $\alpha$ - alquil-  $\beta$ -hidroxil-ramificados que contienen 70-90 átomos de carbono en total, con la rama  $\alpha$  totalmente saturada de 24 carbonos y cadenas de meromicolato de 40-60 carbonos y una larga cadena  $\alpha$  saturada de

C24- C26, se unen a la capa de arabinogalactano, pero también forman otra capa externa contribuyendo a la permeabilidad de la pared celular y es esencial para la viabilidad celular y la virulencia (Liu *et al.* 1996; Hett y Rubin, 2008), aproximadamente el 25% del peso seco de la micobacteria se debe a lípidos o glicolípidos y el 40% de estos, son moléculas de ácidos micólicos unidos al disacárido trehalosa (disacárido  $\alpha$ -D-glucosa formado por residuos de  $\alpha$ -D-gluopirosanosil (1-1)- $\alpha$ -glucopiranososa), el cual actúa como antígeno presente en numerosas moléculas de micobacterias (Gorocica *et al.*, 2005).

La capa rica en lípidos y carbohidratos de la pared celular sirve como barrera de permeabilidad brindando protección contra compuestos hidrófilos siendo fundamentales en la patogénesis y la supervivencia de las micobacterias (Castellanos, 2010), además, su composición le brinda la capacidad de ser alcohol ácido resistente (Niederweis *et al.*, 2010 citado en McNees *et al.*, 2015).

#### **4.2.3. CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS**

El *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* no puede sintetizar la micobactina que es un sideróforo quelante de hierro, requerido por la bacteria para la absorción de hierro férrico del medio, por tanto, no puede replicarse fuera del huésped animal convirtiéndolo en patógeno intracelular obligado para su replicación (Boxtel *et al.*, 1990; Atreya *et al.*, 2014; Bosca *et al.*, 2015).

Las micobactinas son moléculas lipídicas de elevado peso molecular se unen al hierro, debido a su insolubilidad en agua, estas estructuras altamente hidrofóbicas están confinadas a la membrana celular, presentes en las micobacterias excepto en *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* y algunas cepas de *M. avium* debido a la inactivación del gen *mbtA* en la secuenciación del genoma completo del clon K10 el cual codifica la primera enzima que actúa sobre el ácido salicílico en la vía de biosíntesis de la micobactina (Li *et al.*, 2005; Castellanos, 2010), (Wang *et al.*, 2015).

En cultivos la micobactina se obtiene como fuente de unión a hierro de *Mycobacterium phlei*, siendo factor de crecimiento esencial para el cultivo in vitro (Rathnaiah *et al.*, 2017), no obstante, se ha identificado una enzima reductasa extracelular que es capaz de movilizar el hierro de diferentes fuentes como el citrato de amonio férrico, la ferritina y la transferrina por reducción del metal y podría suponer una alternativa para la captación de hierro y un papel en la evasión de los mecanismos de defensa intracelulares de los macrófagos que infecta el MAP (Homuth *et al.*, 1998).

El *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* carece de fosfatasa alcalina y es resistente a la D-cicloserina y la ansamicina, los requerimientos nutricionales para el cultivo de MAP como detergentes, triglicéridos, ácidos palmítico y oleico, albúmina sérica bovina, yema de huevo o dióxido de carbono pueden potenciarlo, el glicerol es la fuente de carbono más utilizada, pueden también utilizar hidrocarburos, especialmente alcanos (excepto metano), ácidos grasos derivados, alcoholes, cetonas, y ácidos mono-, Di- o tricarboxílicos, la fuente de nitrógeno preferida es la asparagina, Entre los minerales, los macroelementos que requieren en grandes cantidades son potasio, magnesio, azufre y fósforo, mientras, los microelementos y oligoelementos son hierro, zinc, manganeso, y molibdeno, muchas veces añadidos al medio como impurezas (Ratledge 1982 citado en Sevilla, 2007).

#### **4.2.4. CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS**

El MAP es una bacteria aerobia intracelular facultativa, Gram-positiva, inmóvil, clasificado en el grupo III de Runyon como no fotocromógenos (Runyon, 1959) y de crecimiento lento (por su baja actividad metabólica) con un tiempo de generación de más de 20 horas, la temperatura óptima de crecimiento es de 37°C, el pH óptimo entre 5,4 y 6,5 y es ácido-alcohol resistente (Niederweis *et al.*, 2010 citado en McNees *et al.*, 2015).

La micobacteria es resistente al calor, al frío y a la desecación, puede sobrevivir por extensos periodos en el suelo por más de un año (OIE, 2019), en el agua esterilizada puede sobrevivir 9 meses y 163 días en agua de río, mientras en agua corriente con pH no neutro hasta 14

meses (Sevilla, 2007), es ubicuo en el ambiente y puede conservar su capacidad infectante en pastos contaminados más de año, es susceptible a pH alcalino y a altas concentraciones de calcio en suelo (Zapata *et al.*, 2008), en heces puede sobrevivir hasta los 246 días, en materia orgánica hasta 287 días y entre 21 y 28 días durante la digestión anaeróbica en biodigestor (Sevilla, 2007), también se ha demostrado la capacidad del microorganismo de sobrevivir a la pasteurización de leche (Pritchard *et al.*, 2017).

Es sensible a desinfectantes en suspensión acuosa como el amonio (3%), el formol (5%), compuestos cresólicos (1:32), el fenol (1:40), el bicloruro de mercurio (1:1000), el hipoclorito cálcico (1:50), el cloro, cianamida cálcica o el etanol (Sevilla, 2007).

En medios de cultivo se requiere varias semanas de incubación para detectar crecimiento de colonias (Lambrecht *et al.*, 1988 citado en Rathnaiah *et al.*, 2017), en medios sólidos las colonias son pequeñas, firmes, convexas, húmedas y de color blanco-crema, pero algunas cepas pueden presentar colonias más lisas, suaves y brillantes no pigmentadas (Sevilla, 2007) y depende de la presencia de Tweens (solución tensioactiva no iónica utilizada como suplemento en diversos medios de cultivo).

#### **4.2.5. GENOTIPIFICACIÓN**

La genotipificación puede usarse en el estudio de la genética de poblaciones, la patogénesis y la epidemiología molecular, incluida la vigilancia de enfermedades y la investigación de brotes, sin embargo, en la actualidad, la caracterización de MAP depende principalmente de las pruebas genéticas que utilizan marcadores genéticos como los elementos de inserción, las secuencias repetitivas y los polimorfismos de un solo nucleótido (Fawzy *et al.*, 2018).

Cuando se aisló por primera vez MAP fue clasificado según las características epidemiológicas y fenotípicas en el huésped describiéndose dos tipos, TIPO C (bovino) y TIPO S (ovino), posteriormente se propuso una nueva nomenclatura basada en los análisis filogenéticos; estableciendo tres grupos: tipo I (cepas [S]), tipo II (cepas [C]) y tipo III (cepas

intermedias) (Castellanos *et al.*, 2009), los tipos I y III son cepas aisladas frecuentemente en ovinos y los subgrupos del tipo S y tipo II corresponden a las cepas aisladas en bovinos del cual se tiene dos subgrupos denominados tipo C y tipo B, este último fue aislado en bisontes y catalogados recientemente, el tipo de bisonte indio y el tipo bisonte USA (Bryant *et al.*, 2016; Fawzy *et al.*, 2018).

Los métodos para la tipificación molecular de las cepas MAP han proporcionado información importante sobre la diversidad genética y sus relaciones evolutivas, permitiendo dilucidar la transmisión entre especies y dentro de las especies (Möbius *et al.*, 2008), los análisis basados en el elemento de inserción IS900 (IS900 RFLP) que tiene una longitud de 1.451 pb, presente exclusivamente en 10-20 copias en el genoma de MAP, se ha empleado de forma más extensa en investigaciones al ser un elemento de inserción específico de MAP y revela las características de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) para los tipos I, II y III (Castellanos *et al.*, 2008), también se ha utilizado métodos de análisis para la diferenciación de las líneas de MAP de los tres subtipos (bovinos, ovinos y bisontes) y las preferencias de huésped, el análisis mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y restricción de endonucleasas (PCR-REA) del locus IS 1311 de MAP (Sohal *et al.*, 2014; Mohammad *et al.*, 2016)).

En un estudio realizado en Corea aplicaron tres métodos de tipificación molecular, (IS 1311 PCR-REA, MIRU-VNTR y MLSSR) en un análisis epidemiológico de MAP mostraron que los genotipos de tipo bovino y tipo bisonte coexistían en las granjas bovinas coreanas y que las cepas de tipo bisonte se distribuyeron en todo el país, su amplia distribución en el país coreano tiene un significado importante en el aspecto epidemiológico (Park *et al.*, 2018), en el continente americano también se ha reportado cepas de MAP tipo bisonte en varios países aisladas de especies domésticas y en algunos animales silvestres lo que sugiere que las especies silvestres tienen el potencial de propagar el MAP, no obstante, se requiere estudios epidemiológicos detallados para aclarar la relación entre dos especies hospedadoras (Sohal *et al.*, 2014).

#### 4.2.6. FACTORES DE VIRULENCIA *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis*

Aún con los avances tecnológicos en genómica, proteómica y bioinformática, la identificación de factores de virulencia de las micobacterias es un desafío, debido a la falta de un fenotipo claramente asociado con la virulencia, estos factores de virulencia se identifican como fragmentos de DNA, se identificó una familia de 4 o operones de entrada de células de mamíferos (Mce) mammalian cell entry por sus siglas en inglés, ( mce1, mce2, mce3 y mce4 ), cada operon consta de 8 genes que se traducen a proteínas en la superficie celular de las micobacterias que le confieren la capacidad de ingresar a las células de los mamíferos y sobrevivir dentro de macrófagos. (Singh *et al.*, 2016) estos operones fueron reconocidos por primera vez en *Mycobacterium tuberculosis* (MTB), sin embargo, estos genes están distribuidos en todo el género *Mycobacterium* (Hemati *et al.*, 2018). Los transportadores Mce son complejos multi-proteínas considerados funcionalmente análogos a los transportadores ABC que desempeñan un papel en la virulencia y funcionan en la captación de lípidos, el gen Mce4 es necesario para la captación de colesterol, siendo el colesterol un nutriente importante en la infección por micobacterias, la acumulación de proteínas de unión al colesterol, colesterol y esfingolípidos en la membrana plasmática crea plataformas ricas en lípidos llamadas balsas lipídicas que facilitan el ingreso a la célula, la señalización y la interacción célula-patógeno; la evidencia sugiere que el Mce1 es responsable de la importación de ácidos micólicos y ácidos grasos de cadena larga, por lo tanto estos factores de virulencia son necesarios para el ingreso de las micobacterias a la célula y su supervivencia en ambientes intracelulares ricos en lípidos, esto sugiere un fuerte vínculo entre las proteínas Mce y el colesterol (Perkowski *et al.*, 2016). El gen *MAP2191* es un operón miembro de mce5, que tiene naturaleza antigénica potencial y epítomos inmunogénicos de células T y B específicos para MAP (Perkowski *et al.*, 2016; Singh *et al.*, 2016; Hemati *et al.*, 2018)

Las proteínas PE (Prolina-ácido glutámico) y PPE (Prolina-prolina-ácido glutámico) se cree que desempeñan un papel importante en la infección antigénica e inmunológica de MAP, estas son proteínas ácidas ricas en glicina que se identifican por sus dominios específicos

(Pro-Pro-Glu y Pro-Glu) Con frecuencia contienen secuencias polimórficas repetitivas (PGRS) y múltiples copias de las principales repeticiones tándem polimórficas, se piensa que estas proteínas se expresan en la superficie celular y proporcionan la variación antigénica que provoca diferentes respuestas inmunológicas en las micobacterias (Li *et al.*, 2005).

Otro factor de virulencia descritos es la proteína de shock térmico 70 (HSP70) esta proteínas pueden iniciar respuesta proinflamatoria en las células presentadoras de antígenos y facilitan el plegamiento y despliegue de proteínas citosólicas, se reporta la expresión diferencial de HSP65 y HSP70 durante las diferentes etapas del desarrollo de la paratuberculosis, lo que sugiere que podrían actuar como marcadores en diferentes etapas de la infección (Okuni *et al.*, 2017), la HSP parece jugar un importante papel con respecto a la protección celular, además de haber sido probada su utilización para producir una vacuna (Koets *et al.*, 2006 citado en Sevilla, 2007).

Otra proteína de superficie celular de 35 kDa, denominada proteína de membrana principal (MMP) encontrado *M. leprae* y más tarde en *M. avium* y *M. paratuberculosis* (Bannantine *et al.*, 2003), esta codificada por MAP2121c que es un antígeno micobacteriano localizado en la superficie que es reconocido por células de humanos y de bovinos infectado con micobacterias, se ha demostrado que favorece la invasión de células epiteliales bovinas (Bannantine *et al.*, 2007).

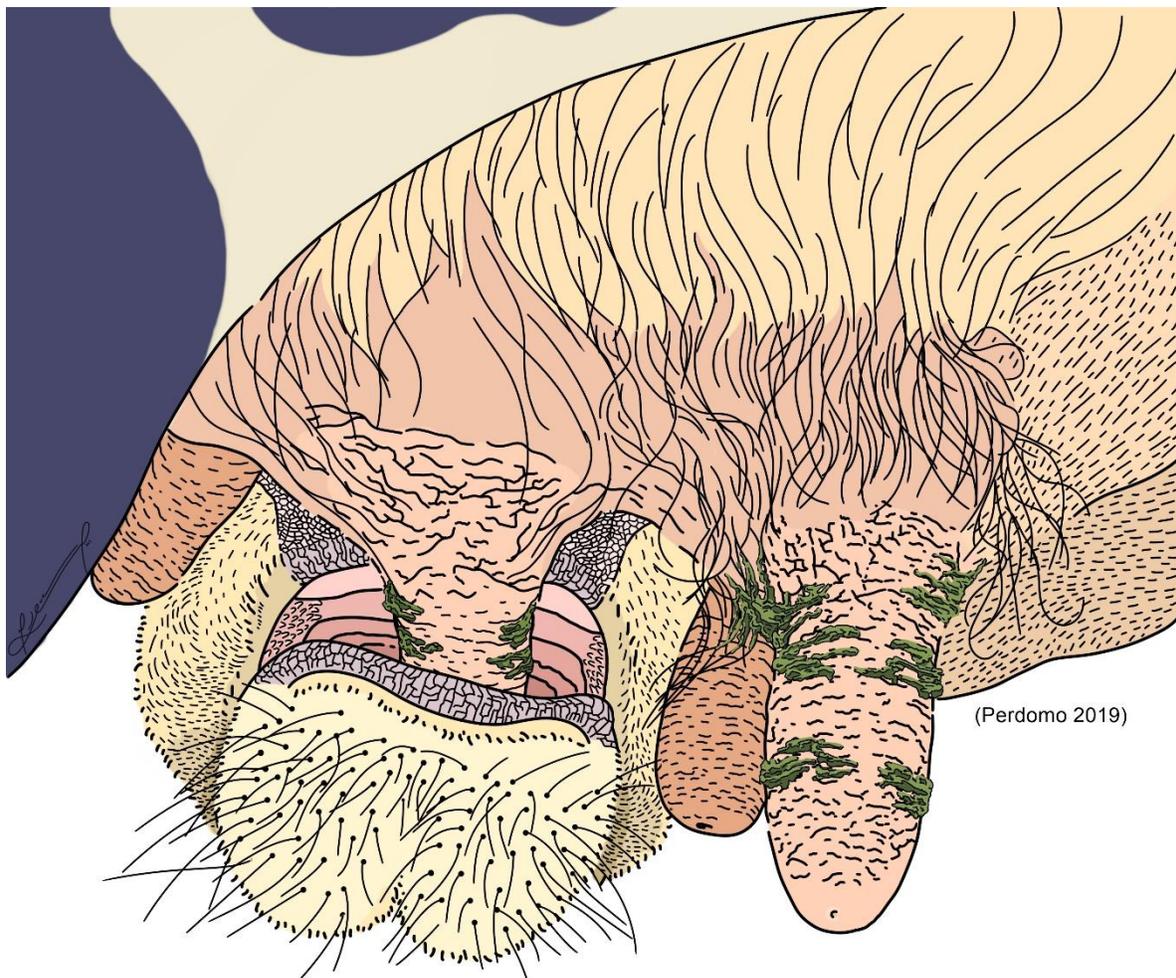
El gen *pstA* está involucrado en la virulencia de MA participando en la biosíntesis de glucopeptidolípidos (GPL), el gen inicia con un operón que contiene dos genes grandes que codifican sintetetas peptídicas no ribosómicas (*pstA* y *pstB*) que incorporan cuatro aminoácidos (Phe, Thr, Ala y alaninol) en las moléculas del lipopéptido central y también participa en la formación de biopelículas en *M. avium* (Wu *et al.*, 2009; Ghosh *et al.*, 2013).

El factor sigma alternativo (*SigH*) demostró ser importante para la supervivencia de *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* dentro de los macrófagos bovinos activados con interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) (Ghosh *et al.*, 2013).

### 4.3. VÍAS DE TRANSMISIÓN DEL *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis*

#### 4.3.1. TRANSMISIÓN HORIZONTAL (FECAL-ORAL)

La principal vía de transmisión es fecal-oral, siendo los terneros los más propensos a adquirir la infección por contacto con los pezones contaminados (Figura 2), la leche, los pastos, los piensos, la tierra, el agua y otras superficies. Al-Mamun, *et al.*, (2017).



Perdomo, 2019

**Figura 2.** Principal vía de transmisión de *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* en terneros (ruta fecal-oral).

*Transmisión de MAP a terneros se da principalmente por ingestión de bacterias, a través de la ruta fecal-oral mediante el consumo de leche contaminada por un alto número de MAP en las heces, calostro y leche. (Al-Mamun, et al., 2017).*

La dosis infecciosa oral en rumiantes varía desde  $1.5 \times 10^6$  / UFC la más baja que produjo infección detectable a las tres semanas posterior a la inoculación, también, se citan dosis más altas de  $2.5 \times 10^{10}$  UFC produciendo una infección tisular más amplia y una posterior diseminación a sitios extraintestinales, estos estudios apoyan la hipótesis de que la mucosa intestinal ileal y yeyunal es el portal primario de entrada de MAP (Sweeney *et al.*, 2006).

Corbett *et al.*, (2017) evaluó la excreción fecal en terneros inoculados por vía oral con MAP y detectó de 7 a 10 días post inoculación MAP en muestras fecales, los terneros infectados fueron alojados grupalmente con terneros sanos y encontraron que “las nuevas infecciones por MAP se produjeron debido a la exposición de terneros sanos con terneros infectados”, Corbett *et al.*, (2018) evaluaron también 3 dosis de inoculación (dosis alta [ $1 \times 10^{10}$  UFC], dosis moderada [ $5 \times 10^8$  UFC] y dosis baja [ $1 \times 10^8$  UFC]) de MAP en terneros recién nacidos infectados experimentalmente y concluyeron que la excreción fecal de MAP se ve afectado por la frecuencia de exposición y no por la concentración de la dosis infecciosa.

La excreción de MAP puede verse afectado por la frecuencia de exposición, la respuesta inmunitaria y el grado de infección en los tejidos, se requiere dilucidar los mecanismos detrás de la translocación de MAP a la luz intestinal y subsiguiente excreción en heces (Ayele *et al.*, 2004; Mortier *et al.*, 2014; Stinson *et al.*, 2018).

Se han reconocido dos tipos de animales excretores de MAP, los que tienen un aumento de UFC en el tiempo, se caracterizan por una excreción continua y progresiva, su respuesta inmune humoral es detectable y progresiva y están los que no presentan un aumento de UFC en el tiempo, estos se caracterizan por una excreción intermitente y baja en heces, con ausencia de respuesta inmune humoral detectable (Schukken *et al.*, 2015). Otros autores sugieren 3 categorías: los animales intermitentes (sin infección progresiva), los animales jóvenes persistentemente infectados que controlan parcialmente la infección (infección

progresiva lenta) y los animales persistentes de edad avanzada que no controlan la infección de forma efectiva (infección progresiva) (Mitchell *et al.*, 2015).

En cuanto a los intervalos de excreción de MAP hay gran diferencia en los intervalos de excreción, que varían en animales infectados experimentalmente e infectados naturalmente, probablemente lo afecte los diferentes mecanismos patológicos, la respuesta inmune, las dosis infecciosa y la vía de ingreso, otras consideraciones proponen vías diferentes de la enfermedad, ya que las infecciones naturales suelen estar inactivas hasta que un evento impulsa un cambio en el intervalos de excreción, mientras la patogénesis en afecciones experimentales se caracterizan por una infección activa y progresiva con diferentes etapas (Mitchell *et al.*, 2015).

#### **4.3.2. TRANSMISIÓN HORIZONTAL (CONTACTO SEXUAL)**

Los macrófagos infectados pueden transportar MAP por sangre a otros sitios del cuerpo como el útero, el feto, la glándula mamaria y los testículos, que son tejidos diana para la infección, un estudio longitudinal de la distribución de MAP, encontró una correlación positiva entre la aparición de MAP en semen y en sangre indicando que la diseminación se produce a través de la vía sanguínea (Münster *et al.*, 2012)

El aislamiento de MAP en próstata, glándula bulbouretral, glándula seminal y semen en bovinos se ha reportado desde 1965 (Tunkle y Aleraj, 1965; Ayele *et al.*, 2004; Fechner *et al.*, 2015; Fechner *et al.*, 2017), este semen contaminado puede infectar a la hembra y contribuir a la infección por MAP en la etapa temprana del desarrollo embrionario (Larsen *et al.*, 1970 citado en Ayele *et al.*, 2004), Eppleston y Wittington, (2001) evaluaron sí el semen de 11 carneros con la Enfermedad de Johne adquirida naturalmente podría contener MAP, los resultados confirmaron la presencia de la bacteria en 3 (27%) de los 11 animales evaluados, no obstante, la fuente del microorganismo no fue determinada en la investigación, los autores indicaron que el MAP podría ser transmitido por ruta vaginal en las ovejas durante el apareamiento natural o por el semen contaminado en procedimientos de reproducción artificial, sin embargo, en la mayoría de estudios previos, se han encontrado bajas

concentraciones de MAP en el semen de toros infectados, tal vez limitado por factores como la capacidad de la micobacteria, para establecer la infección por ruta vaginal, se requieren más estudios para considerar la vía de transmisión sexual como riesgo en las producciones ganaderas (Fechner *et al.*, 2015).

Se ha estudiado si el MAP podría diseminarse desde el tracto gastrointestinal a los órganos reproductivos en toros infectados naturalmente, se aisló de una muestra de semen la micobacteria mediante cultivo por 25 semanas de incubación y fue analizado mediante la técnica qPCR para la secuencia de inserción IS900. (Ayele *et al.*, 2004) Nueve muestras de semen analizadas por qPCR para IS900 de MAP fueron positivas y se observó una amplia distribución extraintestinal de la bacteria. (Khol *et al.*, 2010) La dosis mínima detectable para análisis en PCR fue de  $10^2$ - $10^5$  MAP/ ml de semen (Münster *et al.*, 2012).

La importancia de evaluar la presencia de MAP en el semen para fines de reproducción radica en que los donantes pueden ser portadores asintomáticos y existe riesgo de transmisión venérea de la enfermedad (Fechner *et al.*, 2017). Además, la bacteria puede sobrevivir a la congelación y al tratamiento con antibióticos, se requiere de técnicas sensibles de laboratorio para identificación de la bacteria con el fin de reducir el riesgo de llevar la enfermedad a países libres de MAP (Khamesipour *et al.*, 2014).

#### **4.3.3. TRANSMISIÓN VERTICAL**

Un modo de transmisión vertical de MAP, se da a través de la ingestión de leche contaminada y calostro, los terneros alimentados con calostro de madres infectadas, tienen más probabilidad de adquirir el MAP, sobre los factores que influyen en la cantidad de excreción de MAP en leche la literatura no es muy amplia y puede verse influenciada por la etapa de infección y los días de lactancia (Sweeney *et al.*, 1992; Ayele *et al.*, 2004; Stabel *et al.*, 2014).

El MAP migra en los macrófagos intestinales infectados a nódulos linfáticos mesentéricos conduciendo una diseminación hematogena o linfática de la bacteria, esta diseminación puede llegar a la leche, sangre, semen y otros tejidos extraintestinales como nódulos linfáticos supramamarios (Sweeney *et al.*, 1992; Chiodini, 1996; Ayele *et al.*, 2004), algunos estudios indican una fuerte correlación entre la excreción de MAP en leche o calostro y el estadio de la enfermedad, mostrando que cuanto más avanzado es el estadio mayor es la probabilidad de detectar la bacteria por los diferentes métodos analíticos (Stabel *et al.*, 2014). Al parecer la ubre es un sitio favorable para la replicación de MAP, no se ha evaluado el mecanismo de supervivencia de los bacilos en la ubre, pero esta proporciona un medio rico en proteínas de unión al hierro como la lactoferrina (Buergelt y Williams, 2004).

El aislamiento de MAP en tejido mamario, nódulos linfáticos supramamarios y en la leche podría dar lugar a la transmisión de MAP a animales sanos (Stabel *et al.*, 2014). En un estudio obtuvieron cultivos positivos, de 77 muestras de leche, 9 (11,6%) fueron positivos y de 81 muestras de nódulos linfáticos supramamarios en 22 (27%) se aisló el microorganismo; la probabilidad de excreción de la bacteria en leche es mayor en animales con una infección avanzada y podrían excretar el MAP por esta vía, los autores concluyeron que la concentración de microorganismos en las muestras analizadas fue baja (2-8 UFC por 50 mL/leche) y el riesgo de infección sería multiplicado por los litros de leche consumido por un ternero al día (4 litros por día) (Sweeney *et al.*, 1992). Otro estudio aisló la bacteria de leche cruda bovina, evaluadas por PCR (límite de detención 1000 UFC/mL de leche) y cultivo en laboratorio (límite de detención 100 UFC/mL de leche), siendo más sensible el método de cultivo (Giese y Ahrens 2000) (Singh y Vihan, 2004)

El análisis para determinar la prevalencia de MAP en leche, presenta dificultades debido a que la bacteria es de crecimiento lento y puede tardar hasta 20 semanas para ser observada en medio de cultivo, siendo inaplicable para analizar la leche antes de su procesamiento y consumo humano, el PCR es una técnica más rápida, de en leche, tiene limitantes debido a sustancias inhibitorias de la leche y requiere una adecuada preparación para asegurar la reacción de la PCR con el fin de maximizar la sensibilidad (Boddien *et al.*, 2006), otras técnicas como (ELISA) también ha sido empleada para el análisis de la leche, pero diversos

estudios mostraron una alta variación y no deben usarse como prueba de detección de MAP (Hirst *et al.*, 2002; Buergelt y Williams, 2004; Khol *et al.*, 2013). En la Elisa se pueden producir falsos positivos y también puede tener una sensibilidad reducida en los animales infectados que aún no han alcanzado una fase de producción de anticuerpos, se debe tener en cuenta las características individuales de la vaca y la respuesta inmune, por lo que los resultados de ELISA en leche deben examinarse más allá de una clasificación positiva o negativa, cada diagnóstico va acompañado de ventajas y limitaciones como el costo, la eficiencia y el equilibrio entre la sensibilidad y la especificidad de la prueba (Beaver *et al.*, 2017).

#### **4.3.4. TRANSMISIÓN VERTICAL (FETAL)**

Algunos estudios científicos aceptan la transmisión vertical de MAP de la vaca al feto (Pribylova *et al.*, 2013), la ruta de transmisión fetal ha sido evaluada desde 1929 (Münster *et al.*, 2012) y al parecer la transmisión al feto puede ocurrir con mayor frecuencia en el último tercio de la preñez, mientras otros autores sugieren que entre los 60 y 70 días de preñez, al parecer, en vacas infectadas sin signos clínicos la infección fetal se desarrolla con una frecuencia más baja que la reportada en vacas con signos clínicos (Kruip *et al.*, 2003).

La infección experimental se ha desarrollado al inocular la bacteria en útero a una dosis de ( $5 \times 10^8$  UFC/5 mL en Solución salina) mediante un equipo de inseminación artificial (Merkal *et al.*, 1982 citado en Münster *et al.*, 2012), estas concentraciones son mayores a las reportadas en semen ( $10^2$ - $10^5$  UFC/mL) (Pieper *et al.*, 2014).

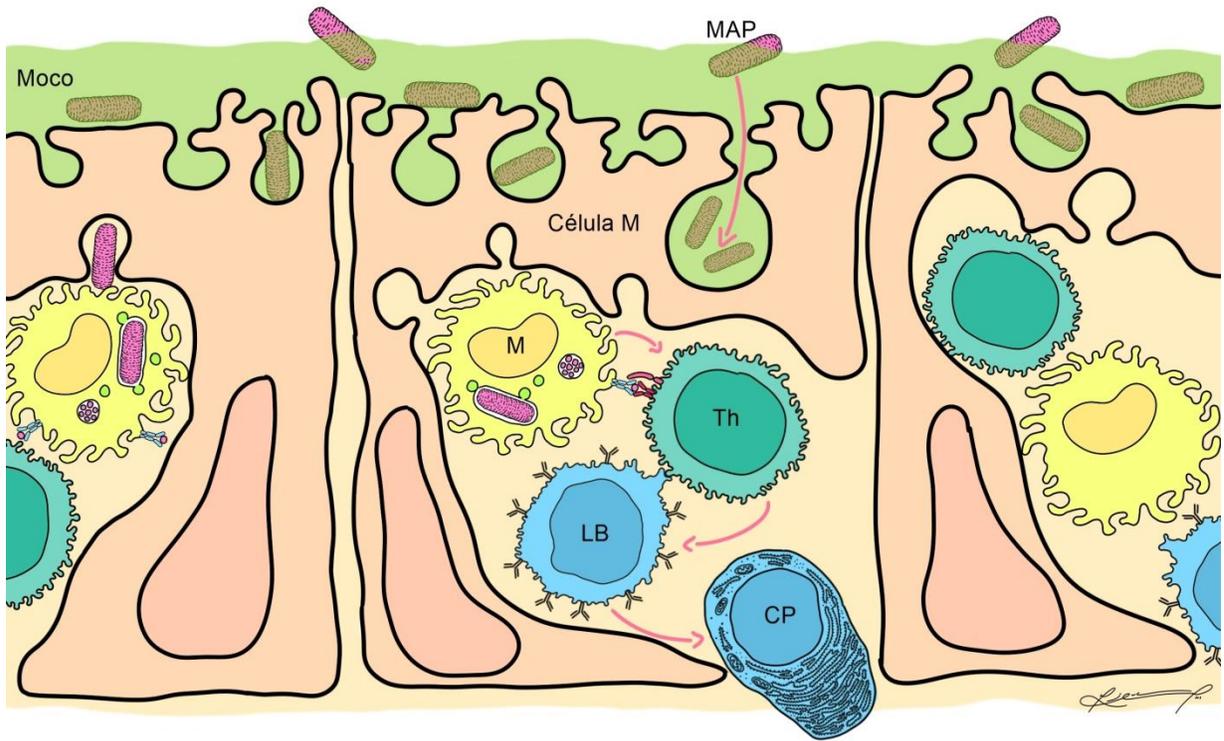
En cuanto a la posibilidad de transmisión de MAP por transferencia de embriones bovinos fertilizados *in vivo* e *in vitro* en animales sanos hay pocos estudios, estudios sobre el tema evaluaron embriones obtenidos de donadoras asintomáticas infectadas naturalmente con MAP y de donadoras no infectadas, encontrando que “la transferencia de embriones *in vivo* y embriones fertilizados *in vitro* infectados con MAP no evidencio la transmisión de la infección a las receptoras sanas o a la descendencia durante un período de 5 años Bielanski

*et al.*, (2006). Otros investigadores indican que es poco probable que se transmita MAP a través de embriones en vacas sanas, se cree que la placenta epitelio-corial es impermeable a la bacteria 42 a 49 días después de la inseminación y que la zona pelúcida es una barrera de protección efectiva para las células embrionarias contra la infección por MAP también es poco probable antes de la etapa de desarrollo de los cotiledones que haya infección, pero no se excluye la posibilidad de transmisión en una etapa posterior a los 60 días, estas observaciones sugieren la posibilidad de salvaguardar embriones valiosos de animales infectados en estadios tempranos de la infección (Rosenberger *et al.*, 1992).

#### **4.4. FISIOPATOLOGÍA DE LA PARATUBERCULOSIS**

El ingreso de *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* se da principalmente por la vía oro-fecal a dosis infecciosas de MAP, que van desde  $10^6$ – $10^8$  UFC/g de heces, en estudios experimentales  $1.5 \times 10^6$  UFC vía oral indujeron infección intestinal localizada, mientras dosis mayores pueden ocasionar infecciones a otros tejidos (Gilmour *et al.*, 1965).

La evidencia sugiere que las células M de la mucosa del íleon y yeyuno son el principal portal de ingreso del MAP a través de endocitosis (figura 3), trasladando la micobacteria desde la luz intestinal a la submucosa intestinal, allí el MAP será fagocitado por macrófagos y células dendríticas, donde sobrevivirá intracelularmente y establecerá una infección crónica, iniciando la reacción inflamatoria (Sweeney *et al.*, 2006).



Perdomo, 2019

**Figura 3.** Ingreso de *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* en células M y estructura de las células M.

La ilustración describe el ingreso por endocitosis de MAP a través de las células M localizadas en la mucosa intestinal, en la bolsa basolateral el MAP será fagocitado por macrófagos y expresarán CMH II para la presentación de antígeno a las células T CD4+ y Th, activando linfocitos B, que se diferenciarán en células plasmáticas productoras de inmunoglobulina A y migrarán a lo largo de la mucosa intestinal.

Adaptado de: (Kind *et al*, 2006; Sweeney *et al.*, 2006).

#### 4.4.1. ETAPAS DE LA INFECCION POR *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis*

La Enfermedad de Johne cursa con cuatro estados definidos en relación con la severidad de los signos clínicos, el potencial para excretar MAP por las heces y la facilidad de detectar la enfermedad empleando técnicas diagnósticas de laboratorio. Se cree que por cada caso clínico avanzado de EJ en la granja, la probabilidad de animales infectados es de 25% (Tabla 1), solo el 15% al 25% de estos animales infectados es detectable y esta presentación clínica de la enfermedad tiene forma de Iceberg (Whitlock y Buergelt, 1996).

**Tabla 1.** Estados clínicos de la Enfermedad de Johne (El efecto Iceberg)

ESTADO	ETAPA	ANIMAL AFECTADO	SIGNOS CLÍNICOS	ANIMALES AFECTADOS (n)
I	Infección sileciosa	Terneros, jóvenes y adultos	Sin signos clínicos	15-35*
II	Enfermedad subclínica (Progresiva asintomatica)	Adultos portadores	Sin signos clínicos	10-14
III	Enfermedad clínica	Adultos	Diarrea intermitente, pérdida de peso.	4-8
IV	Enfermedad clínica avanzada	Adultos	letargia, debilidad y emaciación. El edema intermandibular	1

\*Algunos cálculos indican que por cada 15 a 25 animales afectados, sólo un animal se detectará con la enfermedad avanzada (Adaptado de Whitlock y Buergelt, 1996).

**Etapa 1 Infección silenciosa:** la infección por MAP puede suceder durante el periodo perinatal, donde hay mayor susceptibilidad por un sistema inmune inmaduro, por lo que la bacteria penetra la mucosa intestinal, la infección se puede dar a través del calostro, la leche, los pezones y los elementos contaminados con materia fecal (Begg *et al.*, 2011). Después del

ingreso del MAP se produce replicación lenta de la micobacteria en la submucosa del íleon y yeyuno, establecida la infección, esta se puede propagar a sitios extraintestinales cercanos como nódulos linfáticos mesentéricos (Whitlock y Buergelt, 1996; Sweeney, 2011).

**Etapa 2 Infección progresiva asintomática:** se da un aumento en el número de bacterias en el tejido intestinal, generando una respuesta local inflamatoria, granulomatosa, caracterizada por penetración de linfocitos Th1, macrófagos y secreción de citoquinas como gamma interferón e interleucina 12 y 2 (Begg *et al.*, 2011), el progreso de la etapa 2, varía entre 2 a 10 años posteriores a la infección y los animales portadores no presentan signología clínica, esta etapa se reconoce como etapa de eclipse, donde los animales infectados pueden excretar continua o intermitentemente MAP en leche y heces llegando a expulsar hasta  $10^2$  a  $10^{12}$  UFC/ por gramo de heces, estos animales asintomáticos son la principal fuente de infección dentro del hato, Los rumiantes pueden progresar rápidamente a la etapa 3 por factores como la edad, la concentración y la frecuencia de las dosis infecciosas, factores genéticos, el estrés ambiental, los factores nutricionales, el parto y la lactancia (Whitlock y Buergelt, 1996; Sweeney, 2011).

**Etapa 3 Enfermedad clínica:** es nombrada como Enfermedad de Johne, esta etapa está caracterizada por una pérdida gradual de peso, diarrea, caquexia, emaciación progresiva acompañada de problemas reproductivos y disminución en la producción de leche (Fecteau, 2018), las lesiones a nivel intestinal son difusas y con gran número de bacilos ácido–alcohol resistentes, además de una diseminación extraintestinal de MAP por vía linfática y sanguínea a otros órganos como el útero y la glándula mamaria, la reacción inflamatoria crónica lleva a una enteropatía, con pérdida de proteínas y mala absorción, lo que desencadena el cuadro clínico (Whitlock y Buergelt, 1996; Sweeney, 2011; Silva *et al.*, 2013).

**Etapa 4 Enfermedad clínica avanzada:** en esta etapa final se presenta debilidad, caquexia, emaciación y diarrea crónica profusa, generalmente heces sin sangre y moco; la mala absorción y la pérdida de proteínas en el intestino delgado lleva a presentación clínica de edema intermandibular (maxilar en botella), alta excreción de MAP en heces, leche y calostro y la muerte del animal (Whitlock y Buergelt, 1996; Silva *et al.*, 2013; Fecteau, 2018).

#### 4.4.2. RESPUESTA INFLAMATORIA

La inmunología del intestino involucra interacciones complejas entre bacterias y células del huésped, los eventos locales se traducen en la defensa del huésped y desempeñan un papel importante en el desarrollo de las lesiones inflamatorias, el paso del MAP se da través de las células M facilitado por la unión a fibronectina e integrinas, estas son células especializadas de la mucosa intestinal que están asociadas a las placas de Peyer del íleon y yeyuno y son encargadas de traslocar por endocitosis bacterias lumenales y entregarlas a las células dendríticas y macrófagos, las bacterias acceden al compartimento subepitelial de la pared intestinal a través del transporte transcelular o paracelular de las células M. siendo la ruta transcelular la más común este es un evento importante en el manteniendo la respuesta inmune adaptativa (Sigur *et al.*, 2003; Sweeney *et al.*, 2006) además, se ha reportado la internalización directa de MAP a través de células epiteliales por receptores tipo toll (TLR9 y NOD1) que son proteínas que reconocen patrones moleculares asociados a patógenos relacionados con una respuesta inmune innata, otra posible vía de ingreso descrita son las células caliciformes (Golan *et al.*, 2009; Pott *et al.*, 2009).

Después del paso por la barrera epitelial del MAP, las células dendríticas y macrófagos fagocitan la micobacteria, donde persiste y se multiplica al interior de las células, la vida intracelular prolongada de la micobacteria, es una característica esencial de su patogenicidad permitiendo el desarrollo subclínico de la enfermedad y su propagación en el hato, la progresión de la infección se da por la replicación e infección a otros macrófagos, proceso que puede estar limitado por la activación respuesta inflamatoria intrínseca del animal (Whittington *et al.*, 2012).

La respuesta humoral por IgA en los animales infectados es mayor, lo que sugiere una activación inflamatoria adaptativa, además, una fuerte respuesta temprana de IFN- $\gamma$  es un indicativo de animales resistente, a diferencia de animales con enfermedad clínica donde la respuesta de IFN- $\gamma$  es retrasada (Silva *et al.*, 2013) (Silva *et al.*, 2018). El IFN- $\gamma$  es una citoquina esencial en la respuesta inflamatoria inicial de la infección por MAP, la producción de IFN- $\gamma$  es superior en vacas infectadas por la respuesta de linfocitos Th1, que predominan

al inicio de la infección y en animales subclínicos, sugiriendo que la activación Th1 y mayor secreción de IFN- $\gamma$  son importantes en el control inmune del MAP (Cooper *et al.*, 2003) (Fernández *et al.*, 2017).

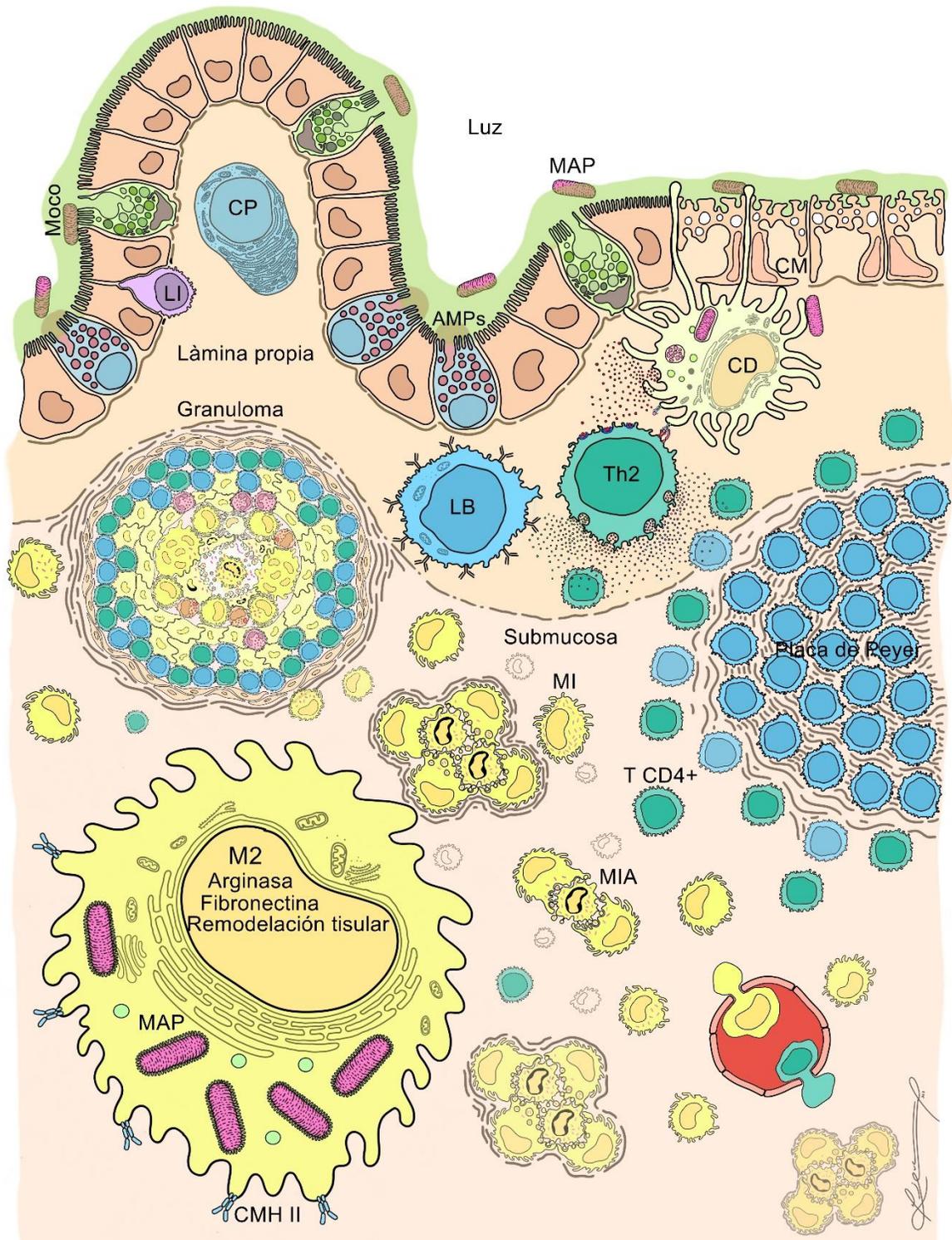
El IFN- $\gamma$  es producido por linfocitos CD4+, Th1, células CD8+ y las células Natural killer, es necesario en la activación de los macrófagos, limitando la expansión local de la micobacteria en el intestino, los macrófagos activados de la forma clásica se polarizan a un fenotipo M1, esta los capacita para hacer frente a microorganismos virulentos llevando a codificación de la enzima óxido nítrico sintasa 2, que convierte la arginina en óxido nítrico, generando peroxinitrito y radical dióxido de nitrógeno convirtiéndolos en destructores bacterianos muy potentes, además, los fenotipos M1 sintetizan la enzima arginosuccinato sintasa que recicla la citrulina, este sistema de reciclaje de citrulina esta ausente en macrófagos del fenotipo M2, la actividad fagocítica se ve aumentada por la activación clásica, lo que produce una mayor secreción de citoquinas proinflamatorias e induce una mayor expresión de moléculas de complejo mayor de histocompatibilidad II (CMH II) (Silva *et al.*, 2018; Fernández *et al.*, 2017). La activación de células Th1, así como de macrófagos M1 y la mayor producción de IFN- $\gamma$  coincide con lesiones paucibacilares (menor número de bacilos ácido-alcohol resistentes) focales con menor probabilidad de desarrollar lesiones granulomatosas y de extensión de la infección a nivel local, la respuesta inmune periférica de IFN- $\gamma$  puede ser un reflejo de la respuesta inmune local (Figura 4) (Silva *et al.*, 2018).



Descripción: CM: células M, CP: células plasmáticas, LB: linfocito B, TH1: Linfocito TH1, CD: células dendríticas, iNOS: sintetasa de óxido nítrico inducible, TCD4+: Linfocito TCD4+, AMPs: péptidos antimicrobianos, LI: linfocito intraepitelial

Una secreción menor de IFN- $\gamma$  se ha relacionado con lesiones multibacilares (mayor número de bacilos ácido-alcohol resistente) difusas, caracterizadas por la activación de células Th2 por la IL-1, la polarización de macrófagos de fenotipo M2 (alternativamente activados) capacitados para la remodelación de tejidos, así como por una actividad presentadora de antígeno limitada y una mayor disponibilidad de hierro con una producción reducida de óxido nítrico debido a que la polarización de M2 se acompaña de expresión de arginasa que convierte la arginina en ornitina (Lugo *et al.*, 2013). Los macrófagos M2 expresan factores de crecimiento CD163, calprotectina, IL-10 asociada a granulomas fibroticos además de Nramp-1 (proteína ubicada en la membrana del fagosoma que reduce la ruptura fagosomica), los niveles altos de Nramp-1 están relacionados con lesiones multibacilares por presentar mayor número de fagosomas formados por numerosos bacilos ácido-alcohol resistentes intracelulares y a la alta presencia de CD68 (ubicado en membranas lisosomales) indica mayor número de lisosomas libres (Figura 5) (Silva *et al.*, 2018).

El reclutamiento de monocitos y la presencia de macrófagos inactivos se relaciona con niveles altos de calprotectina, un complejo proteico citosólico que desaparece en macrófagos activados y polarizados, este perfil se relaciona con mayor crecimiento intracelular de MAP (más macrófagos infectados), los M2 pueden presentar un estado de transición a macrófagos espumosos ricos en colesterol y lípidos, la presencia de este fenotipo puede tener consecuencias perjudiciales para el granuloma como estructura protectora pues permite la supervivencia y replicaicon intraclular del MAP además de la infección de macrófagos reclutados, contribuyendo a la patogénesis de la paratuberculosis y, a la presentación clínica de la enfermedad (Fernández *et al.*, 2017).

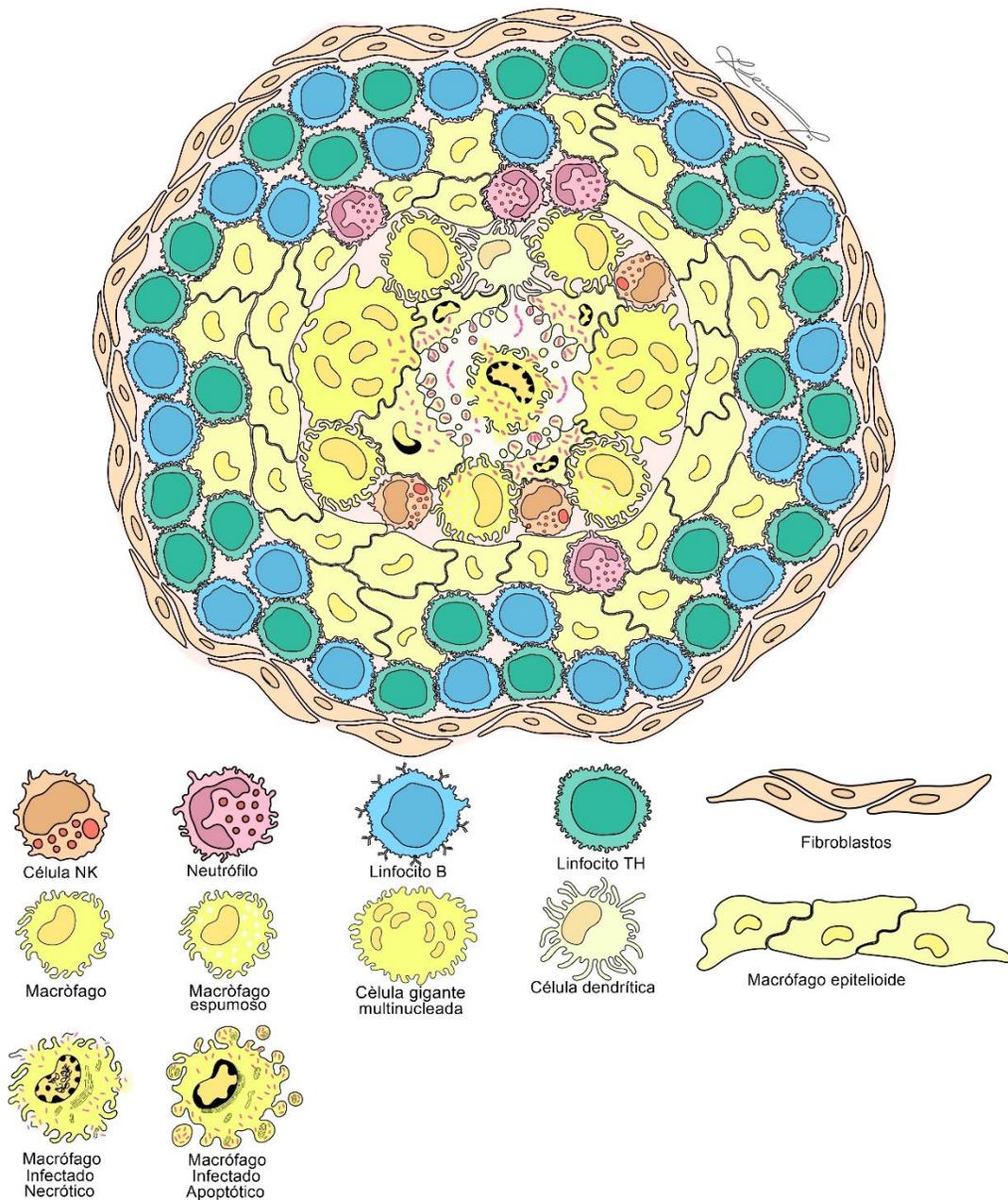


Perdomo, 2019.

**Figura 5.** Inmunopatología de la paratuberculosis B.

CM: células M, CP: células plasmáticas, LB: linfocito B, TH1: Linfocito TH1, CD: células dendríticas, iNOS: sintetasa de óxido nítrico inducible, TCD4+: Linfocito TCD4+, MIA: Macrófago infectado apoptótico, MI: macrófago infectado, AMPs: péptidos antimicrobianos, LI: linfocito intraepitelial.

Los mecanismos innatos en la defensa del huésped frente a *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* involucran procesos crónicos y una respuesta celular fuerte, esta defensa es liderada por células fagocíticas mononucleares y linfocitos T CD4+ (Fayyazi *et al.*, 2000). En las primeras etapas, las micobacterias pueden ser eliminadas por macrófagos, si no se da esta eliminación, la contención de la infección se caracteriza por la formación de agregados celulares compactos y organizados llamados granulomas que son considerados una estructura protectora que restringe y previene la diseminación de la infección (Davis y Ramakrishnan, 2009; Ramakrishnan, 2012), estos granulomas concentran una variedad de células involucradas en la infección por MAP tales como células dendríticas, macrófagos, linfocitos T, linfocitos B, células natural killer, neutrófilos, células espumosas, células gigantes, fibroblastos en el límite exterior y las células epitelioides que son macrófagos diferenciados con características de células epiteliales que desarrollan uniones interdigitadas estrechas entre sus membranas celulares, son de gran importancia en la formación y la dinámica de los granulomas puesto que sin la formación de este granuloma la diseminación de las micobacterias sería mayor (Ramakrishnan, 2012; Colleen *et al.*, 2016; Fernández *et al.*, 2017) (Figura 6).



Perdomo, 2019.

**Figura 6.** Estructura inflamatoria del granuloma\*

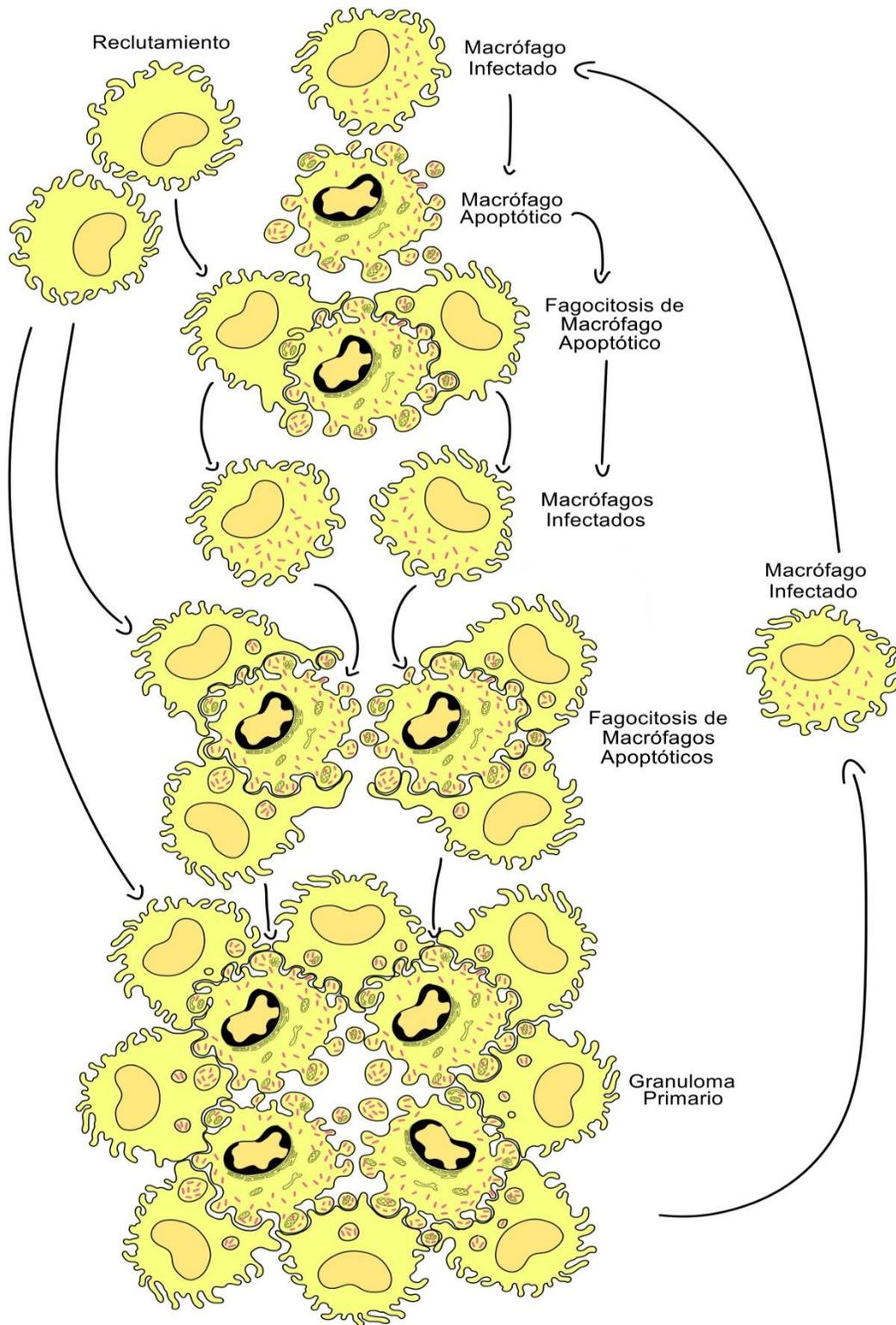
*\*Se caracteriza por la agregación compacta de células organizadas, con un exterior cubierto por fibroblastos y una banda de linfocitos Th y linfocitos B, las células dendríticas, también se asocian al granuloma, así como, neutrófilos y células natural killer. La principal población de células son los macrófagos, estos se diferencian en macrófagos epitelioides que rodean el núcleo necrótico del granuloma y forman uniones estrechas interdigitadas,*

*macrófagos espumosos ricos en lípidos ubicadas en el borde necrótico y macrófagos que se pueden unir y formar células gigantes multinucleadas; en el área central del granuloma se encuentran macrófagos infectados necróticos y apoptóticos con gran cantidad de micobacterias.*

Modificado de: (Ramakrishnan, 2012; McClean y Tobin, 2016).

La formación del granuloma inicia posterior a la infección por MAP, los macrófagos infectados que sufren muerte celular por apoptosis son fagocitados por nuevos macrófagos reclutados en el sitio de la infección, la muerte consecutiva de macrófagos que sucumben a la infección lleva a una fagocitosis continua y a la infección de nuevos macrófagos por fagocitosis de MAP, así, se forman agregados celulares y el flujo de células CD4+ y Th1 en el granuloma llevan a mayor producción de TNF y IFN- $\gamma$ , conllevando a una activación y reclutamiento de más macrófagos haciendo del granuloma una estructura dinámica (figura 7) (Davis y Ramakrishnan, 2009; Ramakrishnan, 2012; Colleen *et al.*, 2016; Fernández *et al.*, 2017).

La formación de células gigantes se da por la fusión de macrófagos influenciados por la IL-4 o estos macrófagos también se pueden diferenciar en células espumosas con acumulación de lípidos, el centro del granuloma se caracteriza por la presencia de bacilos ácido-alcohol resistentes y células muertas (Davis y Ramakrishnan, 2009), la muerte celular de macrófagos se da por necrosis inducida por bacterias, la muerte por necrosis se debe a producción de lipoxinas y por supresión de TNF o la muerte por apoptosis es promovida por la falta de BCL2 protectores antiapoptótico y abundancia de señales proapoptótico (BAX) , (Fayyazi *et al.*, 2000; Colleen *et al.*, 2016), la apoptosis puede no ser la mejor vía para la supervivencia del MAP en el centro del granuloma, pero conlleva a la diseminación de la infección por fagocitosis de los cuerpos apoptóticos que contienen MAP por múltiples macrófagos no infectados, lo que le proporcionara nuevos nichos de replicación a la micobacteria, contrario a la necrosis que promueve la replicación y el crecimiento bacteriano más que la apoptosis debido a que el macrófago necrótico liberará bacterias al contenido extracelular permitiendo el crecimiento bacteriano en un ambiente rico en componentes celulares y lípidos (Davis y Ramakrishnan, 2009; Silva *et al.*, 2018).



*Perdomo, 2019*

**Figura 7:** Formación del granuloma

Modificado de: (Kind *et al.*, 2006; Ramakrishnan, 2012; McClean y Tobin, 2016).

La necrosis y la apoptosis están fuertemente relacionadas con el inicio de la caseificación, y la formación de un granuloma caseificante, siendo esto la característica morfológica de la necrosis en el granuloma macroscópicamente formando un material similar al queso y moderadamente firme, la caseificación puede ayudar a detener la proliferación bacteriana al producir un entorno anóxico para las bacterias, en granulomas establecidos, la expansión y el flujo de macrófagos reclutados e infectados facilitara el transporte intracelular de bacterias a sitios extraintestinales, lo que contribuye a la expansión de la infección y la presentación de lesiones y los signos clínicos de la enfermedad (Fayyazi *et al.*, 2000; Clay *et al.*, 2008).

#### **5.4.3. MECANISMO DE SUPERVIVENCIA INTRACELULAR DEL *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis***

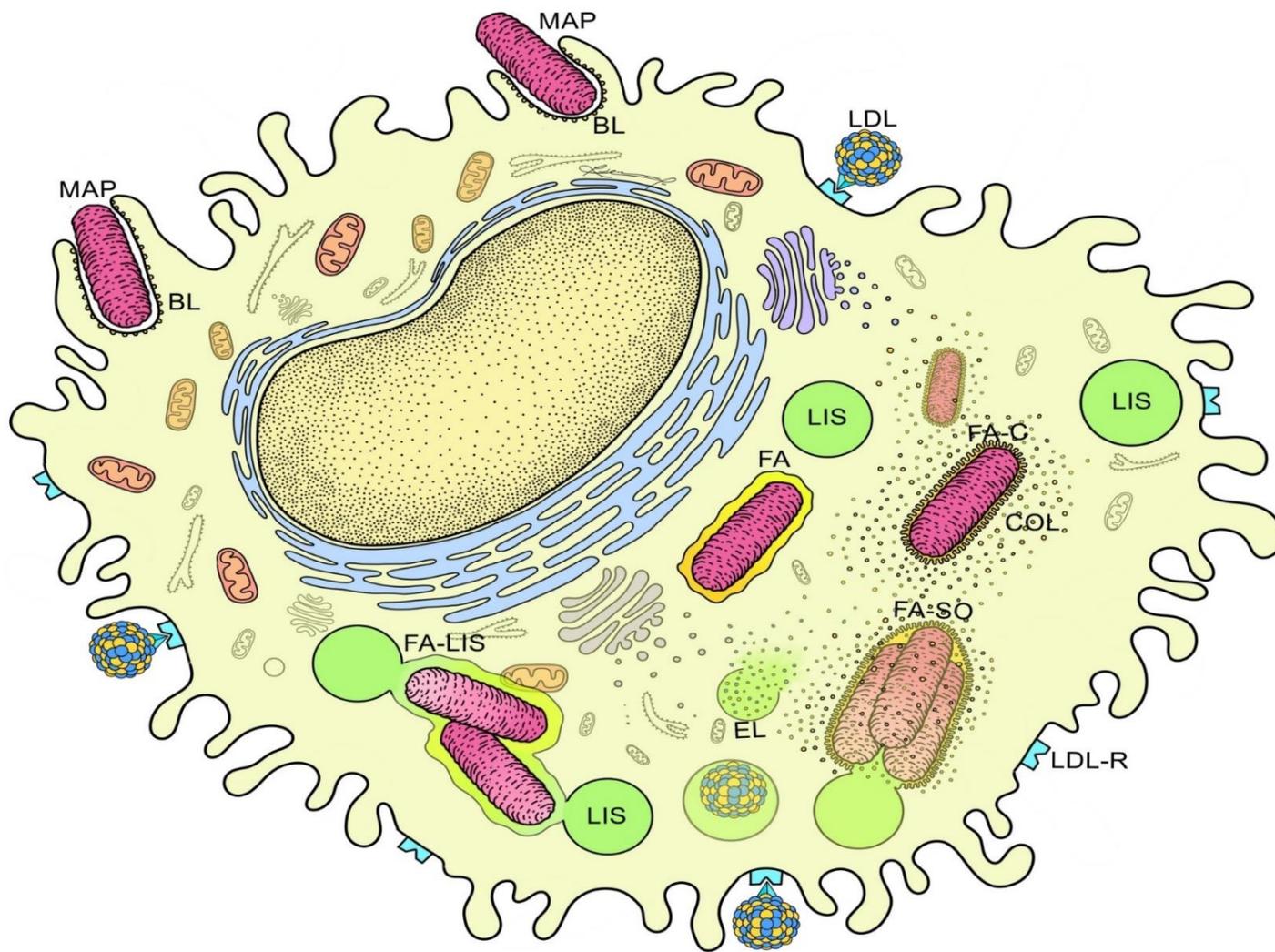
Actualmente, no se tienen claros los mecanismos involucrados en la supervivencia intracelular de MAP en macrófagos, la vida intracelular de la bacteria en los macrófagos es clave en el establecimiento y la progresión de la infección, las micobacterias han desarrollado mecanismos que facilitan su ingreso y supervivencia en macrófagos y células dendríticas; estrategias como la inducción de la opsonización por complemento (C3b) para facilitar su reconocimiento y fagocitosis, además el reconocimiento y la unión a manosa (Kuehnel *et al.*, 2001) hipótesis actuales señalan que las micobacterias pueden alterar el metabolismo, el ingreso y la salida de lípidos en las células, el desequilibrio de estos mecanismos puede conducir al deterioro en la migración de macrófagos, señalización celular y la maduración y la acidificación de la vacuola fagocítica además de impedir la unión con el lisosoma y la formación de un fagolisosoma funcional, esto esta acompañado de una acumulación de colesterol intracelular en macrófagos infectados, debido a la regulación positiva de receptores de lipoproteínas de baja densidad y aumento de la endocitosis lipídica (Chiodini, 1996; Chastellier y Thilo, 2006; Whittington *et al.*, 2012; Matt *et al.*, 2019).

El colesterol es importante para el ingreso de la micobacteria a la célula y su supervivencia siendo fuente de energía y carbono a las micobacterias, el colesterol facilita la fagocitosis, además, es un componente ubicuo de las membranas celulares y es requerida su presencia en la membrana plasmática que rodeara la bacteria y formara el fagosoma (Van *et al.*, 2007; Pandey y Sasseti, 2008; Matt *et al.*, 2019).

El aumento del colesterol y lípidos en el citoplasma de los macrófagos forma las células espumosas, esta acumulación de lípidos lleva a la formación de nichos intracelulares ricos en colesterol y proporciona un microentorno local enriquecido en lípidos, parece ser que, estos sitios son el lugar predilecto por la micobacteria para habitar la célula (Chastellier y Thilo, 2006).

Formado el fagosoma este se vuelve cada vez más ácido a través de la V ATPasa y complejos NADPH oxidasa que bombea protones al interior del fagosoma, la bacteria establece fagosomas individuales que impiden la fusión con los lisosomas, esto se ve favorecido por la concentración de colesterol en la membrana del fagosoma, que muestra un aspecto corrugado y una estrecha cercanía con la superficie bacteriana lo que impide la maduración del fagosoma y su acidificación a un pH de 6,1 fagosomas con micobacterias vivas tienen un pH de 6.3 (Kuehnel *et al.*, 2001; Van *et al.*, 2007; Matt *et al.*, 2019).

Este mecanismo tiene una excepción, cuando el fagosoma contiene más de una micobacteria (fagosoma social), debido a que la membrana del fagosoma se aleja de la superficie bacteriana en las áreas entre ellas, esto lleva a la maduración y la formación de un fagolisosoma funcional; el agotamiento intracelular de colesterol lleva a un aflojamiento de la membrana de los fagosomas dando un aspecto ondulado y un mayor espacio entre la bacteria y la membrana fagosomica, lo que permitira la maduración del fagosoma y la fusión con el lisosoma, los fagolisosomas formados se fusionarán entre ellos para formar fagolisosomas mas ácidos de pH de 5,6, equilibrándose a un pH de 4.5-5, con múltiples micobacterias (Van *et al.*, 2007) (Chastellier y Thilo, 2006) (Figura 8).



Perdomo, 2019

**Figura 8.** Mecanismos de supervivencia intracelular del *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis*

*La acumulación o el agotamiento del colesterol dentro de las células son determinantes en la vida intracelular del (MAP) en macrófagos, el (MAP) ingresa a la célula en zonas de la membrana celular ricas en colesterol y esfingolípidos llamada Balsa lipídica (BL); la acumulación de colesterol dentro del fagosoma y en la membrana produce una apariencia corrugada y estrecha cercanía con la superficie bacteriana (FA-C) estos pueden formar fagosomas sociales (FA-SO) ubicados en nichos ricos en colesterol (COL), la acumulación de lípidos se da gracias a la endocitosis lipídica (EL), (MAP) es capaz de acumular lípidos por síntesis y expresión de receptores de lipoproteína de baja densidad (LDL), (LDL-R), el agotamiento de colesterol lleva a maduración y acidificación de la vacuola fagocítica (FA), y la unión con el lisosoma (LIS) formación de un fagolisosoma (FA-LIS) la lisis bacteriana.*

**Basado en:** (Chastellier y Thilo, 2006; Johansen *et al*, 2019)

#### **4.5. FISIOPATOLOGÍA DE LA ENFERMEDAD DE CROHN**

La Enfermedad de Crohn (EC) es una enfermedad inflamatoria intestinal crónica, debilitante, caracterizada por una inflamación granulomatosa transmural crónica, segmentaria con períodos de exacerbación y remisión que puede afectar cualquier parte del tracto intestinal (Baumgart y Sandborn, 2012; Feuerstein, y Cheifetz, 2017).

La etiología de la Enfermedad de Crohn es inespecífica, se cree que es el resultado de una interacción de múltiples factores genéticos y ambientales, la fisiopatología de las lesiones intestinales en la EC no está completamente identificada y entendida en detalle, se estudia el vínculo causal de diversos agentes infecciosos como el *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* el cual ha sido relacionado con la patogénesis de la enfermedad, también se mencionan hipótesis como la respuesta inflamatoria exacerbada por factores genéticos o a la posible desregulación de la actividad inmune intestinal debido a las interacciones complejas establecidas entre el microbioma intestinal y el huésped, la presentación de la enfermedad no se puede explicar por eventos aislados o únicamente por alteraciones genéticas. (Randal *et al.*, 2015; Zielińska *et al.*, 2015).

#### 4.5.1. FACTORES GENÉTICOS

Las alteraciones genéticas asociadas a la presentación de la Enfermedad de Crohn (EC) involucran el reconocimiento y manejo intracelular de bacterias y vías proteicas de la autofagia. El 15% de las personas con Enfermedad de Crohn tienen un pariente con EC o UC y los patrones de la enfermedad dentro de las familias son similares, la heredabilidad de la EC involucra múltiples genes que confiere susceptibilidad y especificidad a la enfermedad, los mecanismos inmunes innatos son esenciales para la salud intestinal y el control de microorganismos, una activación inflamatoria crónica sería perjudicial para el ambiente y la supervivencia celular, para ello, las células poseen un proceso fundamental de autofagia que es un mecanismo de defensa bien conservado que mantiene la homeostasis celular que implica la degradación lisosomal de componentes celulares, bacterias intracelulares, desechos tóxicos y productos celulares durante la inflamación, el polimorfismo del gen *ATG16L1* que codifica una proteína en la vía autofagosómica en las células epiteliales reduce la autofagia y contribuye al desarrollo de la EC, además, la vía de la IL-23 se ve favorecida por la expresión del gen que codifica el receptor de IL-23 (Mehto *et al.*, 2019), (Silva *et al.*, 2019) otro elemento más de la respuesta inflamatoria son los inflamasomas (complejos multiproteicos) los cuales se activan por señales de origen patógeno y no patógeno.

La activación del inflamasoma NLRP3 se da a través de la unión de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) y patrones moleculares asociados a daños (DAMP) a receptores tipo Toll (TLR) y posterior activación del factor nuclear  $\kappa\beta$  y una señalización proinflamatoria y activan enzimas proteolíticas como caspasa-1 y estimulan la producción de citocinas proinflamatorias como la interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) e IL-18 (Franchi *et al.*, 2012), (Jo *et al.*, 2016).

La proteína NLRP3 activada (dominios NACHT, LRR y PYD que contienen la proteína 3) conduce al reclutamiento de la proteína ASC (PYCARD) (proteína asociada a la apoptosis que contiene una CARD) el cual contiene un dominio de unión para la caspasa-C terminal, resultando la activación de caspasa-1 la cual convierte los precursores citosólicos de la citocina proinflamatoria IL-1 $\beta$  en formas activas desempeñando un papel vital en la patogénesis de la EC (Jo *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2018; Mehto *et al.*, 2019).

La activación aberrante e innecesaria de los inflamasomas es regulada por la GTPasa M (IRGM), que pertenece a la familia de GTPasas inducibles por interferón (IRG), siendo uno de los sistemas de resistencia autónoma celular más fuertes a los patógenos intracelulares (Singh *et al.*, 2006), el IRGM controla la inflamación al suprimir la activación de los inflamasomas NLRP3 al interactuar con SQSTM1/p62 (proteína p62 de unión a ubiquitina dirige a otras proteínas que se unen a ella para la autofagia selectiva) y controla la autofagia selectiva dependiente de p62 de NLRP3 y ASC, al obstaculizar la actividad del IRGM protege las células de la piroptosis y la inflamación (Mehto *et al.*, 2019).

Las interacciones proteína-proteína y la ubiquitinación de la proteína IRGM, conduce a la asociación con reguladores claves de autofagia (ULK1 y BECN1) en sus formas activadas, también interactúa con otros factores (ATG16L1 y NOD2) (Hampe *et al.*, 2006; Chauhan *et al.*, 2016), al haber una alteración en los polimorfismos que alteran la expresión o la función de cualquiera de los 3 factores individualmente pueden afectar la acción de la IRGM y por ende la autofagia celular (Mehto *et al.*, 2019).

La variación genética en la vía autofágica más estudiada vinculada a la patogénesis de la Enfermedad de Crohn es el polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) *ATG16L1* (rs2241880, Thr300Ala) (Hampe *et al.*, 2006), se sabe que su alteración conduce a una autofagia perturbada y puede ser la causa principal de la EC, los ratones con hipomórficos de codificación *ATG16L1* alterado, son más susceptibles a la inflamación intestinal ya que las células de Paneth, tiene defectos en la secreción de péptidos antimicrobianos y los macrófagos secretan citoquinas proinflamatorias en mayor cantidad, (Teimoori *et al.*, 2018; Mehto *et al.*, 2019).

Por otro lado la variante Thr300Ala (T300A) desempeña un papel importante en respuesta a microorganismos intestinales, su mutación afecta directamente la secreción de lisozimas por parte de las células de Paneth y de las células caliciformes (Lavoie *et al.*, 2019), estos efectos pueden alterar la composición microbiana en el intestino, exhibiendo estrés en retículo endoplasmático de las células de Paneth como lo indica la alta expresión de la proteína de inmunoglobulina de unión GRP78, el estrés provocado por la eliminación del factor de transcripción XBP1 de la respuesta de proteína desplegada (UPR) en las células epiteliales intestinales o en células de Paneth, induce una

forma leve y superficial de enteritis por falta de mecanismos protectores de inmunidad innata (Tschurtschenthaler *et al.*, 2017; Mehto *et al.*, 2019). La variante rs2241880 se observa en todas las isoformas de *ATG16L1*, juega un papel crucial en la eliminación de patógenos, lo que resulta en la producción de citocinas desequilibradas y vinculada a otros procesos de señalización inflamatoria anormal. (Murthy *et al.*, 2014; Salem *et al.*, 2015).

La genética puede marcar el rumbo de la enfermedad, una respuesta inmune adaptativa agresiva contra los antígenos lumbinales se debe a un defecto genético alterado en el gen NOD2 (dominio de oligomerización de nucleótido) o NLR, el cual es uno de los receptores de reconocimiento de patrones (PRR) (Frade *et al.*, 2019), estos se expresan en monocitos, tras su activación por agonistas inflamatorios como TNF- $\alpha$  o IFN- $\gamma$  inducen señales metabólicas de defensa (Bonen *et al.*, 2003) (Corridoni *et al.*, 2014).

El NOD2 reconoce muramil dipéptido a la exposición intracelular, el muramil dipéptido es un producto de descomposición del peptidoglucano y del lipopolisacárido bacteriano (LPS) presente en la pared celular de las bacterias Gram-negativas y Gram-positivas (Corridoni *et al.*, 2014; Bonen *et al.*, 2003), la exposición a muramil dipéptido causa un cambio conformacional en NOD2 permitiendo la oligomerización de NOD2 a través del dominio NACHT, la unión promueve la activación de la quinasa RIP2, el complejo activo NOD2-RIP2 inicia vías de señalización intracelular, incluida la proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK) y la vía NF- $\kappa$ B (Corridoni *et al.*, 2014).

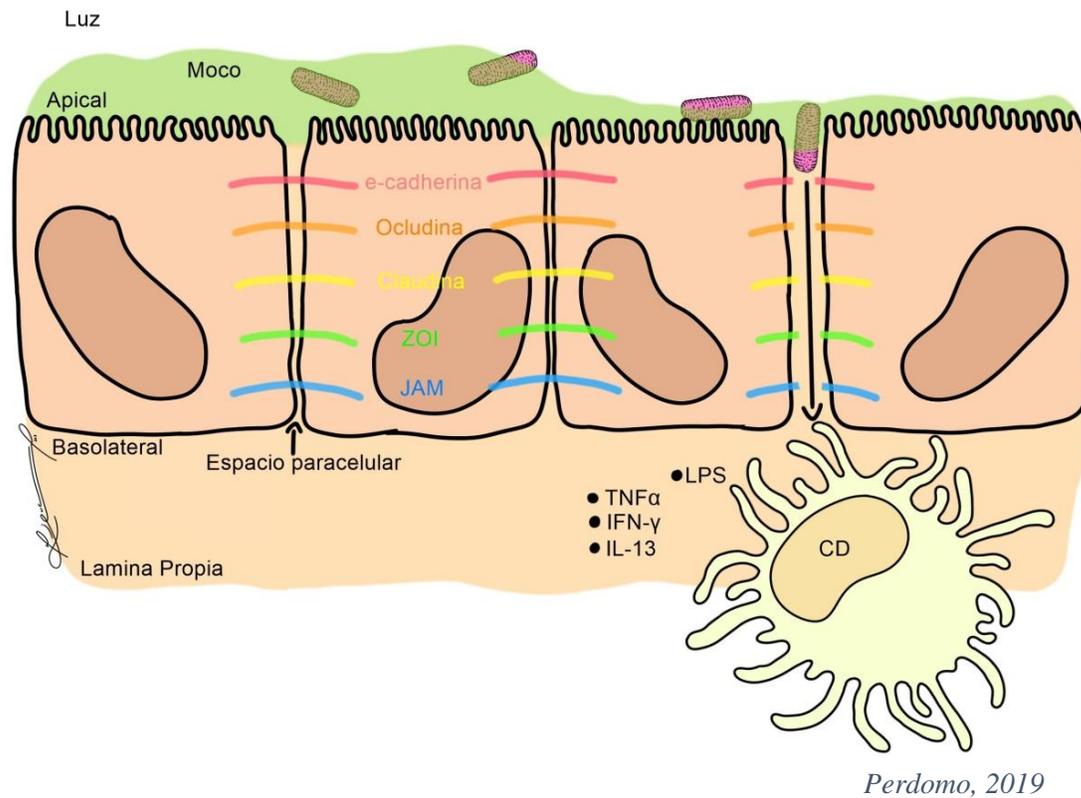
Tres polimorfismos principales presentes dentro de la región de codificación de NOD2 (L1007fsinsC, G908R y R702W) se han asociado genéticamente con la Enfermedad de Crohn en poblaciones europeas y americanas, estudios sugieren que alteraciones en la variante L1007fsinsC, interfiere en con la LRR terminal de NOD2, resultando en la pérdida de la activación de NF- $\kappa$ B en respuesta a LPS (Bonen *et al.*, 2003; McNees *et al.*, 2015). En ratones con deficiencia de NOD2, la microbiota bacteriana en íleon esta desregulada exhibiendo una capacidad deteriorada para eliminar bacterias, por tanto, la interacción alterada de la microbiota ileal y la mutación de la proteína NOD2 juegan un papel importante en la patogénesis de la Enfermedad de Crohn, la deficiencia de un receptor NOD2 funcional plantea que la barrera epitelial se vuelve mas permisiva

a la entrada de productos microbianos y menos resistente a la invasión bacteriana, por lo tanto las mutaciones en NOD2 influyen directamente en la función de la barrera epitelial. (Sidiq *et al.*, 2016; Balasubramanian y Geo, 2017).

### **5.5.2. FACTORES INMUNOLÓGICOS**

Los eventos inmunológicos en la Enfermedad de Crohn involucran una respuesta inmune innata, barreras físicas, defensinas, macrófagos, células dendríticas y la activación de linfocitos Th 17 junto con interleucinas 12 y 23 que son importantes en la activación de la inmunidad adaptativa, la mucosa, formada por células epiteliales y moco secretado por células caliciformes son barreras físicas importantes, en pacientes con Enfermedad de Crohn existe una disminución de la expresión de mucina (gen MUC1), esta idea es apoyada por estudios de los genes MUC1, MUC19 y PTGER4 en paciente con trastornos inflamatorios intestinales la ruta paracelular se vuelve permeable por cambios en la expresión de proteínas como la claudina que aumenta la permeabilidad y la traslocación de antígenos de la luz intestinal a la lámina propia (Baumgart y Sandborn, 2012).

Los defectos inmunes innatos y su función aberrante son un elemento central en la patogénesis de la Enfermedad de Crohn, la capa de células epiteliales es una barrera física importante en la defensa inmune del intestino, alteraciones en la expresión de claudinas y ocludinas moléculas de unión en el espacio paracelular de las células epiteliales intestinales, lo que aumenta la permeabilidad intestinal y el ingreso de bacterias y componentes bacterianos a la lamina propia (figura 9) (Silva *et al.*, 2019).



**Figura 9.** Alteración de las uniones estrechas de las células epiteliales intestinales.

Modificado de: (Silva *et al*, 2019)

La Enfermedad de Crohn es mediada por células T que afecta predominantemente al intestino delgado distal, el tejido inflamado en pacientes con EC está infiltrado por linfocitos T<sub>h</sub>1 y Th 17 activados, estas células sintetizan citocinas como IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  1,3 que desencadenan la respuesta inmune celular (Baumgart y Sandborn, 2012) el aumento de linfocitos CD4+ diferenciados y activados por IL-12 a linfocitos T<sub>h</sub>-1, liberan en exceso citoquinas proinflamatorias como IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ), IL-17, IL-22, IL-1, IL-6 , IL-23 la producción excesiva de IL-10 puede alterar el equilibrio entre sus efectos antiinflamatorios y proinflamatorios y otros mediadores que influyen en la inmunopatogénesis de la Enfermedad de Crohn, (Zielińska *et al.*, 2015).

### 5.5.3. ALTERACIÓN DE LA MICROBIOTA INTESTINAL

El intestino alberga una densa población microbiana que se ve afectada por la dieta, antibióticos, inflamaciones e infecciones por patógenos, esta alteración se le conoce con el término “disbiosis” y se refiere a la alteración de la composición de la microbiota y parece existir una asociación del genotipo del huésped, el sistema inmune humano y el microbioma intestinal en la patogénesis de la Enfermedad de Crohn (Ni *et al.*, 2017).

La disbiosis bacteriana es probablemente un factor relacionado con la Enfermedad de Crohn, puede desarrollarse como resultado de la inflamación intestinal y tener un papel en la inflamación crónica, en estos pacientes hay una población mayor de Proteobacterias *de la familia Enterobacteriaceae* como *Escherichia coli*, *Pasteurellaceae*, *Veillonellaceae* y *Fusobacteriaceae*, y disminución de *Erysipelotrichales*, Bacteroides, bacterias clostridiales y *Firmicutes*, como *Faecalibacterium prausnitzii*, además de *proteus spp*, (Khanna y Raffals, 2017).

Los estudios de la microbiota intestinal en personas con Enfermedad de Crohn demuestran un aumento de microorganismos patógenos, mientras que las poblaciones de filamentos comensales normales disminuyen, esta reducción de la abundancia de *Firmicutes*, principalmente *Clostridia*, puede reducir la producción de ácidos grasos de cadena corta (SCFA) que aumentan las células T reguladoras, las cuales confieren tolerancia inmune en el intestino (Ni *et al.*, 2017).

La actividad metabólica de la microbiota intestinal normal produce ácidos grasos de cadena corta (SCFA), principalmente ácidos acético, propiónico y butírico que sirven como combustible para las células epiteliales intestinales y estimulan el crecimiento de las células epiteliales del colon, el ácido butírico y el ácido propiónico inhiben el crecimiento y promueven la apoptosis de las líneas celulares de carcinoma de colon humano, mientras que el ácido acético, propiónico y butírico tiene propiedades antiinflamatorias, el ácido acético producido por las bifidobacterias estimula la defensa de las células epiteliales contra la infección por *Escherichia coli* (Zanten *et al.*, 2012).

En cuanto a la microbiota intestinal la diversidad fúngica se ve alterada y disminuye, se presenta un aumento en personas con Enfermedad de Crohn de varias especies de hongos como, *Candida* spp, *Gibberella moniliformis*, *Alternaria brassicicola* y *Cryptococcus neoformans* mientras que se presenta una disminución de *Saccharomyces cerevisiae*, en cuanto a virus aun no se establece una relación, pero pacientes con EC albergan mayor número de bacteriófagos (Yan *et al.*, 2019).

#### 5.5.4. ALTERACIÓN DEL TEJIDO ADIPOSO

La anorexia, la desnutrición y la alteración en la distribución del tejido adiposo en las enfermedades inflamatorias del intestino (EII) principalmente en la Enfermedad de Crohn son características muy conocidas (Karmiris *et al.*, 2006; Zielińska *et al.*, 2015), la acumulación de tejido adiposo intra-abdominal (WAT) en mesenterio o la grasa progresiva (CF) se hipertrofia alrededor del intestino involucrado con la infiltración inflamatoria (Kredel *et al.*, 2018).

El tejido adiposo intraabdominal produce y libera una gran cantidad de proteínas multifuncionales como las adipocinas, en pacientes con EC hay una expresión anormal de leptina, adiponectina y resistina, sugiriendo que los adipocitos mesentéricos pueden actuar como células inmunorreguladoras en la inflamación intestinal (Karmiris *et al.*, 2006).

Estudios en ratones con colitis y pacientes con EC mostraron translocación bacteriana a la grasa mesentérica, sugiriendo que las poblaciones de adipocitos responden al desafío bacteriano mediante la expresión constitutiva de un amplio conjunto de moléculas de patrones de reconocimiento (PRM), como los receptores Tipo Toll (TLR), el dominio de oligomerización de nucleótidos (NOD) 1 y NOD2 del receptor tipo Toll, la translocación bacteriana representa un factor estimulante (Peyrin *et al.*, 2012). Los mediadores pro y antiinflamatorios están regulados al alza en la grasa mesentérica de pacientes con EC, incluidas citoquinas como TNF- $\alpha$ , IL-1Ra, IL-10, MCP1 y las adipocinas leptina y adiponectina, se sabe que las adipocinas ejercen una regulación inmunológica (Kredel *et al.*, 2018), la adiponectina parece tener propiedades antiinflamatorias debido a su antagonismo contra TNF- $\alpha$  en tejidos objetivos (Karmiris *et al.*, 2006).

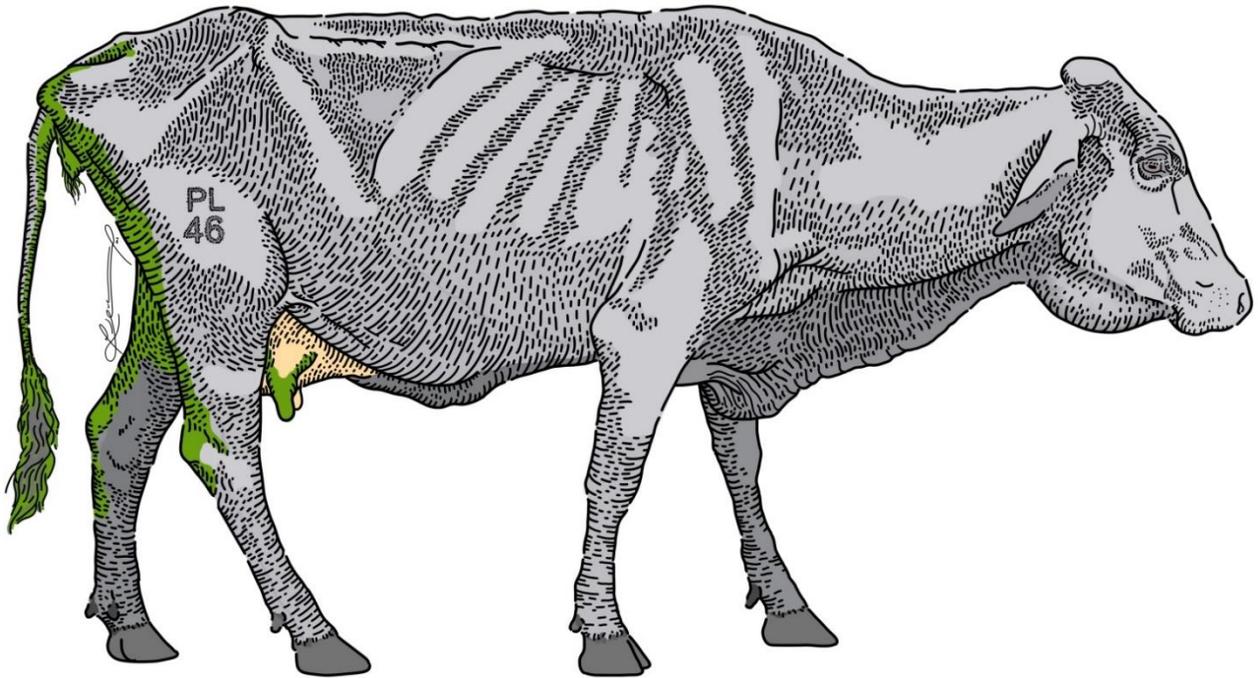
La lámina propia de los pacientes con Enfermedad de Crohn está dominada por macrófagos proinflamatorios, sugieren que tejido adiposo construye una barrera para prevenir la propagación bacteriana sistémica pero también demuestra una función reguladora que limita la inflamación local (Kredel *et al.*, 2018).

La translocación de bacterias junto a la producción de citoquinas en el mesenterio inflamado, puede desencadenar la producción de la proteína C reactiva por parte de los adipocitos mesentéricos en pacientes con Enfermedad de Crohn contribuyendo al aumento de los niveles séricos de la proteína C reactiva que se considera uno de los biomarcadores más importantes en la Enfermedad de Crohn (Peyrin *et al.*, 2012).

## **4.6. SIGNOS CLÍNICOS**

### **4.6.1. SIGNOS CLÍNICOS DE LA PARATUBERCULOSIS**

La paratuberculosis se manifiesta en dos etapas: clínica y subclínica (Tabla 2), caracterizándose por un largo periodo de latencia donde los animales infectados son difíciles de detectar en etapas iniciales de la infección (Davis, 2015), los signos clínicos que más frecuentes son: diarrea crónica o intermitente, disminución de producción de leche y la pérdida de peso progresiva se da a consecuencia de la malabsorción de proteínas en el tracto gastrointestinal (Figura 10) (Chiodini *et al.*, 1984; Radostits *et al.*, 1994 citados en Clarke, 1997; Rathnaiah *et al.*, 2017), posibles impactos en la fertilidad y la salud de la ubre (Tiwari *et al.*, 2006), también se ha reportado edema submandibular, los síntomas se van agravando poco a poco llevando a un estado de malnutrición, debilitamiento y muerte (OIE, 2019). Estudios experimentales en pequeños rumiantes han reportado baja condición corporal y pérdida progresiva de peso (Venkata *et al.*, 2016).



*Perdomo, 2019.*

**Figura 10 .** Signos clínicos de la paratuberculosis en un bovino.

Se menciona que la presencia de la paratuberculosis en los sistemas productivos, asemeja al efecto Iceberg, donde un pequeño número de animales presentan signos clínicos, pero existe un gran porcentaje de animales infectados que son potencialmente excretores de MAP y que no presenta signología clínica, Whitlock y Buergelt (1996) establecieron que, por cada animal clínicamente infectado nacido en la granja, es probable que un mínimo de 25 animales está infectado. El efecto Iceberg se aplica para proporcionar estimaciones de la prevalencia de la paratuberculosis en los hatos, un animal en la etapa avanzada, se supone que hay uno o dos en la etapa clínica, cuatro a ocho en la etapa subclínica y diez a catorce en la etapa silenciosa (Magombedze *et al.*, 2013).

Miller *et al.*, (2017), reportaron signos clínicos en un canino doméstico de dos años de edad, el animal presentaba letargia, membranas mucosas pálidas, y dolor a la palpación abdominal, la imagen ultrasonido abdominal se evidencio agrandamiento de los nódulos linfáticos mesentéricos, realizaron aspiraciones celulares de nódulos linfáticos y se observó inflamación granulomatosa que fue confirmada mediante cultivo a MAP, Glanemann *et al.*, (2008) reportaron que el 19% de los perros con vómitos ADN específico de crónicos o diarrea fueron positivos para el MAP en las

biopsias intestinales, lo que sugiere que el MAP puede ser una causa poco reconocida de enfermedad gastrointestinal en caninos. Es poco probable que los caninos sean una fuente de infección de MAP a pesar de la asociación controvertida entre MAP y la Enfermedad de Crohn, el riesgo zoonótico asociado a la paratuberculosis en animales de compañía es muy bajo (Miller *et al.*, 2017).

#### **4.6.2. SIGNOS CLÍNICOS DE LA ENFERMEDAD DE CROHN**

La presentación de síntomas clínicos en pacientes con Enfermedad de Crohn puede ser heterogénea e insidiosa y depende de la ubicación, la gravedad de la inflamación y el comportamiento de la enfermedad (Dieser *et al* 2017), se reporta dolor abdominal en el hipogastrio derecho, diarrea crónica, pérdida de peso, fatiga y anorexia, (Tabla 2) (Torres *et al.*, 2017).

Aproximadamente un tercio de los pacientes con EC presentan enfermedad perianal con lesiones cutáneas (ulceraciones y marcas cutáneas), lesiones del canal anal como estenosis, fisuras, úlceras y fístulas con o sin abscesos, cuando hay un absceso además del dolor abdominal, los pacientes pueden tener síntomas sistémicos como fiebre, escalofríos o peritonitis aguda (Yu *et al.*, 2017). Los pacientes con estenosis desarrollan obstrucciones intestinales en intestino se caracterizan por la falta de flatos, evacuaciones intestinales, ruidos intestinales, náuseas y vómitos (Torres *et al.*, 2017).

La enfermedad penetrante puede provocar síntomas relacionados con la ubicación de la fístula como diarrea en casos de fístula enteroentérica, infección del tracto urinario por fístula enterovesicular o enterouretral, paso de las heces de la vagina en casos de fístula enterovaginal, o drenaje de la piel en la fístula enterocutánea (Yu *et al.*, 2017). En los casos de colitis graves es posible que haya heces con sangre, pero clásicamente esto se asocia comúnmente con la Enfermedad de Crohn, aproximadamente el 50% de los pacientes presentan inflamaciones en la piel, las articulaciones o en los ojos que (Dieser *et al* 2017; Torres *et al.*, 2017).

**Tabla 2.** Características clínicas de la Enfermedad de Crohn y la Enfermedad de Johne

<b>CARACTERISTICAS</b>	<b>ENFERMEDAD DE CROHN</b>	<b>ENFERMEDAD DE JOHNE</b>
<b>ETAPA PRECLINICA</b>		
Síntomas y signos	No conocida	Disminución producción de leche.
Periodo de incubación	Desconocido	Mínimo 6 meses
<b>ETAPA CLÍNICA</b>		
Síntomas y signos	Diarrea crónica, dolor abdominal, pérdida de peso. Sudoración nocturna.	Diarrea persistente, pelaje hirsuto, emaciación progresiva, caquexia, edema intermandibular.
<b>SÍNTOMAS Y SIGNOS GASTROINTESTINALES.</b>		
Diarrea	Crónico (> 3 semanas)	Intermitente/crónica
Sangre en heces	Se ha reportado	Poco frecuente
Moco en heces	No	Poco frecuente
Vómito	Se ha reportado	No
Dolor abdominal	Sí	Desconocido
Obstrucción	Sí	No
<b>MANIFESTACIONES EXTRAINTESTINALES</b>		
Poliartritis	Se ha reportado	No
Uveítis	Sí, raro	No
Lesiones de la piel	Sí	No
Amilosis	Sí, raro	Si
Granulomatosis hepática	Sí, raro	Sí
Afectación renal	Sí, raro	Sí
Edema intermandibular	No	Sí
<b>CUADRO CLÍNICO</b>		
Remisión y recaída	Sí	Sí

**Adaptado de:** Committee on Diagnosis and Control of Johne's Disease, (2003).

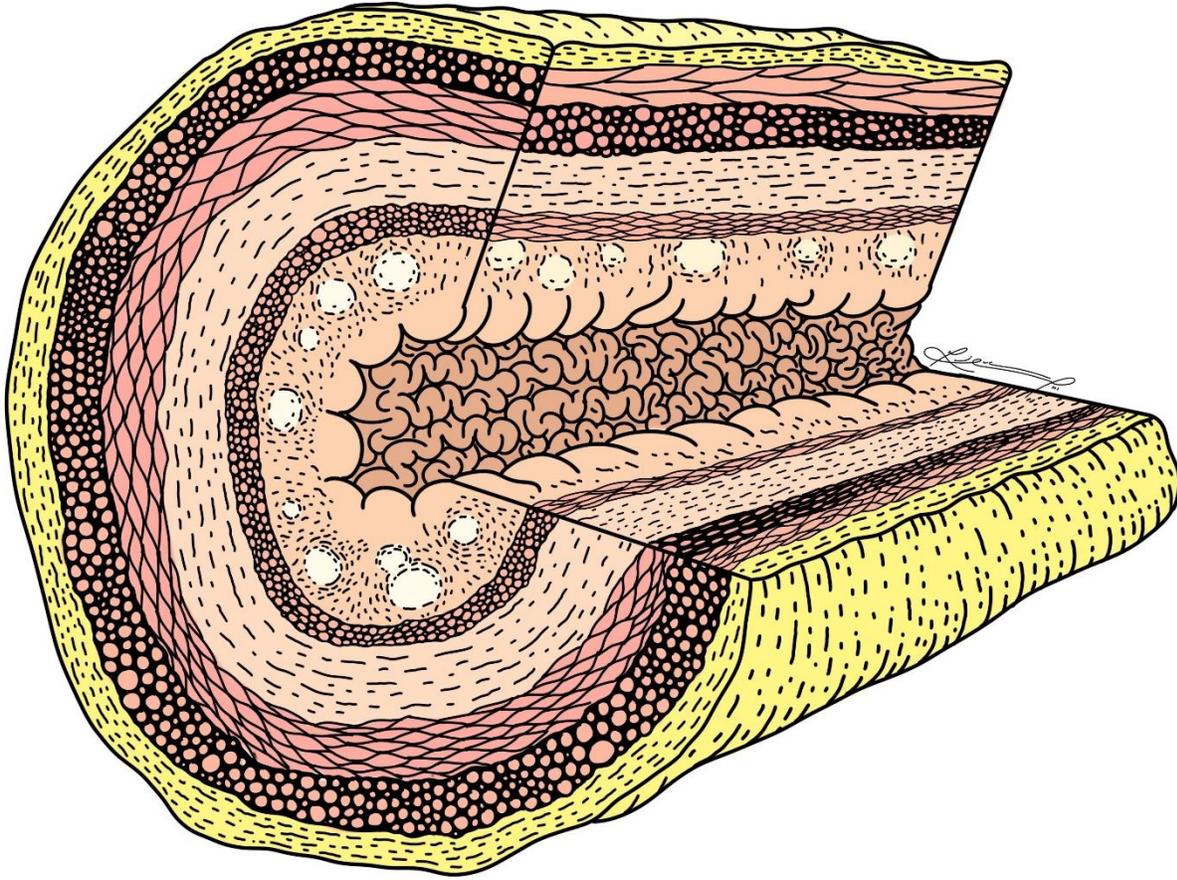
## **4.7. LESIONES MACROSCÓPICAS**

### **5.7.1. LESIONES MACROSCÓPICAS DE LA PARATUBERCULOSIS**

La paratuberculosis en fase clínica avanzada se acompaña de lesiones macroscópicas comunes a los procesos caquetizantes como la marcada disminución de depósitos grasos, atrofia serosa del tejido adiposo, pérdida de masa muscular, presencia de edema subcutáneo, ascitis y acumulación de líquidos serosos en otras cavidades (Fernández, 2017).

La respuesta inmune celular del huésped conduce a una enteritis granulomatosa caracterizada por una pared intestinal gruesa y corrugada típica de la Enfermedad de Johne (EJ) (Rathnaiah *et al.*, 2017), las lesiones macroscópicas se observan principalmente en el intestino y en nódulos linfáticos mesentéricos en la región del íleon, aunque pueden ocurrir en toda la longitud del tracto intestinal, la pared intestinal está engrosada, edematosa y la mucosa tiene pliegues transversales exagerados que imitan la forma de cartón corrugado (Figura 11 y 12) (Tiwari *et al.*, 2006) o a las circunvoluciones del cerebro (Ramírez *et al.*, 2011) alterando significativamente la arquitectura intestinal normal (Tiwari *et al.*, 2006; Fernández *et al.*, 2016; Rathnaiah *et al.*, 2017).

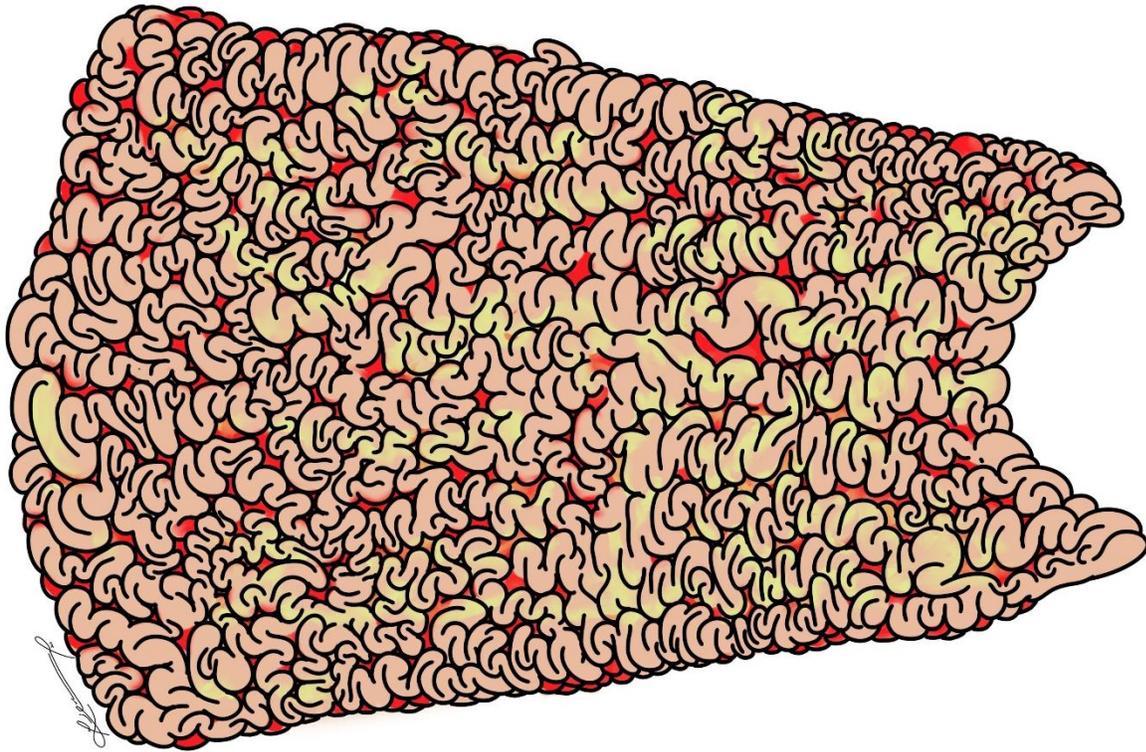
Los vasos linfáticos de las serosas y los mesentéricos están dilatados, engrosados y congestivos con un grado variable de linfangiectasia visible a modo de cordón retorcido con aspecto blanquecino (Fernández, 2017; Pérez *et al.*, 2012; Ramírez *et al.*, 2011).



*Perdomo, 2019.*

**Figura 11.** Ilustración de las lesiones macroscópicas de la paratuberculosis en mucosa de ileón en bovino.

*Descripción macroscópica: Sección de Ileón con la pared engrosada, mucosa de apariencia cerebroide y múltiples focos de caseificación.*



*Perdomo, 2019.*

**Figura 12.** Ilustración de las lesiones macroscópicas de la paratuberculosis en mucosa de ileón en un bovino

*Descripción macroscópica: mucosa intestinal con áreas en alto relieve, apariencia cerebriforme y con exudación de moco y sangre.*

Después de inocular experimentalmente cabras de diferentes edades con dosis variables de MAP, se evaluaron los hallazgos patomorfológicos a los 12 meses post inoculación y se observaron lesiones con mayor frecuencia en nódulos linfáticos mesentéricos, ileocólicos y en tejido linfático organizado en la pared intestinal, los nódulos linfáticos afectados estaban agrandados con áreas de necrosis y calcificación, la mucosa yeyunal presentaba ligero sangrado y superficie ocasionalmente ulcerada, describieron serositis vellosa crónica inconsistente y mucosa intestinal corrugada, concluyen que los modelos experimentales de la infección en cabras son mejores ya que son más susceptibles a los 3 tipos de MAP y el progreso de la enfermedad es más rápido (Köhler *et al.*, 2015)

Los nódulos linfáticos (yeyunales, mesentérico caudal e ileocecal) presentan con mayor frecuencia caseificaciones y calcificaciones en cabras que en otros rumiantes, sin embargo, la intensidad de los signos clínicos no está directamente relacionada con la presencia de lesiones, en pequeños rumiantes y fase subclínica de la enfermedad, así como animales clínicos y lesiones macroscópicas mínimas (Radostits *et al.*, 2007 citado en Fernández, 2017).

En un reporte de caso de paratuberculosis en un canino domestico reportaron a la necropsia tejidos ictéricos, masas multifocales de color crema en el bazo que varían en tamaño desde 1 mm hasta 50 mm de diámetro, este estudio es el primer caso reportado en caninos domésticos con la infección, especialmente en áreas donde la Enfermedad de Johne está presente en el ganado bovino (Miller *et al.*, 2017).

### **5.7.2. LESIONES MACROSCOPICAS DE LA ENFERMEDAD DE CROHN**

Inicialmente se describía la Enfermedad de Crohn con una infección solo del íleon terminal, posteriormente se informaron otros segmentos del tracto gastrointestinal afectados, desde entonces, se ha reconocido la EC gastroduodenal por el aumento de reportes por endoscopia digestiva (Pimentel *et al.*, 2019).

La presencia de úlceras aftoides, úlceras longitudinales, estenosis y fístulas, son hallazgos endoscópicos que sugieren la enfermedad inflamatoria (Gomollón *et al.*, 2016). Para la clasificación de las lesiones en pacientes con EC se estratifica según la gravedad de la enfermedad (leve, moderada o grave), la ubicación de la enfermedad (GI superior, ileal, ileocolónica, colónica o perianal), extensión de la enfermedad y fenotipo de la enfermedad (penetrante, estenosis o inflamatorio), la gravedad de la enfermedad se determina por el curso clínico y el historial de tratamiento (Cheifetz, 2013; Torres *et al.*, 2017), también se emplea los criterios de Rutgeerts *et al.* (0: Sin lesiones; 1: menos de 5 lesiones aftosas; 2: más de 5 lesiones aftosas con mucosa normal entre las lesiones, o lesiones confinadas al revestimiento anastomótico ileocolónico [ $<1$  cm]; 3:

ileitis aftosa difusa con mucosa difusamente inflamada; 4: inflamación difusa ileal con úlceras más grandes, nódulos o estrechamiento (Gomollón *et al.*, 2016).

En la Enfermedad de Crohn esofágica la prevalencia varía de 3.3% a 6.8% en la población adulta, las principales lesiones macroscópicas que reportaron son: estenosis con o sin obstrucción, fístulas y perforación consistente con esofagitis, en raras ocasiones los pacientes presentan fistulización en bronquios, pleura, pulmones, estómago y mediastino, así como la formación de abscesos en mucosa y órganos adyacentes con apariencia de adoquines (Davis, 2015).

En los casos de Enfermedad de Crohn colónica o ileal, los hallazgos endoscópicos se caracterizan por lesiones con diversos grados de inflamación (que incluyen eritema, friabilidad, erosiones y úlceras) junto a áreas de mucosa de apariencia normal, se pueden observar estenosis lumbinales y menos frecuentes fístulas (Mocci *et al.*, 2017; Torres *et al.*, 2017; Pimentel *et al.*, 2019). En otros reportes de Enfermedad de Crohn se describieron lesiones macroscópicas en ileón como fue mucosa hinchada congestionada intercalada con ulceraciones difusas e irregulares con apariencia de adoquines (granulomas no caseificantes en todas las capas de la pared intestinal desde la serosa a la mucosa), también observaron múltiples fisuras, perforación y fístulas entre las asas intestinales (Alegbeleye, 2019). En hallazgos intraoperatorio se han reportado masas inflamatorias que involucraban el ciego, el íleon terminal y el colon sigmoide (Alegbeleye, 2019).

## **4.8. LESIONES MICROSCÓPICAS**

### **4.8.1. LESIONES MICROSCÓPICAS DE LA PARATUBERCULOSIS**

Histopatológicamente, los cambios en los nódulos linfáticos e intestinales se clasifican como lesiones granulomatosas y estos cambios histológicos varían ampliamente (Clarke, 1997) las lesiones se clasifican según su localización, tipo de células inmunes, números de micobacterias presentes y estado clínico del animal (Koets *et al.*, 2015).

Un sistema de puntuación histopatológica para las lesiones microscópicas de la paratuberculosis, las lesiones tipo I están compuestos por granulomas formados por células con apariencia de macrófagos (núcleos claros y grandes con nucléolos evidentes, abundante citoplasma ligeramente espumoso y células con núcleos alargados, con apariencia a las células endoteliales), estos granulomas se observaron exclusivamente en tejido linfóide placas de Peyer y ocasionalmente en nódulos linfáticos regionales. Los tipos II, presentan las mismas lesiones de tipo I siendo más graves en placas de Peyer, los granulomas se observan lineales desde la zona basal interfolicular hasta el vértice penetrando en la lámina propia de la mucosa intestinal, bien delineados, redondeados y variables en número (Pérez *et al.*, 1996).

Las lesiones tipo III (lesiones graves asociadas con la enfermedad clínica o subclínica), consisten de una infiltración celular multifocal a difusa que se extiende a áreas de la mucosa no asociadas con tejidos linfoides más allá de la lámina propia hacia la submucosa con engrosamiento de la mucosa intestinal y atrofia de las vellosidades, alterando la absorción del intestino delgado (Pérez *et al.*, 1996; Koets *et al.*, 2015; Fernández, 2017), las lesiones de los tipos 3b y 3c, que involucran enteritis granulomatosa difusa, son los tipos más avanzados y se asocian con lesiones macroscópicas típicas en la necropsia, la naturaleza multifocal difusa de las lesiones tipo 3a se observan en del desarrollo temprano de las lesiones. (Clarke, 1997).

González *et al.*, (2005) propusieron una clasificación histopatológica mejorada de Pérez *et al.*, (1996) y describieron las lesiones como focales, multifocales y difusas en casos subclínicos de paratuberculosis, las lesiones focales se caracterizaron por acumulación de 5 a 30 macrófagos con abundante citoplasma ligeramente espumoso siendo más prevalentes en tejido linfático como en nódulos linfáticos las lesiones multifocales se observaron en lámina propia y nódulos linfáticos drenantes mientras que lesiones difusas se hizo una distinción entre multibacilar difuso (alta carga intracelular de MAP en macrófagos espumosos); linfocítico difuso (una forma rara (<10%) con pocos macrófagos e infiltrado predominantemente linfocítico) e intermedio difuso (poco bacilos ácido alcohol resistentes intracelular en células gigantes y macrófagos) (González, *et al.*, 2005; Köhler *et al.*, 2015).

Krüger *et al.*, (2014) evaluaron las lesiones anatómo-patológicas en cabritos que emplearon como modelos experimentales después de la infección con MAP vía oral (10 mg de masa húmeda bacteriana de MAP a dosis total de  $2.6 \times 10^8$  UFC) y observaron lesiones microscópicas a partir del tercer mes post-infección (MPI) y describieron infiltrados granulomatosos característicos en tejidos linfoides asociados al intestino (GALT), especialmente en placas de Peyer yeyunales y tejido linfoide en la válvula ileocecal y en los nódulos linfáticos intestinales, desde lesiones paucibacilares focales leves hasta patrones multibacilares difusos severos, en el otro estudio, las lesiones fueron comparables a 2, 3, 4, 5 y 9 MPI evidenciándose lesiones más graves entre al 6 a 7 MPI (Munjal *et al.*, 2005), los autores concluyen que la arteritis granulomatosa en la submucosa intestinal de varias cabras observadas en el experimento puede contribuir a la propagación del MAP a la pared intestinal y posiblemente de forma sistémica, estas lesiones observadas durante el período clínicamente inaparente de la paratuberculosis son los indicadores más probables de la progresión de la infección y el desarrollo de la enfermedad clínica (Köhler *et al.*, 2015).

Aproximadamente el 70% de los animales enfermos desarrollan patología multibacilar o lepromatosa y está vinculada a la fuerte respuesta Th2 y altos niveles de interleucina (IL-5), las lesiones se observan en íleon terminal compuesta por macrófagos infectados y el resto desarrolla patología paucibacilar o tuberculoide con una infiltración linfocítica granular y pocos bacilos ácido alcohol resistente, tras inoculaciones experimentales de MAP obtenido de conejos a becerros bovinos, desarrollaron lesiones histopatológicas típicas compatibles con la Enfermedad de Johne, lo que demuestra que los animales salvajes que no sean rumiantes también pueden contribuir a la propagación de la enfermedad. (Nicol *et al.*, 2016). Tiwari *et al.*, (2006)

Un estudio realizado en Nueva Zelanda donde inocularon cepas de MAP en ovejas merinas a diferentes dosis orales ( $2.1 \times 10^7$ ,  $9.3 \times 10^6$  y  $2.3 \times 10^8$  UFC) de la suspensión de MAP y al sacrificarlas a las 63 semanas, evaluaron histológicamente las muestras de hígado, válvula ileocecal y nódulo linfático mesentérico, el 58% presentaron lesiones y aproximadamente el 85% de los tejidos cultivados fueron positivos para MAP y se evidenciaron lesiones granulomatosas típicas en válvula ileocecal y nódulo linfático mesentérico, mientras que en hígado los microgranulomas eran pequeños y escasos; en ese estudio aproximadamente el 92% de las ovejas excretaron MAP en

heces a las 36 semanas post-infección y disminuyó alrededor del 40% al final del estudio, se cree que es por el inicio de la respuesta inmune sérica (Venkata *et al.*, 2016).

En bovinos, el íleon es el órgano donde se observa con mayor frecuencia las lesiones, en pequeños rumiantes las lesiones granulomatosas focales son más evidentes en placas de Peyer en yeyuno y en válvula ileocecal durante la fase subclínica de la enfermedad (Koets *et al.*, 2015; Venkata *et al.*, 2016; Nicol *et al.*, 2016; Pisanu *et al.*, 2018), también se ha descrito las lesiones histopatológicas en rumiantes silvestres como antílopes, presentando enteritis granulomatosa multibacilar, linfadenitis mesentérica y hepatitis periportal, esta especie de bóvidos muestra una alta susceptibilidad al MAP y un rápido curso de la enfermedad en comparación a otras especies de rumiantes domésticos (Naylor *et al.*, 2018).

En caninos domésticos se ha reportado enteritis granulomatosa en la submucosa del íleon, linfangitis granulomatosa multifocal en la capa interna de la túnica muscular, esplenitis granulomatosa nodular multifocal con pérdida de la arquitectura esplénica y nefritis intersticial granulomatosa multifocal, en tinción de Ziehl-Neelsen los macrófagos epitelioides y las células gigantes de Langerhans en el íleon, el bazo y el riñón estaban repletos de innumerables bacterias filamentosas ácido alcohol resistentes compatibles con la infección por MAP (Miller *et al.*, 2017).

En ratones infectados experimentalmente describieron lesiones histopatológicas como hepatitis portal y periportal con infiltración de linfocitos, células plasmáticas y macrófagos, obliteración de la estructura normal de la pulpa blanca y roja esplénica con pérdida de la arquitectura normal de bazo (Shin *et al.*, 2015), en estudios en conejos se observaron lesiones granulomatosas en distintos tramos intestinales (Arrazuria *et al.*, 2016).

#### **4.8.2. LESIONES MICROSCÓPICAS DE LA ENFERMEDAD DE CROHN**

Los hallazgos histológicos primarios en pacientes con la Enfermedad de Crohn que se reportan como proceso inflamatorio crónico con predominio de células linfoplasmocíticas, con diversos

grados de infiltración de linfocitos, células plasmáticas, granulocitos y gastritis focal activa, presencia de granuloma epitelioides menos frecuente, distorsión de la arquitectura, abscesos, atrofia y ramificación de las criptas (Dieser *et al.*, 2017; Torres *et al.*, 2017; Alegbeleye, 2019), el hallazgo clásico es un granuloma no caseificante con una ocurrencia menor del 25% de los casos, otro hallazgo patológico de cronicidad es la metaplasia de células de paneth (Dieser *et al.*, 2017).

La severidad histológica de la Enfermedad de Crohn se califica en escala de: 0 sin actividad histológica activa de la enfermedad, 1 inflamación activa leve (criptitis sin abscesos en cripta), 2 inflamación moderada activa (pocos abscesos en cripta), 3 inflamación severa activa (numerosos abscesos en la cripta) (Baars *et al.*, 2012).

El granuloma es un agregado de macrófagos epitelioides, cuyos contornos son poco definidos, las células gigantes multinucleadas no son características y la necrosis generalmente no es aparente en el centro del granuloma, solo los granulomas en la lámina propia no asociados con la lesión activa de la cripta pueden considerarse como una característica en la EC (Gomollón *et al.*, 2016).

Se describen lesiones microscópicas en ciego, colon e íleon terminal en un paciente con EC, hallaron folículos linfáticos prominentes y agrandados, proliferación de la mucosa muscular y formación de fisuras que se extienden desde la mucosa hasta la serosa junto con edema, infiltración de células inflamatorias que involucraba las capas intestinales Alegbeleye (2019).

En un meta-análisis donde se evaluó un total de 2511 pacientes con EC, 815 presentaron EC en tracto gastrointestinal superior donde el hallazgo histopatológico más frecuente fue la inflamación gástrica inespecífica en el 32% de los pacientes, seguida de granuloma gástrico en el 7,9%, la gastritis focal en el 30,9% teniendo en cuenta esto, la inflamación gástrica estaba presente en el 84% de los pacientes, seguida de la inflamación duodenal en el 28,2% y el granuloma gástrico en el 23,2% (Díaz *et al.*, 2015). En los estudios de Park *et al.*, (2017) los hallazgos histológicos más comunes en pacientes pediátricos con EC, independientemente del sitio anatómico, fueron la inflamación crónica (75.0%), seguida de la erosión (17.3%), granuloma en el 9,6% de los pacientes, concluyendo que no hubo asociación entre la presencia o ausencia de síntomas gastrointestinales superiores y los hallazgos histológicos.

Zarei *et al.*, (2019) compararon las lesiones histopatológicas en tejidos de pacientes con Enfermedad de Crohn las lesiones en tejidos de animales con Enfermedad de Johne, los principales hallazgos en pacientes con EC fueron, enteritis linfoplasmocítica crónica (17%), enteritis granulomatosa (83%), granulomas criptolíticos sin necrosis central y caseificación (63%), ulceración de la mucosa, metaplasia de glándula pilórica, hiperplasia linfoide en placas de Peyer (33%), hiperplasia de células de Paneth, linfangiectasia, edema e hiperplasia de células caliciformes en (67%), los autores reportaron anomalías arquitectónicas de la mucosa, irregularidades en las vellosidades, atrofia de las criptas y dilatación quística en el intestino afectado.

Mientras las lesiones microscópicas más comunes en Enfermedad de Johne fueron la enteritis granulomatosa multifocal a difusa (formas multibacilar [43%] y paucibacilar [33%]), linfangiectasia y edema de la mucosa y la submucosa (96%), linfangitis (73%), enteritis granulomatosa (90%), hiperplasia linfoide (43%) de los casos, de otro lado los hallazgos menos comunes fueron la fibrosis reactiva en los ganglios linfáticos mesentéricos (10%), criptitis (14%) y abscesos de las criptas (10%), los autores consideran que las lesiones histopatológicas entre Enfermedad de Crohn y Enfermedad de Johne muestran una asociación y respaldan la relación etiológica del *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* (tabla 3) (Zarei *et al.*, 2019).

**Tabla 3.** Características patológicas de la Enfermedad de Crohn y la Enfermedad de Johne

<b>CARACTERISTICAS</b>	<b>ENFERMEDAD DE CROHN</b>	<b>ENFERMEDAD DE JOHNE</b>
<b>UBICACIÓN DE LA LESIÓN</b>		
Esófago y cavidad oral.	Sí	No
Íleon	Sí	Si
Colon	Sí	Sí
Nódulos linfáticos mesentéricos	Sí	Sí
Recto	Sí	Casos avanzados
Ano	Sí	Casos avanzados

---

Afectación segmentaria del intestino.	Sí	Sí
---------------------------------------	----	----

### **CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS**

Apariencia macroscópica	Edema de la pared intestinal afectada, apariencia de "manguera de jardín"	Pared intestinal engrosada
Edema parietal	Sí	Sí
Estenosis	Sí	Raro
Perforación	Sí	Raro
Fístula	Sí	No
Pseudopolipos	Sí	No
Mucosa intestinal	Aspecto de adoquín	Gruesa y corrugada
Vasos linfáticos mesentéricos	Dilatados	Dilatados, engrosados y congestivos

### **APARIENCIA MICROSCÓPICA**

Compromiso transmural	Sí	Raro
Fibrosis	Sí	No
Agregados linfoides	Sí	Sí
Granuloma	Sí (50-70% de los casos)	Sí
Caseificación en nódulos linfáticos	No	Sí en cabras
Fisuras	Sí	No
Bacilos ácido-alcohol resistente	No	Sí

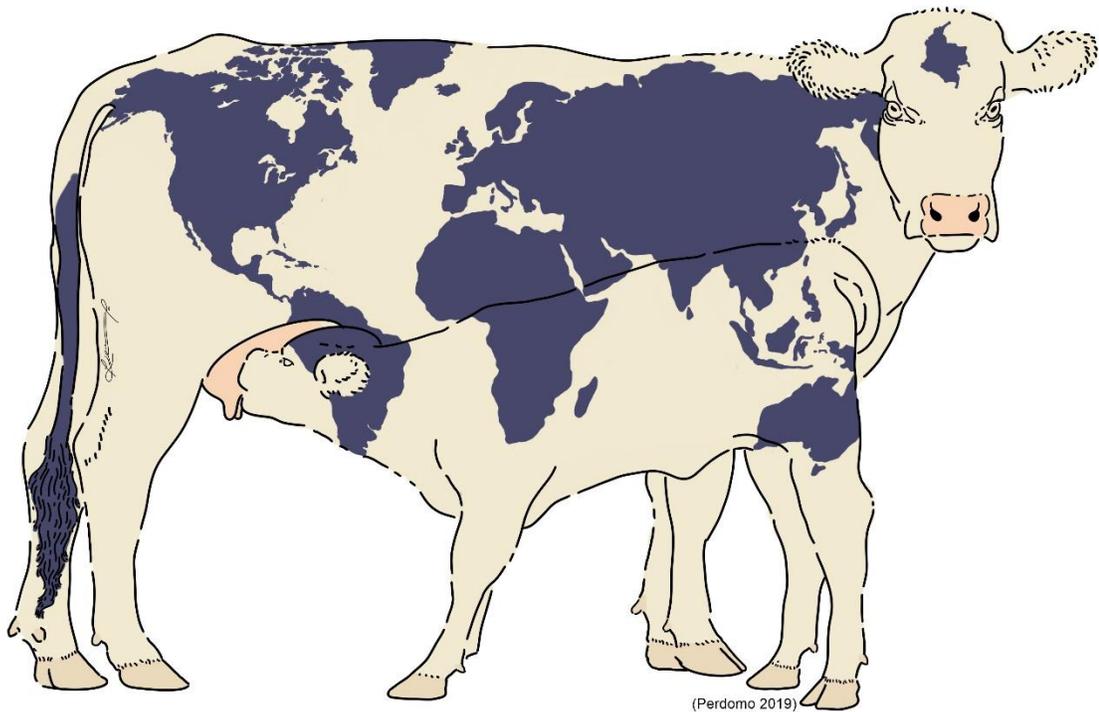
---

**Adaptado de:** Committee on Diagnosis and Control of Johne's Disease, (2003).

## 4.9. EPIDEMIOLOGÍA

### 4.9.1. SITUACIÓN MUNDIAL DE LA PARATUBERCULOSIS

Es una enfermedad de distribución global que afecta la productividad y la rentabilidad financiera en el hato. La enfermedad de Johne se distribuye en hatos de todo el mundo y en algunos países es endémica, afectando principalmente a rumiantes domésticos y actualmente se considera una enfermedad emergente a pesar de su reconocimiento desde hace más de un siglo, sin embargo, aún no se ha establecido una prevalencia mundial debido a factores como la baja sensibilidad de las pruebas diagnósticas disponibles para animales en etapa subclínica, y que los animales afectados en la fase clínica de la enfermedad generalmente se eliminan antes de realizar un diagnóstico final de la infección por MAP (Figura 13) (Fawzy et al., 2018).



*Perdomo, 2019*

**Figura 13.** Ilustración de la distribución mundial de la paratuberculosis

En Estados Unidos, al menos el 68% de los rebaños lecheros tienen animales infectados con MAP con una prevalencia de menos del 10% mientras en rebaños de carne es del 7, 8%, según las estimaciones más recientes en una muestra de 106 hatos lecheros oscilaron entre el 0% y el 27,3%, con una media del 5,5%, las pérdidas económicas pueden variar entre \$200 a \$1,500 millones anuales solo en Estados Unidos (Harris y Barletta, 2001) estos costos se asocian a la pérdida de la vaca y su ternero, los costos de los reemplazos, los asociados con la pérdida de producción de leche, los relacionados con el tratamiento veterinario y los derivados de las pruebas diagnosticas (García y Shalloo, 2015).

En Canadá, las estimaciones de prevalencia varían dependiendo de la ubicación de las granjas, se presume una prevalencia del 66% en granjas al oeste de Canadá, 54% en Ontario y 47% en el Atlántico canadiense (Corbett *et al.*, 2018), el costo asociado a esta enfermedad está calculado en \$2.472 dólares canadienses por tratamientos y disminución de la producción anual en pequeños rebaños (Gautam *et al.*, 2016).

Existen pocas estimaciones de la prevalencia en Europa debido en parte a problemas con la precisión de la prueba de diagnóstico en la población objeto y a diseños de estudio inadecuados, se estima que en los países europeos es aproximadamente del 20% a nivel de rebaño, sin embargo, algunos países pueden tener una prevalencia más baja (Nielse y Toft, 2009), en Holanda la prevalencia de MAP es de 54.7% en hatos lecheros, en Bélgica del 17.4% en hatos de carne, en España el 46.7% de rebaños estaban infectados con paratuberculosis (Calderón y Góngora, 2009), en algunos países europeos es endémico como en el Reino Unido, se estima que la prevalencia es mayor a 35% en los rebaños bovinos (Barratt *et al.*, 2018).

Se estima que el costo de la Enfermedad de Johne solo en Reino Unido está en un rango de € 0.327 millones - € 10 millones de euros por año para el ganado en general y los costos directos atribuibles a la Enfermedad de Johne por vaca lechera al año es de € 26 mil euros, la pérdida anual para el ganado vacuno lechero y entre € 10-18 mil euros por animal en rebaño de carne (Barratt *et al.*, 2018).

En Nueva Zelanda basado en el análisis de leche a granel mediante ELISA se encontró que 3 al 5% de los rebaños tenían evidencia de infección por MAP, se comparó con una muestra de ELISA por animal resultando 25% de vacas positivas en rebaños infectados en granjas lecheras de otro lado la prevalencia en granjas de bovinos de carne se estimó en un intervalo del 35 al 50% por cultivo fecal combinado y ELISA en suero de 20 animales por rebaño, la incidencia anual de enfermedad de Johne varió de 0,07 al 0,34 casos por cada 100 bovinos, por lo tanto, son inferiores a los del ganado lechero que es aproximadamente del 80% (Gautam *et al.*, 2016).

También se ha evaluado la prevalencia en países asiáticos como la India en rebaños de granjas bovinas mediante ELISA, donde se estimó en un estudio que la prevalencia de MAP es mayor en bovinos y búfalos es del 24,1% en comparación con ovejas y cabras que es del 22,5%, la seropositividad fue mayor en bovinos 26,9%, seguida de cabras 23,9%, búfalos 20,2% y ovejas 19,0% (Singh *et al.*, 2016).

En una revisión de la prevalencia de la paratuberculosis en bovinos, ovinos y caprinos, en América latina y el Caribe, hallaron una prevalencia de 73,1% para bovinos, 11,5% para ovinos y el 15,4% para caprinos, sin embargo, estos estudios fueron insuficientes para determinar con precisión la prevalencia de paratuberculosis en animales de granja en América Latina y el Caribe (Fernández *et al.*, 2017).

#### **4.9.2. SITUACIÓN DE LA PARATUBERCULOSIS EN COLOMBIA**

En Colombia se ha reportado la presencia de la paratuberculosis en bovinos desde hace más de 90 años, sin embargo, su comportamiento epidemiológico en cuanto a la prevalencia e incidencia de la enfermedad en el país es aún desconocido (Zapata *et al.*, 2008; Ramírez *et al.*, 2011). La literatura científica nacional es insuficiente y ni siquiera las entidades sanitarias como el ICA lo incluyen en el boletín anual de las enfermedades prevalentes del hato ganadero en Colombia (Calderón y Góngora, 2008).

El primer caso fue descrito por el Médico veterinario Ildelfonso Pérez en 1924 en bovinos importados por la hacienda El Hato en el municipio de Usme en Cundinamarca (Plata, 1931 y Vega, 1947 citados en Correa *et al.*, 2018; Zapata *et al.*, 2008; Espeschit *et al.*, 2017; Jaramillo *et al.*, 2017; Caraballo *et al.*, 2018).

En 1981 se evaluó la prevalencia de PTB en ovinos en el altiplano Cundi- Boyacense en un estudio de 480 ovinos y se estimó la prevalencia de reactores positivos de  $11,25\% \pm 2,8\%$ , entre 1986 y 1993 en el departamento del Meta se reportaron casos por el Instituto Colombiano Agropecuario (ICA) (Góngora y Villamil, 1999 citado en Caraballo *et al.*, 2018). Entre el 2000 al 2008 se realizaron estudios retrospectivos en Antioquia donde se analizó la información documental de los hallazgos clínicos e histopatológicos de la PTB en 5 animales afectados, el estudio confirmó según los criterios de diagnósticos empleados y el análisis de la información, la presencia, circulación y mantenimiento del MAP en el país (Ramírez *et al.*, 2011).

Benavidez *et al.*, (2015) evaluaron la presencia de anticuerpos anti-MAP en producciones lecheras bovinas en el sur de Nariño y estimaron que el 94% de las producciones había al menos un animal positivo y el 8% de los animales evaluados presentaron anticuerpos anti-MAP. Vélez *et al.*, (2016), estimaron que la seroprevalencia de MAP en bovinos de carne mediante la prueba diagnóstica ELISA fue del 33,8%. Jaramillo *et al.*, (2017) estimó que la prevalencia de MAP fue del 17%, en un hato lechero bovino del altiplano norte de Antioquia. Hernández *et al.*, (2017), evaluaron la seroprevalencia de MAP en un aprisco en Antioquia, los resultados de ELISA fueron negativos en los 59 animales evaluados. Caraballo *et al.*, (2018)

Todos los autores han concluido que se requiere de mayores estudios epidemiológicos para estimar la prevalencia e incidencia del MAP en los hatos productivos de Colombia, no obstante, se requiere de pruebas diagnósticas específicas y sensibles que permita detectar animales positivos en estados iniciales, asimismo, el establecimiento e implementación de estrategias sanitarias y medidas de control encaminadas a minimizar la enfermedad en el hato afectado, sin embargo, esto representaría un alto costo económico y la falta de reglamentaciones sobre el diagnóstico, control y manejo de la enfermedad en Colombia ha impedido la financiación de investigaciones donde se evalúe la epidemiología y el comportamiento de la paratuberculosis en el país. (Zapata *et al.*, 2008).

#### **4.10. CONTROL DE LA PARATUBERCULOSIS**

El control de la paratuberculosis bovina plantea múltiples desafíos, principalmente para los países donde la enfermedad es endémica y con producciones lecheras intensivas especializadas, esta enfermedad se ha extendido desde Europa hacia el resto del mundo debido a la comercialización de animales infectados y su propagación se ha favorecido por las características epidemiológicas, la evolución lenta y silenciosa, la naturaleza subclínica y la baja sensibilidad de las pruebas diagnósticas (Kennedy, 2011). La comunidad internacional ha enfocado su atención hacia la enfermedad, ya que es considerada como un problema de desarrollo agroindustrial, intentando limitar su propagación, también por la importancia en la salud pública ya que varios investigadores han sugerido una posible relacionado del MAP con la Enfermedad de Crohn en humanos (Carslake *et al.*, 2011).

En los intentos de fomentar el estudio de la paratuberculosis y su relación en la Enfermedad de Crohn, la comunidad científica ha establecido coloquios internacionales de discusión que plantean objetivos como el de Comprender mejor la epidemiología y la transmisión de la enfermedad, desarrollar e implementar nuevas pruebas diagnósticas y métodos de diferenciación de cepas, comprender la biología y la patogénesis del MAP, estudiar la respuesta inmune del hospedador al MAP, evaluar y desarrollar nuevas vacunas y también se establecen programas de investigación en salud pública aplicados a la calidad y seguridad de los alimentos (Carslake *et al.*, 2011). La unión europea tiene los siguientes temas de investigación: primero la estandarización, armonización y mejoramiento del diagnóstico de laboratorio de MAP, segundo inactivación del MAP en leche y productos lácteos, tercero riesgo y control y cuarto caracterización de la interacción entre humanos con Enfermedad de Crohn y el MAP (Kennedy, 2011).

En Holanda las estrategias de control se han basado en la evaluación del riesgo con enfoque probabilístico sobre niveles de anticuerpos antiMAP en leche, con el cual establecen una clasificación de las lecherías de alto y bajo riesgo con la probabilidad que tienen estas de contaminar con MAP la leche del granel a niveles superiores de los que la pasteurización puede eliminar, a pesar de estos esfuerzos las autoridades sanitarias no han desarrollado normas obligatorias para el control de la exposición humana al microorganismo (Kennedy, 2011).

En algunos países el control de la enfermedad ha pasado del gobierno a las organizaciones ganaderas, por tanto, las decisiones en las granjas quedan en manos de los productores que pueden o no ejecutar las medidas de control, esto puede deberse a la falta de conocimiento o a la percepción del riesgo y del impacto económico de la enfermedad que puede ser alto debido a disminuciones en la producción de leche, baja fertilidad, aumento de la tasa de reemplazos y sacrificio prematuro (Carslake *et al.*, 2011).

Los objetivos que plantean los países para su control son proteger regiones libres y erradicar la infección de poblaciones de baja prevalencia, mejorar el conocimiento y la comprensión del MAP y así desarrollar herramientas para el manejo adecuado de la infección, mitigar la contaminación y el impacto regional, desarrollar estrategias de prevención y control en la finca, prevenir la presentación de la infección en la finca, demostrar estudios de bajo riesgo en el hato y en las crías y la erradicación de MAP de las poblaciones ganaderas (Beaunée *et al.*, 2017).

Países como Estados Unidos, Australia y países bajos están a la vanguardia del control de la paratuberculosis, aunque el control de la propagación de la infección ha resultado ardua debido a la patogenia y la epidemiología de la enfermedad (Beaunée *et al.*, 2017; Kennedy y Allworth, 2000). Varias medidas se han implementado en estos países para mitigar los riesgos como las regulaciones al movimiento de animales en su territorio desde áreas endémicas a áreas de baja prevalencia y la protección a áreas libres de MAP (Buhnerkempe *et al.*, 2014).

Otra recomendación para el control de la enfermedad en hatos se basa en medidas internas de bioseguridad enfocadas a disminuir la propagación, como eliminar de forma oportuna animales positivos a paratuberculosis con el fin de evitar la infección en los animales de reemplazo (Bajardi *et al.*, 2012).

En un estudio realizado en la región de Bretaña en Francia donde el 85% de las ganaderías son especializadas en producción de leche, evaluaron la eficacia de las estrategias combinadas de control, el estudio evaluó la eficacia epidemiológica teórica en meta-poblaciones donde se efectuaron medidas de control durante 9 años (Beaunée *et al.*, 2017). ellos plantearon que los hatos

no son poblaciones aisladas de bovinos y que estas tienen contacto a través del movimiento de animales, intercambio y comercialización, esto establece factores de riesgo externos que facilitan la propagación de la infección entre las poblaciones, en el estudio se consideraron 5 medidas de control aplicadas en las fincas : 1) pruebas diagnósticas para comercializar animales, su objetivo es evitar la introducción de animales infectados al hato; 2) sacrificio temprano de animales clínicos para reducir la contaminación ambiental en potrero e instalaciones; 3) mejorar la higiene de las instalaciones para reducir la carga bacteriana en áreas comunes, además de eliminar el MAP del calostro y leche por pasteurización; 4) reducir el contacto de las crías con animales adultos; 5), eliminar animales positivos, realizando pruebas diagnósticas a animales mayores de 2 años (Bajardi *et al.*, 2011).

El estudio concluyó que la implementación de medidas de control como mejora de la higiene con lavado de instalaciones y el sacrificio de animales clínicos realizadas al 100% reducirá la infección al interior del hato, mientras el uso de sustitutos lácteos, la pasteurización de la leche y el calostro apenas tuvieron efecto positivo detener la propagación de la infección, entretanto el manejo de la cría al limitar el contacto con adultos redujo en gran medida la propagación del MAP, esta medida debe ser radical, con una separación completa del neonato y del adulto, los autores concluyen que adoptar todas estas las medidas de control combinadas permite disminuir el porcentaje de los rebaños infectados a un 36% pero la erradicación no se logró en los 9 años que abarcó el estudio, pues el MAP persistió en todas las poblaciones estudiadas (Beaunée *et al.*, 2017)

El enfoque actual para el control de la infección debe tener en cuenta la combinación de las medidas y no la implementación individual de estas, con el objeto de reducir la velocidad de propagación y reducir el número de poblaciones infectadas, estas medidas internas se deben enfocar en el manejo de la cría, mejorar la higiene, la identificación y sacrificio temprano de animales clínicos y positivos y las medidas de control externas se deben enfocar en establecer control de los movimientos de animales y compra de animales negativos.

#### 4.11. ENSAYOS DIAGNÓSTICOS EN LOS ÚLTIMOS 5 AÑOS (2015-2019)

A continuación, se resume los reportes de casos e investigaciones de los últimos cinco años:

El elemento de inserción *IS900* es el objetivo más utilizado para la identificación y también la diferenciación de *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* de otras micobacterias mediante PCR (Bharathy *et al.*, (2017), varios estudios han establecido la prevalencia empleando este método de diagnóstico, Nazareth *et al.*, (2015) obtuvieron una prevalencia del 68% mediante ADN MAP por PCR anidada específica de *IS900* en muestras de sangre periférica de 202 pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal (EII) en diferentes períodos, los autores concluyen que posiblemente el MAP tiene implicación en la patogénesis de la Enfermedad de Crohn, otro estudio obtuvo una prevalencia de 23,2% en pacientes con EC mediante ADN específico de MAP por qPCR, 2 de los 69 pacientes evaluados fueron positivos para MAP mediante inmunohistoquímica (IHC) (Khan *et al.*, 2016), Zamani *et al.*, (2017) detectaron anticuerpos anti-MAP en suero de pacientes con Enfermedad inflamatoria intestinal (EII) mediante PCR-*IS900* en 64% (n = 18) de los pacientes, concluyen que el estudio proporcionó evidencias de la alta prevalencia de ADN MAP en esta patología, Timms *et al.*, (2016) obtuvieron cultivos y ensayos de PCR-*IS900* positivos para MAP en tejidos de pacientes con Enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa, concluyeron que la EC no estaba relacionada con la edad, el sexo, el lugar de nacimiento, el tabaquismo o la ingesta de alcohol, pero demostraron una relación significativa de MAP con el desarrollo de la Enfermedad de Crohn.

Zarei *et al.*, (2019) evaluaron mediante PCR-*IS900*, 30 pacientes con EC, 30 pacientes con enfermedad intestinal inflamatoria y 30 cabras con Enfermedad de Johne, obtuvieron una prevalencia de MAP de 47%, 13% y 70% respectivamente, estos autores concluyeron que la identificación de MAP en pacientes con EC respalda una asociación notable de la micobacteria en el desarrollo de esta enfermedad.

En cuanto a reportes diagnósticos mediante cultivo la cual es considerada como prueba de oro por su alta especificidad en humanos es variada debido a que es bastante difícil de cultivar por su naturaleza fastidiosa, de lento crecimiento y se atribuye a la creencia de que en los tejidos humanos

el MAP es deficiente de pared celular como un esferoplasto (Bosca *et al.*, 2015), la falta de una pared celular hace que los esferoplastos sean incapaces de aceptar los métodos de tinción típicos como la tinción de Ziehl Neelsen y, por tanto, es difícil o imposible de detectar mediante microscopía óptica estándar, sin embargo, se cree que la forma negativa de la micobacteria es resistente y se asocia con infecciones persistentes (McNees *et al.*, 2015), en condiciones de cultivo apropiadas y durante un período prolongado (semanas a años) en tejidos humanos, estas micobacterias producen la pared celular y se vuelven positivas para Ziehl-Nielsen (Bosca *et al.*, 2015).

Kuenstner *et al.*, (2015) reportaron hemocultivos positivos y anticuerpos para MAP en 4 de los 5 pacientes con múltiples enfermedades de etiología desconocida, discuten que estos informes de casos de pacientes con estas infecciones proporcionan evidencia de apoyo del papel patogénico de MAP en el humano, otro estudio también reporto hemocultivo positivo para MAP en un paciente diagnosticada con EC confirmando que probablemente el *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* fue el desencadenante de la enfermedad clínica. Oken *et al.*, (2017), Zhang *et al.*, (2017) cultivaron *Mycobacterium avium* subespecie *hominissuis* (MAH) de muestras de sangre de una paciente con EC, mediante análisis de la secuenciación directa del amplicón de PCR confirmaron la presencia de MAH siendo el primer reporte de aislamiento de la micobacteria en pacientes con EC, en el estudio de Carvalho *et al.*, (2016) no obtuvieron cultivos positivos para *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* con ningún medio de cultivo utilizado incluso después de 30 semanas.

Se ha reportado excreción masiva de bacilos ácido-alcohol resistente con morfología de *Mycobacterium avium paratuberculosis* en heces humanas con síntomas clínicos de EC, en el cultivo de las heces se detectaron colonias y mediante PCR-REA (IS 1311 e IS 1311L2) se determinó que la bacteria era del biotipo Indian Bison de MAP (Singh *et al.*, 2016).

En cuanto a las similitudes clínicas, anatomo e histopatológicas entre la Enfermedad de Johne y la Enfermedad de Crohn se han descrito y comparado desde hace más de un siglo, se reporta la literatura lesiones histopatológicas más comunes de Enfermedad de Crohn como enteritis linfoplasmocítica crónica, enteritis granulomatosa, ulceración de la mucosa, metaplasia de la

glándula pilórica, hiperplasia linfoide, hiperplasia de células de Paneth, linfangiectasia, edema e hiperplasia de células caliciformes (McNees *et al.*, 2015; Paquet *et al.*, 2016; Pimentel *et al.*, 2019; Zarei *et al.*, 2019), estas manifestaciones histopatológicas se han observado en rumiantes con Enfermedad de Johne (Alcedo *et al.*, 2016).

Zarei *et al.*, (2019) compararon las lesiones histopatológicas de humanos con EC y cabras con Enfermedad de Johne, describieron lesiones paucibacilares en el 7% de los pacientes con EC, en cabras las lesiones fueron multibacilares en el 43% de los casos, enteritis granulomatosa (83 y 90%), enteritis linfoplasmocítica (17 y 14%), edema y linfangiectasia (67 y 96%) y vasculitis (20 y 73%) fueron hallazgos comunes en las enfermedades de Crohn y Johne respectivamente, los autores concluyen que hay una asociación notable entre MAP y EC respaldando la hipótesis de una relación etiológica.

Se resume los ensayos de diagnóstico para *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* con Enfermedad de Crohn reportados en la literatura de 2015-2019 (Tabla 4).

**Tabla 4.** Resumen de ensayos de diagnóstico para *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* con Enfermedad de Crohn (2015-2019).

<b>Autor</b>	<b>Tipo de Muestra</b>	<b>Técnica de diagnóstico</b>	<b>Resultados clínicos</b>
<b>Kuenstner <i>et al.</i>, (2015)</b>	Sangre Biopsia de colón, íleon	Cultivo Elisa	4 de las 5 muestras fue positivo para Elisa, 3 cultivos fueron positivos para MAP. Las pruebas de PCR de MAP fueron negativas
<b>Carvalho <i>et al.</i>, (2016)</b>	Biopsia de colón, íleon	qRT-PCR cultivo histopatología	No se obtuvo cultivos positivos para MAP. Tres muestras frescas fueron positivas para MAP mediante PCR- <i>IS</i> 900. La muestra de histopatología se observó bacilos ácido-alcohol resistente en la mucosa intestinal.

<b>Timms et al., (2016)</b>	Biopsia de íleon terminal o el colon	PCR <i>IS900</i> Cultivo	Determino la presencia de MAP en pacientes con EC en el 22 de los casos. Cultivo positivo a MAP a partir de tejido humano.
<b>Singh et al., (2016)</b>	Suero, sangre y heces	Microscopia Cultivo Elisa PCR <i>IS 900</i> PCR_RE S <i>1311</i>	La microscopia en muestra de heces fue positiva MAP. El cultivo de heces se detectaron pequeñas colonias. El biotipado de las colonias con IS 1311 PCR_RE e IS 1311 L2 PCR_REA demostró que la bacteria era del "tipo Bisonte indio" de MAP. El suero del paciente fue positivo para MAP por ELISA.
<b>Khan et al., (2016)</b>	Biopsia sangre e intestino	qPCR del gen <i>IS900</i> específico de MAP	Fue significativamente mayor en pacientes con EC (23.2%, en comparación con los controles (7.3%).
<b>Oken et al., (2017)</b>	Muestra de sangre de capa leucocitaria	Immunohistoquímica (IHC) Hemocultivo PCR electroforesis en gel secuenciación de ácido desoxirribonucleico (ADN) del amplicón de PCR en sangre PCR para ADN de MAP en el plasma	La prevalencia de MAP en EC fue de 2.9% y 2.4% en controles. Se cultivó MAP a las 9 semanas, ña identidad fue confirmada por PCR, electroforesis en gel y secuenciación de ácido desoxirribonucleico (ADN) del amplicón de PCR. El título anti-MAP de la de sangre fue positivo. El análisis de PCR para ADN de MAP en el plasma fue negativo.
<b>Zamani et al., (2017)</b>	Biopsias (colon afectado, íleon	Elisa (anticuerpos anti-MAP) ADN-PCR ( <i>IS900</i> )	La especificidad de los péptidos bacterianos logró un 100% para MAP, Positivo en el 64% pacientes con EC y 9,7% de muestras de NIBD.

	terminal y recto)	Cultivo	Solo dos muestras con resultados positivos de ELISA y PCR mostraron simultáneamente colonias de MAP
<b>Zarei et al., (2019)</b>	Biopsias intestinales (íleon, ciego y colon)	Histopatología IS900 PCR	El 7% de los pacientes con EC tuvieron lesiones paucibacilares, el 43% de los casos con EJ fueron multibacilares. Prevalencia de MAP en pacientes con EC y EJ fue de 47 y 70%, respectivamente.

#### 4.12. CRONOLOGÍA DE LA ENFERMEDAD DE JOHNE

Desde hace más de un siglo la comunidad científica ha debatido el papel del *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* como la causa de la Enfermedad de Crohn en los humanos (Sechi y Dow, 2015), aquí se resume cronológicamente los avances científicos de la Enfermedad de Johne en el mundo.

**1894:** el médico veterinario alemán Johne junto con Frothingham describieron por primera vez las lesiones patológicas observadas en tejidos de animales muertos infectados con el microorganismo, realizaron una descripción macroscópica y microscópica las lesiones y por tinción observaron bacterias en los tejidos, los investigadores concluyeron que la enfermedad fue causada por la misma bacteria que causa la tuberculosis en las aves (*Mycobacterium avium*), los investigadores propusieron el nombre de "enteritis pseudotuberculosa" para la enfermedad. (Johne, L. Frothingham, 1895 citado en Johne's Information Center, s,f).

**1900:** Otros investigadores nombran la enfermedad como paratuberculosis y enteritis hipertrófica, en 1906 el Dr J. McFadyean Director del Royal Veterinary College propuso el término "Enfermedad de Johne" y desde entonces, diversas publicaciones han empleado ese término para referirse a la paratuberculosis. (Sechi y Dow, 2015).

**1902:** El Dr. Herman Markus, profesor de patología veterinaria e inspector de mataderos en los Países Bajos, describió al menos 11 casos de inflamación gastrointestinal en el ganado bovino. Intentó aislar las bacterias que se observaron en los tejidos, pero no obtuvo éxito, Markus parecía haber descrito la misma condición patológica la enteritis causada por el *Mycobacterium avium* (Johne's Information Center, s, f).

**1908:** Fue reportado por primera vez en Estados Unidos la Enfermedad de Johne por el Decano de la escuela de Veterinaria de la Universidad de Pennsylvania, el Dr Leonard Pearson en su artículo titulado “*A note on the occurrence in America of chronic bacterial dysentery of cattle*” (Pearson, 1908 citado en Arukčić, 2018), ese mismo año, el médico veterinario KF Meyer recibió el título de '*Doctor medicinae veterinariae*' de la Universidad de Zurich con una tesis titulada “*Über die durch säurefeste Bakterien hervorgerufene difuso Hypertrophie der Darmschleimhaut des Rindes*” (Enteritis hypertrophica bovis specifica. Hipertrofia difusa de la mucosa intestinal en el ganado bovino causada por bacterias ácido-alcohol resistentes.). (Pospischil, 2015).

**1909-1912:** En Dinamarca se llevaron a cabo varias investigaciones sobre la Enfermedad de Johne, el científico O Bang, inoculo vía intradérmica antígenos de *Mycobacterium bovis* y observo una débil respuesta del sistema inmunológico de los animales infectados, sin embargo, tenían mejor respuesta a la tuberculina aviar antígenos de *Mycobacterium avium*, el microorganismo que causa la tuberculosis aviar se podía cultivar en un laboratorio pero el organismo que causa la Enfermedad de Johne no crecía en cultivos hasta que el científico británico F, Twort descubrió en cultivos antiguos, pequeñas colonias que crecían alrededor de colonias del bacilo del heno común *Mycobacterium phlei* y concluyó, que la bacteria *M. phlei* proporcionaba algún nutriente esencial para el crecimiento del patógeno y postulo un nuevo nombre para la enfermedad lo llamo “*Mycobacterium enteriditis chronicae pseudotuberculosis bovis Johne*” (Johne's Information Center, s,f).

**1913:** Thomas Dalziel describió en varios casos de patología las similitudes macroscópicas y microscópicas de los intestinos de pacientes humanos comparados con los intestinos de bovinos con Enfermedad de Johne, cito los reportes hallados por McFadyean y Johne y escribió que las características del tejido eran “...tan similar como para justificar una proposición de que las enfermedades pueden ser las mismas” (Dalziel, 1913 citado en Sechi y Dow, 2015).

**1922:** Se describe las lesiones histopatológicas de la paratuberculosis en animales de africa y asia, en 1923, la primera edición del Manual de Bacteriología Determinativa de Bergey, público y nombro oficialmente que el agente causante de la Enfermedad de Johne es el *Mycobacterium paratuberculosis*, asimismo, en Estados Unidos, los científicos Beach y Hasting publicaron un informe de 22 páginas en el Boletín 343 de la Estación Experimental Agrícola de la Universidad de Wisconsin describiendo la Enfermedad de Johne e incluyeron imágenes de animales afectados, tejidos y cultivos de laboratorio de *M. paratuberculosis* y aconsejaron a los agricultores eliminar animales sospechosos y separar la madre de la cría (Johne's Information Center, s,f).

**1951:** Jacob Jansen científico holandés, observó una asociación entre el pH del suelo y la incidencia de la Enfermedad de Johne, informando que los factores ambientales pueden influir en la aparición de la enfermedad. (Johne's Information Center, s, f).

**1960:** Se realizaron importantes observaciones epidemiológicas, los animales infectados excretan activamente *M. paratuberculosis* en sus heces, se pudo encontrar en el semen de toros infectados y el útero de vacas infectadas, lo que indico la posibilidad de infección fetal (Johne's Information Center, s, f).

**1965-1975:** J. Berg Jørgensen en Dinamarca, describió la epidemiología de la paratuberculosis, mejoró los métodos de diagnóstico, estudió la supervivencia del MAP e informó sobre los resultados de los ensayos experimentales en cerdos, también en esa década NJL Gilmour en Edimburgo publicaron varios artículos en el Journal of Comparative Pathology sobre la patogénesis de la Enfermedad de Johne. (Kampen *et al.*, 2015; Johne's Information Center, s, f).

**1983-1990:** Se realizó el primer Coloquio internacional sobre la paratuberculosis en Ames Estados Unidos donde participaron diferentes científicos mundiales, el Dr Richard Merkal del National Animal Disease Center junto a la Dra Marie Thorel, organizaron un segundo coloquio internacional en la Escuela de Veterinaria de Maisons-Alfort, Francia, en 1988.

**1984-1989:** Se informó por primera vez el aislamiento de *M. paratuberculosis* en tres pacientes con Enfermedad de Crohn, por el Dr. Roderick J, Chiodini y colegas, reportaron MAP en pacientes de Crohn asociando la micobacteria con la Enfermedad de Crohn, queda por determinar si esto es una asociación causal (Chiodiri *et al.*, 1984 citado en Davis *et al.*, 2017), en 1989 Des Collins y JJ McFadden descubrieron la secuencia de inserción IS 900, siendo importante para la detección de *M. paratuberculosis* sin tener que cultivar la bacteria en medios de laboratorio, un proceso que generalmente requiere de 12 a 16 semanas (Johne's Information Center, s,f).

**1989-1992:** Se crea la Asociación Internacional de paratuberculosis dedicada al avance del conocimiento científicos en la lucha por la erradicación de la paratuberculosis en el ganado doméstico y otras especies afectadas por *Mycobacterium paratuberculosis*, la científica M Thorel, realizo varias contribuciones al campo de la investigación de la paratuberculosis y sugirió la taxonomía numérica para clasificar las micobacterias dependientes de micobactina.

**1992-2000:** En Noruega, el veterinario Finn Saxegaard del Laboratorio Veterinario Nacional realizo un estudio en patología comparativa del MAP en terneras y cabras, encontró una cepa de MAP específica para cabras, ayudó a dilucidar las relaciones genéticas entre las micobacterias dependientes de micobactina (Johne's Information Center, s,f).

**2005-2010:** Se realizó la secuencia genómica completa de la cepa de MAP que se aisló en una vaca lechera en Wisconsin, Estados Unidos, el genoma tiene 4.829.781 pares de bases que representan hasta 4.587 genes (Lingling *et al.*, 2005).

**2010-2015:** Se publicó el libro Paratuberculosis Organism, Disease, Control, editado por Marcel *et al.*, 2015 y publicado por CAB International donde se realiza múltiples estudios del genoma del *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* y estudios sobre vacunación, análisis de técnicas diagnósticas y tratamientos anti-MAP.

**2016:** Se realizó el 13th Colloquium Internacional de Paratuberculosis en Francia, las sesiones científicas se centraron en los últimos avances sobre el curso de la infección y el huésped (incluyendo patogénesis, inmunología y genética del huésped), la genómica, biología y diversidad

del patógeno, el diagnóstico y detección del *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (incluyendo en exposición y transmisión), los enfoques epidemiológicos, las estrategias de control, y aspectos de salud pública y seguridad alimentaria.

**2017:** la comunidad científica se reunió en la Universidad de Temple en Filadelfia donde discutieron la relación de *Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis* en la enfermedad humana, esto debido a la preocupación compartida de que el MAP es un posible agente zoonótico que representa una amenaza no solo para la salud animal sino también para la humana, discutieron formas de mejorar las pruebas de diagnóstico para MAP y los posibles ensayos clínicos futuros anti-MAP.

**2018:** Se realizó el Colloquium Internacional de Paratuberculosis número 14 en México donde se reunieron 160 investigadores procedentes de 23 países y discutieron los avances diagnósticos, la inmunología y la respuesta del hospedador, los programas de control de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP), la epidemiología, patogenómica y biología de MAP y por último salud pública, la presencia de MAP en el medio ambiente y de la situación actual de la enfermedad a nivel mundial. También se realizó en este año el Foro Iberoamericano donde se reunió 35 investigadores procedentes de Argentina, Brasil, Colombia, Chile, España, México y Panamá, las secciones de este foro sirvieron para compartir experiencias sobre los planes de control de la paratuberculosis en America Latina.

**2019:** El Dr. Richard Whittington, dirigió un equipo internacional para encuestar programas de control de paratuberculosis en todo el mundo, en esta revisión participaron 76 coautores de 48 países, el informe final reposa en el BMC Veterinary Research, se determinó que la enfermedad es común y notificable en la mayoría de los países participantes, solo 22 de 48 países tienen programas de control de los cuales 16 (73%) informan haber tenido éxito, países como Noruega y Suecia apuntan a erradicar la infección en sus hatos ganaderos (Johne's Information Center, s,f).

**2020:** Se realizará el próximo congreso International Colloquium on Paratuberculosis, en Dublín, en el que el Departamento de Sanidad Animal presentará los nuevos avances y resultados sobre el gran impacto de la paratuberculosis en la ganadería.

## 6. DISCUSIÓN

La sugerencia inicial de que MAP puede estar involucrado en la patogénesis de la Enfermedad de Crohn (EC), estaba basada en las semejanzas clínicas, las lesiones macroscópicas e histopatológicas con una inflamación granulomatosa característica, en la paratuberculosis bovina y EC, sin embargo, los signos clínicos como la diarrea, pueden no estar relacionado con la severidad de las lesiones histopatológicas y las infecciones multibacilares, esto argumenta que los signos clínicos en la paratuberculosis no son consecuencia directa de la presencia del MAP en el intestino, si no que, como en la EC los signos clínicos estarían mas relacionados con la respuesta inmune aberrante, y que los eventos inmunológicos en las dos enfermedades marcan la evolución de la enfermedad y que el daño inmunomediado secundario a la infección explican los hallazgos histopatológicos en la Enfermedad de Johne y la EC (Atreya *et al.*, 2014). Por otro lado, investigaciones actuales revelan la presencia de ADN de MAP y anticuerpo anti-MAP en sangre de pacientes con Enfermedad de Crohn y en personas sanas, lo que indica una exposición y susceptibilidad a la infección en humanos (Davis y Madsen, 2012).

Los primeros aislamientos de MAP en personas con EC en los años 80s sugieren la primera evidencia de un posible vínculo etiológico (Chiodini *et al.*, 1984), sin embargo, actualmente su aislamiento ha resultado difícil y pone en duda el vínculo del MAP en la patogénesis de la Enfermedad de Crohn, sin embargo, ante los intentos fallidos de visualización de las micobacterias por medio de tinción, se propone que MAP puede estar en forma de esferoplasto, una forma carente de pared celular que podría estar presente en el tejido infectado estimulando la respuesta inmunológica, además, el alto número de detección de MAP en personas sanas y los controles en las investigaciones hacen debatir su posible vínculo causal, asimismo, el uso de PCR para detectar ADN de MAP no permite concluir si el MAP necesita estar vivo para tener un efecto patogénico, además de abrir una discusión sobre el uso de PCR como prueba de detección de ADN de MAP en leche y productos lácteos, pues este no diferenciaría entre MAP vivo o inactivo, en cuanto a los estudios clínicos que utilizan antibióticos contra MAP muestran resultados variables pero no correlacionan sus resultados con la presencia de MAP en pacientes con Enfermedad de Crohn (Atreya *et al.*, 2014).

Por otro lado en la respuesta inmune, existen características comunes en la respuesta inflamatoria entre la paratuberculosis y la Enfermedad de Crohn, pues estas, involucran enteritis granulomatosa, linfocitos y macrófagos, así como, en las infecciones por micobacterias en humanos y la respuesta inmunológica, muestran un perfil celular dominado por células T CD4+, células Th1, Th17, Th22 y macrófagos con una respuesta de células CD8 menos amplia y secreción de IFN- $\gamma$ , IL-17, IL-22, IL23 y una mayor secreción de TNF- $\alpha$ , presente en la enteritis de personas con EC positivos a MAP, esto otorga evidencia de eventos inmunológicos que vincula micobacterias en la enfermedad inflamatoria intestinal, esto agrega evidencia adicional pues una característica clave de la patogenicidad del MAP es modular la respuesta de células TCD4+, además, los macrófagos son las células comunes en la respuesta inflamatoria de las dos enfermedades y tienen un papel crítico en el mantenimiento de la inflamación, podrían estos determinar las alteraciones histopatológicas mediadas por el sistema inmune.

En la tabla 5 se resume las pruebas a favor y en contra expuestas en la literatura consultada sobre la hipótesis del vínculo etiológico del *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* en la Enfermedad de Crohn.

**Tabla 5.** Pruebas a favor y en contra de la hipótesis del *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* como agente etiológico en la Enfermedad de Crohn

A FAVOR	EN CONTRA
Similitud de la sintomatología y las lesiones histopatológicas entre Enfermedad de Crohn y la Enfermedad de Johne	En seres humanos la enfermedad involucra el tracto gastrointestinal superior e inferior, en animales solo afecta el tracto gastrointestinal inferior.
Aislamiento del MAP en alimentos principalmente leche, carne y agua para consumo humano.	No existen pruebas de transmisión en seres humanos por consumo de alimentos infectados con MAP.

---

<p>Contacto directo de seres humanos con animales posiblemente infectados con MAP en producciones ganaderas.</p>	<p>Ausencia de estudios epidemiológicos que evalúen el riesgo de contacto en poblaciones humanas susceptibles.</p>
<p>Identificación de MAP en tejidos humanos en medio de cultivo.</p>	<p>Dificultad de aislar MAP en medios de cultivos de tejidos humanos debido su lento crecimiento y a la deficiencia de pared celular a diferencia de MAP en cultivos de tejidos bovinos.</p>
<p>Identificación de MAP mediante prueba analítica de PCR.</p>	<p>Genotipo de especies MAP aisladas de animales infectados y de individuos con Crohn difieren.</p>
<p>Mayor presencia de anticuerpos específicos contra MAP en pacientes con Enfermedad de Crohn.</p>	<p>Detección MAP en pacientes con colitis ulcerosa, voluntarios sanos o con otro tipo de enfermedad intestinal.</p>
<p>Aislamiento de MAP en leche de madres con Enfermedad de Crohn.</p>	<p>No hay evidencia sobre la transmisión de MAP de madre a hijo a través de la leche humana.</p>
<p>Kruiningen <i>et al.</i>, (1986) dando cumplimiento a los postulados de Koch produjo enteritis en un cabrito después de la inoculación de MAP aislado de pacientes con EC.</p>	<p>Kruiningen <i>et al.</i>, (2011), reitera el fracaso para establecer una conexión etiológica entre MAP con la Enfermedad de Crohn, considera que en los datos obtenidos en 1986 pudo haber contaminación cruzada lo que conllevó a resultados falsos positivos en animales.</p>

---

## 7. CONCLUSIONES

Aún no hay evidencia definitiva de un vínculo causal entre MAP y Enfermedad de Crohn y las consideraciones éticas interfieren en la investigación, estaría por aclarar si existe una asociación o causalidad del MAP en la Enfermedad de Crohn y el paso de la asociación epidemiológica a la causalidad en las enfermedades intestinales es difícil, el tracto gastrointestinal de los animales contiene una microbiota muy variada con interacciones complejas, por esta razón encontrar un microorganismo particular en intestino o en heces en enfermedades inflamatorias intestinales, no puede indicar que ese microorganismo es la causa de la enfermedad, por lo tanto, se debe tener en cuenta los modelos epidemiológicos de causalidad, el modelo de pastel de Rothman describe un complejo causal suficiente que está representado por la combinación de varias causas componentes (cortes en el pastel) y estos crean una causa suficiente para generar una enfermedad, además, se requiere la presencia de una causa necesaria que debe estar presente, pero que puede, no ser toda la causa de la enfermedad, siguiendo esta idea, existe la posibilidad que MAP sea una causa necesaria pero no suficiente de la Enfermedad de Crohn, por lo tanto no todas las personas positivas a MAP desarrollarían la enfermedad, como lo evidencia la detección de MAP en controles sanos y pacientes con colitis ulcerosa que implica que MAP por sí solo no es suficiente para causar EC y que MAP no daría inicio a la respuesta inflamatoria como único factor, en tanto, la existencia de una asociación no significa necesariamente que la relación sea causal, Si MAP contribuye a la patogénesis de la EC es probable que lo haga en condiciones complejas de interacción huésped – patógeno, que involucrarían una relación multifactorial entre defectos en las barreras físicas, factores genéticos, ambientales, microbianos, dietéticos y una respuesta inmune innata aberrante, por lo tanto MAP puede considerarse un factor de riesgo más, para desarrollar EC y alternativamente, MAP puede ser un colonizador secundario en la EC. (Uzoigwe *et al.*, 2007),

En conclusión la evidencia apunta a una capacidad zoonótica de MAP y la asociación de MAP con la Enfermedad de Crohn (EC) parece ser definitiva, aunque, el papel del MAP como agente etiológico en la EC no se ha demostrado y puede estar relegado a ser un factor adicional, pues la Enfermedad de Crohn no involucra una simple relación causa efecto y no nos podemos referir a causa y asociación como términos intercambiables y es necesario un vínculo epidemiológico establecido en los criterios de Hill, de los cuales se han cumplido 4 de los 6 criterios

epidemiológicos causales (fuerza de asociación, consistencia del efecto, temporalidad y plausibilidad biológica, donde la temporalidad resulta la evidencia mas importante y pueden estos criterios abordar las limitaciones de los postulados de Koch en la evaluación de las enfermedades crónicas y los postulados de Koch en los cuales el agente causal debe estar presente en cada caso de la enfermedad y ausente en animales sanos, debe aislarse de un animal enfermo y crecer en cultivo puro, al ser inoculado debe provocar la enfermedad en un animal susceptible y por ultimo el microorganismo debe ser aislado de nuevo de las lesiones producidas en los animales infectados experimentalmente (Koch, 1876), estos postulados debería aplicarse en seres humanos para dar respuesta a la interrogante. (Uzoigwe *et al.*, 2007; Lowe *et al.*, 2008; Atreya *et al.*, 2014).

## 8. RECOMENDACIONES

La infección interespecie y el aislamiento de MAP de biopsias de personas con Enfermedad de Crohn sugiere que la bacteria puede infectar el intestino de especies diferentes a los rumiantes (Shin *et al.*, 2015; Khol *et al.*, 2017; Zarei *et al.*, 2019) la evidencia respecto a la excreción de MAP en la leche y prácticas de consumir leche cruda o productos lácteos no pasteurizados, respalda la existencia de riesgo de infección y apunta a la leche como un vector (Bharathy *et al.*, 2017), además, la efectividad de la pasteurización para inactivar MAP no es completa, esto establece un escenario para la transmisión a humanos asociada al consumo de leche, derivados lácteos, así como, otras fuentes potenciales como carne, agua potable y vegetales cultivados en suelos y aguas de riego contaminados, por tanto se deben llevar a cabo estudios sobre la evaluación del riesgo asociado a la exposición (Waddell *et al.*, 2016).

La evidencia sostiene que existe asociación entre MAP y EC, con el debate abierto sobre un vínculo causal, se deben tomar medidas de control dirigidas a mitigar los posibles riesgos en la salud pública y limitar la exposición humana como principio de precaución, este control, no podría estar basado en el análisis de los productos alimenticios por la dificultad de análisis en tiempo real, pero se pueden emplear medidas como controles en los procesos de pasteurización y modificar los tiempos y la temperatura, para aumentar la probabilidad de inactivación y mejorar la detección de ADN de MAP en leche por PCR altamente sensible como fago-PCR para detectar MAP viable (Robertson *et al.*, 2017).

El MAP puede llegar a ser ubicuo en hatos donde se ha establecido la infección, debido a la excreción fecal y su supervivencia prolongada en medio ambiente, esto contribuye a la contaminación ambiental del suelo y de aguas superficiales, entonces, el control se debe enfocar en producción primaria, por lo tanto, la comunidad veterinaria y médica debe crear estrategias y medidas efectivas de control en los hatos, como la vacunación, terapias anti-MAP, estrategias de bioseguridad e higiene enfocadas en la erradicación de la enfermedad en el hato, así mismo, se requeriría la participación de entidades gubernamentales y agencias sanitarias como la FDA, la OMS, la OIE Y USDA que respalden las medidas de bioseguridad. (Groenendaal y Zagmutt, 2008)

En cuanto a las industrias, deberían mostrar a los consumidores los ajustes efectuados en los procedimientos de mitigación del riesgo y requerirá evidencia adicional de la efectividad de sus procesos de pasteurización comercial y extender sus controles a los proveedores de leche dirigidos a certificar hatos libres y evaluar higiene en el ordeño, esto puede ayudar a una percepción favorable del consumidor frente al riesgo, y a minimizar el impacto económico que significaría para la industria la posible zoonosis o asociación causal de MAP-EC, aun así y con la implementación de los controles la eficacia de la protección es incierta. (Groenendaal y Zagmutt, 2008)

El debate sobre la causa de las enfermedades inflamatorias intestinales (EII) continuará y las futuras investigaciones deben estudiar las interacciones complejas que se establecen en el ambiente intestinal entre el microbioma y los mecanismos inmunológicos del huésped, para dar claridad a los eventos inmunológicos que protegen o promueven la enfermedad, las EII se deben pensar como enfermedades dinámicas, multifactoriales y no unidireccionales para lograr evidenciar todos sus componentes causales y la existencia de un agente patógeno específico, así como los estudios futuros que evalúen la presencia de MAP en pacientes con EC deberán utilizar múltiples métodos de detección para verificar y confirmar resultados y resolver la relación de MAP en la EC, pues, el MAP representa una amenaza no solo en la salud animal sino también en la salud pública, con esto se lograra diseñar una evaluación de riesgos basada en la evidencia que ayude a mitigar las posibles consecuencias de la exposición humana a MAP. (Kuenstner *et al.*, 2017).

## 9. REFERENCIA BIBLIOGRAFÍA

1. Abrahams, K. Besra, G. (2018). Mycobacterial cell walls biosynthesis: a multifaceted antibiotic target. *Parasitology*, 145(2). Pp: 116–133.
2. Agrawal, G. Borody, T. Turner, R. Leis, S. Campbell, J. (2015). Combining infliximab, anti-MAP and hyperbaric oxygen therapy for resistant fistulizing Crohn's disease. *Future science OA*, 1(4).
3. Alcedo, K. Thanigachalam, S. Naser, S. (2016). RHB-104 triple antibiotics combination in culture is bactericidal and should be effective for treatment of Crohn's disease associated with *Mycobacterium paratuberculosis*. *Gut pathogens*, 8, 32.
4. Alegbeleye B. (2019). Crohn's disease in a developing African mission hospital: a case report. *Journal of medical case reports*, 13(1).
5. Al-Mamun, M. Smith, R. Nigsch, A. Schukken, Y. Gröhn, Y. (2018). A data-driven individual-based model of infectious disease in livestock operation: A validation study for paratuberculosis. *PLoS ONE*. Pp. 13(12).
6. Al-Mamun, M. Smith, R. Schukken, Y. Gröhn, Y. (2017). Use of an Individual-based Model to Control Transmission Pathways of *Mycobacterium avium* Subsp. *paratuberculosis* Infection in Cattle Herds. *Sci Rep. Nature Publishing Group*. 7 Pp. 11845.
7. Atreya, R. Bülte, M. Gerlach, G. Goethe, R. Hornef, M. Köhler, H. Meens, J. Möbius, P. Siegfried, E. (2014). Facts, myths and hypotheses on the zoonotic nature of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *International Journal of Medical Microbiology*, Volume 304, Issue 7. Pp: 858-867.
8. Ayele, W. Bartos, M. Svastova, P. Pavlik, I. (2004). Distribution of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in organs of naturally infected bull-calves' y breeding bulls. *Veterinary Microbiology*, 103(3-4), Pp. 209–217
9. Baars, J. Nuij, V. Oldenburg, B. Kuipers, E. Woude, C. (2012). Majority of patients with inflammatory bowel disease in clinical remission have mucosal inflammation. *Inflammatory Bowel Diseases*, 18(9). Pp: 1634–1640.
10. Bach, H. (2015). What Role Does *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* Play in Crohn's Disease? *Current Infectious Disease Reports*, 17(2).
11. Balasubramanian, I. Gao, N. (2017). From sensing to shaping microbiota: insights into the role of NOD2 in intestinal homeostasis and progression of Crohn's disease. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, 313(1)- Pp: G7–G13.
12. Bannantine, J. Huntley, J. Miltner, E. Stabel, J. Bermudez, L. (2003). The *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* 35 kDa protein plays a role in invasion of bovine epithelial cell *Microbiology* 149(8). Pp:2061-2069
13. Bannantine, J. Radosevich, T. Stabel, J. Berger, S. Griffin, J. Paustian, M. (2007). Production and characterization of monoclonal antibodies against a major membrane protein of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Clinical and vaccine immunology: CVI*, 14(3). Pp: 312–317.
14. Barratt, A. Arnoult, M. Ahmadi, B. Rich, K. Gunn, G. Stott, A. W. (2018). A framework for estimating society's economic welfare following the introduction of an animal disease: The case of Johne's disease. *PloS one*, 13(6).
15. Baumgart, D. Sandborn, W. (2012). Crohn's disease. *The Lancet*, 380(9853), 1590–1605.
16. Beaver, A. Sweeney, R. Hovingh, E. Wolfgang, D. Grohn, Y. Schukken, Y. (2017). Longitudinal relationship between fecal culture, fecal quantitative PCR, y milk ELISA in *Mycobacterium avium* ssp.

- Paratuberculosis* infected cows from low-prevalence dairy herds. *Journal of Dairy Science*, 100(9), Pp. 7507-7521.
17. Begg, D. Silva, K. Carter, N. Plain, K. Purdie, A. Whittington, R. (2011). Does a Th1 over Th2 dominancy really exist in the early stages of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infections? *Immunobiology*. 216. Pp: 840-846
  18. Bergey, D. Harrison, F. Breed, R. Hammer, B. Huntoon, F. (1923). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 1st ed. Baltimore, The Williams & Wilkins Co. Pp: 1-442.
  19. Bharathy, S. Gunaseelan, L. Porteen, K. (2017). Exploring the potential hazard of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* as a cause for Crohn's disease. *Veterinary world*, 10(4), Pp: 457–460.
  20. Bielanski, J. Algire, G. Ryall, O. Surujballi, (2006). Risk of transmission of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* by embryo transfer of in vivo y in vitro fertilized bovine embryos, *Theriogenology*, Pp. 66(2).
  21. Boada, E. Serramito, I. Sacristán, M. Boone, D. Pimentel, F. (2016). The T300A Crohn's disease risk polymorphism impairs function of the WD40 domain of ATG16L1. *Nature communications*, 7, 11821.
  22. Bonen, K. (2003). Crohn's disease-associated NOD2 variants share a signaling defect in response to lipopolysaccharide and peptidoglycan. *Gastroenterology*, Volume 124, Issue 1. PP: 140-146
  23. Bosca, M. Tosca, J. Anton, R. Mora, M. Minguez, M. Mora, F. (2015). Pathogenesis of Crohn's disease: Bug or no bug. *World journal of gastrointestinal pathophysiology*, 6(1). Pp: 1–12.
  24. Calderón, J. Góngora, A. (2008). Similitudes clinopatológicas entre paratuberculosis y Enfermedad de Crohn ¿posible vínculo zoonótico? *Rev MVZ Córdoba*; 13(1). Pp. 1226-1239.
  25. Cameron, R. Stevenson, K. Inglis, N. Klausen, J. Sharp, J. (1994). Identification and characterization of a putative serine protease expressed in vivo by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Microbiology* 140. Pp: 1977-1982.
  26. Carvalho, I. Schwarz, Germano, D. Pietralonga, P. Faria, A. Braga, I. Carvalho, G. Valente, F. Machado, J. Guimarães, L. Ferrari, M. Abreu, Silva, J. Moreira, M. (2016). Presence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) in Brazilian patients with inflammatory bowel diseases and in controls. *Sao Paulo Medical Journal*, 134(1). Pp: 13-19.
  27. Castellanos, E. Aranaz, A. Alvarez, J. Rodríguez, S. Romero, B. Domínguez, L. (2009). Single nucleotide polymorphisms in the IS900 sequence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* are strain type specific. *Journal of clinical microbiology*, 47(7), Pp. 2260–2264
  28. Chastellier, C. Thilo, L. (2006). Cholesterol depletion in *Mycobacterium avium*-infected macrophages overcomes the block in phagosome maturation and leads to the reversible sequestration of viable mycobacteria in phagolysosome-derived autophagic vacuoles. *Cellular Microbiology*. 8(2). Pp: 242 – 256
  29. Cheifetz A. (2013). Management of active Crohn disease. *JAMA*, 309(20). Pp: 2150–2158.
  30. Chiba, M. Tsuji, T. Nakane, K. Tsuda, S. Ishii, H. Ohno, H. Sugawara, T. (2017). Induction with Infliximab and a Plant-Based Diet as First-Line (IPF) Therapy for Crohn Disease: A Single-Group Trial. *The Permanente journal*, 21, 17–19.
  31. Chiaradia, L. Lefebvre, C. Parra, J. Marcoux, J. Burlet, O. Etienne, G. Tropis, M. & Daffé, M. (2017). Dissecting the mycobacterial cell envelope and defining the composition of the native mycomembrane. *Scientific Reports* volume 7, Article number: 12807.
  32. Chiodini, R. (1996). Immunology: Resistance to *Paratuberculosis*. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*. 12, (2). Pp: 313-343

33. Chiodini, R. Kruiningen, K. Thayer, W. Merkal, R. Coutu J. (1984). Possible role of mycobacteria in inflammatory bowel disease - I. An unclassified Mycobacterium species isolated from patients with Crohn's disease. *Digestive Diseases and Sciences*. 29(12). Pp: 1073-1079.
34. Chiodini, R. Kruiningen, V. Merkal, R. (1984). Characteristics of an unclassified *Mycobacterium* species isolated from patients with Crohn's disease. *J Clin Microbiol*: 20 Pp. 966–971.
35. Clarke, C. (1997). The pathology y pathogenesis of paratuberculosis in ruminant's and other species. *Journal of Comparative Pathology*, 116(3), 217–261.
36. Clay, H. Volkman, H. Ramakrishnan, L. (2008). Tumor necrosis factor signaling mediates resistance to mycobacteria by inhibiting bacterial growth and macrophage death. *Immunity*. 29. Pp: 283–294
37. Colleen, M. McClean, D. Tobin, M. (2016). Macrophage form, function, and phenotype in mycobacterial infection: lessons from tuberculosis and other diseases. *Pathogens and Disease*. 74, (7), 68.
38. Cooper, A. Dalton, D. Stewart, T. Griffin, J. Russell, D. Orme, I. (1993). Disseminated tuberculosis in interferon gamma gene-disrupted mice. *Journal of experimental medicine*. 178 (6): 2243
39. Corbett, C. De Buck, J. Orsel, K. Barkema, H. (2017). Fecal shedding y tissue infections demonstrate transmission of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in group-housed dairy calves. *Veterinary research*. 48(1), Pp. 27.
40. Corbett, C. Naqvi, S. Bauman, C. De Buck, Orsel, K. Uehlinger, F. Barkema, H. (2018). Prevalence of *Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis* infections in Canadian dairy herds. *Journal of Dairy Science*. 101. Vol. 12
41. Corridoni, D. Kodani, T. Rodriguez, A. Pizarro, T. Xin, W. Nickerson, K. Cominelli, F. (2014). Dysregulated NOD2 predisposes SAMP1/YitFc mice to chronic intestinal inflammation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(42), 16999–17004
42. Dalziel, T. (1913). Chronic interstitial enteritis. *British Medical Journal* vol. 2, no. 2756, Pp 1068-1070.
43. Davis, W. (2015). On deaf ears, *Mycobacterium avium paratuberculosis* in pathogenesis Crohn's y other diseases. *World journal of gastroenterology*, 21(48), Pp. 13411–13417.
44. Davis, W. (2015). Crohn's Disease of the Foregut. *Surgical Clinics of North America*, 95(6). PP: 1183–1193.
45. Davis, W. Kuenstner, J. Singh, S. (2017). Resolution of Crohn's "Johne's" disease with antibiotics: what are the next steps? *Expert Review of Gastroenterology & Hepatology*: 11:5. Pp. 393-396.
46. Davis, W. Ramakrishnan, L. (2009). The role of the granuloma in expansion and dissemination of early tuberculous infection. *Cell*. 136(1). Pp: 37-49.
47. Davis, W. Todd, J. Vir Singh, S. (2017) Resolution of Crohn's (Johne's) disease with antibiotics: what are the next steps? *Expert Review of Gastroenterology & Hepatology*, 11:5. Pp: 393-396
48. Davis, W. Sally A. Madsen-Bouterse. (2012). Crohn's disease *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis*: the need for a study is long overdue. *Veterinary immunology and immunopathology*. Volume 145(1-2) Pp:1-6.
49. Díaz, L. Hernández, R. Deshpande, A. Moshiree, B. (2015). Upper Gastrointestinal Involvement in Crohn Disease: Histopathologic and Endoscopic Findings. *South Med J*. 108(11). Pp: 695-700.
50. Eisenberg, S. W., Rutten, V. P. Koets, A. (2015). Dam *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (MAP) infection status does not predetermine calves for future shedding when raised in a contaminated environment: a cohort study. *Veterinary research*, 46(1), Pp. 70

51. Epleston, J. Whittington, R. (2001). Isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from the semen of rams with clinical Johne's disease. *Australian Veterinary Journal*, 79(11), Pp. 776–777.
52. Fawzy, A. Zschöckb, M. Ewersc, C. Eisenberg, T. (2018). Genotyping methods and molecular epidemiology of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP). *International Journal of Veterinary Science and Medicine*. 6(2). Pp: 258-264
53. Fayyazy, A. Eichmeyer, B. Soruri, A. Schweyer, S. Herms, J. Schwarz, P. Radzun, H. (2000). Apoptosis of macrophages and T cells in tuberculosis associated caseous necrosis. *The Journal of Pathology*. 191(4). Pp: 417-25.
54. Fechner, K. (2017). Distribution of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in clinically asymptomatic bull's y different non-ruminant species. University Göttingen, Germany
55. Fechner, K. Schäfer, J. Wiegel, C. Ludwig, J. Münster, P. Sharifi, A. Czerny, C. (2015). Distribution of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in a Subclinical Naturally Infected German Fleckvieh Bull. *Transboundary y Emerging Diseases*, 64(3), Pp. 916–928.
56. Fecteau, M. (2018). *Paratuberculosis* in cattle. *Veterinary clinics of north America: food animal practice*. 34(1). Pp: 209-222
57. Fernández, M. (2017). Influencia del agente etiológico y la respuesta inmunitaria local sobre la patogenia de la paratuberculosis de los rumiantes. Universidad de León. España
58. Fernández, M. Benavides, J. Castaño, P. Elguezabal, N. Fuertes, M. Muñoz, M. Pérez, V. (2017). Macrophage Subsets within Granulomatous Intestinal Lesions in Bovine paratuberculosis. *Veterinary Pathology*, 54(1), 82–93.
59. Fernandez, M. Fuertes, M. Elguezabal, N. Castaño, P. Royoa, M. Ferreras, C. Benavides, J. Pérez, V. (2017) Immunohistochemical expression of interferon- in different types of granulomatous lesions associated with bovine *paratuberculosis*. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*. 51. Pp: 1-8
60. Feuerstein, J. (2017). Crohn Disease: Epidemiology, Diagnosis, and Management. *Clinic Proceedings*, Volume 92, (7), Pp: 1088 – 1103.
61. Frade, S. Smol, T. Frenois, F. Sand, O. Vaillant, E. Dhennin, V. Vasseur, F. (2019). A Novel Rare Missense Variation of the *NOD2* Gene: Evidences of Implication in Crohn's Disease. *International journal of molecular sciences*, 20(4). P: 835.
62. Franchi, L. Muñoz, R. Núñez, G. (2012). Sensing and reacting to microbes through the inflammasomes. *Nature immunology*, 13(4). Pp: 325–332.
63. Freeman, H. (2014). Natural history and long-term clinical course of Crohn's disease. *World journal of gastroenterology*, 20(1). Pp: 31–36.
64. From history of Johne's disease. Johne's Information Center. (2014). Available from: <http://www.johnes.org/history/index.html>
65. Frothingham, R. Wilson, K. (1993). Sequence-based differentiation of strains in the *Mycobacterium avium* complex. *J Bacteriol* 175 Pp. 2818–25.
66. García, A. Shalloo, L. (2015). Invited review: The economic impact and control of *paratuberculosis* in cattle *J. Dairy Sci.* 98. Pp: 5019–5039
67. Garvey, M. (2018). *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*: A possible causative agent in human morbidity and risk to public health safety. *Open veterinary journal*, 8(2). Pp: 172–181.
68. Gautam, M. Ridler, A. Wilson, A review of paratuberculosis in New Zealand's pastoral livestock systems with a focus on current control strategies Milan Gautam, Anne Ridler, Peter Wilson and Cord Heuer

69. Geller, S. Campos, F. (2015). Crohn disease. *Autopsy & case reports*, 5(2), 5–8. doi:10.4322/acr.2015.001
70. Ghosh, P. Wu, C. Talaat, A. (2013). Key role for the alternative sigma factor, SigH, in the intracellular life of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* during macrophage stress. *Infection and immunity*, 81(6). Pp: 2242–2257.
71. Giese, S. Ahrens, P. (2000). Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk from clinically affected cows by PCR and culture. *Veterinary Microbiology*. Volume 77, Issues 3–4, 20. Pp: 291-297
72. Gilmour, N. Nisbet, D. Brotherston, J. (1965). Experimental oral infection of calves with *Mycobacterium johnei*. *Journal of Comparative Pathology*, 75(3), Pp. 281–286.
73. Glanemann, B. Schönenbrücher, H. Bridger, N. Abdulmawjood. A. Neiger, R. Bülte, M (2008). Detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*-specific DNA by PCR in intestinal biopsies of dogs. *J Vet Intern Med.* (5):1090-4.
74. Golan, A. Livneh, E. Gonen, S. Yagel, I. Rosenshine, N. Shpige, Y. (2009). *Mycobacterium avium paratuberculosis* Invades Human Small-Intestinal Goblet Cells and Elicits Inflammation. *The Journal of Infectious Diseases*. 199 (3,1). Pp: 350–354.
75. Gomollón, F. Dignass, A. Annese, V. Tilg, H. Van Assche, G. Lindsay, J. (2016). 3rd European Evidence-based Consensus on the Diagnosis and Management of Crohn's Disease 2016: Part 1: Diagnosis and Medical Management. *Journal of Crohn's and Colitis*, 11(1). Pp: 3–25.
76. Góngora, A. Perea, J. (1984). Evaluación de tres métodos diagnósticos en paratuberculosis bovina. [Tesis]. Bogotá, Colombia. UNAL.
77. Góngora, A. Villamil, J. (1999). La paratuberculosis bovina desde la óptica de la salud pública. *Holstein Colomb* 147:44-48
78. González, J. Geijo, M. García, C. Verna, A. Corpa, J. Reyes, L. Ferreras, M. Juste, R. García, J. Pérez, V. (2005). Histopathological classification of lesions associated with natural paratuberculosis infection in cattle. *J Comp Pathol.* 133:184–196.
79. Gorocica, P. Jiménez, M. Garfias, S. Lascurain, R. (2005). Componentes glicosilados de la envoltura de *Mycobacterium tuberculosis* que intervienen en la patogénesis de la tuberculosis. *Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias*, 18(2), 142-153.
80. Hampe, J. Franke, A. Rosenstiel, P. Till, A. Teuber, M. Huse, K. Schreiber, S. (2006). A genome-wide association scan of nonsynonymous SNPs identifies a susceptibility variant for Crohn disease in ATG16L1. *Nature Genetics*, 39(2). Pp: 207–211
81. Harris, N. Barletta, R. (2001). *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Veterinary Medicine. *Clinical microbiology reviews*, 14(3). Pp: 489–512.
82. Hemati, Z. Haghkhah, M. Derakhshandeh, A. Singh, S. Chaubey, K. (2018). Cloning and characterization of MAP2191 gene, a mammalian cell entry antigen of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Molecular biology research communications*, 7(4). Pp: 165–172.
83. Hett, E. Rubin, E. (2008) Bacterial growth and cell division: a mycobacterial perspective. *Microbiol Mol Biol Rev* 72. Pp: 126-56
84. Hirst, H. Garry, F. Salman, M. (2002). Assessment of test results when using a commercial enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of paratuberculosis in repeated samples collected from adult dairy cattle. *J Am Vet Med Assoc.* 2002 220(11), Pp.1685-9.

85. Homuth, M. Valentin, P. Rohde, M. Gerlach, G. (1998). Identification and characterization of a novel extracellular ferric reductase from *Mycobacterium paratuberculosis*. *Infection and immunity*, 66(2)-Pp: 710–716.
86. Jo, E. Kim, J. Shin, D. M. Sasakawa, C. (2016). Molecular mechanisms regulating NLRP3 inflammasome activation. *Cellular & molecular immunology*, 13(2). Pp: 148–159.
87. Johansen, M. de Silva, K. Karren M. Whittington, J. Purdie, A. (2019) *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* is able to manipulate host lipid metabolism and accumulate cholesterol within macrophages. *Microbial Pathogenesis*. 130, 44-53.
88. Kampen, H. Johansen T. Valheim, M. HoPp, P. (2015). The surveillance programme for paratuberculosis in Norway 2014. Surveillance programmes for terrestrial y aquatic animals in Norway. Annual report 2014. Oslo. *Norwegian Veterinary Institute*.
89. Khamesipour, F. Doosti, A. Mazrouei S., M. (2014). Survey for the Presence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in the Bull Frozen Semen Samples y Blood Samples of Cattle, Sheep y Camel by Nested-PCR. *Kafkas Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi* 20, Pp. 681-686.
90. Khan, I. Pilli, S. Rampal, R. Chauhan, S. Tiwari, V. Ahuja, V. (2016). Prevalence and Association of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* with Disease Course in Patients with Ulcer-Constrictive Ileocolonic Disease. *PloS one*, 11(3).
91. Khanna, S. Raffals, L. (2017). The Microbiome in Crohn's Disease. *Gastroenterology Clinics of North America*, 46(3). Pp: 481–492.
92. Khol, J. Kralik, P. Slana, I. Beran, V. Aurich, C. Baumgartner, W. Pavlik, I. (2010). Consecutive Excretion of *Mycobacterium avium* Subspecies *paratuberculosis* in Semen of a Breeding Bull Compared to the Distribution in Feces, Tissue y Blood by IS900 y F57 Quantitative Real-Time PCR y Culture Examinations. *Journal of Veterinary Medical Science*, 72(10), Pp. 1283–1288.
93. Khol, J. Wassertheurer, M. Sodoma, E. Revilla-Fernyez, S. Damoser J. Osterreicher, E. Dunser, M. Baumgartner W. (2013). Long-term detection of *mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in individual y bulk tank milk from a dairy herd with a low prevalence of Johne's disease *Journal of Dairy Science*, 96(6), Pp. 3517-3524
94. Kindt, T. J., Goldsby, R. A., Osborne, B. A., & Kuby, J. (2007). *Kuby immunology*. New York: W.H. Freeman
95. Koets, A. Hoek, A. Langelaar, M. Overdijk, M. Santema, W. Franken, P. Eden, W. Rutten V. (2006). Mycobacterial 70 kD heat-shock protein is an effective subunit vaccine against bovine *paratuberculosis*. *Vaccine*, 24(14)
96. Koch, R. 1876. The etiology of anthrax, based on the life history of *Bacillus anthracis*. *Beiträge zur Biologie der Pflanzen* 2(2), 277-310
97. Köhler, H. Soschinka, A. Meyer, M. Kather, A. Reinhold, P. Liebler-Tenorio, E. (2015). Characterization of a caprine model for the subclinical initial phase of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection. *BMC veterinary research*, 11, 74. doi:10.1186/s12917-015-0381-1
98. Kredel, L. Jödicke, L. Scheffold, A. Gröne, J. Glauben, R. Erben, U. Siegmund, B. (2018). T-cell composition in ileal and colonic creeping fat - separating ileal from colonic Crohn's disease. *Journal of Crohn's and Colitis*.
99. Krüger, C. Köhler, H. Liebler, E. (2015). Cellular composition of granulomatous lesions in gut-associated lymphoid tissues of goats during the first year after experimental infection with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Veterinary Immunology y Immunopathology*, 163(1-2), Pp. 33–45.

100. Kruij, T. Muskens, J. Roermund, H. Bakker, D. Stockhofe-Zurwieden, N. (2003). Lack of association of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* with oocytes y embryos from moderate shedders of the pathogen. *Theriogenology*, 59(7), 2003, Pp. 1651-1660.
101. Kruiningen, H. (2011). Where are the weapons of mass destruction — the Mycobacterium paratuberculosis in Crohn's disease? *Journal of Crohn's and Colitis*, Volume 5, Issue 6. Pp: 638–644.
102. Kruiningen H. Chiodini, R. Thayer, W. Coutu, J. Merkal, R. (1986). Experimental disease in infant goats induced by a *Mycobacterium* isolated from a patient with Crohn's disease. A preliminary report. *Dig Dis Sci* 31. Pp: 1351-1360
103. Kuehnel, M. Goethe, R. Habermann, A. Mueller, E. Rohde, M. Griffiths, G. Weigand, P. (2001). Characterization of the intracellular survival of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*: phagosomal pH and fusogenicity in J774 macrophages compared with other mycobacteria. *Cellular Microbiology*. 3(8). Pp: 551-566
104. Kuenstner, J. Chamberlin, W. Naser, S. Collins, M. Dow, C. Aitken, J. Petrie, T. (2015). Resolution of Crohn's disease and complex regional pain syndrome following treatment of *paratuberculosis*. *World journal of gastroenterology*, 21(13). Pp: 4048–4062.
105. Kuenstner, J. Kali, M. Welch, C. (2019). Whole exome sequencing of patients who resolved Crohn's disease and complex regional pain syndrome following treatment for *paratuberculosis*. *Gut pathogens*, 11, 34.
106. Kuenstner, J. Naser, S. Chamberlin, W. Borody, T. Graham, D. McNees, A. Kuenstner, L. (2017). The Consensus from the *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP) Conference 2017. *Frontiers in public health*, 5, 208.
107. Kuenstner, J. Saleh, M. Chamberlin, W. Borody, T. Graham, D. McNees, A. Hermon-Taylor, J. Hermon-Taylor, A. Dow, T. Biesecker, T. Collins, M. Sechi, L. Singh, S. Zhang, P. Shafran, I. Weg, S. Telega, G. Rothstein, R. Oken, H. Schimpff, S. Bach, H. Bull, T. Grant, I. Ellingson, J. Dahmen, H. Lipton, J. Gupta, S. Chaubey, K. Manj Singh, M. Agarwal, P. Kumar, A. Misri, J. Sohal, J. Dhama, K. Hemati, Z. Davis, W. Hier, M. Aitken, J. Pierce, E. Parrish, N. Goldberg, N. Kali, M. Bendre, S. Agrawal, G. Baldassano, R. Linn, P. Sweeney, R. Fecteau, M. Hofstaedter, C. Potula, R. Timofeeva, O. Geier, S. Zayanni, N. Malaty, H. Kahlenborn, C. Kravitz, A. Bulfon, A. Daskalopoulos, G. Mitchell, H. Neilan, B. Timms, V. Cossu, D. Mameli, G. Angermeier, P. Jelic, T. Goethe, R. Juste, R. Kuenstner, L. (2017). The Consensus from the *Mycobacterium avium* ssp. *Paratuberculosis* (MAP) Conference *Frontiers in public health*, 5, 208.
108. Lambrecht, R. Carriere, J. Collins, M. (1988). A model for analyzing growth kinetics of a slowly growing *Mycobacterium* sp. *Appl Environ Microbiol* 54 Pp.910–6.
109. Larsen, A. Kopecky, K. (1970). *Mycobacterium paratuberculosis* in reproductive organs y semen of bulls. *American Journal of Veterinary Research*. 31(2): Pp. 255–258
110. Lavoie, S. Conway, K. L. Lassen, K. G. Jijon, H. B. Pan, H. Chun, E. Xavier, R. J. (2019). The Crohn's disease polymorphism, *ATG16L1* T300A, alters the gut microbiota and enhances the local Th1/Th17 response. *eLife*, 8, e39982.
111. Lingling, Li. Bannantine, J. Zhang, Q. Amonsin, A. May, B. Alt, D. Banerji, N. Kanjilal, S. Kapur, V. (2005). The complete genome sequence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 102(35) Pp. 12344–12349.
112. Liu, J. Barry, C. Besra, G. Nikaido, H. (1996). Mycolic acid structure determines the fluidity of the mycobacterial cell wall. *J Biol Chem*. 22; 271(47): Pp: 29545-51.

113. Liu, Q. Zhang, D. Hu, D. Zhou, X. Zhou, Y. (2018). The role of mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. *Molecular Immunology*, 103. Pp: 115–124.
114. Lowe, A. cedric P. Yansouni, Marcel A Behr. (2008). Causality and gastrointestinal infections: Koch, hill and crohn`s, the lancet. *Infectious diseases*. Volume 8 (11), Pp: 720-726. H. Groenendaal, F.J. Zagmutt. (2008). Scenari Analysis of changes in consumption of dairy products caused by a hypothetical causal link between mycobacterium avium subspecies paratuberculosis and crohn`s disease. *Journal of dairy science*. Volume 91 (8) Pp: 3245-3258
115. Mahapatra, S. Scherman, H. Brennan, P. Crick, D. (2005). N Glycolylation of the nucleotide precursors of peptidoglycan biosynthesis of Mycobacterium sPp. is altered by drug treatment. *Journal of bacteriology*, 187(7). Pp: 2341–2347.
116. Matt, D. Silva, K. Karren, M. Whittington, R. Purdie, A. (2019). *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* is able to manipulate host lipid metabolism and accumulate cholesterol within macrophages. *Microbial Pathogenesis*. 130. Pp: 44-53.
117. Magombedze G, Ngonghala CN, Lanzas C (2013) Correction: Evaluation of the “Iceberg Phenomenon” in Johne's Disease through Mathematical Modelling. *PLOS ONE* 8(11):
118. McAloon, C. Roche, S. Ritter, C. Barkema, H. Whyte, P. More, S. Doherty, M. (2019). A review of paratuberculosis in dairy herds Part 1: Epidemiology. *The Veterinary Journal*.264. Pp. 59-65.
119. McClean, C. Tobin, D. (2016). Macrophage form, function, and phenotype in mycobacterial infection: lessons from tuberculosis and other diseases. *Pathogens and disease*, 74(7).
120. McNees, A. Markesich, D. Zayyani, N. Graham, D. (2015). *Mycobacterium paratuberculosis* as a cause of Crohn's disease. *Expert review of gastroenterology & hepatology*, 9(12). Pp: 1523–1534.
121. Mehto, S. Jena, K. Nath, P. Chauhan, S. Kolapalli, S. Das, S. Chauhan, S. (2019). The Crohn's Disease Risk Factor IRGM Limits NLRP3 Inflammasome Activation by Impeding Its Assembly and by Mediating Its Selective Autophagy. *Molecular cell*, 73(3), 429–445.e7.
122. Mehto, U. Kumar, K. Nath, P. Chauhan, S. Prasad, S. Kumar, S. Kumar, P. Ashish, S. Gregory, A. Chauhan, S. (2019). The Crohn’s Disease Risk Factor IRGM Limits NLRP3 Inflammasome Activation by Impeding Its Assembly and by Mediating Its Selective Autophagy, *Molecular Cell*, Volume 73, Issue 3. Pp: 429-445
123. Mocchi, G. Migaleddu, V. Cabras, F. Sirigu, D. Scanu, D. Virgilio, G. & Marzo, M. (2017). SICUS and CEUS imaging in Crohn's disease: an update. *Journal of ultrasound*, 20(1), 1–9.
124. Mohammad, T. Nader, M. Mohammad, Keyvan Taday M. Rouholah, K. Reza, A. Kioomars, S. Shojaat, D. (2016). Rapid identification of *Mycobacterium avium* ssp *paratuberculosis* laboratory strains by IS900-Nested polymerase chain reaction. *International Journal of Mycobacteriology*, 5(1), PP. S232-S233
125. Mortier, R. Barkema, H. Orsel, K. Wolf, R. De Buck, J. (2014). Shedding patterns of dairy calves experimentally infected with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Veterinary research*, 45(1), Pp. 71.
126. Münster, P. Völkel, I. Wemheuer, W. Schwarz, D. Döring, S. Czerny, C. (2012). A Longitudinal Study to Characterize the Distribution Patterns of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* in Semen, Blood y Faeces of a Naturally Infected Bull by IS900 Semi-Nested and Quantitative Real-Time PCR. *Transboundary y Emerging Diseases*, 60(2), Pp. 175–187.
127. Munjal, S. Tripathi, B. Paliwal, O. (2005). Progressive immunopathological changes during early stages of experimental infection of goats with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Vet. Pathol.* 42, 427–436.

128. Murthy, A. Li, Y. Peng, I. Reichelt, M. Katakam, A. K. Noubade, R. Campagne, M. (2014). A Crohn's disease variant in Atg1611 enhances its degradation by caspase 3. *Nature*, 506(7489). Pp: 456–462.
129. Naylor, D. Richardson, D. Sellar, M. Harley, J. Philbey, A. Girling, S. (2018). Clinical signs, antemortem diagnostics, and pathological findings associated with *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* infection in *Mishmi takin (Budorcas taxicolor taxicolor)*. *J Zoo Wildl Med.* 49(2). Pp: shin412-419
130. National Research Council (US) Committee on Diagnosis and Control of Johne's Disease. Diagnosis and Control of Johne's Disease. Washington (DC): National Academies Press (US); 2003. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK207652/>
131. Nazareth, N. Magro, F. Appelberg, R. Silva, J. Gracio, D. Coelho, R. Sarmento, A. (2015). Increased viability but decreased culturability of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in macrophages from inflammatory bowel disease patients under Infliximab treatment. *Medical Microbiology and Immunology*, 204(6). Pp: 647–656.
132. Nazareth, N. Magro, F. Machado, E. Ribeiro, T. Martinho, A. Rodrigues, P. Sarmento, A. (2015). Prevalence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and *Escherichia coli* in blood samples from patients with inflammatory bowel disease. *Medical Microbiology and Immunology*, 204(6), Pp: 681–692.
133. Ni, J. Shen, T. Chen, E. Bittinger, K. Bailey, A. Roggiani, M. Wu, G. (2017). A role for bacterial urease in gut dysbiosis and Crohn's disease. *Science translational medicine*, 9(416).
134. Nielsen, N. (2008). Ante mortem diagnosis of *paratuberculosis*: A review of accuracies of ELISA, interferon- $\gamma$  assay and faecal culture techniques. *Veterinary Microbiology* 129 (3–4 22). Pp: 217-235
135. Nicol, L. Wilkie, H. Gossner, A. Watkins, C. Dalziel, R., Hopkins, J. (2016). Variations in T cell transcription factor gene structure and expression associated with the two disease forms of sheep paratuberculosis. *Veterinary research*, 47(1), 83. doi:10.1186/s13567-016-0368-3
136. OIE (2019). Paratuberculosis. Recuperado el 15 de mayo de 2019. Disponible en web:<http://www.oie.int/es/sanidad-animal-en-el-mundo/enfermedades-de-los-animales/Paratuberculosis/>
137. OIE. (2018). Código sanitario para los animales terrestres. Volumen I. Capítulo 8.13 paratuberculosis.
138. Oken, H. Saleeb, P. Redfield, R. Schimpff, S. (2017). Is *Mycobacterium avium paratuberculosis* the Trigger in the Crohn's Disease Spectrum? *Open forum infectious diseases*, 4(3).
139. Okuni, J. Kateete, D. Okee, M. Nanteza, A. Joloba, M. Ojok, L. (2017). Application of antibodies to recombinant heat shock protein 70 in immunohistochemical diagnosis of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in tissues of naturally infected cattle. *Irish veterinary journal*, 70, 10.
140. Pandey, A. Sasseti, C. (2008). Mycobacterial persistence requires the utilization of host cholesterol. *PNAS*. 105 (11). Pp: 4376-4380
141. Paquet, N. Glickman, J. Erturk, S. Ros, P. Heverhagen, J. Patak, M. (2016). Crohn's disease Activity: Abdominal Computed Tomography Histopathology Correlation. *European journal of radiology open*, 3. Pp: 74–78.
142. Park, H. Park, H. Park, W. (2018). Genetic diversity of bovine *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* discriminated by IS1311 PCR-REA, MIRU-VNTR, y MLSSR genotyping. *J Vet Sci.* 19(5): Pp.627–634.
143. Park, J. Nam, H. Lee, J. Hong, J. Yi, D. Ryoo, E. Tchah, H. (2017). Characteristics of Upper Gastrointestinal Tract Involvement in Korean Pediatric Crohn's Disease: A Multicenter Study. *Pediatric gastroenterology, hepatology & nutrition*, 20(4). Pp: 227–235.

144. Pearson, L. (1908). A note on the occurrence in America of chronic bacterial dysentery of cattle" *Am. Vet. Rev.* 32: Pp. 602-605-
145. Pérez, V, García, J. Badiola, J. (1996). Description and classification of different types of lesion associated with natural paratuberculosis infection in sheep. *J Comp Pathol.* 114:107–122.
146. Pérez, V. Vázquez, P. Fernández, M. Ferreras, M. (2012). Control de la paratuberculosis. *Pequeños Rumiantes.* 13: 52- 59.
147. Peyrin, L. Gonzalez, F. Dubuquoy, L. Rousseaux, C. Dubuquoy, C. Decourcelle, C. Desreumaux, P. (2012). Mesenteric fat as a source of C reactive protein and as a target for bacterial translocation in Crohn's disease. *Gut,* 61(1). Pp: 78–85.
148. Pieper, L. Ulrike, I. Godkin, A. Trevor, D., Lissemore, K. Kelton, D. (2014) Management Practices Their Potential Influence on Johne's Disease Transmission on Canadian Organic *Dairy Farms—A Conceptual Analysis Sustainability.* 6 Pp. 8237-8261.
149. Pimentel, A. Rocha, R. Santana, G. (2019). Crohn's disease of esophagus, stomach and duodenum. *World journal of gastrointestinal pharmacology and therapeutics,* 10(2). Pp: 35–49.
150. Pisanu, S. Cubeddu, T. Cacciotto, C. Pilicchi, Y. Pagnozzi, D. Uzzau, S. Addis, M. F. (2018). Characterization of paucibacillary ileal lesions in sheep with subclinical active infection by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Veterinary research,* 49(1), 117.
151. Pospischil, A. (2015). Human y animal health on three continents a biography of the early life of Karl Friedrich Meyer (1884–1974). *Pathogens y Disease,* Volume 73, Issue 6, August
152. Pott, J. Basler, T. Duerr, C. Rohde, M. Goethe, R. Hornef, M. (2009). Internalization-dependent recognition of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* by intestinal epithelial cells. *Cellular Microbiology.* 11(12). Pp: 1802–1815
153. Qasem, A. Naser, S. A. (2018). TNF $\alpha$  inhibitors exacerbate *Mycobacterium paratuberculosis* infection in tissue culture: a rationale for poor response of patients with Crohn's disease to current approved therapy. *BMJ open gastroenterology,* 5(1)-
154. Qian, X. Wang, T. Shen, J. & Ran, Z. (2018). Low dose of azathioprine is effective to induce and maintain remission in active Crohn disease: A prospective observational study. *Medicine,* 97(34).
155. Radostits, G. Gay, C. Hinchcliff, K. (2007). Paratuberculosis (Johne's disease). En: *Veterinary Medicine.* 10th ed. Elsevier Saunders. Londres. Reino Unido. Pp. 1017-1044.
156. Radostits, O. Blood, D. Gay, C. (1994). In: *Veterinary Medicine,* 8th Edit., Baillière Tindalls London, Pp. 841-850.
157. Raizman, E. Fetrow, J. WellsLoss, S. (2009). Loss of income from cows shedding *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* prior to calving compared with cows not shedding the organism on two Minnesota dairy farms. *J. Dairy Sci.* 92, Pp. 4929-4936.
158. Ramakrishnan, L. (2012). Revisiting the role of the granuloma in tuberculosis. *Nature Reviews Immunology.* 12. Pp: 352 – 366.
159. Ramírez, V. Rodríguez, B. Fernández, S. (2011). Diagnóstico clínico e histopatológico de paratuberculosis bovina en un hato lechero en Colombia. *Revista MVZ Córdoba,* 16(3), 2742-2753.
160. Rathnaiah, G. Zinniel, D. Bannantine, J. Stabel, J. Gröhn, Y. Collins, M. Barletta, R. (2017) Pathogenesis, Molecular Genetics, y Genomics of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, the Etiologic Agent of Johne's Disease. *Front. Vet. Sci.* 4:187.
161. Ratledge, C. (1982). Nutrition, Growth and Metabolism. En: Ratledge, C. y Stanford, J. editores. *Physiology, Identification and Classification. The Biology of the Mycobacteria.* Pp. Academic Press. London. Pp: 185-271.

162. Rosenberger, R. Sweeney, R. Whitlock, A. (1992). *Mycobacterium paratuberculosis* isolated from fetuses of infected cows not manifesting signs of the disease. *Am. J. Vet. Res.*, 53. Pp.477-480
163. Roberson, R. Oliver Cerf, Robin J. Condrón, John A. Donaghy, Claus Heggum, Keiran Jordan. (2017). Review of the controversy over whether or not *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* poses a food safety risk with pasteurized dairy products. *International dairy journal*. Volume 73 Pp: 10-18
164. Raja Atreya, Michael Bulte, Gerald-F Gerlach, Ralph Goethe, Mathias W. Hornef, Heike Kohler, Jochen Meens, Petra Mobius, Elke Roeb, Siegfried Weiss. (2014). Facts, myths and hypotheses on the zoonotic nature of *mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *International journal of medical microbiology*. Volume 304 (7), Pp: 858-867.
165. Runyon, E. (1959). Anonymous *Mycobacteria* in Pulmonary Disease. *Medical Clinics of North America*, 43(1), 273–290. doi:10.1016/s0025-7125(16)34193-
166. Rutgeerts, P. Feagan, B. Lichtenstein, G. Mayer, L. Schreiber, S. Colombel, J. (2004). Comparison of scheduled and episodic treatment strategies of infliximab in Crohn's disease. *Gastroenterology*. 126: 402-13.
167. Salem, M. Ammitzboell, M. Nys, K. Seidelin, J. Nielsen, O. (2015). *ATG16L1*: A multifunctional susceptibility factor in Crohn disease. *Autophagy*, 11(4). Pp: 585–594.
168. Schukken, Y. Whitlock, R. Wolfgang, D. Grohn, Y. Beaver, A., VanKessel, J. Mitchell, R. (2015). Longitudinal data collection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infections in dairy herds: the value of precise field data. *Veterinary research*, 46(1), Pp. 65
169. Sechi, L. Dow, C. (2015). *Mycobacterium avium* ss. *paratuberculosis* Zoonosis - The Hundred Year War - Beyond Crohn's Disease. *Frontiers in immunology*, 6, 96.
170. Sergeant, E. McAloon, C. Tratalos, J. Citer, L. Graham, L. More, S. (2019) Evaluation of national surveillance methods for detection of Irish dairy herds infected with *Mycobacterium avium* ssp. *Paratuberculosis*. *Journal of Dairy Science*. 102(3). Pp: 2525-2538
171. Sevilla, I. (2007). Caracterización molecular, detección y resistencia de *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. Tesis doctoral. Universidad del País Vasco
172. Shin, M. Seung, Shin, Myunghwan, J. Hongtae, P. Hyun, P. Han Sang, Y. (2015). Host gene expression for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in human THP-1 macrophages, *Pathogens and Disease*, Volume 73, Issue 5.
173. Shin, M. Park, H. Shin, S. Jung, M. Lee, S. Kim, D. Yoo, H. (2015). Host Transcriptional Profiles and Immunopathologic Response following *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* Infection in Mice. *PloS one*, 10(10),
174. Sidiq, T. Yoshihama, S. Downs, I. Kobayashi, K. (2016). Nod2: A Critical Regulator of Ileal Microbiota and Crohn's Disease. *Frontiers in immunology*, 7, 367.
175. Sigur, O. Dardo, T. PRESS, O. (2001). Uptake of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* through the Distal Small Intestinal Mucosa in Goats: An Ultrastructural Study. *Veterinary pathology*. 38. Pp:184–189
176. Silva, K. Douglas, J. Karren, M. Auriol, C. Purdie, A. Navneet, K. Dhand, R. Whittington, R. (2013). Can early host responses to mycobacterial infection predict eventual disease outcomes? *Preventive Veterinary Medicine* 112 (3–4). Pp: 203-212.
177. Silva, K. Karren, A. Douglas, R. (2018). Defining resilience to mycobacterial disease: Characteristics of survivors of ovine *paratuberculosis*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 195. Pp: 56-64.

178. Silva, F. Gatica, T. Pavez, C. (2019). Etiología y fisiopatología de la enfermedad inflamatoria intestinal. *Revista medica clínica los condes*. volumen 30 (4) Pp: 262-272.
179. Singh, A. Chauhan, D. Singh, S. Kumar, V. Yadav, V. (2016). Current status of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection in animals & humans in India: What needs to be done? *The Indian journal of medical research*, 144(5). Pp: 661–671.
180. Singh, P. Katoch, V. Mohanty, K. K. & Chauhan, D. (2016). Analysis of expression profile of mce operon genes (mce1, mce2, mce3 operon) in different *Mycobacterium tuberculosis* isolates at different growth phases. *The Indian journal of medical research*, 143(4). Pp: 487–494.
181. Singh, S. Davis, A. Taylor, G. Deretic, V. (2006). Human IRGM Induces Autophagy to Eliminate Intracellular Mycobacteria. *Science*, 313(5792). Pp: 1438–1441.
182. Singh, S. Kuenstner, J. Davis, W. Agarwal, P. Kumar, N. Singh, D. Dhama, K. (2016). Concurrent Resolution of Chronic Diarrhea Likely Due to Crohn's Disease and Infection with *Mycobacterium avium paratuberculosis*. *Frontiers in medicine*, 3, 49.
183. Singh, S. Vihan, V. (2004). Detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in goat milk, small *Ruminant Research*, 54, (3), Pp. 231-235
184. Sohal, J. Arsenault, J. Labrecque, O. Fairbrother, J. Roy, J. Fecteau, G. L'Homme, Y. (2014). Genetic structure of *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* population in cattle herds in Quebec as revealed by using a combination of multilocus genomic analyses. *J Clin Microbiol*.52. Pp. 2764–2775.
185. Stabel, J. Bradner, L. S. Robbe-Austerman, A. Beitz, D. (2014). Clinical disease y stage of lactation influence shedding of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* into milk y colostrum of naturally infected dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 97(10), PP. 6296-6304
186. Stinson, K. Baquero, M. Plattner, B. (2018). Resilience to infection by *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* following direct intestinal inoculation in calves. *Veterinary research*, 49(1), Pp. 58.
187. Sweeney, R. (2011). Pathogenesis of *paratuberculosis*. *Veterinary clinics of north America: food animal practice*. 27(3). Pp: 537-546
188. Sweeney, R. Uzonna, A. Whitlock, R. Habecker, P. Chilton, P. Scott, P. (2006). Tissue predilection sites and effect of dose on *Mycobacterium avium* subs. *paratuberculosis* organism recovery in a short-term bovine experimental oral infection model. *Research in Veterinary Science*. 80. Pp: 253–259
189. Sweeney, R. Whitlock, R. Rosenberger, A. (1992). *Mycobacterium paratuberculosis* cultured from milk and supramammary lymph nodes of infected asymptomatic cows. *Journal of clinical microbiology*, 30(1). Pp: 166–171.
190. Teimoori, L. Samadpoor, S. Mehrtash, A. Ghadir, M. Vahedi, H. (2018). Among autophagy genes, ATG16L1 but not IRGM is associated with Crohn's disease in Iranians. *Gene*, 675. Pp: 176–184.
191. Thorel, M. Krichevsky, M. Levy-Frebault, V. (1990) Numerical taxonomy of mycobactin-dependent mycobacteria, emended description of *Mycobacterium avium*, and description of *Mycobacterium avium* subsp. *avium* subsp. nov. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* subsp. nov. and *Mycobacterium avium* subsp. *silvaticum* subsp. nov. *Int J Syst Bacteriol* 40: 254-260.
192. Timms, V. Daskalopoulos, G. Mitchell, H. Neilan, B. (2016). The Association of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* with Inflammatory Bowel Disease. *PloS one*, 11(2).
193. Tiwari, A. VanLeeuwen, J. McKenna, S. Keefe, G. Barkema, H. (2006). Johne's disease in Canada Part I: clinical symptoms, pathophysiology, diagnosis, y prevalence in dairy herds. *The Canadian veterinary journal = La revue veterinaire canadienne*, 47(9), Pp. 874–882.

194. Torres, J. Mehandru, S. Colombel, J.-F. & Peyrin-Biroulet, L. (2017). Crohn's disease. *The Lancet*, 389(10080). Pp: 1741–1755.
195. Tracey, C. Pritchard, M. Coffey, K. Bond, M. Hutchings, E. (2017). Phenotypic effects of subclinical paratuberculosis (Johne's disease) in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, Volume 100(1), Pages 679-690.
196. Tschurtschenthaler, M. Adolph, T. Ashcroft, J. Niederreiter, L. Bharti, R. Saveljeva, S. Kaser, A. (2017). Defective ATG16L1-mediated removal of IRE1 $\alpha$  drives Crohn's disease-like ileitis. *The Journal of experimental medicine*, 214(2). Pp: 401–422.
197. Tunkle, B. Aleraj, Z. (1965): The recovering of *M. johnei* in the semen of bull from one station for artificial insemination. *Vet. Glasnik*, 19, Pp. 845–849.
198. Twort, F. Ingram, G. Ingram, Y. (1912). A method for isolating y cultivating *Mycobacterium enteritidis chronicae pseudotuberculosis* bovis johne y some experiments on the preparation of a diagnostic vaccine for pseudotuberculosis enteritis of bovines. *Proc Royal Soc Lond* 84:517
199. Ubhash, M. Kautilya, J. Parej, N. Swati, C. Srinivasa, P. Saroj, K. Pradyumna, K. Sahoo, A. Gregory, A. Santosh, C. (2019). The Crohn's Disease Risk Factor IRGM Limits NLRP3 Inflammasome Activation by Impeding Its Assembly and by Mediating Its Selective Autophagy, *Molecular Cell*, Volume 73, Issue 3. Pp: 429-445.
200. Uzoigwe, J. Khaita, M. Gibbs, P. (2007). Epidemiological evidence for mycobacterium avium subspecies paratuberculosis as cause of crohn's disease. *Epidemiology infects*. Volume 135, Pp: 1057-1068.
201. Venkata S. Dukkipati, A. Ridler, K. Thompson, B. Buddle, B. Hedgespeth, M. Douglas J. Begg, J. Whittington, B. (2016). Experimental infection of New Zealand Merino sheep with a suspension of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis (Map) strain Telford: Kinetics of the immune response, histopathology and Map culture. *Veterinary Microbiology*, Volume 195, Pp: Pages 136-143
202. Wang, J. Moolji, J. Dufort, A. Staffa, A. Domenech, P. Reed, M. Behr, M. (2015). Iron Acquisition in *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Journal of bacteriology*, 198(5). Pp: 857–866.
203. Waddell, L. Rajic, A. Stark, K. Mcewen, S. (2016). *Mycobacterium avium* ssp paratuberculosis detection in animals, food, water and other sources or vehicles of human exposure: A scoping review of the existing evidence. *Preventive veterinary medicine*. Volume 132 Pp: 32-48.
204. Wing Yan Mak, Ailsa L Hart, Siew C Ng. (2019). Crohn's disease. *Medicine*, Volume 47 (6).Pp:377-387
205. Wayne, L. (1966) Classification and identification of mycobacteria. 3. Species within group 3. *Am Rev Respir Dis* 93. Pp: 919-928
206. Whitlock, R. H., & Buergelt, C. (1996). Preclinical and Clinical Manifestations of Paratuberculosis (Including Pathology). *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 12(2), 345–356.
207. Whittington, R. Begg, D. de Silva, K. Purdie, A. Dhy, N. Plain, K. (2017). Case definition terminology for paratuberculosis (Johne's disease). *BMC veterinary research*, 13(1), Pp. 328.
208. Whittington, R. Begg, D. Silva, K. Karren, A. (2012). Comparative immunological and microbiological aspects of *paratuberculosis* as a model mycobacterial infection. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 148(1–2)- Pp: 29-47
209. Whittington, R. Windsor, P. (2009). In utero infection of cattle with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: A critical review y meta-analysis. *The Veterinary Journal*.179

210. Wu, C. Schmoller, S. Bannantine, J. Eckstein, T. Inamine, J. Livesey, M. Talaat, A. (2009). A novel cell wall lipopeptide is important for biofilm formation and pathogenicity of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Microbial pathogenesis*, 46(4). Pp: 222–230.
211. Yu, Y. Rodriguez, J. (2017). Clinical presentation of Crohn's, ulcerative colitis, and indeterminate colitis: Symptoms, extraintestinal manifestations, and disease phenotypes. *Seminars in Pediatric Surgery*, 26(6). Pp: 349–355.
212. Zamani, S. Zali, M. Aghdaei, H. Sechi, L. Niegowska, M. Caggiu, E. Feizabadi, M. (2017). *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and associated risk factors for inflammatory bowel disease in Iranian patients. *Gut pathogens*, 9, 1.
213. Zanten, G. Knudsen, A. Röytiö, H. Forssten, S. Lawther, M. Blennow, A. Jespersen, L. (2012). The effect of selected synbiotics on microbial composition and short-chain fatty acid production in a model system of the human colon. *PLoS one*, 7(10), e47212.
214. Zarei, F. Geramizadeh, B. Khodakaram, A. (2019). Prevalence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* IS 900 DNA in biopsy tissues from patients with Crohn's disease: histopathological and molecular comparison with Johne's disease in Fars province of Iran. *BMC infectious diseases*, 19(1), 23.
215. Zhang, P. Minardi, L. Kuenstner, J. Kruzelock, R. (2017). *Mycobacterium avium* subspecies *hominissuis* in Crohn's disease: a case report. *Gastroenterology report*, 5(4), Pp: 316–319.
216. Zielińska, A. Siwiński, P. Sobolewska, A. Wiśniewska, M. Fichna, J. Włodarczyk, M. (2019). The role of adipose tissue in the pathogenesis of Crohn's disease. *Pharmacological Reports*, Volume 71, (1). Pp: 105-111
217. Zielińska, M. Jarmuż, A. Wasilewski, A. Sałaga, M. Fichna, J. (2015). Role of Transient Receptor Potential Channels in Intestinal Inflammation and Visceral Pain: Novel Targets in Inflammatory Bowel Diseases, *Inflammatory Bowel Diseases*, Volume 21, Issue 2, 1, Pp: 419–427.