









# *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis (MAP) en un hato lechero de búfalos en Colombia

Brahian Tuberquia-López<sup>1</sup> ; Felipe Uribe-García<sup>1</sup> ; María Medrano-Montoya<sup>1</sup> ; Nathalia Correa-Valencia<sup>1</sup> ; Nicolás Fernando Ramírez<sup>1</sup> ; Jorge A. Fernández-Silva<sup>1\*</sup> .

<sup>1</sup>Universidad de Antioquia, Facultad de Ciencias Agrarias, Escuela de Medicina Veterinaria, Grupo Centauro, Medellín, Colombia. Correspondencia: [jorge.fernandez@udea.edu.co](mailto:jorge.fernandez@udea.edu.co)

Recibido: Noviembre 2020; Aceptado: Mayo 2021; Publicado: Diciembre 2021.

## RESUMEN

**Objetivo.** Determinar la presencia de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) mediante métodos serológicos, microbiológicos y moleculares, para genotipar los aislamientos de MAP y explorar factores asociados a la seropositividad a MAP en un hato de búfalos del departamento de Antioquia (Colombia). **Materiales y métodos.** Se realizó un estudio transversal para analizar muestras fecales y de suero de 21 búfalas adultas asintomáticas mediante cultivo y ELISA. Los cultivos con aislamientos sospechosos se confirmaron mediante PCR de MAP-IS900 (IS900-PCR). El ADN positivo se volvió a analizar mediante PCR cuantitativo de MAP-IS900 (IS900-qPCR), y luego, se subtipificó utilizando las técnicas basadas en la detección de unidades repetitivas intercaladas de micobacterias-número variable de repeticiones en tándem (MIRU-VNTR) y repetición de secuencia corta de múltiples locus (MLSSR). **Resultados.** Al muestreo, la edad promedio de los animales era de 4.7 años, el 90.5% (19/21) eran hembras y el 84.2% (16/19) estaban preñadas. El puntaje promedio de condición corporal fue 4.2 (en una escala de 1 a 5). La producción de leche promedio fue de 3.5 L/día/animal. No se detectaron animales seropositivos a MAP. Una hembra de los 21 búfalos fue positiva mediante cultivo fecal en la semana 6 de incubación y luego se confirmó mediante IS900-PCR. El análisis de subtipado reveló que el aislado de MAP correspondía al genotipo INMV 3 por MIRU-VNTR. **Conclusiones.** Según el conocimiento de los autores, este es el primer diagnóstico y aislamiento de MAP en búfalos en Colombia y la primera vez que se encuentra un perfil INMV 3 de MAP en esta especie en el país.

**Palabras clave:** Búfalos; Colombia; cultivo; PCR; paratuberculosis (*Fuente: MeSH*).

## ABSTRACT

**Objective.** To determine the presence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) using serological, microbiological, and molecular methods, to genotype MAP isolates, and to explore factors associated to MAP-seropositive status in a buffalo herd of the province of Antioquia (Colombia). **Materials and methods.** The study was carried out to test fecal and serum samples from 21

### Como citar (Vancouver).

Tuberquia-López B, Uribe-García F, Medrano-Montoya M, Correa-Valencia N, Ramírez NF, Fernández-Silva JA. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) en un hato lechero de búfalos en Colombia. Rev MVZ Córdoba. 2022; 27(1):e2204. <https://doi.org/10.21897/rmvz.2204>



©El (los) autor (es) 2021. Este artículo se distribuye bajo los términos de la licencia internacional Creative Commons Attribution 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>), que permite a otros distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir de su obra de modo no comercial, siempre y cuando den crédito y licencien sus nuevas creaciones bajo las mismas condiciones.

asymptomatic adult buffaloes using culture and ELISA tests. Suspicious culture isolates were confirmed by MAP-IS900-PCR (IS900-PCR). The positive DNA was retested using MAP-IS900-quantitative PCR (IS900-qPCR), and then, sub-typed using techniques based on the detection of mycobacterial interspersed repetitive units-variable number of tandem repeats (MIRU-VNTR) and multilocus short sequence repeat (MLSSR). **Results.** At sampling, the average age of animals was 4.7 years, 90.5% (19/21) were females and 84.2% (16/19) were pregnant. The average body condition score was 4.2 (in a 1-to-5 scale). The average milk yield was 3.5 L/day/animal. No MAP-seropositive animals were detected. One dairy buffalo cow out of the 21 buffaloes was positive by fecal culture at week 6 of incubation and then confirmed by IS900-PCR. Sub-typing analysis revealed that the MAP isolate corresponded to the INMV 3 genotype by MIRU-VNTR. **Conclusions.** To the best of the author's knowledge, this is the first report of MAP diagnosis and isolation in Colombian buffaloes and the first time an INMV 3 MAP-profile is found in this species the country.

**Keywords:** Buffaloes; Colombia; culture; PCR; paratuberculosis (*Fuente: MeSH*).

## INTRODUCCIÓN

La paratuberculosis (PTB) o enfermedad de Johne (EJ) es una enterocolitis granulomatosa que afecta tanto a rumiantes domésticos como salvajes. El agente etiológico de la PTB es *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) (1).

El diagnóstico de la PTB en rumiantes incluye varios tipos de pruebas. La sensibilidad (Se) y la especificidad (Sp) de las pruebas de diagnóstico varían según el estadio clínico de la infección (2).

Debido a la rusticidad de los búfalos, es probable que la PTB se produzca de forma asintomática, lo que lleva a una diseminación silenciosa de la bacteria, no solo dentro del hato, sino a otras poblaciones de rumiantes (3,4). Datos sobre la distribución de MAP en poblaciones de búfalos del mundo está disponible. Se han publicado estudios en India, Brasil e Italia con diversas frecuencias y pruebas de diagnóstico utilizadas (3,5,6,7,8). La PTB es una enfermedad de declaración obligatoria en búfalos en Colombia, Brasil, Italia, Japón y Suiza (9).

En 2019, se reportó que la población de búfalos en Colombia era de alrededor de 356.908 cabezas según los registros oficiales. El departamento de Antioquia reportó 58.891 búfalos, siendo el segundo del país —de 32 departamentos, con el mayor número de animales de esta especie (15.94%) (10). A pesar de estos datos, la PTB en búfalos no ha sido investigada en Colombia y hasta el momento no se han establecido medidas de control o programa de control para la enfermedad (11).

Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue determinar la presencia de MAP utilizando métodos serológicos, microbiológicos y moleculares, para genotipar los aislamientos de MAP y explorar los factores asociados a la seropositividad a MAP en un hato de búfalos en un municipio de Antioquia (Colombia).

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Consideraciones éticas.** Este estudio fue aprobado por el Comité de Ética para la Experimentación Animal de la Universidad de Antioquia (Acta # 91, 25 de septiembre, 2014).

**Tipo de estudio, población y ubicación.** En mayo de 2015 se realizó un estudio transversal en un hato de búfalos adultos (> 2 años de edad; n=21) en una finca ubicada en el municipio de Gómez Plata, departamento de Antioquia (Colombia), a 1.080 m.s.n.m. La finca tiene un área de 84 hectáreas y está ubicada en una zona de bosque montañoso altamente húmedo, con una temperatura promedio anual de 25°C, una humedad relativa del 80% y una precipitación anual de 1.800 mm (12). Además de búfalos, el hato también cría ganado de la raza criolla colombiana (Blanco OrejiNegro-BON) y su cruce con Holstein. En un estudio previo, se determinó que el 4% (2/50) de la población de bovinos adultos BON de esta finca eran seropositivos a MAP por ELISA.

**Toma de muestras.** Se tomaron muestras de sangre de 20 de los 21 búfalos adultos del estudio (ya que una de las búfalas no pudo ser muestreada debido a su difícil manejo). La muestra de sangre se tomó de la vena coccígea

o yugular, previamente desinfectada con alcohol antiséptico, y luego se recogió mediante tubos Vacuette® (Kremsmunster, Kremsmünster, Austria). Las muestras de sangre se dejaron a temperatura ambiente para facilitar la formación del coágulo. Posteriormente, el suero sanguíneo se separó de los componentes celulares mediante centrifugación a 2.000 r.p.m durante 5 min. El suero se almacenó a 4°C hasta su análisis (12-24 h después). Se tomó una muestra fecal de 20 g de cada uno de los 21 búfalos adultos. La muestra se tomó directamente del recto utilizando un guante individual nuevo de látex, recogido en un recipiente de plástico estéril.

**Prueba ELISA.** Para el análisis serológico se utilizó un kit ELISA preabsorbido comercial (ID Screen® paratuberculosis Indirect, ID-Vet, Grabels, Francia).

**Cultivo de materia fecal.** Las muestras de materia fecal se almacenaron a 4°C hasta su procesamiento (12-24 h después). A continuación, las muestras fecales se descontaminaron de acuerdo con un procedimiento previamente publicado (13). Brevemente, se agregaron 30 ml de una solución de cloruro de hexadecilpiridinio (HPC) al 0.75% a 3 g de heces en un tubo Falcon estéril de 50 ml, luego se mezclaron mediante agitación y se dejaron en posición vertical durante 5 min para permitir la precipitación y sedimentación de partículas grandes. Posteriormente, se tomaron 20 ml de sobrenadante de la solución, que se transfirió a un nuevo tubo Falcon estéril de 50 ml, y se dejó en posición vertical durante 24 horas a temperatura ambiente y en la oscuridad. Después de 24 horas, los tubos se centrifugaron a 900 × g durante 30 min. Se descartó el sobrenadante y se inocularon 300 µl del sedimento descontaminado por duplicado en inclinaciones del medio de yema de huevo de Herrold (HEYM) con micobactina J (Becton Dickinson, Sparks, Nueva Jersey, EE. UU.). Los tubos inoculados se incubaron a 37°C durante 20 semanas y se revisaron semanalmente para verificar el crecimiento bacteriano.

**PCR-IS900.** El ADN de las colonias compatibles con MAP se extrajo usando un kit comercial (InnuPREP Bacteria DNA Kit®, Analytic Jena, Jena, Alemania). La confirmación molecular se realizó mediante una PCR convencional para la detección de IS900 (PCR-IS900), utilizando los cebadores TJ1 (GCT GAT CGC CTT GCT CAT) y TJ2 (CGG GAG TTT GGT AGC CAG TA), según

Bull et al (14) con algunas modificaciones en las condiciones de temperatura y tiempo del termociclador: 1 ciclo de 95°C durante 10 min y luego 35 ciclos de 94°C durante 30 s, 60°C durante 130 s y 72°C durante 30 s, seguido de 1 ciclo de 72°C durante 5 min. Para la visualización del producto de 355 pb del PCR-IS900 se utilizó un gel de agarosa al 1.5%.

**qPCR-IS900.** Antes de la subtipificación, el ADN positivo se volvió a analizar mediante una PCR cuantitativa dúplex de MAP-IS900 (qPCR-IS900) (Bactotype MAP PCR Kit®, Qiagen, Leipzig, Alemania), que incluía un control de amplificación interno y controles de MAP positivo y negativo. El volumen total de reacción fue de 25.2 µl (17 µl de mezcla master, 8 µl de muestra y 0.2 µl del IAC, diluido a 1:5 en agua destilada ultrapura sin ADNasa y RNasa).

**Subtipado de MAP.** Para la caracterización molecular de los aislados de MAP se utilizó el ADN extraído del cultivo HEYM y definido como MAP-positivo por PCR-IS900 y qPCR-IS900. Se aplicó una combinación de dos métodos de subtipado diferentes, ambos basados en la amplificación por PCR de elementos repetitivos del genoma MAP.

**Unidades repetitivas intercaladas de micobacterias-número variable de repeticiones en tándem (MIRU-VNTR).** Como primer método de genotipado, se llevó a cabo mediante la amplificación de ocho loci MIRU-VNTR 3, 7, 10, 25, 32, 47, 292 y X3 (alias 1658), así como las condiciones de PCR según lo informado previamente por Thibault et al (18). Las condiciones de PCR incluyeron 1 ciclo de 3 min a 95°C, 1 ciclo de 1 min a 95°C, 30 ciclos de 1 min a 58°C, 1 ciclo de 1 min a 72°C y 10 min a 72°C. Se determinó el peso molecular (PM) de cada producto de PCR y para estimar el número de repeticiones en tándem presentes en cada locus, se cargaron 10 µl de producto de PCR en un gel de agarosa al 2%. Además, se utilizó una escalera de 50 pb para determinar el PM. Se utilizó el generador de imágenes Gel Doc TM (BioRad). Los resultados se expresaron mediante un código octal y el patrón de genotipo (INMV) se determinó utilizando la base de datos internacional de acceso gratuito en línea (<http://mac-inmv.tours.inra.fr/>). Los genotipos MIRU-VNTR se expresaron como la combinación del número de repeticiones encontradas en cada locus. La cepa MAP K10 se utilizó como control de referencia.

**Repetición de secuencia corta de múltiples locus (MLSSR).** Como segundo método de genotipado, se llevó a cabo mediante la amplificación de cuatro repeticiones de secuencia corta (SSR) en el locus 1 (repeticiones g), locus 2 (repeticiones g), locus 8 (repeticiones ggt) y locus 9 (repeticiones ggt), así como las condiciones de PCR, como informaron previamente Amonsin et al (19). Las condiciones de la PCR incluyeron 1 ciclo de 3 min a 95°C, 1 ciclo de 1 min a 95°C, 35 ciclos de 1 min a 60°C, 1 ciclo de 2 min a 72°C y 7 min a 72°C. Los productos de la PCR se analizaron mediante electroforesis utilizando geles de agarosa al 1.5% (grado de electroforesis de agarosa; TransGen Biotech). Todos los amplicones de cada locus fueron purificados utilizando el MinElute® PCR Purification Kit (Qiagen, Leipzig, Alemania) y secuenciados de forma independiente (Unidad de Genómica, Laboratorio de Biotecnología, Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, Argentina). La calidad de la secuenciación y el número de unidades de repetición cortas para identificar los alelos se analizaron utilizando el software de Análisis de Secuenciación v5.4 (Applied Biosystems). Los genotipos MLSSR se expresaron como la combinación del número de repeticiones encontradas en los cuatro loci amplificados por PCR. Si el número de repeticiones g en el locus 2 era superior a 11, las repeticiones g para dicho locus se indicaban como >11 g, como se sugirió anteriormente (15). Los procedimientos de subtipificación se realizaron en el Instituto de Agrobiotecnología y Biología Molecular (IABIMO)-CONICET, INTA en Buenos Aires, Argentina.

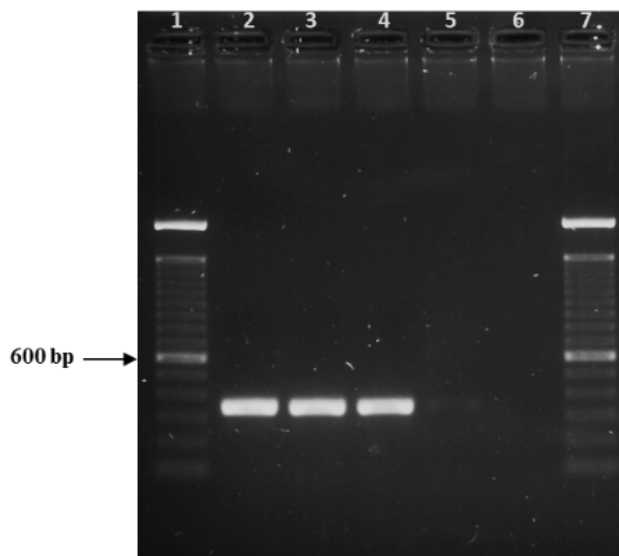
**Recolección de información.** Se administró un cuestionario en el momento de la toma de muestras de sangre y materia fecal al administrador del hato en una entrevista cara a cara, para recopilar información sobre factores a nivel animal [es decir, sexo, edad, puntaje de condición corporal —CC, por observación directa según Alapati et al (16), producción diaria de leche, origen —nacido dentro o fuera del hato, estado reproductivo —preñada o vacía, meses después del parto]. La información recopilada se ingresó en una hoja de cálculo de Excel (Microsoft Corp., Redmond, WA, EE. UU.) y luego se exportó a Stata 14.0 (StataCorp, 2017, Texas, EE. UU.) para su análisis. Las estadísticas descriptivas se reportaron mediante porcentajes. Se aplicó la prueba de chi-cuadrado para explorar las asociaciones entre los factores asociados a nivel animal y el resultado serológico.

## RESULTADOS

Al momento del muestreo, la edad de los búfalos era de 4.7 años en promedio. El 90.5% (19/21) eran hembras y el 84.2% (16/19) estaban preñadas y el 66.7% de las búfalas (14/21) nacieron fuera del rebaño (origen externo). La CC promedio fue 4.2 (en una escala de 1 a 5). El tiempo promedio desde el último parto fue de 7.4 meses y la producción de leche diaria promedio fue de 3.5 L (Tabla 1).

La prueba de ELISA no detectó resultados positivos o sospechosos para MAP en las 20 muestras de suero analizadas. Por lo tanto, los factores a nivel animal no pudieron ser explorados en busca de asociaciones.

Una de las 21 muestras fecales (4.8%) mostró colonias compatibles con MAP (i.e. blancas, circulares, brillantes, elevadas y convexas) en HEYM en la semana 6, y se confirmó como MAP mediante PCR-IS900 convencional (Figura 1), y posteriormente, por qPCR-IS900 como se mencionó anteriormente en la metodología. La búfala de la que se obtuvo la muestra fecal positiva estaba preñada y aparentemente sana al momento del muestreo, y la misma correspondía al animal del cual no fue posible coleccionar la muestra de sangre.



**Figura 1.** Resultados de la PCR para la detección de la secuencia de inserción IS900 específica de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) (14). Carril 1 y 7: Marcador molecular (escala de 100 pb), Carril 2: Muestra fecal sospechosa de la búfala n° 1, Carril 3: Cepa de referencia ATCC, Carril 4: Vaca confirmada como MAP-positiva en un estudio anterior (17), Carril 5: Control de extracción de ADN negativo, Carril 6: Control de PCR negativo.

**Tabla 1.** Factores a nivel animal y resultados diagnósticos de *Mycobacterium avium* susp. *paratuberculosis* (MAP) de 21 búfalos de un hato en Colombia (2015).

Sexo	#	Edad (años)	CC	Producción de leche diaria (L)	Origen	Estado reproductivo	Meses después parto	Resultados	
								Cultivo, PCR-IS900	ELISA
Hembra	1	6.8	4.0	4.5	E	Preñada	8.8	Positivo	No realizado
	2	6.6	4.3	2.0	E	Preñada	8.0	Negativo	Negativo
	3	6.3	4.3	4.0	E	Preñada	7.8	Negativo	Negativo
	4	5.9	3.8	4.5	E	Preñada	7.0	Negativo	Negativo
	5	5.7	4.0	5.5	E	Preñada	7.0	Negativo	Negativo
	6	5.7	4.0	4.0	E	Preñada	10.0	Negativo	Negativo
	7	5.7	4.0	8.5	E	Vacía	19.0	Negativo	Negativo
	8	5.7	4.0	0.0	E	Preñada	7.0	Negativo	Negativo
	9	5.5	4.3	4.5	E	Preñada	0.0	Negativo	Negativo
	10	5.4	4.0	3.5	E	Preñada	8.0	Negativo	Negativo
	11	5.2	4.0	7.5	E	Vacía	17.0	Negativo	Negativo
	12	5.2	3.8	7.5	E	Preñada	7.0	Negativo	Negativo
	13	5.1	4.3	6.0	E	Preñada	6.0	Negativo	Negativo
	14	5.0	4.3	0.0	E	Preñada	6.8	Negativo	Negativo
	15	3.2	4.5	0.0	I	Preñada	0.0	Negativo	Negativo
	16	3.0	4.3	4.0	I	Vacía	0.0	Negativo	Negativo
	17	2.8	4.3	0.0	I	Preñada	0.0	Negativo	Negativo
	18	2.8	4.5	0.0	I	Preñada	0.0	Negativo	Negativo
	19	2.7	4.5	0.0	I	Preñada	0.0	Negativo	Negativo
Macho	20	2.7	4.5	NA <sup>2</sup>	I	NA	NA	Negativo	Negativo
	21	2.7	4.0	NA	I	NA	NA	Negativo	Negativo

CC: Puntuación de la condición corporal obtenida por observación directa según Alapati et al (16); E: Externo; I: Interno; HEYM: Medio cultivo de yema de huevo de Herrold; PCR: Reacción en cadena de la polimerasa; ELISA: Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas; NA: No aplica.

Para el subtipo, se encontró que el aislamiento de MAP era INMV 3 por MIRU-VNTR (código numérico: 32332218; Tabla 2). El resultado de MLSSR no mostró ningún perfil diferencial.

**Tabla 2.** Perfiles MIRU-VNTR y MLSSR de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) aislamiento obtenido de una búfala de un hato en Colombia (2015).

Número de copias de MIRU-VNTR							
3	7	10	25	32	47	292	X3 (1658)
2	2	1	3	8	3	3	2
Perfil INMV							
3							
Número de copias del loci SSR							
1 (g)	2 (g)	8 (ggt)	9 (tgc)				
7	9	5	5				

Perfil INMV realizado según Thibault et al (18); Perfiles MLSSR realizados de acuerdo con Amonsin et al (19).

## DISCUSIÓN

En el presente estudio, se detectó MAP en un hato de búfalos ubicado en un municipio de Antioquia (Colombia), utilizando métodos serológicos, microbiológicos y moleculares.

Con respecto a los factores a nivel animal considerados en el presente estudio, la mayoría de los animales muestreados nacieron fuera del hato, incluida la única búfala que resultó positiva para MAP por cultivo de materia fecal. Por lo tanto, podría plantearse la hipótesis de que no se infectaron en el hato. Sin embargo, la presencia de bovinos infectados en el mismo rebaño podría indicar que MAP podría estar circulando entre ambas poblaciones.

En el presente estudio, ELISA no detectó anticuerpos anti-MAP en la población de búfalos de interés. Por lo tanto, ninguno de los factores de interés a nivel animal pudo ser explorado para su asociación con el estatus serológico a MAP (i.e. sexo, edad, CC, producción diaria de leche, origen, estado reproductivo, meses después

del parto). Un estudio anterior encontró una asociación entre el estatus seropositivo a MAP y un factor de manejo del hato de búfalos, como la ausencia de un área de parto o la presencia de sistemas vaca-cría (8). Estudios futuros en la población nacional de búfalos podrían indicar si este u otros factores relacionados con el manejo del hato o los animales pueden considerarse factores de riesgo de infección por MAP en Colombia.

Los resultados negativos obtenidos por la prueba ELISA contrastan con estudios previos realizados en búfalos de Italia, Brasil e India, en los que se encontró una seroprevalencia de 4, 10.3 y 28.6%, respectivamente (5,6,8). Dichas diferencias pueden deberse a factores como el tamaño de la muestra, menor para el presente estudio, que reduce la probabilidad de detectar animales seropositivos, y la baja Se reportada para la prueba ELISA en animales asintomáticos. La Se de ELISA en suero y leche en bovinos es de aproximadamente 25.6-45.3% y su Sp es mayor (97.6-98.9%) (20). Esta es la principal razón para obtener animales falsos negativos (21).

Se aisló MAP de un cultivo de materia fecal y luego se confirmó mediante PCR-IS900 y qPCR-IS900. La ausencia de análisis ELISA de esta única búfala no permitió confirmar completamente su estado inmunológico. Este animal podría tratarse de un caso del fenómeno "excreción de pasaje", en el cual los animales que no fueron infectados en etapas tempranas de la vida pueden ingerir cantidades significativas de MAP del ambiente y luego eliminarlo a través de las heces (22) La fuente de MAP en el hato podría ser la población de búfalos o el ganado bovino infectado que coexisten y pastan en los mismos pastos.

Se han reportado otros estudios sobre MAP en búfalos utilizando métodos serológicos y moleculares en Filipinas y Brasil, mostrando variaciones entre sus estimaciones y el presente estudio (23,24). Estas variaciones pueden

deberse a las características inherentes de la muestra y al método de recolección, así como a otros factores relacionados con la población. Hay que tener en cuenta que, en los casos subclínicos de la infección, la eliminación de la MAP es intermitente y es posible que la carga bacteriana estuviera reducida o ausente al momento de la toma de la muestra, subestimando los resultados serológicos y de cultivo (3). De esta forma, existen reportes de presentación subclínica de PTB en búfalos, como lo mencionan de Moraes et al (4), quienes encontraron un 30% (31/115) de muestras de tejidos intestinales con lesiones histopatológicas compatibles con PTB de búfalos sacrificados sin signos clínicos evidentes. Además, se aisló MAP en un 4.3% (5/115) mediante cultivo fecal y en un 13% (15/115) mediante qPCR-IS900.

El perfil MIRU-VNTR encontrado en el presente estudio (INMV 3) ha sido reportado previamente en bovinos en el mundo (15,18,25,26,27,28). Sin embargo, no se ha realizado ningún informe en búfalos y las conclusiones con respecto a la epidemiología molecular de MAP basadas en los resultados de subtipificación son difíciles de hacer debido al uso de diferentes enfoques técnicos y diferentes loci para el análisis.

En conclusión, MAP se aisló de una muestra de materia fecal de una búfala de un hato de 21 búfalos adultos negativos a ELISA para MAP. El análisis de subtipado reveló que el aislado MAP correspondía al genotipo INMV 3 por MIRU-VNTR. Para los autores, este es el primer informe de diagnóstico y aislamiento de MAP en búfalos colombianos y la primera vez que se encuentra un perfil INMV 3 MAP en esta especie en el país.

### Conflicto de intereses

Los autores declaran que no hay conflicto de intereses para la publicación de este artículo.

## REFERENCIAS

1. Fecteau ME. Paratuberculosis in Cattle. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 2018; 34(1):209-222. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2017.10.011>
2. Carvalho IA, Campos VE, Souza IM, Zanardo LG, Filho JD, Gomes MJ, Moreira MA. Diagnosis of paratuberculosis in cattle: microbiological culture, serology and PCR. *Braz J Microbiol.* 2012; 43(2):581-585. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822012000200020>
3. Sivakumar P, Tripathi BN, Singh N, Sharma AK. 2006. Pathology of naturally occurring paratuberculosis in water buffaloes (*Bubalus bubalis*). *Vet. Pathol.* 2006; 43(4):455-462. <http://doi.org/10.1354/vp.43-4-455>
4. de Moraes Pereira H, Santos HP, de Oliveira EAA, Rocha TB, Araújo IMS, Soares DM, et al. High prevalence of subclinical paratuberculosis in buffaloes (*Bubalus bubalis*) in Maranhão, Brazil. *Braz J Microbiol.* 2020; 51:1383-1390. <http://doi.org/10.1007/s42770-020-00267-4>
5. Singh SV, Singh AV, Singh R, Sharma S, Shukla N, Misra S, et al. Sero-prevalence of bovine Johne's disease in buffaloes and cattle population of North India using indigenous ELISA kit based on native *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* 'Bison type' genotype of goat origin. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 2008; 31(5):419-433. <http://doi.org/10.1016/j.cimid.2007.06.002>
6. Mota RA, Peixoto PV, Yamasaki EM, Medeiros ES, Costa MM, et al. Ocorrência de paratuberculose em búfalos (*Bubalus bubalis*) em Pernambuco. *Pesq. Vet. Bras.* 2010; 30(3):237-242. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2010000300008>
7. Dalto AC, Bandarra PM, Pavarini SP, Boabaid FM, de Bitencourt AP, Gomes MP, et al. Clinical and pathological insights into Johne's disease in buffaloes. *Trop. Anim. Health. Prod.* 2012; 44(8):1899-1904. <http://doi.org/10.1007/s11250-012-0154-9>
8. Desio G, Nizza S, Montagnaro S, Sasso S, De Martino L, Iovane V, et al. Estimated prevalence of Johne's disease in herd of water buffaloes (*Bubalus bubalis*) in the province of Caserta. *Ital J Anim Sci.* 2013; 12:8. <https://doi.org/10.4081/ijas.2013.e8>
9. Whittington R, Donat K, Weber MF, Kelton D, Nielsen SS, Eisenberg S, et al. Control of paratuberculosis: who, why and how. A review of 48 countries. *BMC Vet Res.* 2019; 15:198. <https://doi.org/10.1186/s12917-019-1943-4>
10. ICA. Consolidado nacional por especies. Instituto Colombiano Agropecuario: Colombia; 2019. <https://www.ica.gov.co/areas/pecuaria/servicios/epidemiologia-veterinaria/censos-2016/censo-2018>
11. Correa-Valencia NM, García-Tamayo Y, Fernández-Silva JA. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Colombia (1924-2016): A review. *Rev Colomb Cienc Pecu.* 2018; 31(3):165-179. <http://dx.doi.org/10.17533/udea.rccp.v31n3a01>.
12. IDEAM. Mapa de clasificación climática de Caldas-Lang, Clasificación climática de Lang, 2012/Colombia. Colombia, Bogotá DC: Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales (IDEAM); 2012. <https://www.datos.gov.co/Ambiente-y-Desarrollo-Sostenible/Clasificaci-n-Climtica-Caldas-Lang-2012/3akx-3ph5>
13. Fernández-Silva JA, Abdulmawjood A, Bulte M. Diagnosis and molecular characterization of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from dairy cows in Colombia. *Vet Med Int.* 2011; 2011:1-12. <https://doi.org/10.4061/2011/352561>
14. Bull TJ, McMinn EJ, Sidi-Boumedine K, Skull A, Durkin D, Neild P, et al. Detection and verification of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in fresh ileocolonic mucosal biopsy specimens from individuals with and without Crohn's disease. *J Clin Microbiol.* 2003; 41(7):2915-2923. <http://doi.org/10.1128/JCM.41.7.2915-2923.2003>
15. Thibault VC, Grayon M, Boschirolí ML, Willery E, Allix-Béguec C, Stevenson K, et al. Combined multilocus short-sequence-repeat and mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem-repeat typing of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolates. *J Clin Microbiol.* 2008; 46(12):4091-4094. <http://doi.org/10.1128/JCM.01349-08>

16. Alapati A, Kapa SR, Jeepalyam S, Rangappa SM, Yemireddy KR. Development of the body condition score system in Murrah buffaloes: validation through ultrasonic assessment of body fat reserves. *J Vet Sci.* 2010; 11(1) 1-8. <https://doi.org/10.4142/jvs.2010.11.1.1>
17. Fernández-Silva JA, Abdulmawjood A, Akineden O, Bulte M. 2011. Serological and molecular detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in cattle of dairy herds in Colombia. *Trop Anim Health Prod.* 2011; 43(8):1501-1507. <http://doi.org/10.1007/s11250-011-9833-1>
18. Thibault VC, Grayon M, Boschioli ML, Hubbans C, Overduin P, Stevenson K, et al. New variable-number tandem-repeat markers for typing *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and *M. avium* strains: Comparison with IS900 and IS1245 restriction fragment length polymorphism typing. *J Clin Microbiol.* 2007; 45(8):2404-2410. <http://doi.org/10.1128/JCM.00476-07>
19. Amonsin A, Li LL, Zhang Q, Bannantine JP, Motiwala AS, Sreevatsan S, et al. Multilocus short sequence repeat sequencing approach for differentiating among *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* strains 3. *J Clin Microbiol.* 2004; 42:1694-1702. <http://doi.org/10.1128/JCM.42.4.1694-1702.2004>
20. Lavers CJ, Dohoo IR, McKenna SL, Keefe GP. Sensitivity and specificity of repeated test results from a commercial milk enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in dairy cattle. *J Am Vet Med Assoc.* 2015; 246(2):236-244. <http://doi.org/10.2460/javma.246.2.236>
21. Nielsen SS, Grønbaek C, Agger JF, Houe H. Maximum-likelihood estimation of sensitivity and specificity of ELISAs and faecal culture for diagnosis of paratuberculosis. *Prev Vet Med.* 2002; 53(3):191-204. [http://doi.org/10.1016/s0167-5877\(01\)00280-x](http://doi.org/10.1016/s0167-5877(01)00280-x)
22. Fecteau ME, Whitlock RH, Buergelt CD, Sweeney RW. Exposure of young dairy cattle to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) through intensive grazing of contaminated pastures in a herd positive for Johne's disease. *Can Vet J.* 2010; 51(2):198-200. [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2808288/pdf/cvj\\_02\\_198.pdf](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2808288/pdf/cvj_02_198.pdf)
23. Uy MRD, Cruz JL, Miguel MA, Salinas MBS, Lazaro JV, Mingala CN. Serological and molecular evaluation of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (Johne's disease) infecting riverine-type water buffaloes (*Bubalus bubalis*) in the Philippines. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 2018; 61:24-29. <http://doi.org/10.1016/j.cimid.2018.11.004>
24. de Albuquerque PPF, de Melo RPB, de Farias Brito M, Bovino F, de Souza MA, Lima AMC, et al. First molecular epidemiological study of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in cattle and buffalo from different regions of Brazil. *Trop. Anim. Health Prod.* 2018; 50(8):1929-1935. <http://doi.org/10.1007/s11250-018-1650-3>
25. Fernández-Silva JA, Abdulmawjood A, Akineden O, Bulte M. Genotypes of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from South American countries determined by two methods based on genomic repetitive sequences. *Trop Anim Health Prod.* 2012; 44(6):1123-1126. <http://doi.org/10.1007/s11250-011-0060-6>
26. Fernández-Silva JA, Abdulmawjood A, Akineden O, Bulte M. Molecular epidemiology of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* at a regional scale in Germany. *Res Vet Sci.* 2012; 93(2):776-782. <http://doi.org/10.1016/j.rvsc.2011.12.005>
27. Ahlstrom C, Barkema HW, Stevenson K, Zadoks RN, Biek R, Kao R, et al. Limitations of variable number of tandem repeat typing identified through whole genome sequencing of *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* on a national and herd level. *BMC Genomics.* 2015; 16(1):161. <http://doi.org/10.1186/s12864-015-1387-6>
28. de Kruijf M, Lesniak ON, Yearsley D, Ramovic E, Coffey A, O'Mahony J. Low genetic diversity of bovine *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* isolates detected by MIRU-VNTR genotyping. *Vet Microbiol.* 2017; 203:280-285. <http://doi.org/10.1016/j.vetmic.2017.03.029>