

***Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* en heces de bovinos del municipio de Sincelejo, Sucre, Colombia**

***Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* IN BOVINE FAECES FROM THE MUNICIPALITY OF SINCELEJO, SUCRE, COLOMBIA**

Libardo Caraballo-Blanco^{1,3}, Anais Castellar-Martínez¹, Enrique Pardo-Pérez²

RESUMEN

El objetivo del estudio fue determinar la presencia de *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* (MAP) en heces de bovinos del municipio de Sincelejo, Sucre, Colombia. Se realizó un estudio bacteriológico directo por técnicas de microscopía y reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para pools de heces con dos marcadores moleculares, uno específico para MAP (IS900) y otro basado en 16S del género *Mycobacterium*. La presencia de bacilos ácido-alcohol resistentes (BAAR) se dio en el 21.1% de las muestras de heces teñidas con Ziehl Neelsen. Tres pools resultaron positivos con IS900 y tres con 16S. La secuenciación indicó la presencia de tres especies de bacterias: MAP, *Mycobacterium abscessus* y *Dietzia timorensis*. Se identifica por primera vez la presencia de MAP en el departamento de Sucre.

Palabras clave: *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*; PCR; enfermedades del ganado; Sincelejo; paratuberculosis

ABSTRACT

The objective of the study was to determine the presence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) in cattle faeces from the municipality of Sincelejo, Sucre, Colombia. A direct bacteriological study was performed by microscopy techniques and polymerase chain reaction (PCR) for pools of faeces with two molecular markers, one specific for MAP (IS900) and another based on 16S of the genus *Mycobacterium*. The presence of acid-fast bacilli occurred in 21.1% of the faecal samples stained with Ziehl Neelsen. Three pools were positive with IS900 and three with 16S. The sequencing

¹ Grupo de Investigaciones Biomédicas, Universidad de Sucre, Sucre, Colombia

² Grupo de Investigaciones GENES, Universidad de Córdoba, Córdoba, Colombia

³ E-mail: libardo.caraballo@unisucra.edu.co

Recibido: 5 de enero de 2018

Aceptado para publicación: 26 de junio de 2018

indicated the presence of three species of bacteria: MAP, *Mycobacterium abscessus* and *Dietzia timorensis*. The presence of MAP in the department of Sucre is identified for the first time.

Key words: *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis*; PCR; cattle diseases; Sincelejo; paratuberculosis

INTRODUCCIÓN

El agente causal de la paratuberculosis o enfermedad de Johne's es un *Mycobacterium* del complejo avium (MAC), conocido como *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP). Es una bacteria pequeña, ácido alcohol resistente y no tuberculosa (McNees *et al.*, 2015). En el bovino causa una enteritis crónica granulomatosa que se caracteriza por largos periodos de incubación, pérdida de peso, diarrea, caquexia progresiva y muerte (Gilardoni *et al.*, 2016). A nivel económico, MAP induce grandes pérdidas en el sector ganadero, inducidos principalmente por la disminución de la producción de leche, los efectos adversos en el rendimiento reproductivo y el aumento de las tasas de sacrificio (Britton *et al.*, 2016).

Existe un amplio rango de técnicas usadas para detectar la infección por MAP en bovinos, pero su funcionalidad puede variar dependiendo de la etapa de la infección de la enfermedad. Whitlock *et al.* (2000) describen tres estados de infección con MAP: (1) los bovinos no excretan MAP en las heces y no presentan signos clínicos, (2) los bovinos excretan MAP en las heces, pero no exhiben signos clínicos de la enfermedad, y (3) los bovinos excretan MAP y presentan signos clínicos de la enfermedad (Britton *et al.*, 2016). Es por esto que se debe tener presente la clínica presentada por el bovino para utilizar una prueba diagnóstica que arroje resultados acordes con la infección del animal.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por su sigla en inglés) ofrece un método rápido, rentable y de alto rendimiento para

evaluar el estado del MAP en una serie de muestras, incluyendo cultivos, heces, tejidos y leche. Esta técnica puede adaptarse para detectar diferentes dianas genéticas, tales como la secuencia de inserción (IS) IS900 o IS1311. La IS900-PCR se utiliza comúnmente para analizar muestras, debido a que es una secuencia con aproximadamente 15 copias dentro del genoma de MAP, lo cual la hace altamente sensible, aunque también puede ser encontrada en otras especies de micobacterias, de allí que sea necesario emplear otro gen diana o blanco al momento de hacer el diagnóstico por PCR.

Conocido el impacto de la ganadería en la economía nacional y los problemas que genera MAP al sector ganadero, se justifica tener métodos de diagnóstico que permitan una detección temprana de hatos con vacas infectadas a fin de desarrollar estrategias que permitan controlar los brotes y pérdidas para los ganaderos. Además, conociendo la relación aparente entre MAP y la enfermedad de Crohn, y que la leche y sus derivados son una vía de transmisión del microorganismo, se requiere desarrollar estrategias de vigilancia para un monitoreo de la leche que sale de los predios ganaderos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Zona de Estudio

El estudio se realizó en el departamento de Sucre, municipio de Sincelejo, en fincas de los corregimientos de San Antonio, Sabanas de Potrero, Las Huertas, Buena Vista, Buenavística, San Jacinto, vía a Chochó, vía a Las Palmas y La Garita. El municipio de

Sincelejo tiene un área de 292 km². Las actividades económicas de mayor importancia son la ganadería, especialmente de vacunos, la agricultura y el comercio. Sincelejo es uno de los municipios ganaderos más importantes en todo el departamento (IGAC, 1996).

Tamaño de Muestra

El tamaño de muestra se calculó con base a una población de 31 376 de vacunos en el municipio de Sincelejo, con un error del 5%, un nivel de confianza del 95% y considerando que 50% de la población se encuentra en riesgo de padecer la enfermedad. El número de muestra resultante fue de 268 individuos. Las fincas se agruparon por conglomerados y de cada grupo se hizo un muestreo aleatorio simple.

Recolección de Muestras

Se muestrearon bovinos de todas las edades, con previa firma de un consentimiento informado por los dueños o encargados de los predios, donde se explicaban los fines, beneficios, objetivos del estudio y potenciales riesgos según lo establecido en la resolución 08430 de 1993 del Ministerio de Salud de Colombia.

Se recolectaron muestras de heces directamente del recto de cada animal, introduciendo el brazo protegido con un guante desechable que lo cubría hasta por encima del codo. A unos 20 cm de haber introducido el brazo se cogía la muestra y al sacar el brazo se invertía el guante para evitar contacto de las heces con el medio exterior. Se sellaba y mantenía a 4 °C en una caja de poliestireno expandido con gel refrigerante hasta su procesamiento.

Identificación de Bacilos Ácido Alcohol Resistentes (BAAR)

Se realizaron frotis de heces, se colorearon con el reactivo de Ziehl Neelsen y fueron observados al microscopio a 100X

para la identificación de bacilos ácido-alcohol resistentes (Bernardelli, 2000).

Extracción de ADN y PCR

Las muestras de heces fueron agrupadas en pooles de cinco individuos según la finca donde fueron colectadas. A cada pool se le hizo extracción de ADN empleando el método desarrollado por Garrido *et al.* (2000), con algunas modificaciones. En breve, del método indicado solo se utilizó la parte correspondiente a la precipitación del ADN con SDS al 5% y lavados consecutivos con PBS 1X. Seguido a esto, se procedió a extraer el ADN con TRIzol® Reagent, siguiendo las indicaciones del inserto del reactivo. Los extractos de ADN fueron cuantificados en un NanoDrop 2000 y diluidos 1/10 para la reacción de PCR (Cuadro 1). Los productos fueron corridos en un gel de agarosa al 1.8%, teñidos con Gel Start durante 40 minutos a 80 v. Luego fueron visualizados haciendo uso de un fotodocumentador. Una muestra se consideró positiva al presentar el tamaño del fragmento génico de interés y, además, por ser similar al control positivo utilizado (ADN de MAP aislado de un bovino en Antioquía). Como control negativo se utilizó agua ultra pura. Los productos PCR positivos fueron enviados a secuenciar a Macrogen (Corea del Sur).

Los resultados de la secuenciación fueron analizados con el programa MEGA 6 (Tamura *et al.*, 2013) y la comparación de homología de secuencias se realizó con la base de datos GenBank.

Al momento de la toma de muestras se tomaron datos sobre el sexo, edad, ocurrencia de cuadros diarreicos y estado físico del animal, tipo de explotación ganadera, manejo de las excretas, fuentes de agua para el consumo animal, así como la población total y destino de la producción, con la finalidad de evaluar la asociación de estos factores con la presencia de la enfermedad (Sánchez-Villalobos *et al.*, 2009).

Cuadro 1. Cebadores y programas utilizados para las pruebas de PCR

Cebadores	Secuencias	Tamaño del producto	Concentraciones y volúmenes finales	Programas
IS900 (Sanderson <i>et al.</i> , 1992; Stabel <i>et al.</i> , 2004)	IS900F 5'-CCG CTA ATT GAG AGA TGC GAT TGG-3' IS900R 5'-AAT CAA CTC CAG CAG CGC GGC CTC G-3'	229 pb	Mix 25 µl, buffer 10X 2.5 µl, MgCl ₂ a 1 mM 1 µl, dNTPs a 0.2 mM 2.5 µl, cebador a 10 pmol (c/u) 0.25 µl, Taq 1U/µl 0.2 µl, ADN 3 µl	5' a 94 °C, 35 ciclos (45" a 94 °C, 30" a 60 °C, 45" a 72 °C) y 10' a 72 °C
16S rRNA (Tevere <i>et al.</i> , 1996; Hsiao <i>et al.</i> , 2003)	KY 75 5'GCC CGT ATC GCC CGC ACG CTC ACA-3' KY 18 5'CAC ATG CAA GTC GAA CGG AAA GG-3'	565-590pb	Mix 25 µl, buffer 10X 2.5 µl, MgCl ₂ a 1.5 mM 1.5 µl, dNTPs a 0.2 mM 2.5 µl, cebador a 10 pmol (c/u) 0.25 µl, Taq 1U/µl 0.2 µl, ADN 3 µl	5' a 95 °C, 35 ciclos (20" a 94 °C, 30" a 65 °C, 45" a 72 °C) y 10' a 72 °C

Cuadro 2. Distribución porcentual de las 26 fincas seleccionadas para el muestreo de *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis*, según el corregimiento, Municipio de Sincelejo, Colombia

Corregimiento	Porcentaje
Buenavista	19.2
Buenavística	7.7
La Garita	3.8
Las Huertas	15.4
Sabana del Potrero	23.1
San Jacinto	7.7
Vía a Chochó	19.2
Vía Las Palmas	3.8
Total	100

Análisis Estadístico

Se hizo un análisis descriptivo de los datos, seguido de una prueba exacta de Fisher para determinar posibles asociaciones entre las variables con los resultados del PCR. El valor de significancia utilizado fue de $p < 0.05$.

El análisis fue corrido en el programa InfoStat, versión estudiantil.

RESULTADOS

Se visitaron 26 fincas correspondientes a ocho corregimientos del municipio de Sincelejo (Cuadro 2), tomándose muestras de heces a 275 bovinos. Las muestras se agruparon en 57 pooles. La mayor proporción de animales estuvo en los rangos de >1 y 3 (36%) y >3 y 5 (40%) (Figura 1). Así mismo, el 98.9% (272/275) fueron hembras, dado que se trabajó con ganado lechero.

Del total de las muestras coloreadas con la técnica de Zielh Neelsen, 58 de 275 (21.1%) resultaron sospechosas al visualizarse la presencia de los bacilos de una tonalidad rosa en las placas (Figura 2).

La mayor cantidad de individuos con sospecha de excreción de MAP en las heces provenían de fincas de los corregimientos de Buenavista (16/61), Sabanas del Potrero (13/

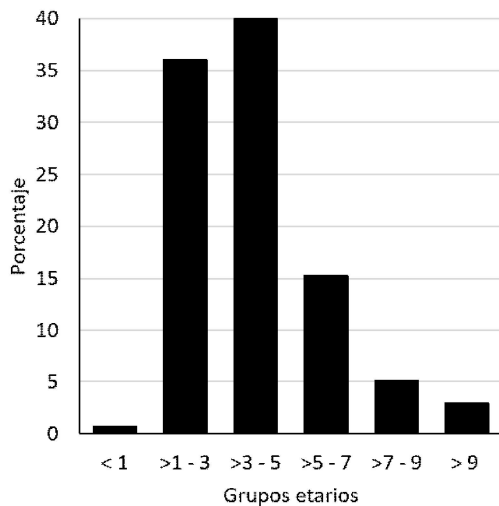


Figura 1. Distribución porcentual de los grupos etarios de bovinos muestreados en el Municipio de Sincelejo

52) y Las Huertas (10/33). Así mismo, la mayor cantidad de individuos sospechosos por Ziehl Neelsen se encontraba en el rango de edad >1 y 3 (8.4%).

Mediante el análisis por PCR utilizando los cebadores de la secuencia de inserción IS900 se detectó ADN de MAP en tres pooles

de heces que correspondían a tres fincas (11.5%, 3/26), dos del corregimiento de Buenavista y una de la Vía a Chochó (Figura 3). Por otro lado, al utilizar los cebadores basados en el gen 16S de *Mycobacterium* se detectó ADN en tres muestras (11.5%, 3/26) distintas a las obtenidas con IS900 (Figura 4).

Las muestras detectadas con IS900 indican que, en efecto, el ADN extraído correspondía a MAP, indicando la presencia de la bacteria en el municipio de Sincelejo y por extensión en el departamento de Sucre; hecho que fue sustentado por los resultados de la secuenciación, donde las secuencias obtenidas fueron homólogas a secuencias registradas en la base de datos GenBank con un 99% de identidad. Por otro lado, la secuenciación del segmento del gen 16S indicó la presencia de *Mycobacterium abscessus* y *Dietzia timorensis*, dos especies de bacterias dentro del orden Actinomycetales.

El análisis de asociación de las variables registradas durante la toma de las muestras con la detección de MAP en heces no mostró relación estadística.

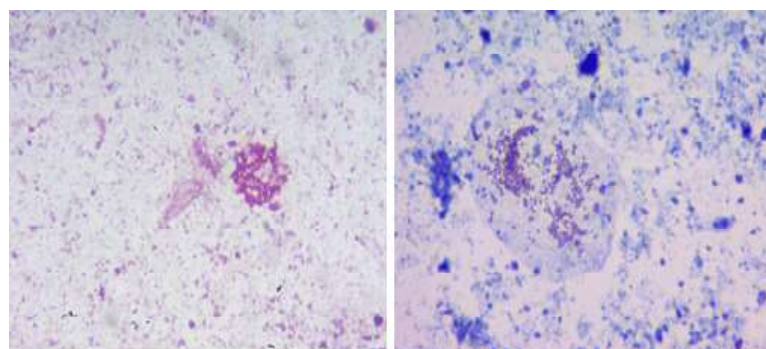


Figura 2. Bacilos ácido alcohol-resistentes en frotis de heces de bovinos del municipio de Sincelejo. 100X

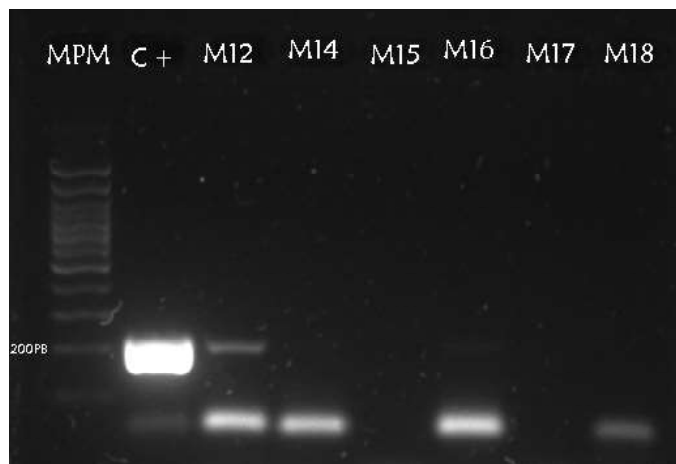


Figura 3. Electroforesis en gel de Agarosa para detección de MAP. MPM: marcador de peso molecular de 100pb; C+: control positivo; M: muestras

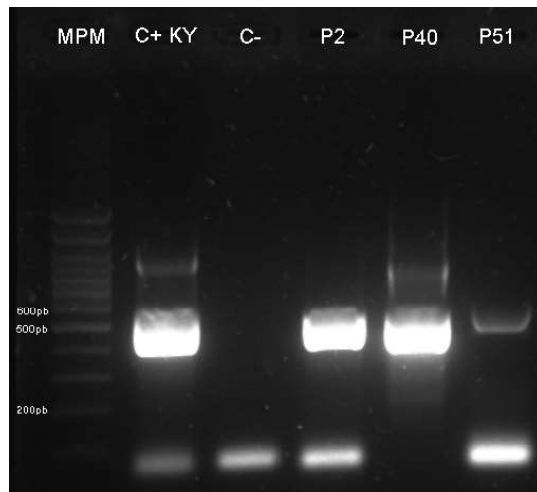


Figura 4. Electroforesis en gel de Agarosa para detección del gen 16S de *Mycobacterium*. MPM: marcador de peso molecular de 100pb; C+: control positivo; C-: control negativo; P: muestras

DISCUSIÓN

La paratuberculosis se conoce en Colombia desde 1924, cuando fue diagnosticada por primera vez en la hacienda El Hato en Usme, cerca de Bogotá. Posteriormente, el Instituto Colombiano Agropecuario (ICA) reportó casos entre 1986 y 1993 en el departamento del Meta (Góngora y Villamil, 1999).

En años más recientes, se han reportado casos en el Municipio de San Pedro de los Milagros, Antioquia, en una de las fincas lecheras del departamento (Zapata Restrepo *et al.*, 2008), mientras que en Nariño se encontró un seroprevalencia del 94% (Benavides *et al.*, 2015); sin embargo, aún no existe un programa de trabajo sólido que ayude a comprender el comportamiento de la paratuberculosis en los hatos ganaderos del país.

En este estudio se determinó por primera vez la presencia de MAP en heces de bovinos del departamento de Sucre, con un acercamiento inicial mediante la tinción de Ziehl Neelsen, donde el 21.1% de las muestras sugerían la presencia de BAAR. Dichos resultados son consistentes con los trabajos de Méndez *et al.* (2013), quienes obtuvieron 8.2% (6/136) de muestras de heces con la presencia de bacilos sugestivos de MAP, y con el estudio de Weber *et al.* (2009) con 27.3% (538/1968) de muestras positivas por Ziehl Neelsen.

Hasta este punto, se tenía indicios de la presencia de MAP en fincas ganaderas del municipio de Sincelejo, lo cual enciende las alarmas debido al problema de salud pública que es la paratuberculosis. Los resultados llevan a sospechar que a través de la leche también se esté excretando la bacteria, al encontrarse que la mayoría de vacas sospechosas se encuentran entre >1 y 3 años de edad, que es la edad promedio en que las vacas inician su mayor producción lechera (Bolívar *et al.*, 2009). Sin embargo, solo se puede hablar de bovinos con sospecha de estar excretando MAP, dado que la técnica de tinción de Ziehl Neelsen solo produce un diagnóstico presuntivo debido a la existencia de otros grupos de bacterias con características ácido alcohol-resistentes como *Nocardia*, *Clostridium* y Actinobacterias (Zimmer *et al.*, 1999; Negroni, 2009; Weber *et al.*, 2009; Méndez Olvera *et al.*, 2013).

Con IS900-PCR se pudo identificar los predios con presencia real de MAP en vacas en estado subclínico. El 11.5% de frecuencia de infección fue relativamente similar al 29.5% (7/27) encontrado por Correa (2016) utilizando un juego de cebadores de la IS900. Así mismo, Douarre *et al.* (2010) detectaron ADN de MAP en el 36.2% (105/290) de muestras colectadas en siete fincas de Irlanda con antecedentes clínicos de enfermedad de Johne.

Se reconoce que el uso directo de la PCR en ADN extraído de material fecal facilita el diagnóstico de la enfermedad de Johne en comparación con el cultivo (3 días vs. 14-22 semanas); además, es una prueba relativamente económica barata que permite evaluar un número representativo de animales de un hato (Douarre *et al.*, 2010). Por ello, es de suponer que al detectar ADN de MAP en un individuo, se debe considerar en estado infeccioso y, por ende, todo el predio se debe considerar en riesgo.

La mayoría de vacas en las fincas positivas a MAP estaban entre un rango de edad de >3 y <7 años, lo que concuerda con la historia natural de la enfermedad, considerando que el periodo de incubación de la infección es de aproximadamente 5 años (Salgado *et al.*, 2013; Benavides *et al.*, 2015). Sin embargo, no se halló asociación significativa con esta variable, dado posiblemente porque en este periodo de la enfermedad hay poca evidencia de la excreción de MAP (Windsor y Whittington, 2010).

CONCLUSIONES

Mycobacterium avium subespecie *paratuberculosis* (MAP) está presente en el municipio de Sincelejo y por extensión en el departamento de Sucre.

Agradecimientos

Los autores agradecen a los propietarios de las fincas, al veterinario de FEDEGAN Fredy Beleño, a Nathalia María del Pilar Correa y al Dr. Jorge Fernández Silva del grupo CENTAURO de la Universidad de Antioquia, al proyecto Formación de Capacidades en Ciencia, Tecnología e Innovación en el departamento de Sucre, Caribe, a la gobernación de Sucre, al GRUBIODEQ de la Universidad de Córdoba y al Grupo Biomédicas de la Universidad de Sucre.

LITERATURA CITADA

1. **Benavides B, Arteaga AV, Montezuma CA. 2015.** Estudio epidemiológico de paratuberculosis bovina en hatos lecheros del sur de Nariño, Colombia. *Rev Med Vet* 31: 57-66.
2. **Bernardelli A. 2000.** Manual de procedimiento técnico: diagnóstico de paratuberculosis. México: SENASA. 74 p.
3. **Bolívar DM, Echeverry JJ, Restrepo LF, Cerón MF. 2009.** Productividad de vacas Jersey, Holstein y Jersey x Holstein en una zona de bosque húmedo montano bajo (Bh-MB). *Livestock Res Rural Dev* 21(6). [Internet]. Disponible en: <http://www.lrrd.org/lrrd21/6/boli210-80.htm>
4. **Britton LE, Cassidy JP, O'Donovan J, Gordon SV, Markey B. 2016.** Potential application of emerging diagnostic techniques to the diagnosis of bovine Johne's disease (paratuberculosis). *Vet J* 209: 32-39. doi: 10.1016/j.tvjl.2015.-10.033
5. **Correa N. 2016.** Diagnosis and risk factors of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) in dairy herds of the Northern Region of Antioquia, Colombia. Tesis de Maestría. Colombia: Univ. de Antioquia. 164 p.
6. **Douarre P, Cashman W, Buckley J, Coffey A, O'Mahony J. 2010.** Isolation and detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) from cattle in Ireland using both traditional culture and molecular based methods. *Gut Pathog* 2: 11-18. doi: 10.1186/1757-4749-2-11
7. **Garrido JM, Cortabarría N, Oguiza JA, Aduriz G, Juste RA. 2000.** Use of a PCR method on fecal samples for diagnosis of sheep paratuberculosis. *Vet Microbiol* 77: 379-386. doi: 10.1016/S0378-1135(00)00323-0
8. **Gilardoni LR, Fernández B, Morsella C, Mendez L, Jar AM, Paolicchi FA, Mundo SL. 2016.** *Mycobacterium paratuberculosis* detection in cow's milk in Argentina by immunomagnetic separation-PCR. *Braz J Microbiol* 47: 506-512. doi: 10.1016/j.bjm.2016.01.013
9. **Góngora A, Villamil L. 1999.** La paratuberculosis bovina desde la óptica de la salud pública. *Holstein Colomb* 147: 44-48.
10. **Hsiao PF, Tzen CY, Chen HC, Su HY. 2003.** Polymerase chain reaction based detection of *Mycobacterium tuberculosis* in tissues showing granulomatous inflammation without demonstrable acid-fast bacilli. *Int J Dermat* 42: 281-286. doi: 10.1046/j.1365-4362.2003.01461.x
11. **[IGAC] Diccionario geográfico de Colombia. 1996.** Bogotá: Instituto geográfico Agustín Codazzi. 620 p.
12. **McNees AL, Markesich D, Zayyani NR, Graham DY. 2015.** *Mycobacterium paratuberculosis* as a cause of Crohn's disease. *Expert Rev Gastroent* 9: 1523-1534. doi: 10.1586/17474124.-2015.1093931
13. **Méndez ET, Ramírez IN, Rojas N, Olivares JL, Martínez D. 2013.** Detección de *Mycobacterium avium paratuberculosis* en caprinos ubicados en una zona semi-árida en el municipio de Tecozautla Hidalgo. *Rev Salud Anim* 35: 182-188.
14. **Negrón M. 2009.** Microbiología estomatológica: fundamentos y guía práctica. 2º ed. Médica Panamericana. 656 p.
15. **Salgado M, Steuer P, Troncoso E, Collins MT. 2013.** Evaluation of PMS-PCR technology for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* directly from bovine fecal specimens. *Vet Microbiol* 167: 725-728. doi: 10.1016/j.vetmic.2013.09.009
16. **Sánchez-Villalobos A, Arráiz-Rodríguez N, Becerra-Ramírez L, Faria N, Montero-Urdaneta M, Oviedo-Bustos A, Pino-Ramírez D. 2009.** Infección por *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* en un rebaño criollo limonero. *Rev Cient LUZ* 19: 555: 565.

17. **Sanderson JD, Moss MT, Tizard ML, Hermon-Taylor J. 1992.** *Mycobacterium paratuberculosis* DNA in Crohn's disease tissue. *Gut* 33: 890-896. doi: 10.1136/gut.33.7.890
18. **Stabel J, Bosworth T, Kirkbride T, Forde R, Whitlock R. 2004.** A simple, rapid, and effective method for the extraction of *Mycobacterium paratuberculosis* DNA from fecal samples for polymerase chain reaction. *J Vet Diagn Invest* 16: 22-30. doi: 10.1177/1040638-70401600105
19. **Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipowski A, Kumar S. 2013.** MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* 30: 2725-2729. doi: 10.1093/molbev/mst197
20. **Tevere VJ, Hewitt PL, Dare A, Hocknell P, Keen A, Spadaro JP, Young KK. 1996.** Detection of *Mycobacterium tuberculosis* by PCR amplification with pan-*Mycobacterium* primers and hybridization to an *M. tuberculosis*-specific probe. *J Clin Microbiol* 34: 918-923.
21. **Weber MF, Verhoeff J, van Schaik G, van Maanen C. 2009.** Evaluation of Ziehl-Neelsen stained faecal smear and ELISA as tools for surveillance of clinical paratuberculosis in cattle in the Netherlands. *Prev Vet Med* 92: 256-266. doi: 10.1016/j.prevetmed.2009.08.017
22. **Whitlock RH, Wells SJ, Sweeney RW, van Tiem J. 2000.** ELISA and fecal culture for paratuberculosis (Johne's disease): sensitivity and specificity of each method. *Vet Microbiol* 77: 387-398. doi: 10.1016/S0378-1135(00)00324-2
23. **Windsor PA, Whittington RJ. 2010.** Evidence for age susceptibility of cattle to Johne's disease. *Vet J* 184: 37-44. doi: 10.1016/j.tvjl.2009.01.007
24. **Zapata MM, Rodas JD, Maldonado JG 2008.** Paratuberculosis bovina: ¿conocemos la situación real de la enfermedad en la ganadería colombiana? *Rev Colomb Cienc Pec* 21: 429-435.
25. **Zimmer K, Dräger KG, Klawonn W, Hess RG 1999.** Contribution to the diagnosis of Johne's disease in cattle. Comparative studies on the validity of Ziehl-Neelsen staining, faecal culture and a commercially available DNA-Probe test in detecting *Mycobacterium paratuberculosis* in faeces from cattle. *Zbl Vet Med B* 46: 137-140. doi: 10.1111/j.0931-1793.1999.00214.x