

Microbiología

Viabilidad de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* en la maduración de quesos caprinos y bovinos

Viability of Mycobacterium avium subsp paratuberculosis in elaborated goat and bovine milk cheese maturity

► Karina Mariela Cirone^{1*}, Claudia Graciela Morsella^{2*}, Daniel Colombo^{3**}, Fernando Alberto Paolicchi^{4*}

-
1. Lic. en Ciencia y Tecnología de Alimentos.
 2. Auxiliar de Laboratorio.
 3. Médico Veterinario.
 4. Magíster Scientiae.

* Laboratorio de Bacteriología, Área Producción Animal, Unidad Integrada INTA UNMdP, CC 276, (7620) Balcarce, Argentina. fpaolicchi@balcarce.inta.gov.ar.

** Actividad Privada, Mar del Plata.

Resumen

Mycobacterium avium subsp. *paratuberculosis* (*Map*) es el microorganismo causante de la Paratuberculosis o Enfermedad de Johne, enteritis crónica que afecta a rumiantes y a otros animales domésticos y silvestres. También ha sido vinculado a la enfermedad de Crohn en humanos. Hembras caprinas y bovinas infectadas con *Map* pueden excretar micobacterias en su leche, que consumida cruda o usada para la elaboración de quesos sin pasteurizar podría constituir una fuente potencial para la infección humana. El objetivo del trabajo fue determinar la viabilidad de *Map* en quesos elaborados con leche caprina y bovina infectada experimentalmente y sometida o no a tratamiento térmico. Durante la maduración, *Map* fue aislado sólo en los quesos elaborados con leche sin tratamiento térmico, manteniendo su viabilidad hasta los 60 días para los quesos caprinos y hasta los 45 días en los bovinos. En quesos caprinos los mayores valores de pH se hallaron entre los 30 y 45 días de maduración, coincidiendo con los aislamientos más numerosos de *Map*; en cambio, en los quesos bovinos no se observó relación alguna. La maduración de los quesos contribuiría a disminuir la viabilidad de *Map* en quesos elaborados con leche sin tratamiento térmico y el calentamiento de la leche a 65 °C durante 20 min seguido por la maduración de los quesos resultaría beneficioso ya que eliminaría las micobacterias presentes, mejorando la calidad higiénico-sanitaria del alimento.

Palabras clave: *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* * quesos * viabilidad * maduración

Summary

Mycobacterium avium subsp paratuberculosis (*Map*) is the etiologic agent of *Paratuberculosis* or *Johne's disease*. It is a chronic enteritis affecting ruminants, domestic and wild species. Goats and cows infected with *Map*

Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana

Incorporada al Chemical Abstract Service.

Código bibliográfico: ABCLDL.

ISSN 0325-2957

Acta Bioquím Clín Latinoam 2006; 40 (4): 000-0

mycobacteria in their milk. This fact represents a potential risk when people consume raw milk or non-pasteurized cheese. The objective of this work was to determine the viability of Map in cheese elaborated with experimentally infected caprine and bovine milk with different thermal treatments (65 °C or 37 °C). During maturity, Map was isolated in cheese with only treatment of milk with 37 °C, keeping its viability until days 60 and 45 days in caprine and bovine cheese respectively. In caprine cheese the highest pH value was found between days 30 and 45 of maturity in agreement with the biggest number of Map's isolates. The maturity decreases the Map viability in elaborated cheese without thermal treatment, and the treatment with 65°C of temperature plus cheese maturity process would be beneficial for the mycobacteria elimination in these products.

Key words: *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis * cheese * viability * maturity*

Introducción

Mycobacterium avium subsp. *paratuberculosis* (*Map*) es el microorganismo causante de la Paratuberculosis (PTBC) o Enfermedad de Johne, enteritis crónica que afecta a rumiantes domésticos y especies silvestres. Está caracterizada clínicamente por diarrea, pérdida de peso, debilitamiento y finalmente la muerte; sin embargo, una gran proporción de los animales infectados presenta la condición de portadores asintomáticos (1).

Map ha sido vinculado a la enfermedad de Crohn en humanos. Durante el transcurso de esta patología, *Map* puede parasitar las células inmunorregulatorias en el intestino de personas con susceptibilidad adquirida o heredada, resultando en una inmunodepresión del revestimiento mucosal del intestino, lo que provoca síntomas como: diarrea profusa, inflamación de ganglios linfáticos e intestino, depresión inmunológica general y debilitamiento (2).

En los últimos años se ha investigado la relación entre *Map* y esta enfermedad, poniendo énfasis en los productos alimenticios como fuente de infección. Una posible vía de transmisión al humano serían los alimentos contaminados, principalmente los lácteos.

Algunas evidencias sugieren que los humanos se pueden infectar por el consumo de leche contaminada, aunque relativamente poco se conoce sobre la supervivencia de *Map* durante los procesos de elaboración de lácteos. Ciertos autores afirman que la pasteurización es capaz de destruir las micobacterias (3-6). Otros, por el contrario, sostienen que *Map* es capaz de resistir las condiciones de pasteurización cuando está presente en la leche (7-17).

En Inglaterra esta micobacteria fue detectada en un 2% de muestras de leche pasteurizada comercial y en un 6,7% de muestras de leche cruda sometida a pasteurización experimental a 72 °C por 15 o 25 s (13). También en Estados Unidos fueron encontrados organismos viables en un 2,8% de envases de leche comercial pasteurizada (18). El más reciente de estos estudios fue realizado en República Checa (19) donde

un grupo de investigadores analizaron muestras de leche pasteurizada comercializada en distintos puntos de venta de ese país. *Map* fue cultivado a partir de 4 (1,6%) de 244 muestras. Estos resultados indican que este patógeno es capaz de sobrevivir en ocasiones a la pasteurización comercial.

Esta micobacteria, además, podría estar presente en quesos y otros productos lácteos, especialmente aquellos que se elaboran con leche sin pasteurizar. En quesos, el bajo pH y la concentración de sal son los dos factores más importantes que contribuyen a la inactivación de patógenos durante el proceso de maduración. Collins MT *et al.* (20) estudiaron el efecto de tres factores sobre la viabilidad de *Map* en quesos (pH, concentración de sal y tratamiento térmico), determinando que el calentamiento y el bajo pH afectaban la viabilidad de este patógeno, pero no la concentración de sal. Otras investigaciones realizadas en quesos duros y semiduros elaborados con leche cruda artificialmente contaminada con *Map* demostraron que los recuentos decrecieron lentamente durante la maduración y relacionaron la muerte del bacilo con la temperatura aplicada durante la elaboración y el descenso del pH durante la maduración de los quesos (21). Recientes estudios demuestran que la población de micobacterias puede concentrarse durante la producción de quesos y que *Map* puede sobrevivir al proceso de maduración de este producto por más de 27 semanas (22).

El objetivo de este trabajo fue determinar la viabilidad de *Map* en quesos elaborados con leche caprina y bovina infectada artificialmente y sometida a distintos tratamientos térmicos.

Materiales y métodos

A. ELABORACIÓN DE LOS QUESOS

A.1. LECHE: Se recolectaron 5 litros de leche caprina y 5 litros de leche bovina en envases estériles de plástico, desde el tanque de enfriado de tambos respectivos. La leche provenía de animales libres de brucelosis, tu-

berculosis y al momento de la toma de muestras no presentaban sintomatología ni evidencias bacteriológicas o serológicas positivas (ELISA) a PTBC.

A.2. INÓCULO: Cada parte de leche (caprina y bovina) fue infectada, antes del tratamiento térmico, con 2,5 mL de un inóculo de *Map* cuya concentración fue de $1,6 \times 10^{13}$ ufc.mL⁻¹. Esta suspensión fue preparada en *buffer* salino, pH 7 (PBS), el día previo a la elaboración de los quesos y mantenida a temperatura ambiente. La cepa perteneciente a la colección de INTA Balcarce fue tipificada por PCR y RFLP con *BstEII* para la identificación del segmento de inserción característico IS900 e identificación del patrón genotípico, respectivamente.

Para comprobar la viabilidad de la cepa luego de agregado el inóculo a las leches caprina y bovina, se tomó una muestra de cada una previo al tratamiento térmico y se cultivó en medio Herrold con micobactina y agregado de piruvato y antibióticos (ácido nalidixico, nistatina, anfotericina B) luego de someterlas a decontaminación con hexadecilpiridinium (HPC) (Sigma, USA) al 0,75% durante 5 h previas al cultivo.

A.3. PROCESO DE ELABORACIÓN DE QUESOS: La leche de cada especie animal se dividió en dos partes: leche con tratamiento térmico (LT) y leche sin tratamiento térmico (LnT).

La leche LT fue sometida a un calentamiento de 65 °C por 20 min, para luego ser enfriada a 37 °C. La leche LnT sólo fue calentada hasta 37 °C. Se agregó a ambas el cultivo iniciador comercial mesófilo homofermentativo (CHH-22 CRISTIAN HANSEN). Luego de 20 min, fueron agregados 4 mL de cuajo comercial a cada una de las partes (LT y LnT). Cuando la leche coaguló, el cuajo fue cortado para llevar a cabo el desuerado, lavando las masas con agua a 40 °C. Las mismas fueron coladas y colocadas en moldes apropiados, para ser prensadas. Cada queso fue sometido a salado en seco por una hora y se maduraron por 60 días en una sala con aproximadamente 20 °C de temperatura y 70% de humedad relativa.

B. OBTENCIÓN Y TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS

Una vez elaborados los quesos, a los 10, 20, 30, 45 y 60 días del inicio de la maduración, se tomaron 5 g de

muestra del centro de cada queso. Las mismas fueron colocadas y maceradas en bolsas de polietileno sometiendo a decontaminación con 20 mL de HPC al 0,75% durante 5 h. Se trasvasó el contenido de cada bolsa a tubos de plástico estériles y se centrifugaron a 550 g durante 15 min, resuspendiendo el *pellet* con 2 mL de PBS. Se sembraron 6 gotas (120 µL) de cada muestra en medios específicos usando Herrold con agregado de micobactina, piruvato y antibióticos (23). Los cultivos fueron observados cada 15 días durante cuatro meses, identificando el desarrollo de las colonias sospechosas de *Map*. Las colonias fueron analizadas microscópicamente mediante la coloración de Ziehl Neelsen (ZN). Los recuentos se expresaron en ufc.g⁻¹ de queso.

En cada momento de la toma de muestras de quesos fue registrado el pH utilizando una cinta de pH (Merck, USA) de rango 0-14 sobre un macerado en agua destilada estéril de cada muestra.

Resultados

A. INÓCULO

Los cultivos realizados a partir de la leche inoculada con *Map* previo a los tratamientos térmicos fueron positivos mostrando una alta carga de micobacterias sobre Herrold y en frotis directos coloreados con ZN.

B. RECUENTO Y VIABILIDAD DE MAP

La evolución de los recuentos de *Map* durante el período de maduración de los quesos puede observarse en la Tabla I. Se aisló *Map* sólo en los quesos elaborados con LnT, siendo los elaborados con leche caprina los que mantuvieron la viabilidad de las micobacterias hasta el final del proceso de maduración. En los quesos bovinos, *Map* sobrevivió sólo hasta los 45 días de maduración.

En el queso caprino, a los 20 días del proceso de maduración los recuentos disminuyeron aproximadamente 1 orden respecto al período anterior, mientras que este dato no pudo ser registrado para el queso de origen bovino debido a la competencia con microorganismos contaminantes presentes en los medios de cultivo con *Map*. Sin embargo, en el que-

Tabla I. Recuento de células viables de *Map* en ufc.g⁻¹ de muestras de quesos elaborados con LnT durante 60 días de maduración.

Tipo de queso	Días de maduración				
	10	20	30	45	60
LnT* Bovina	$13,3 \times 10^1$	S/R**	$2,6 \times 10^1$	2×10^1	-
LnT Caprina	$9,8 \times 10^1$	$0,9 \times 10^1$	24×10^1	$1,4 \times 10^1$	$0,8 \times 10^1$

* LnT: Leche sin tratamiento térmico; **S/R: dato no registrado.

so caprino a los 30 días de dicho proceso se registró un recuento de viables más alto, llegando a valores de 240 ufc.g⁻¹ de queso. Para el queso bovino, sin embargo, el recuento fue un orden menor que en el caprino, para el mismo período de maduración. A los 45 días se detectaron micobacterias viables (14 ufc.g⁻¹ de queso caprino y 20 ufc.g⁻¹ de queso bovino), reduciéndose a 8 ufc.g⁻¹ a los 60 días para el queso caprino, mientras que en el bovino no fueron aisladas micobacterias.

C. PH DURANTE LA MADURACIÓN

La evolución del pH durante el periodo de maduración de los quesos se muestra en la Tabla II.

D. RELACIÓN ENTRE EL PH DE LOS QUESOS Y EL RECUENTO DE CÉLULAS VIABLES DE MAP

En los quesos caprinos a los 30 días de maduración se registró un valor de pH 7.5 que fue el valor más alto y coincidió con el mayor recuento de *Map* en el queso elaborado con LnT, alcanzando 240 ufc.g⁻¹. Sin embargo, en el queso de origen bovino no se observó relación entre la viabilidad de *Map* y la variable pH (Fig. 1) (Fig. 2).

Discusión y Conclusiones

Map es un microorganismo que se encuentra presente en distintos sistemas productivos de Argentina y

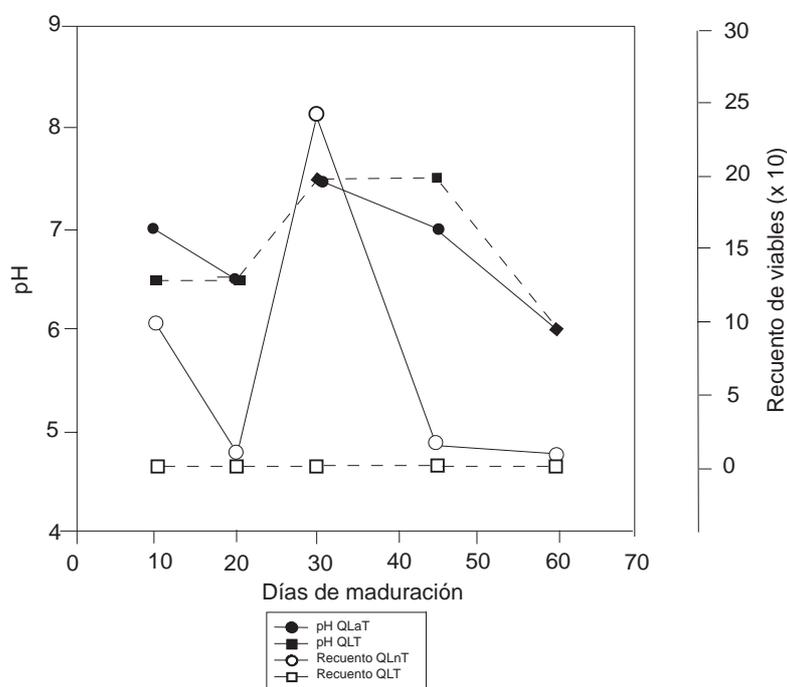


Figura 1. Evolución del pH y de las ufc.g⁻¹ de *Map* en quesos elaborados con leche caprina con tratamiento térmico (LT) a 65 °C por 20 min y sin tratamiento térmico (LnT).

Tabla II. Evolución del pH de los quesos elaborados con LT y LnT durante 60 días de maduración.

Tipo de queso	Días de maduración				
	10	20	30	45	60
LnT Bovina	6,0	7,0	7,0	7,5	6,0
LT Bovina	6,0	6,5	6,5	8,0	6,0
LnT Caprina	7,0	6,5	7,5	7,0	6,0
LT Caprina	6,5	6,5	7,5	7,5	6,5

* LnT: Leche sin tratamiento térmico; LT: Leche con tratamiento térmico.

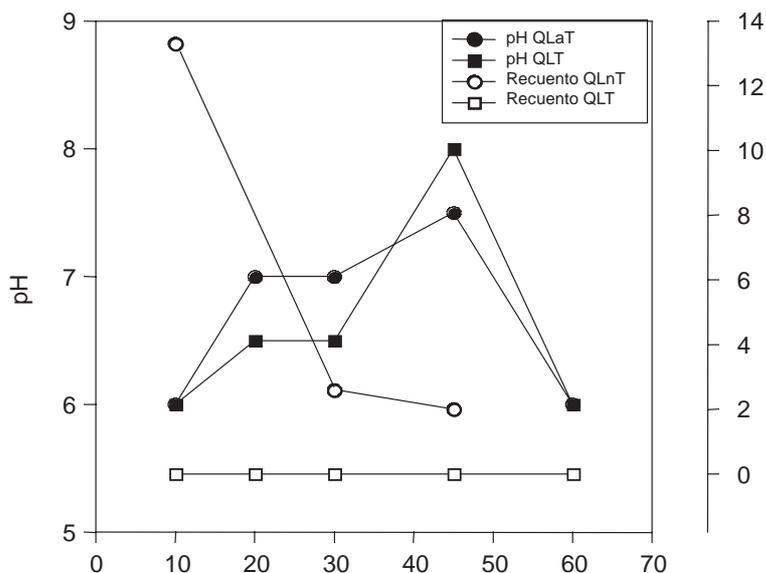


Figura 2. Evolución del pH y de las ufc.g⁻¹ de *Map* en quesos elaborados con leche bovina con tratamiento térmico (LT) a 65 °C por 20 min y sin tratamiento térmico (LnT).

también puede hallarse en la cadena agroalimentaria, lo que significaría un riesgo para la Salud Pública. En los últimos años se ha avanzado en la investigación sobre la relación de este microorganismo y la enfermedad de Crohn en humanos, poniendo énfasis en los productos alimenticios, especialmente lácteos, como vía de transmisión. Actualmente es de considerable interés determinar la eficacia de los tratamientos térmicos usados en la industria láctea para evitar la presencia de células viables de *Map* en el producto final y determinar el tratamiento más efectivo y factible de aplicar en la producción de lácteos que asegure la eliminación de esta micobacteria.

Estudios realizados sobre la supervivencia de *Map* en productos lácteos derivados reafirman la resistencia de este microorganismo a altas temperaturas y condiciones medioambientales adversas. Algunas investigaciones indican que este patógeno es capaz de sobrevivir la pasteurización comercial. En 7 países europeos fueron analizadas mediante PCR muestras de leche en polvo, resultando positivas un 49% de ellas, a pesar de que *Map* solo fue cultivada en una de las muestras (24). En Argentina, se realizó un trabajo donde se analizaron 70 muestras de leche fluida comercial sometidas por la industria a distintos tratamientos térmicos. Sobre el total de las muestras analizadas, se logró el aislamiento de dos cepas de *Map* (2,86%) confirmadas por PCR que demostraron pertenecer al patrón genotípico "A" mediante RFLP, un patrón conocido por ser el más prevalente en los aislamientos de Argentina (25) (26). Similares estudios se efectuaron en Europa obteniendo resultados semejantes a los de este trabajo,

por lo cual se está reglamentando la aplicación de controles en las industrias lácteas para evitar la presencia de *Map* viables en leche y subproductos (27).

Otras investigaciones han sido realizadas en quesos con el objetivo de determinar la resistencia de *Map* durante su elaboración. Collins *et al.* (20) estudió el efecto del pH, concentración de sal y tratamiento térmico en la producción de quesos, sobre la viabilidad de *Map* y encontró que el calentamiento de la leche cruda para la elaboración de quesos que se maduraron por 60 días, inactivó aproximadamente 10³ células de *Map* por mL. Además, comprobó que la concentración de sal tiene poco efecto sobre la viabilidad de este patógeno, sin embargo, el bajo pH fue correlacionado positivamente con su muerte. Spahr y Schafroth (21) inocularon artificialmente leche cruda con 10⁴ ufc.mL⁻¹ de *Map* y elaboraron quesos duros y semiduros, observando que en ambos los recuentos de *Map* decrecieron durante la maduración. Estos autores concluyeron que la temperatura aplicada durante la elaboración y el descenso del pH durante la maduración fueron los factores más importantes para la muerte de la micobacteria. El más reciente de estos trabajos reveló que *Map* puede sobrevivir al proceso de maduración de este producto por más de 27 semanas (22). Debido a esto, el tiempo de maduración habitualmente utilizado en la industria láctea no sería suficiente para eliminar las células de *Map* viables presentes en el producto.

Otro hallazgo de importancia que indica que estos productos podrían ser otra fuente de exposición del humano a *Map* se efectuó con productos de Grecia y de República Checa donde se estudió la presencia de *Map*

en distintos tipos de quesos comerciales, hallando un 31,7% y un 3,6% de las muestras positivas por PCR y cultivo respectivamente (28). Un dato interesante es que pudieron correlacionar el mayor porcentaje de positividad con aquellos quesos que tenían menor concentración de NaCl (< 2%). El aislamiento de esta micobacteria a partir de quesos comerciales, si bien se dio en baja frecuencia, indica que estos productos podrían ser otra fuente de exposición del humano a *Map*.

Los resultados preliminares de este trabajo indican que el proceso de maduración contribuiría a la disminución de la viabilidad de *Map* en los quesos elaborados con **LT**. A diferencia de otros trabajos, la concentración de *Map* en la leche artificialmente inoculada fue alta ($1,6 \times 10^{13}$ ufc.mL⁻¹) con el objetivo de evaluar con mayor precisión la caída de la viabilidad durante la maduración. Una de las causas principales de la disminución en el número de bacterias por g observada en los primeros días de maduración podría deberse a la disminución de la actividad de agua (a_w). Por otro lado, a partir de los quesos elaborados con **LT** no se logró aislar micobacterias, lo cual indicaría que *Map* sería sensible al tratamiento térmico usado (65 °C / 20 min) sumado a los cambios bioquímicos que ocurren durante el proceso de maduración.

En el queso elaborado con leche caprina se observó que el descenso del pH eliminaría muchas de las células viables de *Map* por g ya que cuando el pH llegó a valores más altos se registró el mayor recuento de viables. Sin embargo, en los quesos elaborados con leche bovina no se observó dependencia de la viabilidad de *Map* con respecto a la variación del pH.

De acuerdo a los resultados de este trabajo, el tratamiento térmico aplicado a la leche para la elaboración de quesos sería recomendable para eliminar su posible contaminación con *Map* ya que esta micobacteria sobreviviría por más de 60 días durante la maduración cuando este tipo de quesos son librados al mercado a los 15 ó 20 días posteriores a la elaboración. Debería asegurarse el descenso del pH durante la maduración, ya que la combinación de ambos factores resulta determinante para disminuir la viabilidad de *Map* o de otras bacterias patógenas que puedan estar presentes en el alimento.

La aplicación de un tratamiento térmico a la leche cruda previo a la elaboración de este producto sería deseable con el fin de obtener un alimento inocuo. Por otro lado, debería enfatizarse el control de PTBC en los sistemas sanitarios de los rodeos lecheros así como en industrias lácteas, con el objetivo de proteger a los consumidores contra el posible riesgo de infección con *Map* u otras bacterias potencialmente patógenas.

Se considera que son necesarias nuevas investigaciones cuali-cuantitativas para determinar claramente la resistencia de *Map* a los tratamientos térmicos realizados en industrias lácteas, como así también evaluar su supervivencia a los distintos procesos de elabora-

ción de los productos derivados. Por último, sería importante desarrollar y ajustar métodos de identificación rápidos y confiables para detectar la presencia de *Map* en productos alimenticios antes de ser liberados al mercado para el consumo humano.

Referencias bibliográficas

- Collins MT, Goodger WJ, Nordlund KV, Pelletier J. Associations between subclinical paratuberculosis and milk production, milk components, and somatic cell counts in dairy herds. *J Am Vet Med Assoc* 1996; 208(11):1872-6.
- Hermon-Taylor J, Bull T. Crohn's disease causes by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: a public health tragedy whose resolution is long overdue. *J Med Microbiol* 2002; 51: 3-6.
- Stabel JR. On-farm batch pasteurization destroys *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in waste milk. *J Dairy Sci* 2001; 84 (2):524-7.
- Pearce LE, Crawford RA, Troung HT, Yates GF, Lisle GW. The recovery of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* following heat treatment of inoculated milk in a turbulent-flow pasteuriser is not adversely affected by decontamination and antibiotic selection. *Proceedings of the 7th International Colloquium on Paratuberculosis*. Bilbao, Portugal 2002; 102.
- Rademaker J, Meeuwisse J, Giffel M. Heat inactivation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Proceedings of the 7th International Colloquium on Paratuberculosis*, Bilbao 2002; 317-9.
- Mc Donald W, O'Riley K, Schroen J, Condrón R. Heat inactivation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk. *Appl Environ Microbiol* 2005; 71 (4): 1785-9.
- Gao A, Mutharia L, Chen S, Rahn K, Odumeru J. Effect of pasteurization on survival of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk. *J Dairy Sci* 2002; 85: 3198-205.
- Grant IR. Letter to the editor: Does *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* survive current pasteurization conditions? *Appl Environ Microbiol* 1998; (7): 2760-1.
- Grant IR, Ball HJ, Neill SD, Rowe MT. Inactivation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in cows' milk at pasteurization temperatures. *Appl Environ Microbiol* 1996; 62 (2): 631-6.
- Grant IR, Ball HJ, Rowe MT. A novel staining technique for assessing clumping and viability of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* cells during pasteurization. *Proceedings of the 5th International Colloquium on Paratuberculosis*. Rehoboth, MA, USA. 1997; 456-8.
- Grant IR, Ball HJ, Rowe MT. Effect of higher pasteurization temperatures, and longer holding times at 72 degrees C, on the inactivation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk. *Lett Appl Microbiol* 1999; 28(6):461-5.

12. Grant IR, Pope CM, O'Riordan LM, Ball HJ, Rowe MT. Improved detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk by immunomagnetic PCR. *J Vet Microbiol* 2000; 77(3-4): 369-78.
13. Grant IR, Hitchings EI, Ball HJ, Rowe MT. Impact of commercial HTST pasteurization on *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in naturally infected cow's milk. *Appl Environ Microbiol* 2002; 68(2): 602-7.
14. Grant IR, Kirk E, Hitchings EI, Rowe MT. Comparative evaluation of MGIT and BACTEC culture systems for the recovery of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from milk. *J Appl Microbiol* 2003; 95: 169-201.
15. Grant IR, Williams A, Rowe M, Muir D. Efficacy of various pasteurization time-temperature conditions in combination with homogenization on inactivation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk. *Appl Environ Microbiol* 2005; 71(6): 2853-61.
16. Hammer P, Kiesner C, Walte H, Teufel P. Heat resistance of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in raw milk tested in a pilot plant pasteurizer. *Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte* 2002; 54: 275-303.
17. Millar D, Ford J, Withey S, Tizard M, Doran T, Hermon-Taylor J. IS900 PCR to detect *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in retail supplies of whole pasteurized cow's milk in England en Wales. *Appl Environ Microbiol* 1996; 5(11): 3446-52.
18. Ellingson J, Anderson J, Koziczkowski J, Radcliff R, Sloan S, Allen S, *et al.* Detection of viable *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in retail pasteurized whole milk by two culture methods and PCR. *J Food Prot* 2005; 68 (5): 966-72.
19. Ayele W, Svastova P, Roubal P, Bartos M, Pavlik I. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* cultured from locally and commercially pasteurized cow's milk in the Czech Republic. *Appl Environ Microbiol* 2005; 71 (3): 1210-4.
20. Collins MT, Sung N. Effect of three factors in cheese production (pH, salt and heat) on *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* viability. *Appl Environ Microbiol* 2000; 66(4):1334-9.
21. Spahr U, Schafroth K. Fate of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Swiss Hard and Semihard cheese manufactured from raw milk. *Appl Environ Microbiol* 2001; 67(9): 4199-205.
22. Donaghy JA, Totton NL, Rowe MT. Persistence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* during manufacture and ripening of Cheddar cheese. *Appl Environ Microbiol* 2004; 70 (8): 4899-905.
23. Paolicchi FA, Zumarraga MJ, Gioffre A, Zamorano P, Morsella C, Verna A, *et al.* Application of different methods for the diagnosis of paratuberculosis in dairy cattle herds in Argentina. *J Vet Med* 2003; 50: 20-6.
24. Hruska K, Bartos M, Kralik P, Pavlik I. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in powdered infant milk. Proceedings of the 8th International Colloquium on Paratuberculosis. Copenhagen, Denmark 2005; 67.
25. Cirone K. Caracterización y viabilidad de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* en leche, quesos y agua. Balcarce, Argentina: Universidad Nacional de Mar del Plata, Facultad de Ciencias Agrarias; 2004.
26. Moreira A, Paolicchi F, Morsella C, Zumarraga M, Cataldi A, Bigi F, *et al.* Distribution of IS900 restriction length polymorphism types among animal *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolates from Argentina and Europe. *J Vet Microbiol* 1999; 70: 251-9.
27. Greenstein R. Is Crohn's disease caused by a mycobacterium? Comparasions with leprosy, tuberculosis, and John's disease. *The Lancet* 2003; 3: 507-13.
28. Ikonomopoulos J, Pavlik I, Bartos M, Svastova P, Ayele W, Roubal P, *et al.* Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in retail cheeses from Greece and Czech Republic. *Appl Environ Microbiol* 2005; 71(12): 8934-6.

Aceptado para su publicación el 15 de septiembre de 2006