



Departamento de Sanidad Animal

PROGRAMA DE DOCTORADO

“Ciencias Veterinarias y de los Alimentos”

Tesis Doctoral

**EFFECTO DE LA VACUNACIÓN FRENTE A LA
PARATUBERCULOSIS CAPRINA SOBRE LA
RESPUESTA INMUNITARIA Y LA PATOGENIA DE
LA ENFERMEDAD**

PhD Thesis

**EFFECT OF VACCINATION AGAINST
PARATUBERCULOSIS ON THE IMMUNE RESPONSE
AND PATHOGENESIS OF THE DISEASE IN GOATS**

Memoria presentada por D. Marcos Royo González para optar al grado de Doctor en Veterinaria con mención internacional por la Universidad de León.

León, Octubre 2018.

Directores:

Valentín Pérez Pérez

Julio Benavides Silván

María del Carmen Ferreras Estrada

La realización de este estudio ha sido posible por la financiación del Ministerio de Economía, Industria y Competitividad a través del proyecto de investigación con referencia: AGL2012-39818-C02-01, cuyo título es el siguiente “Desarrollo de modelos de patogenia e inmunización en paratuberculosis”. El autor de la presente tesis doctoral disfrutó de un contrato predoctoral para la formación de doctores por parte del Ministerio de Economía, Industria y Competitividad.

No nos atrevemos a muchas cosas porque son difíciles, pero son difíciles
porque no nos atrevemos a hacerlas

Lucio Anneo Séneca



A mis padres y a mi hermano,

A mi tía Mari y a mi prima Lucía,

A mi yaya.

AGRADECIMIENTOS

El desarrollo de una tesis doctoral es un trabajo muy arduo pero que, al finalizarlo, ofrece muchas recompensas, siendo la principal de ellas, la gente extraordinaria que conoces y te ayuda de una manera directa o indirecta en el progreso de la misma. Por ello, quiero agradecer a mis compañeros, amigos y familiares que me han acompañado en este camino que hemos recorrido juntos durante estos cuatro años.

En primer lugar, a mis directores de tesis Valentín, Julio y Maica. Gracias Valentín, por haber confiado en mí para esta tesis y darme la oportunidad de crecer tanto en lo personal, como en lo profesional y, sobre todo, por el tiempo perdido en la corrección de mis fallos (que no eran pocos). Gracias Julio, “campeón”, por tus enseñanzas, al igual que por tu infinita paciencia a la hora de mostrarme las técnicas que tanto he necesitado en esta tesis (incluso las más tontas, como las diluciones). Gracias Maica, por tus lecciones de histología, tus buenos consejos y por tranquilizarme en cualquiera de mis ataques.

Gracias Miguel, “mi cuarto director”, por esas primeras nociones en la paratuberculosis (descubriendo qué es un granuloma), por ayudarme en los muestreos hasta horas intempestivas. Sin ti, este trabajo no hubiese sido tan ameno. A nivel personal, no puedo olvidarme de que fuiste mi maestro en el tapeo y en la maravillosa historia de León.

A mis compañeros y compañeras que me han ayudado y han sufrido mis histerismos a la hora de hacer los experimentos, los sacrificios, los muestreos, las comunicaciones orales y en la escritura de la tesis. Gracias Maikel, por tus sabios consejos y por la simpatía que has adquirido a lo largo de estos años. Gracias Pablo, por tu compañerismo y por tus inesperados abrazos. Gracias Elena, por ser mi compañera de fatigas. Gracias MT, mi compañera de confianzas, a pesar de que llegaste de las últimas, sin tus risas, tu apoyo y tu amistad, no lo habría conseguido. Gracias Nerea, por los ratos de desconexión y nuestros debates sobre la vida. Gracias Dani por ser un gran amigo y mostrarme que estás ahí siempre que lo necesito. Gracias Noive, el dicho quien mal empieza

(con comentarios tipo: conduces fatal y esto que haces es muy aburrido) bien acaba, es perfecto para nosotros. Gracias Raquel, la “nueva” becaria y mi manzana favorita, cómo olvidarme de tus actos tan espontáneos. Gracias Laetitia y María, las antiguas glorias de nuestro equipo, sin ellas el estudio de la paratuberculosis estaría incompleto, vosotras allanasteis el camino, que los demás estamos, simplemente, continuando. También quiero agradecer al resto del personal de la Unidad de Anatomía Patológica: Alba, Claudia, Eva, Francisco, Gloria y María José. Gracias en general a la Universidad de León, en especial al servicio de citometría que han aportado sus conocimientos.

Gracias al personal del IGM, por vuestros consejos y vuestro interés por la tesis: Camino, Carmen Agudín, Fernando, Gonzalo, Lucio, María, María Jesús, Mariví, Mario, Marta, Miguel, Nuria, Pablo, Pilar, Sonia y Yolanda. En especial quiero dar mi más sincero agradecimiento a Carmen, mi “madre” del IGM, no sólo has sido la mejor técnico, sino que me has ayudado innumerables veces, eres grande como persona y como trabajadora. Gracias Javier Giráldez, por tu paciencia en las clases particulares de estadística. Gracias Iván, por tu disponibilidad dentro y fuera del trabajo. Y, por último, gracias por prestarme vuestras instalaciones y todo lo necesario para la realización de los experimentos.

No podría olvidarme de la parte fundamental del IGM, los becarios y becarias. Gracias al grupo de Marzanas, por nuestras salidas de los jueves, nuestras excursiones y nuestros ratos de desahogo: Alba, Alex, Carolina, Javi, Myriam, Saúl, Tamara y Vero (para que veas que no me olvido de ti). Una especial mención para Elora, gracias por apuntarte a todo (hasta a un bombardeo) y por ser la consejera de mis problemas; y para David, gracias a mi bestie, por todo lo que me aportas en mi vida y, sencillamente, por ser mi amigo.

Gracias Gonzalo, un ganadero joven que apuesta por la innovación. Su ayuda y la de sus trabajadores, ha sido vital en nuestros muestreos. Gracias a CZ Veterinaria, por cedernos las PPDs y las vacunas empleadas en la tesis, y a la Junta de Castilla y León por haber facilitado este estudio. Tampoco puedo olvidarme de los estudiantes de grado que me han ayudado durante todos estos años: Clara, Cristina, Jorge y Raquel.

Me gustaría dar las gracias a la gente de Neiker que me instruyó en el arte de las técnicas microbiológicas, así como en la elaboración y facilitación del inóculo experimental y la johnina: Elena, Iker, Joseba, Natalia (por tus aportaciones a este proyecto) y Ramón. Principalmente a Olalla, Rakel y Miriam, gracias por ser mi apoyo en Bilbao y redescubrirme la paratuberculosis. Gracias por ceder vuestros laboratorios para hacer cualquier cultivo necesario.

I had the opportunity to know some of the greatest researchers in paratuberculosis when I went to Moredun Research Institute. I want to express my gratitude to Karen, Craig and Val. They improved my knowledge about paratuberculosis and they had a lot of patience to teach me, because my English level was not very good at those days. Thanks Alicia, Ana, Maria and Antonia to be my support in that moment.

Gracias a mis amigos por escucharme y apoyarme: Bárbara, Eva, Judith, María (mi amore), Nacho, Nina y Yully.

Por último, gracias a mi familia, mi apoyo constante, sois la fuerza que necesito cada día para ponerme en marcha. Gracias a mi madre y a mi padre, me habéis enseñado que, a pesar de nuestras limitaciones, no hay cosa imposible en este mundo. Gracias a mi hermano Jose, por tu apoyo constante e incondicional. Gracias a mi tía Mari, tú has sido, eres y serás, mi pilar en esta vida. Tú me animaste a empezar veterinaria y este doctorado, seguramente, a cualquier cosa que me proponga en esta vida. Soy quien soy, hoy en día, gracias a ti. Gracias a mi prima Lucía, mi hermana pequeña, tan parecidos y diferentes a la vez y, a pesar de ello, siempre estaremos el uno para el otro. Gracias a mi yayo Tino y a mi yaya Lucía, ellos han demostrado que nuestros orígenes no importan, porque con tu esfuerzo y tu constancia puedes llegar donde te propongas. Gracias Tiko, por esperarme cada día y ser mi compañero en cada aventura que emprendo.

Gracias a todos por ayudarme, sin vosotros no lo hubiera conseguido. También a esas personas que, aunque no nombre, han estado apoyándome en algún momento de esta etapa que finaliza.

GRACIAS A TODOS, esta es mi tesis y la vuestra.

ÍNDICE

CAPÍTULO I PARATUBERCULOSIS: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	1
1. ETIOLOGÍA	3
1.1. Taxonomía	3
1.2. Características bacteriológicas	5
1.3. Persistencia en el medio	6
2. EPIDEMIOLOGÍA	8
2.1. Hospedadores susceptibles	8
2.2. Transmisión	8
2.3. Distribución y prevalencia	10
2.4. Importancia económica	14
3. PATOGENIA.....	15
3.1. Entrada de Map en el hospedador	16
3.2. Aparición de las lesiones iniciales y su progresión	19
3.3. Respuesta inmunitaria del hospedador.....	22
3.3.1. Respuesta inmunitaria innata.....	22
3.3.2. Respuesta inmunitaria adaptativa	25
3.3.2.1. Respuesta inmunitaria celular	28
3.3.2.2. Respuesta inmunitaria humoral	30
4. SIGNOS CLINICOS Y LESIONES	33
4.1. Síntomas	33
4.2. Lesiones	34
4.2.1. Lesiones macroscópicas	34
4.2.2. Lesiones microscópicas	36
4.2.3. Lesiones extraintestinales	36
4.3. Clasificación lesional.....	37
4.4. Relación entre las formas lesionales y la respuesta inmunitaria	44
5. INFECCIONES EXPERIMENTALES	46
6. MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO	52
6.1. Diagnóstico anatomopatológico.....	52
6.2. Diagnóstico microbiológico.....	54
6.2.1. Baciloscopia	54
6.2.2. Cultivo bacteriológico	54
6.2.3. Detección del ADN micobacteriano	56

6.3.	Diagnóstico inmunológico.....	58
6.3.1.	Pruebas basadas en la respuesta inmunitaria celular.....	59
6.3.2.	Pruebas basadas en la respuesta inmunitaria humoral	62
7.	TRATAMIENTO Y CONTROL	63
7.1.	Quimioprofilaxis.....	64
7.2.	Medidas de control de la enfermedad	65
8.	VACUNACIÓN	67
8.1.	Tipos de vacunas y adyuvantes.....	70
8.2.	Pautas vacunales	81
8.3.	Efectos vacunales.....	84
8.4.	Efectos adversos	89
8.5.	Interferencias diagnósticas con la tuberculosis	90
9.	MAP EN LA SALUD PÚBLICA	97
	CAPÍTULO II JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....	103
	CAPÍTULO III EFECTO DE LA VACUNACIÓN FRENTE A	
	PARATUBERCULOSIS EN UN REBAÑO CAPRINO DE LECHE: SEGUIMIENTO	
	DURANTE 2 AÑOS.....	113
1.	INTRODUCCIÓN.....	115
2.	MATERIAL Y MÉTODOS.....	116
2.1.	Selección de animales y protocolo de vacunación	116
2.2.	Duración y estudios realizados	117
2.2.1.	Seguimiento clínico y necropsias	117
2.2.2.	Valoración de la respuesta inmunitaria periférica.....	118
2.2.2.1.	Valoración de la respuesta inmunitaria celular	118
2.2.2.2.	Valoración de la respuesta inmunitaria humoral	121
2.3.	Análisis estadístico	124
3.	RESULTADOS.....	124
3.1.	Evaluación del número de bajas	124
3.2.	Valoración de la respuesta inmunitaria periférica.....	126
3.2.1.	Valoración de la respuesta inmunitaria celular.....	126
3.2.2.	Valoración de la respuesta inmunitaria humoral.....	128
4.	DISCUSIÓN	129

CAPÍTULO IV ESTUDIO DE LOS EFECTOS DE LA VACUNACIÓN ANTES O DESPUÉS DE UNA INFECCIÓN EXPERIMENTAL CON <i>Mycobacterium avium</i> subespecies <i>paratuberculosis</i> (Map) EN LA ESPECIE CAPRINA	139
1. INTRODUCCIÓN.....	141
2. MATERIAL Y MÉTODOS.....	142
2.1. Selección de animales y diseño experimental	142
2.2. Vacunación y desafío.....	145
2.3. Estudios <i>in vivo</i> realizados.....	146
2.3.1. Valoración de la respuesta inmunitaria periférica.....	146
2.3.1.1. Valoración de la respuesta inmunitaria celular	146
2.3.1.2. Valoración de la respuesta inmunitaria humoral	148
2.3.1.3. Caracterización de las subpoblaciones linfocitarias en sangre periférica	148
2.3.2. Cultivo de Map en muestras de heces.....	152
2.3.2.1. Medios de cultivo empleados.....	152
2.3.2.2. Siembra de las muestras y cultivo bacteriológico	154
2.4. Estudios <i>post mortem</i> realizados.....	156
2.4.1. Estudios anatomopatológicos	156
2.4.1.1. Necropsia, examen macroscópico y toma de muestras	156
2.4.1.2. Estudio histopatológico.....	156
2.4.2. Estudios bacteriológicos.....	159
2.4.2.1. Detección de Map mediante cultivo bacteriológico a partir de tejidos... ..	159
2.4.2.2. Detección de Map mediante PCR anidada de tejidos en parafina	159
2.4.3. Valoración de la respuesta inmunitaria local	164
2.4.3.1. Extracción de leucocitos mononucleares a partir de los tejidos.	164
2.4.3.2. Valoración de la secreción <i>in vitro</i> de IFN- γ	165
2.4.3.3. Caracterización de las subpoblaciones linfocitarias en tejidos.....	166
2.5. Análisis estadístico	166
3. RESULTADOS.....	167
3.1. Estudios <i>in vivo</i> realizados.....	167
3.1.1. Valoración de la respuesta inmunitaria periférica.....	167
3.1.1.1. Valoración de la respuesta inmunitaria celular	167
3.1.1.2. Valoración de la respuesta inmunitaria humoral	171
3.1.1.3. Caracterización de las subpoblaciones linfocitarias en sangre periférica	173
3.1.2. Cultivo de Map en muestras de heces.....	174

3.2.	Estudios post-mortem realizados	175
3.2.1.	Estudios anatomopatológicos	175
3.2.2.	Estudios bacteriológicos	188
3.2.2.1.	Aislamiento e identificación de Map mediante cultivo bacteriológico a partir de tejidos	188
3.2.2.2.	Detección de ácidos nucleicos de Map mediante PCR de tejidos incluidos en parafina	188
3.2.3.	Valoración de la respuesta inmunitaria local	189
3.2.3.1.	Valoración de la secreción <i>in vitro</i> de IFN- γ	189
3.2.3.2.	Caracterización de las subpoblaciones linfocitarias en los tejidos ...	191
3.3.	Resultados globales de los animales estudiados en los dos sacrificios	192
4.	DISCUSIÓN	196
CAPÍTULO V PRODUCCIÓN DE IFN-Γ EN SANGRE PERIFÉRICA EN CABRAS VACUNADAS FRENTE A PARATUBERCULOSIS EN RESPUESTA A DIFERENTES ANTÍGENOS DE <i>Mycobacterium avium</i> subespecies <i>paratuberculosis</i> Y <i>M. bovis</i>		
213		
1.	INTRODUCCIÓN.....	215
2.	MATERIAL Y MÉTODOS.....	216
2.1.	Selección de animales y diseño experimental	216
2.2.	Antígenos empleados.....	217
2.3.	Valoración de la producción de IFN- γ en sangre periférica	218
2.3.1.	Toma y procesado de las muestras de sangre	218
2.3.2.	Valoración de la respuesta inmunitaria periférica.....	219
2.3.2.1.	Determinación de la cantidad de IFN- γ	219
2.4.	Análisis estadístico	219
3.	RESULTADOS.....	219
3.1.	Valoración de la producción de IFN- γ	219
4.	DISCUSIÓN	226
CAPÍTULO VI DISCUSIÓN GENERAL		
233		
CAPÍTULO VII CONCLUSIONES / CONCLUSIONS.....		
251		
CAPÍTULO VIII RESUMEN / SUMMARY		
259		
CAPÍTULO IX BIBLIOGRAFÍA		
269		

LISTADO DE ABREVIACIONES

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

ARN: Ácido ribonucleico.

APPCC: Análisis de Peligros y Puntos Críticos

BAAR: Bacilos ácido alcohol resistentes.

BCG: Bacille Calmette-Guerin - Bacilo de calmette-guérin.

B.O.C.Y.L.: Boletín Oficial de Castilla y León.

Cptb: *Corynebacterium pseudotuberculosis*.

CARD15: Caspase Recruitment Domain 15 - Dominio de reclutamiento de caspasa 15.

CMH: Complejo mayor de histocompatibilidad.

CMNR: *Corynebacterium* (C), *Mycobacterium* (M), *Nocardia* (N) y *Rhodococcus* (R).

CPA: Células Presentadoras de Antígeno.

CR: Complement Receptor - Receptores del complemento.

CSIC: Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

DIVA: Reagents to Differentiate Infected from Vaccinated Animal - Reactivos para diferenciar animales infectados de vacunados.

dpi: días post infección.

dpv: días post vacunación.

EC: Enfermedad de Crohn.

EE.UU.: Estados Unidos de América.

EGF: Epidermal Growth Factor - Factor de crecimiento epidérmico

ELISA: Enzyme Linked Immunosorbent Assay - Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas.

G: Fuerza centrífuga relativa.

HEYM: Herrold's Egg Yolk Mycobactin.

HIS: Hibridación *in situ*.

HE: Hematoxilina - Eosina.

- HPC:** Hexadecylpyridinium chloride - Cloruro de hexadecil piridinio.
- IBD:** Inflammatory Bowel Disease - Enfermedad inflamatoria intestinal.
- IAC:** Internal Amplification Control - Control interno de amplificación.
- IDTB:** Intradermotuberculinización.
- IFN- γ :** Interferon gamma - gamma interferón.
- IgG:** Inmunoglobulinas tipo G.
- IGRA:** Interferon Gamma Release Assay - Prueba de la liberación del gamma interferón.
- IGM:** Instituto de Ganadería de Montaña.
- IL:** Interleuquina.
- ILd:** Íleon distal.
- ILm:** Íleon medio.
- ILp:** Íleon proximal.
- IHQ:** Inmunohistoquímica.
- iNOS:** inducible Nitric Oxide Synthase - Óxido nítrico sintetasa inducible.
- IS:** Insertion Sequences - Secuencias de inserción.
- ITT:** Intradermal Tuberculin Test – Intradermotuberculinización.
- LP:** Lámina propia.
- Nramp1:** Natural resistance-associated macrophage Protein 1 - Proteína macrófaga 1 asociada a la resistencia natural.
- Maa:** *Mycobacterium avium* subspecies *avium*.
- MAC:** *Mycobacterium avium* Complex - Complejo *Mycobacterium avium*.
- Mah:** *Mycobacterium avium* subspecies *hominisuis*.
- Map:** *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*.
- MAPA:** Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación.
- Mas:** *Mycobacterium avium* subspecies *silvaticum*.
- mpv:** meses post vacunación.
- min:** minutos.

mm: milímetros.

NL: Nódulo linfático.

NLM: Nódulo linfático mesentérico.

NLP: Nódulo linfático preescapular.

NLR: NOD-Like Receptor - Receptores de tipo NOD.

NLYC: Nódulo linfático yeyunal caudal.

NLYM: Nódulo linfático yeyunal medio.

NOD2: Nucleotide-Binding Oligomerization Domain 2 - Dominio de oligomerización de unión a nucleótidos 2.

OADC: Oleico - Albumina - Dextrosa - Catalasa.

OIE: Organización Mundial de Sanidad Animal.

PAMP: Pathogen-Associated Molecular Patterns - Patrones moleculares asociados al patógeno.

PATUBES: Plan de Actuación sobre Tuberculosis en Especies Silvestres.

PBMC: Peripheral Blood Mononuclear Cells - Células mononucleares de sangre periférica.

PCR: Polymerase Chain Reaction - Reacción en cadena de la polimerasa.

PCR-REA: PCR-restriction enzyme analysis - PCR-análisis de restricción enzimática.

PDGF: Platelet Derived Growth Factor - Factor de crecimiento derivado de plaquetas

PFGE: Pulsed-Field Gel Electrophoresis - Electroforesis en gel de campo pulsado.

PNETB: Plan Nacional de Erradicación de Tuberculosis Bovina.

PPD: Purified Protein Derivative - Derivado proteico purificado.

PPY: Placa de Peyer del yeyuno.

PPYd: Placa de Peyer del yeyuno distal.

PPYm: Placa de Peyer del yeyuno medio.

PPYp: Placa de Peyer del yeyuno proximal.

PRR: Pattern Recognition Receptors - Receptores de reconocimiento de patrones.

qPCR: quantitative PCR - PCR cuantitativa.

RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism - Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción.

rpm: revoluciones por minuto.

s: segundos.

SFB: Suero Fetal Bovino.

SNP: Single Nucleotide Polymorphism - Polimorfismo de un solo nucleótido.

TCR: T Cell Receptor - Receptor de células T.

TLR: Toll-Like Receptor - Receptor tipo Toll.

TNF- α : Tumor Necrosis Factor α - Factor de necrosis tumoral α .

U: Unidades Internacionales

UFC: Unidades Formadoras de Colonias.

ULE: Universidad de León.

VIC: Válvula ileocecal.

WC1+: Workshop Cluster 1⁺.

Yd: Yeyuno distal sin placa de Peyer.

Ym: Yeyuno distal sin placa de Peyer.

Yp: Yeyuno distal sin placa de Peyer.

ZN: Ziehl-Neelsen.

ÍNDICE DE TABLAS

Capítulo I. Revisión bibliográfica

Tabla I.1. Resumen de la prevalencia en rebaños bovinos en Europa. Datos tomados de Nielsen y Toft (2009) 11

Tabla I.2. Resumen de la prevalencia en rebaños ovinos y caprinos en Europa. Datos tomados de Nielsen y Toft (2009) 11

Tabla I.3. Tabla resumen de vacunas. Datos tomados de Rosseels y Huygen (2008) y de Bastida y Juste (2011) 75

Tabla I.3. Tabla resumen de vacunas. Datos tomados de Rosseels y Huygen (2008) y de Bastida y Juste (2011) (continuación I) 76

Tabla I.3. Tabla resumen de vacunas. Datos tomados de Rosseels y Huygen (2008) y de Bastida y Juste (2011) (continuación II) 77

Tabla I.3. Tabla resumen de vacunas. Datos tomados de Rosseels y Huygen (2008) y de Bastida y Juste (2011) (continuación III) 78

Capítulo III. Efecto de la vacunación frente a paratuberculosis en un rebaño caprino de leche: seguimiento durante 2 años

Tabla III.1. Soluciones de trabajo empleadas para la realización de la prueba ELISA indirecto 122

Tabla III.2. Número de bajas, y porcentaje, distribuidos de acuerdo a cada grupo experimental y el periodo en el que se produjeron (1º o 2 año, y el total). AdultasV: vacunadas > 1,5 años; AdultasNV: no vacunadas > 1,5 años; 5MV: vacunadas a los 5 meses; 5MNV: no vacunadas a los 5 meses; 1,5MV: vacunadas a los 1,5 meses; 1,5MNV: no vacunadas a los 1,5 meses 125

Capítulo IV. Estudio de los efectos de la vacunación antes o después de una infección experimental con *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* (Map) en la especie caprina.

Tabla IV.1. Distribución de los animales en los distintos grupos experimentales según el momento en el que fueron vacunados, desafiados o sacrificados. 143

Tabla IV.2. Soluciones de trabajo empleadas en la extracción de PBMCs 150

Tabla IV.3. Reactivos y cantidades empleadas para la elaboración de los medios de cultivo en un volumen final de 2 litros 154

Tabla IV.4. Etapas de las tinciones llevadas a cabo en las secciones de tejido para los estudios histopatológicos 158

Tabla IV.5. Reactivos para la realización de la mezcla para la amplificación de las secuencias en las rondas 1 y 2 162

Tabla IV.6. Etapas de la primera y la segunda ronda de amplificación en la PCR anidada para detectar ácidos nucleicos de Map 163

Tabla IV.7. Distribución del número de animales en función del tipo de lesión, pertenecientes a los dos grupos infectados, sacrificados a los 120 dpi. NVI: no vacunado e infectado; VI: vacunado a los -30 dpi e infectado..... 177

Tabla IV.8. Distribución de los animales en función del tipo de lesión encontrado en el intestino durante el segundo sacrificio realizado a los 330 dpi, y del grupo experimental. NVI: no vacunado, infectado. VI: vacunado a los -30 dpi e infectado; IV: Infectado y vacunados a los 150 dpi..... 179

Tabla IV.9. Resumen de todos los estudios in vivo y post mortem realizados antes o en el primer sacrificio a los 120 dpi en los cabritos de los diferentes grupos estudiados. VI: vacunado -30 dpi e infectado; VNI: vacunado a los -30 dpi, pero no infectado; NVI: no vacunado, pero sí infectado; NVNI: no vacunado no infectado. dpi: días post-infección..... 194

Tabla IV.10. Resumen de todos los estudios in vivo y post mortem realizados antes o en el segundo sacrificio a los 330 dpi en los cabritos de los diferentes grupos estudiados. VI: vacunado -30 dpi e infectado; VNI: vacunado a los -30 dpi, pero no infectado; NVI: no vacunado, pero sí infectado; IV: infectado y vacunado a los 150 dpi; NIV: no infectado, vacunado a los 150 dpi. NVNI: no vacunado no infectado 195

ÍNDICE DE FIGURAS

Capítulo I. Revisión bibliográfica.

Figura I.1. Localización de las lesiones granulomatosas y evolución de las lesiones en el intestino. El dibujo representa una sección de intestino con y sin placa de Peyer. LESIÓN FOCAL. Pequeños granulomas restringidos al espacio interfolicular. LESIÓN MULTIFOCAL. Los granulomas se extienden hacia la LP adyacente al tejido linfoide (Tipo a) y hacia LP no asociada a tejido linfoide (Tipo b). LESIÓN DIFUSA. Los granulomas aumentan de tamaño y se produce una alteración de la estructura histológica normal de la mucosa y submucosa 41

Capítulo III. Efecto de la vacunación frente a paratuberculosis en un rebaño caprino de leche: seguimiento durante 2 años.

Figura III.1. Esquema del diseño del estudio y momentos de toma de muestras de sangre (M0 a M7). mpv: meses post vacunación 118

Figura III.2. Esquema representativo del procedimiento seguido en la técnica IGRA 120

Figura III.3. Esquema representativo del procedimiento seguido en la técnica ELISA indirecto 123

Figura III.4. Evolución de la producción de IFN- γ tras la estimulación de la sangre con la PPD aviar según cada grupo experimental. AdultasV: 1,5 años vacunadas; 5MV: 5 meses vacunadas; 1,5MV: 1,5 meses vacunadas; AdultasNV: 1,5 años no vacunadas; 5MNV: 5 meses no vacunadas; 1,5MNV: 1,5 meses no vacunadas. mpv: meses post vacunación. * diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los grupos vacunados y los no vacunados 127

Figura III.5. Evolución de la producción del IFN- γ tras la estimulación de la sangre con la PPD bovina según cada grupo experimental. AdultasV: 1,5 años vacunadas; 5MV: 5 meses vacunadas; 1,5MV: 1,5 meses vacunadas; AdultasNV: 1,5 años no vacunadas; 5MNV: 5 meses no vacunadas; 1,5MNV: 1,5 meses no vacunadas. mpv: meses post vacunación. * diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los grupos vacunados y los no vacunados 128

Figura III.6. Evolución de la producción de anticuerpos frente a Map según cada grupo experimental. AdultasV: 1,5 años vacunadas; 5MV: 5 meses vacunadas; 1,5MV: 1,5 meses vacunadas; AdultasNV: 1,5 años no vacunadas; 5MNV: 5 meses no vacunadas; 1,5MNV: 1,5 meses no vacunadas. mpv: meses post-vacunación. * diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los grupos vacunados y los no vacunados 129

Capítulo IV. Estudio de los efectos de la vacunación antes o después de una infección experimental con *Mycobacterium avium* subespecies *paratuberculosis* (Map) en la especie caprina.

Figura IV.1. Esquema del diseño experimental. M: muestreo; DPV: días post vacunación; DPI: días post infección; VNI: vacunado a los -30 dpi y no infectado;

VI: vacunado a los -30 dpi e infectado; NVI: no vacunado, pero sí infectado; IV: infectado y vacunado a los 150 dpi; NIV: no infectado, pero sí vacunado a los 150 dpi 144

Figura IV.2. Representación esquemática de la disposición de las muestras para su incubación con PBS, con PPD aviar y con CoA (concanavalina A). NLP: nódulo linfático preescapular; NLYC: nódulo linfático yeyunal caudal; NLYM: nódulo linfático yeyunal medio; PPYm: placa de Peyer yeyunal de la zona media. ILd: Íleon distal..... 166

Figura IV.3. Evolución del índice IFN- γ de los diferentes grupos experimentales cuando las muestras de sangre fueron estimuladas con la PPD aviar. V: vacunación, I: infección; S: sacrificio; VI: vacunado a los -30 dpi e infectado; VNI: vacunado a los -30 dpi y no infectado; NVI: no vacunado e infectado; IV: infectado y vacunado a los 150 dpi; NIV: no infectado y vacunado a los 150 dpi; NVNI: no vacunado no infectado. dpi: días post infección 169

Figura IV.4. Evolución del índice IFN- γ de los diferentes grupos experimentales cuando las muestras de sangre fueron estimuladas con la PPD bovina. V: vacunación, I: infección; S: sacrificio; VI: vacunado a los -30 dpi e infectado; VNI: vacunado a los - 30 dpi y no infectado; NVI: no vacunado e infectado; IV: infectado y vacunado a los 150 dpi; NIV: no infectado y vacunado a los 150 dpi; NVNI: no vacunado no infectado. dpi: días post infección 170

Figura IV.5. Incremento medio del grosor cutáneo, en mm, de los animales de los distintos grupos experimentales tras la ejecución de la IDTB a los 90 dpi, tras la inoculación de PPD aviar, PPD bovina y johnina. VI: vacunado a los -30 dpi e infectado; VNI: vacunado a los -30 dpi y no infectado; NVI: no vacunado e infectado; NVNI: no vacunado, no infectado 171

Figura IV.6. Evolución de los niveles medios del índice ELISA (anticuerpos séricos) en los diferentes grupos experimentales. V: vacunación, I: infección; S: sacrificio; VI: vacunado a los -30 dpi e infectado; VNI: vacunado a los -30 dpi y no infectado; NVI: no vacunado e infectado; IV: infectado y vacunado a los 150 dpi; NIV: no infectado y vacunado a los 150 dpi; NVNI: no vacunado no infectado. dpi: días post infección 173

Figura IV.7. Porcentaje medio de las diferentes subpoblaciones linfocitarias inmunomarcadas con los anticuerpos CD4, CD8, WC1 y CD21 en los diferentes grupos experimentales en sangre a los 120 dpi. PBMCS: células mononucleares de sangre periférica. VI: vacunado a los -30 dpi e infectado; VNI: vacunado a los -30 dpi y no infectado; NVI: no vacunado, infectado; NVNI: no vacunado no infectado 174

Figura IV.8. Porcentaje medio de las diferentes subpoblaciones linfocitarias inmunomarcadas con los anticuerpos CD4, CD8, WC1 y CD21 en los diferentes grupos experimentales en sangre a los 330 dpi. PBMCS: células mononucleares de sangre periférica. VI: vacunado a los -30 dpi e infectado; VNI: vacunado a los -30 dpi y no infectado; NVI: no vacunado, infectado; NVNI: no vacunado no infectado. 174

Figura IV.9. Sección de yeyuno del animal del grupo VI que mostraba un engrosamiento difuso de la mucosa intestinal 175

Figura IV.10. a. Lesión focal del grupo NVI. Granuloma poco delimitado, con carácter infiltrativo. Yeyuno. HE. b. Lesión focal del grupo VI. Granuloma bien delimitado formado por macrófagos y células gigantes. Yeyuno. HE. c. Lesión multifocal a del grupo NVI. Varios granulomas localizados en la zona interfolicular de placa de Peyer yeyunal, que comienzan a invadir los folículos linfoides. Se aprecian granulomas en la lámina propia adyacente al tejido linfoide. Yeyuno. HE. d. Lesión multifocal b del grupo NVI. Granuloma en lámina propia no adyacente a tejido linfoide. Yeyuno. HE. e y f. Lesión focal del grupo VI. Detalle de un granuloma con HE y con tinción tricrómica de Masson donde se puede observar gran cantidad de tejido conjuntivo, infiltrando el granuloma. Yeyuno..... 178

Figura IV.11. a Lesión multifocal a del grupo NVI. Granulomas de mayor tamaño en el tejido y algunos invaden la lámina propia adyacente. Yeyuno. HE. b. Lesión multifocal b del grupo NVI. Granulomas localizados en la lámina propia no adyacente a tejido linfoide. Yeyuno. HE. c. Lesión multifocal b del grupo NVI. Granuloma a mayor detalle donde se puede ver el carácter infiltrativo. Yeyuno. d. Lesión multifocal del grupo NVI. Nódulo linfático con múltiples granulomas en su cortical. HE. e. Serositis granulomatosa del grupo NVI. Granuloma localizado en la serosa del yeyuno. HE. f. Lesión focal del grupo VI. Granulomas de pequeño tamaño y bien delimitado, como se puede observar a mayores aumentos 181

Figura IV.12. a. Lesión focal del grupo VI. Granuloma poco delimitado y de carácter infiltrativo localizado en el espacio interfolicular de una placa de Peyer del yeyuno HE. b. Lesión multifocal a del grupo VI. Granulomas de mayor tamaño. Un número escaso de granulomas invaden la lámina propia adyacente al tejido linfoide. Yeyuno HE. c. Lesión multifocal b del grupo VI. Granulomas localizados en la lámina propia no adyacente a tejido linfoide. Yeyuno. HE. d. Lesión multifocal del grupo VI. Nódulo linfático yeyunal con múltiples granulomas en su cortical y áreas de necrosis. HE 183

Figura IV.13 a. Lesión difusa del grupo IV. Granulomas alterando la estructura normal de la submucosa del íleon. HE. b. Lesión difusa del grupo IV. Detalle de un engrosamiento de las microvellosidades del íleon. HE. c. Lesión difusa del grupo IV. Granuloma alterando la estructura normal de la submucosa del íleon y dilatación de los vasos linfáticos. HE. d. Lesión difusa del grupo IV. Los granulomas alteran la estructura tanto de la mucosa como submucosa de la VIC, provocando un engrosamiento de las microvellosidades. HE. e. Lesión difusa del grupo IV. Múltiples granulomas en la cortical y medular de un nódulo linfático yeyunal. f. Lesión difusa del grupo IV. Los granulomas confluyen la zona derecha de la imagen, formando un granuloma de gran tamaño que presenta necrosis caseosa y áreas de mineralización en su centro. HE. g. Lesión difusa del grupo VI. Presencia de BAAR en el citoplasma de los macrófagos asociados a una lesión difusa en yeyuno. ZN. h. Lesión difusa del grupo VI. Presencia de BAAR a mayores aumentos 184

Figura IV.14. Evolución del número medio de granulomas por animal en los distintos grupos experimentales, según el momento de sacrificio de los cabritos. VI: vacunado a los -30 dpi e infectado; NVI: No vacunado, infectado; IV: infectado y vacunado a los 150 dpi..... 186

Figura IV.15. Número medio de granulomas por animal encontrado en el primer sacrificio (120 dpi) para cada una de las diferentes localizaciones del

intestino delgado y nódulos linfáticos yeyunales examinadas, según el grupo experimental. VI: vacunado a los -30 dpi e infectado; NVI: No vacunado, infectado. VIC: válvula ileocecal; ILd: íleon distal; ILm: íleon medio; ILp: íleon proximal; PPYYd: placa de Peyer del yeyuno distal; PPYm: placa de Peyer del yeyuno medio; PPYp: placa de Peyer del yeyuno proximal; Yd: yeyuno distal; Ym: yeyuno medio; Yp: yeyuno proximal; NL: nódulos linfáticos asociados . 187

Figura IV.16. Número medio de granulomas por animal encontrado en el segundo sacrificio (330 dpi) para cada una de las diferentes localizaciones del intestino delgado y nódulos linfáticos yeyunales examinadas, según el grupo experimental. VI: vacunado a los -30 dpi e infectado; NVI: No vacunado, infectado; IV: infectado y vacunado a los 150 dpi. VIC: válvula ileocecal; ILd: íleon distal; ILm: íleon medio; ILp: íleon proximal; PPYYd: placa de Peyer del yeyuno distal; PPYm: placa de Peyer del yeyuno medio; PPYp: placa de Peyer del yeyuno proximal; Yd: yeyuno distal; Ym: yeyuno medio; Yp: yeyuno proximal; NL: nódulos linfáticos asociados 187

Figura IV.17. Resultados de los valores medios del índice de IFN- γ en las distintas muestras de tejido analizadas, según los grupos experimentales, a los 120 dpi de los diferentes grupos experimentales en las tres muestras de tejidos tras la estimulación con PPD aviar. NLP: nódulo linfático preescapular; NL: nódulos linfáticos asociados; PP: placas de Peyer de yeyuno e íleon. VI: vacunado a los -30 dpi e infectado; VNI: vacunado a los -30 dpi y no infectado; NVI: no vacunado, infectado; IV: infectado y vacunado a los 150 dpi; NIV: no infectado, vacunado a los 150 dpi; NVNI: no vacunado no infectado..... 190

Figuras IV.18. Resultados de los valores medios del índice de IFN- γ en las distintas muestras de tejido analizadas, según los grupos experimentales, a los 330 dpi de los diferentes grupos experimentales en las tres muestras de tejidos tras la estimulación con PPD aviar. NLP: nódulo linfático preescapular; NL: nódulos linfáticos asociados; PP: placas de Peyer de yeyuno e íleon. VI: vacunado a los -30 dpi e infectado; VNI: vacunado a los -30 dpi y no infectado; NVI: no vacunado, infectado; IV: infectado y vacunado a los 150 dpi; NIV: no infectado, vacunado a los 150 dpi..... 190

Figuras IV. 19. Porcentaje del total de linfocitos expresando los CD4, CD8, WC1 y CD21 en los diferentes grupos experimentales en el NL (Nódulo linfático yeyunal caudal y medio) en el primer sacrificio (1) (120 dpi) y en el segundo (2) (330 dpi) dpi: días post infección. VI: vacunado a los -30 dpi e infectado; VNI: vacunado a los -30 dpi y no infectado; NVI: no vacunado, infectado; IV: infectado, vacunados a los 150 dpi; NIV: no infectado, vacunado a los 150 dpi; NVNI: no vacunado no infectado 191

Figura IV.20. Porcentaje del total de linfocitos expresando los CD4, CD8, WC1 y CD21 en los diferentes grupos experimentales en el el primer sacrificio (1) (120 dpi) y en el segundo (2) (330 dpi) dpi PP (Placas de Peyer de Yeyuno e íleon). VI: vacunado a los -30 dpi e infectado; VNI: vacunado a los -30 dpi y no infectado; NVI: no vacunado, infectado; IV: infectado, vacunados a los 150 dpi; NIV: no infectado, vacunado a los 150 dpi; NVNI: no vacunado no infectado 192

Capítulo V. Producción de IFN- γ en sangre periférica en cabras vacunadas frente a paratuberculosis en respuesta a diferentes antígenos de *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* y *M. bovis*

Figura V.1. Valores medios del índice IFN- γ en los animales de los distintos grupos a los 4 mpv, según el antígeno empleado para estimular la sangre (PPD aviar, johnina, VK 055 y VK 067). mpv: meses post vacunación. V: vacunado. I: infectado. NVNI: no vacunado-no infectado 220

Figura V.2. Valores medios del índice IFN- γ en los animales de los distintos grupos a los 9 mpv, según el antígeno empleado para estimular la sangre (PPD aviar y johnina) a los 9 mpv. mpv: meses post vacunación. V: vacunado. I: infectado. NVNI: no vacunado-no infectado 221

Figura V.3. Valores medios del índice IFN- γ en los animales de los distintos grupos a los 4 y 9 mpv, según el antígeno empleado para estimular la sangre (PPD bovina, PC-EC y PC-HP). mpv: meses post vacunación. V: vacunado. I: infectado. NVNI: no vacunado-no infectado 222

Figura V.4. Valores medios del índice IFN- γ en los animales de los distintos grupos de edad, según el antígeno empleado para estimular la sangre (PPD aviar y johnina), a los 9 mpv. M: meses; mpv: meses post vacunación 223

Figura V.5. Valores medios del índice IFN- γ en los animales de los distintos grupos de edad, según el antígeno empleado para estimular la sangre (PPD bovina, PC-EC, PC-HP), a los 9 mpv. M: meses; mpv: meses post vacunación 224

Figura V.6. Valores medios del índice IFN- γ en los animales de los distintos grupos de edad, según el antígeno empleado para estimular la sangre (PPD aviar y johnina), a los 15 mpv. M: meses; mpv: meses post vacunación 225

Figura V.7. Valores medios del índice IFN- γ en los animales de los distintos grupos de edad, según el antígeno empleado para estimular la sangre (PPD bovina, PC-EC, PC-HP), a los 15 mpv. M: meses; mpv: meses post vacunación 225

CAPÍTULO I
PARATUBERCULOSIS:
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1. ETIOLOGÍA

1.1. Taxonomía

La paratuberculosis o enfermedad de Johne fue descrita por primera vez al observar bacilos ácido alcohol resistentes (BAAR) en el intestino de vacas frisonas que mostraban diarrea crónica y adelgazamiento (Johne y Frothingham, 1895), en lo que se creía en un primer momento, que era una forma de tuberculosis intestinal. Tras haber recibido inicialmente las denominaciones de *Mycobacterium johnei* o *Mycobacterium paratuberculosis* (Sigurdsson, 1945; Francis y Madinaveitia, 1949), actualmente el agente causal se denomina ***Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis*** (Map) (Thorel *et al.*, 1990). Map se engloba dentro de la familia Mycobacteriaceae, suborden Corynebacterinae, orden Actinomycetales, subclase Actinobacteridae, clase Actinobacteria, división Firmicutes y superreino Bacteria (Stackebrandt *et al.*, 1997).

Dentro de la misma familia Mycobacteriaceae se encuentran otras micobacterias como *Mycobacterium avium* subespecie *avium* (Maa) y los agentes causales de la tuberculosis humana (*Mycobacterium tuberculosis*) y de la tuberculosis de los rumiantes (*Mycobacterium bovis* y *Mycobacterium caprae*) (Lory, 2014).

El **complejo *Mycobacterium avium*** (MAC) engloba cuatro subespecies muy relacionadas genéticamente entre sí, aunque cada una está dotada con unas características patogénicas específicas y con un rango de hospedadores definido. Este complejo lo forman: el propio Map, Maa, *Mycobacterium avium* subespecie *hominisuis* (Mah) y *Mycobacterium avium* subespecie *silvaticum* (Mas) (Rindi y Garzelli, 2014). La diferenciación de Map de los demás miembros del complejo se basa en la detección de las denominadas “secuencias de inserción” (IS), que son secuencias de ADN sin expresión fenotípica y que se insertan en diferentes lugares del genoma. Se han descrito, principalmente, 4 secuencias de inserción en las micobacterias del complejo MAC (Turenne *et al.*, 2007), siendo la IS900

la que únicamente se encontraría en Map (Green *et al.*, 1989; Castellanos *et al.*, 2009); además de esta secuencia, existen otras que son raras o de las cuales sólo se conoce parcialmente su distribución como son ISMav2 y ISMpa1, que también serían exclusivas de Map (Rindi y Garzelli, 2014).

Los avances en biología molecular de las últimas décadas han permitido tipificar diferentes cepas de Map, cuya existencia ya había sido señalada en función de criterios microbiológicos principalmente (Taylor, 1951). Para ello, se han empleado diversas técnicas como el análisis de polimorfismos de la longitud de fragmentos de restricción (RFLP) (Whipple *et al.*, 1990), la técnica de reacción en cadena de la polimerasa con endonucleasas de restricción (PCR-REA) (Marsh *et al.*, 1998; Whittington *et al.*, 2000b; Sevilla *et al.*, 2005) y la electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE) (Feizabadi *et al.*, 1997; Stevenson *et al.*, 2002; Sevilla *et al.*, 2007). Gracias a estas técnicas se han logrado clasificar las cepas de Map en dos genotipos principales: las cepas “**tipo C**” (**Cattle**) y “**tipo S**” (**Sheep**), cepas de origen bovino y ovino respectivamente, atendiendo a la principal especie a la que afectan (Stevenson, 2015).

Las cepas ovinas o tipo S se aíslan principalmente del ganado ovino, aunque también en algunos casos, en cabras y más raramente en otras especies, mientras que las cepas bovinas o tipo C, además de en ganado vacuno, son las aisladas principalmente en cabras, ciervos, y en otros rumiantes (Collins *et al.*, 1990; Stevenson, 2015). Se ha demostrado que su especificidad no es absoluta, ya que pueden encontrarse cepas en otras especies distintas de la especie hospedadora principal. Los estudios que demuestran este hecho han sido realizados tanto en condiciones naturales (Muskens *et al.*, 2000; Whittington *et al.*, 2001) como en condiciones experimentales (Verna *et al.*, 2007; Fernández *et al.*, 2014). También se propuso la existencia de un tercera cepa, “**tipo I**” (**Intermedia**) en la cual se observaron patrones de hibridación similares entre las cepas bovinas y ovinas (Collins *et al.*, 1990) pero que actualmente se considera un subtipo de las cepas tipo S (Stevenson, 2015).

Stevenson *et al.* (2002) con la ayuda de la técnica PFGE, clasificaron las cepas de Map en: tipo I, parecidas a las cepas ovinas; tipo II, cepas bovinas y un

tercer tipo o tipo III que se hallaría entre ambas, como tipo intermedio, pero más próximo a las cepas tipo S. Mediante una PCR-REA, también se ha descrito una tercera cepa, denominada “**tipo B**” (**Bison**) que había sido aislada de bisontes americanos y de cabras originarias de India (Whittington *et al.*, 2001; Sevilla *et al.*, 2007), pero que actualmente se considera un sub-linaje de las cepas tipo C o bovino (Stevenson, 2015). Las cabras pueden verse afectadas por cepas tanto bovinas como ovinas, hecho comprobado por Sevilla *et al.* (2007) empleando técnicas como la PFGE y PCR-REA.

Entre los tipos de cepa S y C, además de existir una variabilidad genética, también existen diferencias fenotípicas en su capacidad de crecimiento en medios de cultivo, virulencia, capacidad de infección o rasgos epidemiológicos (Stevenson, 2015). Respecto a la virulencia, Verna *et al.* (2007), en una infección experimental llevada a cabo en corderos, encontraron diferencias entre distintos aislados incluso dentro del mismo tipo de cepa. Posteriormente, también en una infección experimental (Fernández *et al.*, 2014) en la que se evaluaba el efecto de las diferentes cepas de Map sobre la patogenia de la enfermedad en el ganado ovino, se observó que, aquellos animales infectados con cepas tipo C, presentaron lesiones de carácter regresivo y una tendencia descendente en la gravedad de las lesiones a lo largo de la infección, a diferencia de los corderos infectados con cepas tipo S, donde el curso era progresivo. Además, también se confirmó la existencia de variabilidad en su virulencia dentro de los aislados empleados dentro de los mismos tipos de cepa.

1.2. Características bacteriológicas

Map es una bacteria ácido alcohol resistente que mide entre 0.5 y 1.5 μm , tiene forma cocobacilar y es Gram positiva (Chiodini *et al.*, 1984a). La característica de ácido alcohol resistencia es la responsable del empleo de la tinción Ziehl-Neelsen (ZN) como la técnica más adecuada para su identificación. Es un microorganismo aerobio cuya temperatura óptima de crecimiento es de 37 °C (Levy-Frebault y Portaels, 1992).

El crecimiento de esta micobacteria en los medios de cultivo es lento (Grange *et al.*, 1990), de forma que el periodo requerido para observar colonias de Map comprende de 8 a 16 semanas (Chiodini *et al.*, 1984a). Además, para su crecimiento, necesita un factor de crecimiento especial, la micobactina, un compuesto quelante del hierro (Merkal y Curran, 1974). Los principales medios de cultivo donde crece son los elaborados a base de huevo como el medio Herrold (Herrold's Egg Yolk Mycobactin - HEYM) o el Löwenstein-Jensen, y medios sintéticos como el Middlebrook 7H9 o el 7H11 (Garrido *et al.*, 2000). Las colonias son de pequeño tamaño, entre 1 - 5 mm, con una superficie lisa y blanquecina brillante (Chiodini *et al.*, 1984a). El crecimiento lento de la micobacteria y el requerimiento de la micobactina en los medios, son características que permiten la identificación de Map en su aislamiento en laboratorio.

Además, el aislamiento y crecimiento de Map también depende del tipo de cepa. Las del grupo C son mucho más fáciles de aislar a partir de muestras clínicas y crecen mucho más rápido que las cepas de tipo S, produciendo colonias visibles a las 4 - 6 semanas (dependiendo del inóculo inicial y del medio empleado). En cambio, las cepas tipo S son mucho más complicadas de aislar y no muestran colonias visibles hasta las 16-52 semanas (Stevenson, 2015). En cuanto a los medios de cultivo, las cepas tipo S crecen bastante mal en el medio HEYM, al contrario que las cepas tipo C y, si además se emplea piruvato de sodio (aditivo empleado para mejorar el crecimiento y reducir el periodo de incubación), el crecimiento de las cepas tipo S puede inhibirse (Dimareli-Malli *et al.*, 1992), por lo que el método que se recomienda es el medio HEYM para bovinos y el Löwenstein-Jensen sin piruvato para pequeños rumiantes (Juste *et al.*, 1991b) o medios sintéticos (Adúriz *et al.*, 1995).

1.3. Persistencia en el medio

Map es una bacteria intracelular por lo que se podría pensar que no tiene una gran resistencia en el medio ambiente, pero no es así, ya que puede sobrevivir durante largos periodos de tiempo incluso cuando las condiciones ambientales

no son las más idóneas. Tiene una viabilidad estimada de 163 días en ríos, más de 9 meses en aguas esterilizadas, 246 días en heces de bovinos infectados, 12 meses en pastos y hasta 9 meses en aguas pantanosas o estancadas (Lovell *et al.*, 1944; Whittington *et al.*, 2004, 2005). Por el contrario únicamente resiste 7 días en orina, debido a su efecto bactericida (Chiodini *et al.*, 1984a).

Asimismo, se ha comprobado que Map es capaz de resistir más de 200 días en estiércol líquido de bovinos y porcinos a 5 °C, mientras que, si la temperatura alcanza los 15 °C esa resistencia disminuye (Jorgensen, 1977). Map ha mostrado una gran capacidad de resistencia a -14 °C durante al menos un año (Richards y Thoen, 1977), aunque otros estudios han comprobado que la viabilidad de Map se ve comprometida cuando se almacena más de una semana a -20 °C (Khare *et al.*, 2008). Investigadores como Larsen *et al.* (1956) demostraron que Map podía sobrevivir mejor en lugares secos y sombríos que en lugares con luz directa.

Otra característica de Map consiste en su capacidad de supervivencia a los procesos de ensilado en ambientes con pH muy bajo y con altas concentraciones de ácidos orgánicos. También el abono procedente de rebaños infectados con Map debe ser considerado como contaminante (Cook *et al.*, 2013). En esta línea, en un estudio realizado en ocho explotaciones de leche -la mitad de las cuales tenían historial de Map y la otra mitad no-, se recogieron muestras de las botas de los operarios durante tres años y se demostró la presencia de Map en las botas de aquellos que habían estado en las granjas con historial de Map (Eisenberg *et al.*, 2013).

A pesar de que Map es un microorganismo que no soporta bien las elevadas temperaturas y las altas concentraciones de calcio, se estima que entre un 3 y un 5 % de las micobacterias podrían sobrevivir al proceso de pasteurización (Chiodini y Hermon-Taylor, 1993; Rowan *et al.*, 2001). Los tratamientos de esterilización empleados en las aguas de consumo humano no son suficientes para eliminar a Map (Whan *et al.*, 2001), lo que podría tener implicaciones en salud pública. Según Rowan *et al.* (2001) una combinación de temperatura y campos eléctricos pulsátiles podría destruir la micobacteria.

2. EPIDEMIOLOGÍA

2.1. Hospedadores susceptibles

La paratuberculosis ha sido ampliamente estudiada en los **rumiantes domésticos** (bovinos, ovinos y caprinos), donde la importancia de la enfermedad está universalmente reconocida. Sin embargo, los rumiantes salvajes también podrían jugar un importante papel en la difusión de la misma. Entre estos rumiantes salvajes en los que se ha diagnosticado la paratuberculosis destacan: la alpaca (Miller *et al.*, 2000), el antílope (Dukes *et al.*, 1992), el bisonte (Sibley *et al.*, 2007), el búfalo (Khan *et al.*, 2010), el camello (Kramsky *et al.*, 2000), el ciervo (Mackintosh *et al.*, 2010), el corzo (Pavlik *et al.*, 2000), el gamo (Balseiro *et al.*, 2008), la llama (Miller *et al.*, 2000) y el muflón (Pavlik *et al.*, 2000).

Además de los rumiantes, se ha logrado aislar Map en animales **monogástricos** como: el burro (Dierckins *et al.*, 1990), el caballo (Cline *et al.*, 1991), el cerdo (Miranda *et al.*, 2011), la comadreja (Beard *et al.*, 2001a), el conejo (Greig *et al.*, 1997; Arrazuria *et al.*, 2015b), el coyote (Anderson *et al.*, 2007), el jabalí (Zanetti *et al.*, 2008; Álvarez *et al.*, 2009), la liebre (Salgado *et al.*, 2011), el lobo (Beard *et al.*, 2001a), primates no humanos (Zwick *et al.*, 2002; Fechner *et al.*, 2017), el oso pardo (Kopečna *et al.*, 2006), el tejón (Beard *et al.*, 2001a) y el zorro (Beard *et al.*, 2001a); e incluso en algunas aves como los cuervos (Beard *et al.*, 2001a).

2.2. Transmisión

La principal forma de transmisión de Map es la **vía fecal-oral**, al ingerir alimentos o aguas que contienen material fecal, contaminado con micobacterias, procedente de animales infectados (Sweeney, 1996). Los individuos jóvenes en las primeras semanas de vida son los más susceptibles a la infección y se contagiarían al mamar de ubres manchadas con heces de animales infectados (Chiodini *et al.*, 1984a; Clarke, 1997; Barkema *et al.*, 2009). Como se ha descrito previamente, Map puede sobrevivir durante largos periodos de tiempo en las explotaciones ganaderas, pudiendo aislarse en agua estancada contaminada

(Whittington *et al.*, 2005) o en el polvo (Eisenberg *et al.*, 2012), por lo que estas fuentes de contagio también deben ser tenidas en cuenta.

A pesar de que los animales jóvenes son los más susceptibles, hay estudios que demuestran que los animales adultos también pueden llegar a infectarse aunque el riesgo de infección es más bajo (McGregor *et al.*, 2012) y además, en ellos la infección no progresaría hacia formas clínicas graves como en el caso de los individuos jóvenes (Delgado *et al.*, 2012, 2013).

Otra vía de contagio que ha sido comprobada es la **calostrual**, en la cual los animales jóvenes se infectan tras la ingestión de calostro contaminado por Map de sus madres infectadas (Chiodini *et al.*, 1984a; Sweeney, 1996; Lambeth *et al.*, 2004), aunque, por otro lado, también llegó a sugerirse una mayor resistencia a la infección en terneros hijos de madres infectadas, debido al alto nivel de anticuerpos maternos (Yokomizo *et al.*, 1970), sin que esto se haya corroborado en ningún otro estudio. Existen otras vías con una menor relevancia como la **transplacentaria** (Lambeth *et al.*, 2004) o la **vía seminal** (Larsen *et al.*, 1981). Así, se ha podido aislar Map tanto de tejidos del aparato genital de la hembra como del propio feto (Seitz *et al.*, 1989; Whittington y Windsor, 2009). En el caso de los machos, Map también se ha aislado de su aparato genital y del semen (Eppleston y Whittington, 2001; Ayele *et al.*, 2004; Glawischnig *et al.*, 2004).

La abundancia de hospedadores de Map conlleva que muchos de ellos, de vida silvestre, puedan ser posibles reservorios y fuente de infección para el ganado doméstico. El conejo es una de las especies con mayor importancia epidemiológica, ya que se ha descrito que el microorganismo aislado de ellos es capaz de reproducir experimentalmente la enfermedad en bovinos, sugiriendo que una misma cepa es capaz de infectar a bovinos y conejos (Greig *et al.*, 1997; Beard *et al.*, 2001b). Por lo tanto, en aquellas zonas donde la prevalencia de paratuberculosis en los conejos sea alta, los pastos estarían infectados y con ello aumentaría el riesgo de contacto entre las heces de los conejos y los rumiantes que pasten en la zona (Daniels *et al.*, 2001).

En un estudio llevado a cabo por Stevenson *et al.* (2009), se realizaron diferentes técnicas moleculares mediante las cuales se lograron identificar las cepas de Map aisladas de distintos animales y se comprobó que una misma cepa (tipo C) se encontraba presente en animales silvestres y domésticos existiendo, por tanto, una **transmisión interespecie**. Así mismo, se ha observado que diferentes especies rumiantes de una misma granja comparten las mismas cepas (Stevenson *et al.*, 2009; Dimareli-Malli *et al.*, 2013a; Verdugo *et al.*, 2014). Otros autores en cambio, no encontraron ninguna transmisión interespecie, a pesar de observarse infecciones con Map en las distintas especies estudiadas (Pruvot *et al.*, 2014).

2.3. Distribución y prevalencia

La paratuberculosis es una enfermedad que se encuentra ampliamente distribuida en todo el mundo (Chiodini *et al.*, 1984a; Lombard, 2011), pero los estudios concretos de prevalencia son muy dispares, debido a varias razones. Por una parte, la prevalencia varía entre las diferentes especies de hospedadores y además existen otros problemas añadidos, como son la falta de sensibilidad de los métodos diagnósticos y la diferente metodología empleada a la hora de llevar a cabo las encuestas de prevalencia.

Nielsen y Toft (2009) realizaron una revisión de diferentes trabajos, desde 1990 hasta 2007, para analizar las prevalencias de la enfermedad en diferentes especies animales tales como la especie bovina, ovina y caprina, en algunos países europeos. Para ello emplearon estudios que habían utilizado diferentes técnicas para considerar como infectados a los animales analizados como son: el ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), la PCR y el cultivo de heces y tejidos. Los resultados obtenidos en esta revisión se detallan en la Tabla I.1. (resultados en bovinos) y la Tabla I.2. (resultados en ovinos y caprinos). Como se aprecia en dichas tablas, es muy difícil comparar los trabajos entre sí y, además, se pone en evidencia que los estudios llevados a cabo son muy escasos.

Tabla I.1. Resumen de la prevalencia en rebaños bovinos en Europa. Datos tomados de Nielsen y Toft (2009).

Especie	País	Año	Prevalencias	Referencias
Bovina	Alemania	2005	42 %	Donat <i>et al.</i> , 2005
	Bélgica	2000	18 %	Boelaert <i>et al.</i> , 2000
	Dinamarca	1998	70 %	Nielsen <i>et al.</i> , 2000
	Eslovenia	2008	18 %	Ocepek <i>et al.</i> , 2002
	España	-	8 % - 10 %	Sevilla <i>et al.</i> , 1999
	Francia	1999-98	68 %	Petit, 2001
	Holanda	1998	54 %	Muskens <i>et al.</i> , 200
	Italia	Desconocido	42 %	Lillini <i>et al.</i> , 200
			2000-01	65 %
	Irlanda	2000-01	13 %	O'Reilly <i>et al.</i> , 2004
	Noruega	2002	10 %	Mork <i>et al.</i> , 2003
	Reino Unido	1995	17 %	Çetinkaya <i>et al.</i> , 1998
	Suecia	2000-01	0 %	Sternberg y Viske, 2003
Suiza	2005	3 %	Bosshard <i>et al.</i> , 2006	

Tabla I.2. Resumen de la prevalencia en rebaños ovinos y caprinos en Europa. Datos tomados de Nielsen y Toft (2009).

Especie	País	Año	Prevalencias	Referencias
Caprina	España	1996-97	52 %	Reviriego <i>et al.</i> , 2000
	Grecia	Desconocido	0 %	Minas <i>et al.</i> , 1994
	Reino Unido	1998	1 %	Grant <i>et al.</i> , 2001
	Suiza	2002	23 %	Muehlherr <i>et al.</i> , 2003
Ovina	España	1996-97	29 %	Reviriego <i>et al.</i> , 2000
	Grecia	Desconocido	0 %	Minas <i>et al.</i> , 1994
	Reino Unido	1998	0 %	Grant <i>et al.</i> , 2001
	Suiza	2002	24 %	Muehlherr <i>et al.</i> , 2003
Mixto: caprino y ovino	Eslovenia	2000-01	12 %	Ocepek <i>et al.</i> , 2002
	Portugal	Desconocido	27 %	Mendes <i>et al.</i> , 2004

Estudios más recientes sitúan la prevalencia de paratuberculosis en el País Vasco entre un 8,3 y un 20 % (Vázquez *et al.*, 2009), revelando grandes diferencias según la metodología diagnóstica empleada para su cálculo. En el Principado de Asturias, se ha encontrado una prevalencia individual de entre 27,9 y 28,5 % en 134 vacas examinadas empleando técnicas histológicas (incluida la tinción de ZN) e inmunohistoquímicas (Balseiro *et al.*, 2003). En Galicia, la prevalencia en la especie bovina se situó entre un 2,40 y un 27,77 %, incluyendo rebaños de leche, de carne y mixtos, y fue valorada mediante técnicas serológicas (Diéguez *et al.*, 2007).

Respecto a otros países y también en la especie bovina, estudios recientes en el Reino Unido estiman la prevalencia de los rebaños en un 68 % mediante técnicas serológicas (Velasova *et al.*, 2017). En Irlanda en cambio, la prevalencia de los rebaños es mucho más baja, alrededor de un 20,6 % en los rebaños de leche y de un 7,6 % en los rebaños de carne. Esta prevalencia se calculó mediante una encuesta serológica en más de 639 rebaños vacunos irlandeses (Good *et al.*, 2009). En países latinoamericanos y del Caribe se ha llevado a cabo una revisión de la prevalencia en el ganado bovino, siendo la prevalencia individual del 16,9 % y de un 75,8 % la prevalencia en rebaño. Este cálculo se realizó haciendo la media de las prevalencias estimadas en diferentes estudios llevados a cabo en países de Latinoamérica y el Caribe, en los que se emplearon diferentes técnicas diagnósticas: serológicas, PCR, cultivos de muestras fecales e intradermotuberculinización (IDTB) (Fernández-Silva *et al.*, 2014). En un estudio realizado por el Departamento de Agricultura de Estados Unidos de América se comprobó que infección estaba presente en un 70,2 % de los 98 rebaños vacunos estudiados en el año 2002. Este cálculo de la prevalencia se realizó mediante cultivo de muestras de heces de esos rebaños (USDA, 2008).

En cuanto a los pequeños rumiantes, la primera descripción de paratuberculosis ovina en España se llevó a cabo en León en 1973 (Aller *et al.*, 1973). Juste *et al.* (1991) realizaron una encuesta, empleando diferentes técnicas diagnósticas, según la cual el 46,7 % de los rebaños ovinos aragoneses tenían

paratuberculosis. En la provincia de Ávila, la prevalencia de rebaño mediante técnicas serológicas fue del 29 % (Reviriego *et al.*, 2000).

En el ganado caprino se realizó otro estudio, centrado en la zona sur de España, empleando una técnica ELISA con dos tipos de antígenos diferentes, obteniéndose una prevalencia que variaba entre un 40 - 41 % en Huelva, 10 - 13 % en Córdoba y entre un 0,5 - 3 % en las Islas Canarias (Molina *et al.*, 1991). En el año 2000, en otra encuesta en la provincia de Córdoba, se pudo observar una prevalencia individual mucho mayor, alrededor del 50 % (Rodríguez, 2000). En ese mismo año y en la provincia de Ávila se observó una prevalencia de rebaño del 52 % mediante técnicas serológicas (Reviriego *et al.*, 2000), aunque en la Comunidad Autónoma de Madrid esa cifra fue inferior (46,4 %) en un estudio posterior usando métodos serológicos (de Juan, 2005).

Por lo que respecta a estudios recientes en otros países, en Portugal se estimó la prevalencia individual en un 3,7 % en el ganado ovino mediante técnicas serológicas (Coelho *et al.*, 2007). En Dinamarca ha ido disminuyendo desde el año 2008, cuando la prevalencia de rebaño era de un 5,8 % hasta el año 2015, cuando fue de un 3,8 % (Nielsen *et al.*, 2016). En otras partes del mundo como Canadá, se han encontrado prevalencias en rebaños caprinos de leche de un 83 % y en ovinos de leche de un 66,8 %, también usando pruebas serológicas (Bauman *et al.*, 2016). En Latinoamérica y en países del Caribe, se realizó una revisión de diferentes estudios donde se evaluaba la prevalencia mediante pruebas serológicas, PCR, cultivos de muestras fecales e intradermotuberculinización (IDTB), obteniéndose una prevalencia individual 4,3 % y del 3,7 % en el caso de rebaños caprinos (Fernández-Silva *et al.*, 2014). En Mexico, se llevó a cabo un estudio de la seroprevalencia mediante el empleo de la técnica ELISA mostrando una prevalencia del 8,32 % en el ganado caprino (Sosa-Martínez *et al.*, 2018).

En el caso de los rumiantes salvajes como los ciervos, la seroprevalencia en los animales muestreados fue baja (9,2 %) siendo superior en aquellas zonas compartidas con rebaños bovinos de leche (Boadella *et al.*, 2010). En el conejo,

se estima una prevalencia del 2,5 % usando técnicas serológicas en la provincia de Cádiz (Maio *et al.*, 2011).

Uno de los principales inconvenientes de estas encuestas es que el diagnóstico de la prevalencia individual es muy laborioso y con un coste muy elevado, por lo que recientemente se han propuesto alternativas como la recogida de muestras ambientales, mucho más baratas y sencillas de recolectar (Lombard *et al.*, 2006b; Pillars *et al.*, 2009), habiéndose señalado como uno de los métodos más útiles, el aislamiento de Map a partir de las calzas de los trabajadores de las explotaciones (Eisenberg *et al.*, 2013).

2.4. Importancia económica

La paratuberculosis aparece en el capítulo 1.3 apartado 1.3.1 del Código Sanitario para los Animales Terrestres de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE, 2017), en el cual se enumeran las enfermedades que deben ser obligatoriamente notificadas e informadas a esta organización.

Su importancia económica reside en las notables pérdidas que produce, debidas a las muertes prematuras y al descenso de la producción. La cuantificación de dichas pérdidas es complicada, debido al carácter subclínico de la enfermedad, lo que conlleva que su efecto pase desapercibido, por lo que, tanto los ganaderos como la administración, no muestran un especial interés a la hora de controlar la enfermedad (Merkal *et al.*, 1975; Kennedy y Benedictus, 2001). En diferentes estudios se ha valorado el impacto de las pérdidas económicas, principalmente en la especie bovina. Dentro de las principales causas directas destacan las siguientes: muerte o sacrificio de animales enfermos (Merkal *et al.*, 1975; Johnson-Ifearulundu *et al.*, 1999; Kennedy y Benedictus, 2001), disminución de la producción láctea (Groenendaal *et al.*, 2002; Aly *et al.*, 2010; García y Shalloo, 2015), infertilidad (Merkal *et al.*, 1975; Buergelt y Duncan, 1978; García-Ispierto y López-Gatius, 2016), aumento de las mamitis (Merkal *et al.*, 1975; Buergelt y Duncan, 1978) e incremento de la tasa de mortalidad asociada a otras patologías (Johnson-Ifearulundu *et al.*, 1999; García y Shalloo, 2015). A estos costes, habría que sumarle los asociados a la realización de

pruebas de diagnóstico, tratamientos veterinarios, los propios servicios veterinarios y las medidas higiénico-sanitarias puestas en marcha para controlar la enfermedad (Kennedy y Benedictus, 2001; Olsen *et al.*, 2002).

Por lo que se refiere a la producción de leche se han observado disminuciones de entre un 14,5 y un 19,5 % en vacas lecheras que presentaban signos clínicos, siendo más evidentes en la última lactación (Benedictus *et al.*, 1987). La calidad de la leche también se ve reducida, alterándose la secreción de las proteínas (Collins y Nordlund, 1992). En otro estudio se apreció un incremento en el número de animales sacrificados por mamitis, siendo mayor en aquellas hembras subclínicas positivas al cultivo en heces que en las negativas a dicha prueba (Merkal *et al.*, 1975). A pesar de ello, se sigue desconociendo el mecanismo patológico por el cual la paratuberculosis llega a inducir una mamitis (McKenna *et al.*, 2006).

Se estima que las pérdidas ocasionadas por la paratuberculosis en la industria lechera bovina puedan ascender a 200 - 250 millones de dólares anuales en los Estados Unidos de América (Ott *et al.*, 1999; Coussens, 2004; Groenendaal *et al.*, 2015). En granjas de bovino de leche australianas se han cuantificado las pérdidas anuales en 11.748 dólares australianos por granja (Shephard *et al.*, 2016).

3. PATOGENIA

El término patogenia deriva de tres elementos griegos: *pathos* que puede traducirse como enfermedad, *genesis* que significa origen y el sufijo *-ia* de acción. Por lo que, según esta interpretación, patogenia es el estudio del origen y del desarrollo de la enfermedad, tal y como lo define la Real Academia Española de la Lengua. Estudiar la patogenia de una enfermedad permite avanzar en el entendimiento de cómo actúa, sus posibles causas y tratar a esos individuos enfermos adecuadamente. Además, si se conoce el desarrollo de la enfermedad, ésta se puede diagnosticar y prevenir.

La patogenia de la paratuberculosis aún presenta muchos interrogantes a pesar de que, desde su descubrimiento, este es un aspecto al que se han dedicado muchos esfuerzos. Los mayores inconvenientes con los que se encuentra su estudio son los largos tiempos de incubación de Map, la dificultad para su aislamiento y los problemas que existen para reproducir la infección experimentalmente (Grange *et al.*, 1990; Coussens, 2004).

3.1. Entrada de Map en el hospedador

La principal vía de entrada de Map es la **oral**, penetrando el microorganismo principalmente por el tejido linfoide intestinal o placas de Peyer y posteriormente diseminándose hacia otras áreas de la mucosa intestinal y nódulos linfáticos mesentéricos (Brotherston *et al.*, 1961a; Gilmour y Brotherston, 1962; Momotani *et al.*, 1988; Sigurðardóttir *et al.*, 2001; Delgado *et al.*, 2013; Fernández *et al.*, 2014). Los animales jóvenes tienen un mayor desarrollo de este tejido linfoide intestinal que va involucionando con la edad, lo que ha llevado a sugerir que esta podría ser la explicación del hecho de que los animales adultos sean menos susceptibles (o resistentes) a padecer la enfermedad que los individuos jóvenes (Reynolds y Morris, 1983). Sin embargo, en varios estudios experimentales se ha demostrado que las lesiones iniciales aparecen principalmente en el tejido linfoide de la válvula ileocecal o del yeyuno, zonas en las que las placas de Peyer siguen persistiendo en animales adultos (Sigurðardóttir *et al.*, 1999; Delgado *et al.*, 2013; Fernández *et al.*, 2014; Muñoz, 2014), por lo que en la mayor resistencia de los adultos a la infección con Map intervendrían probablemente, otras causas.

No se conoce qué factores determinan esa resistencia a la infección por Map en relación con la edad. El hecho de que, de forma experimental, se haya conseguido la infección de animales adultos pero que ésta no progrese, ha llevado a proponer que la existencia de contactos previos con otras micobacterias ambientales provocaría una sensibilización en el animal capaz de contener una futura infección por Map, a modo de una vacunación natural (Delgado *et al.*, 2013). Este hecho ha sido comprobado en tuberculosis, donde hay evidencias de

que una exposición previa a micobacterias ambientales puede alterar la respuesta inmunitaria del hospedador de una manera adversa en el caso de la vacunación con el Bacilo de Calmette y Guérin (BCG) o mejorando esa respuesta en la vacunación con diferentes cepas de *M. bovis* frente a la tuberculosis (Buddle *et al.*, 2002). En otro estudio, se observó una respuesta mucho más rápida, en los test *in vitro*, frente a las tuberculinas en aquellos animales que fueron previamente sensibilizados con *M. avium* y posteriormente vacunados con BCG (Howard *et al.*, 2002). También, se ha estudiado el efecto que supondría una sensibilización previa con *M. avium* en una futura infección con *M. bovis*. En este caso, se observó una cierta protección frente a la infección tuberculosa, ya que los animales previamente expuestos tenían una menor extensión de las lesiones y una menor tasa de excreción de *M. bovis* al medio en comparación con sus compañeros igualmente infectados con *M. bovis*, pero que no habían sido sensibilizados con *M. avium* (Hope *et al.*, 2005).

Una vez que Map está en la luz intestinal, las **células M** son las principalmente encargadas de captar a Map, para de esta forma ingresar en el organismo (Momotani *et al.*, 1988; Sigurðardóttir *et al.*, 2001). Estas células M son células epiteliales especializadas que recubren las cúpulas de las folículos linfoides de las placas de Peyer y, mediante un mecanismo de endocitosis, facilitan el paso de Map a través de las mismas hasta el tejido linfoide subyacente (Corr *et al.*, 2008), para ser posteriormente fagocitada por los macrófagos subepiteliales activados (células diana de esta micobacteria) (Coussens, 2001; Sigurðardóttir *et al.*, 2001) fundamentalmente mediante mecanismos innatos. Los macrófagos son el tipo celular crucial para que la micobacteria pueda o no ser destruida (Arsenault *et al.*, 2014).

Para que se produzca la endocitosis, Map debe adherirse a la superficie de las células M. Los mecanismos de adhesión aún no están del todo claros, pero se ha identificado una proteína de acoplamiento a la fibronectina o FAP (Fibronectin Attachment Protein) en la superficie de Map que le permite establecer un puente de unión a las integrinas $\beta 1$ (fibronectina), proteínas de la matriz extracelular de las células M (Secott *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2009; Bannantine y Bermudez,

2013), lo que explicaría la predilección de Map por emplear estas células en su ingreso. Sin embargo, en el estudio de Schleig *et al.* (2005) comprobaron que la unión con la fibronectina se encontraba aumentada en algunas cepas de Map, mientras que en otras cepas patógenas ocurría justo lo contrario por lo que, según estos autores, deberían existir otros mecanismos de adhesión diferentes. En este sentido, se han descrito otras proteínas de adhesión, todavía poco estudiadas, como el factor de elongación tu (EF-Tu) (Viale *et al.*, 2014).

Las células M son células especializadas en la captación de antígenos de la luz intestinal y gracias a que no poseen lisosomas ni enzimas hidrolíticas, cuando Map es adherido, pasa intacto a través de vacuolas (Miller *et al.*, 2007). Gracias a este hecho, las características antigénicas de Map permanecen intactas. Todo este proceso de adhesión y captación transcurre rápidamente, en menos de una hora (Sigurðardóttir *et al.*, 2001).

La vía de penetración a través de las células M no es la única, ya que los **enterocitos** también han demostrado ser una vía de entrada de Map al organismo. En un estudio llevado a cabo en cabritas, se indicó que las bacterias podrían atravesar la mucosa intestinal a través tanto de zonas de placa de Peyer como de zonas sin placas, no estando por tanto restringida su entrada a las células M (Sigurðardóttir *et al.*, 2005), aspecto que también se observó más recientemente en un modelo experimental murino (Pott *et al.*, 2009). En otro experimento en ratones transgénicos que no presentaban placas de Peyer, observaron que la micobacteria seguía atravesando la mucosa, a través de los enterocitos (Bermudez *et al.*, 2010). En las infecciones causadas por Mah, la micobacteria penetra a través de los enterocitos, principalmente de zonas de íleon terminal (Sangari *et al.*, 2001). En otro estudio se comprobó que las lesiones inducidas por ambas especies de micobacterias, Mah y Map, sin importar su zona de entrada, eran similares a nivel histológico (Bermudez *et al.*, 2010).

Una vez producida la fagocitosis por los macrófagos, Map posee diversas estrategias de supervivencia para así asegurar su replicación y poder evadir la respuesta del hospedador. Entre ellas destacan: la inhibición de la maduración del fagosoma y de la fusión fagosoma-lisosoma (Hostetter *et al.*, 2003; Arsenault

et al., 2014); inhibición de la acidificación del fagosoma-lisosoma (Cheville *et al.*, 2001; Kuehnel *et al.*, 2001; Hostetter *et al.*, 2002; Weiss *et al.*, 2004); inhibición de fenómenos de apoptosis (Allen *et al.*, 2001; Weiss *et al.*, 2004; Abendaño *et al.*, 2013; Arsenault *et al.*, 2014) y desarrollo de formas de resistencia (formas de pared defectiva, esferoplastos o formas L) (Hulten *et al.*, 2000; Hines y Styer, 2003; Beran *et al.*, 2006).

3.2. Aparición de las lesiones iniciales y su progresión

Una vez Map es fagocitada por los macrófagos, éstos se dirigen hacia los espacios interfoliculares de las placas de Peyer, donde comienzan a formarse los granulomas. Los macrófagos actúan como células presentadoras de antígeno (CPA) de forma que los antígenos de Map son presentados a los linfocitos T, lo que produce una respuesta inmunitaria por parte del hospedador que conlleva la aparición de una inflamación granulomatosa (Koets *et al.*, 2015). Si los mecanismos de supervivencia de Map resultan efectivos, se desarrollará la enfermedad o bien, en la mayoría de los animales, permanecerá la infección en estado latente (García Marín *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2009).

Los granulomas constituyen el medio donde los linfocitos T y B (productores de citoquinas) y los macrófagos (con actividad bacteriostática) van a interactuar para conseguir una activación macrofágica efectiva por parte del hospedador. De esta activación depende la progresión y la diseminación de la infección paratuberculosa. Los granulomas, además, tienen como misión delimitar la zona de daño y proteger las células circundantes del medio tóxico que se requiere para destruir a las micobacterias (Saunders y Cooper, 2000). La persistencia de Map en el granuloma favorece la producción de diferentes citoquinas por parte de los macrófagos y las células dendríticas para estimular al sistema inmunitario. El factor de necrosis tumoral α (TNF- α), producido por los linfocitos T y las CPA, es uno de los factores que juegan un papel más relevante en la formación de los granulomas (Saunders y Cooper, 2000; Martínez y Gordon, 2014). La elevada concentración de esta citoquina puede provocar daño tisular, pero en concentraciones moderadas favorece el reclutamiento de macrófagos (Sohal *et*

al., 2008). La interleuquina 6 (IL-6) juega un importante papel en la diferenciación de macrófagos activados a células multinucleadas (Fitzgerald *et al.*, 2014). Las subpoblaciones de células T $\delta\gamma$ también intervienen en la formación y el desarrollo de los granulomas en las fases tempranas de la infección por Map, y en el control de su diseminación hacia otros órganos (Tanaka *et al.*, 2000; Wangoo *et al.*, 2005).

Para modular el posible daño causado por estas citoquinas, la IL-10 ejerce un efecto supresor en su producción a nivel local (Weiss y Souza, 2008), al igual que la IL-13 (es una citoquina Th2) que posee características antiinflamatorias (Shu *et al.*, 2011).

En la infección por Map se han descrito dos tipos de granulomas: “**tuberculoides**” y “**lepromatosos**”. Los granulomas de tipo “tuberculoides” están relacionados con las fases iniciales de la enfermedad (lesiones focales y multifocales) y con un predominio de la respuesta inmunitaria de tipo celular. Son granulomas bien organizados, con escasas células epitelioides y linfocitos y en los que la presencia de BAAR es prácticamente inexistente. Por el contrario, los granulomas de tipo “lepromatoso” están muy poco organizados y se relacionan con las fases terminales de la paratuberculosis; la respuesta inmunitaria periférica predominante, es la de tipo humoral con una, cada vez más, debilitada respuesta celular. En este caso, hay una abundancia de macrófagos y de células epitelioides con numerosos BAAR en su interior (García Marín *et al.*, 1992, 1999a, Pérez *et al.*, 1996, 1999; Burrells *et al.*, 1998; Tanaka *et al.*, 2005).

La respuesta inmunitaria local juega un papel muy importante en la paratuberculosis, ya que las primeras interacciones entre la micobacteria y el organismo se producen en el tejido linfoide intestinal. En un estudio llevado a cabo en corderos infectados a los 5 días del nacimiento (Begara-McGorum *et al.*, 1998), se observaron diferencias en las poblaciones de linfocitos de los diferentes tejidos implicados en la infección paratuberculosa (placas de Peyer y nódulos linfáticos). En las placas de Peyer del íleon y en el nódulo linfático mesentérico (NLM) observaron un predominio de linfocitos T CD4⁺ y $\delta\gamma$, mientras que en las

placas de Peyer del yeyuno (PPY), la población mayoritaria fueron los CD8⁺. Además, encontraron una baja expresión génica de IFN- γ en las PPY de los animales infectados. En un estudio más reciente llevado a cabo por Fernández *et al.* (2017) en el que analizan muestras de intestino de vacas con distintos tipos de lesiones, observaron un mayor número de células productoras de IFN- γ (principalmente linfocitos), mediante técnicas inmunohistoquímicas, en lesiones focales o difusas paucibacilares, mientras que dichas células se encontraban disminuidas en las formas difusas multibacilares. Además, también observaron una expresión diferencial de otras citoquinas o mediadores de la inflamación a nivel intestinal y en relación con el tipo de lesión, lo que confirma la importancia que la respuesta local juega en el desarrollo de las lesiones.

Los animales que se infectan y desarrollan una respuesta inmunitaria eficiente conseguirán restringir la presencia de granulomas al tejido linfoide de las placas de Peyer, siendo éstos de pequeño tamaño, pero bien organizados (tipo tuberculoide), constituyendo lo que se han denominado **lesiones focales**. Estas formas están relacionadas con fases iniciales de la enfermedad, pudiendo permanecer en estado latente durante largos períodos de tiempo (semanas o años) (García Marín *et al.*, 2000). Las lesiones focales también se han observado en individuos adultos, surgiendo la incógnita de si son lesiones latentes de infecciones pasadas cuando fueron individuos jóvenes o si, por el contrario, son lesiones iniciales de animales adultos recién infectados (García-Marín *et al.*, 1992; Pérez *et al.*, 1996; Corpa *et al.*, 2000c; González *et al.*, 2005; Delgado *et al.*, 2013).

Cuando la respuesta inmunitaria deja de ser efectiva, las lesiones progresan a zonas de lámina propia (LP) asociada a tejido linfoide e incluso, pasan a afectar a zonas de intestino sin tejido linfoide asociado; a este tipo de formas se les ha denominado **lesiones multifocales** (Nisbet *et al.*, 1962; Juste *et al.*, 1994; Clarke, 1997; García Marín *et al.*, 2000; Kurade *et al.*, 2004). Autores como Delgado *et al.* (2013) las clasifican en lesiones multifocales tipo a, si los granulomas solo se han extendido a la mucosa relacionada con las placas de Peyer, o tipo b, si también se observan en zonas de mucosa sin tejido linfoide. Los granulomas, en

animales con lesiones focales en intestino, pero sobre todo multifocales, pueden observarse también en los nódulos linfáticos asociados, principalmente el NLYC y los ileocecales (Nisbet *et al.*, 1962; Juste *et al.*, 1994; Kurade *et al.*, 2004; Delgado *et al.*, 2013; Fernández *et al.*, 2014; Muñoz, 2014).

Los animales infectados podrían ser capaces de recuperarse durante la fase subclínica (formas focales y multifocales), dependiendo de la intensidad de la respuesta por parte del hospedador y de la virulencia de la micobacteria infectante, lo que se asocia a la aparición de granulomas en fase de regresión (Chiodini *et al.*, 1984a; Navarro *et al.*, 1998; Storset *et al.*, 2001). Estos granulomas estarían formados por una capsula fibrosa que los rodea externamente con presencia de células gigantes y macrófagos junto con algún linfocito (Fernández *et al.*, 2014).

Las **formas difusas** son aquellas lesiones que ya se han extendido a amplias zonas de la mucosa intestinal, provocando el engrosamiento de la pared, visible a nivel macroscópico y causando una enteritis granulomatosa difusa. Este tipo de lesiones están relacionadas con la aparición de signos clínicos en los animales (Pérez *et al.*, 1996; González *et al.*, 2005). En los casos más avanzados se han observado lesiones granulomatosas en hígado y nódulos linfáticos hepáticos, riñones, pulmones, etc., e incluso se ha detectado Map en sangre (Koenig *et al.*, 1993; van der Giessen *et al.*, 1994).

3.3. Respuesta inmunitaria del hospedador

3.3.1. Respuesta inmunitaria innata

La respuesta inmunitaria adaptativa, en la cual participan los linfocitos T y B, es una respuesta que necesita tiempo para activarse y así poder destruir a los microorganismos invasores. La respuesta inmunitaria innata es una respuesta mucho más rápida y efectiva pero muy inespecífica y primitiva que, además, no induce memoria inmunológica (Roitt *et al.*, 2017). Esta respuesta, aunque ha sido considerada como de menor importancia, es la primera barrera que posee el

hospedador frente a los organismos patógenos y va a guiar a la futura respuesta adquirida (Medzhitov y Janeway, 1997).

La respuesta inmunitaria innata se inicia con el reconocimiento de los patrones moleculares asociados al patógeno o **PAMP**, que son moléculas que están presentes en la práctica totalidad de los microorganismos. Algunos ejemplos de PAMP son los lipopolisacáridos, las lipoproteínas, los ácidos nucleicos o las proteínas presentes en los agentes patógenos, pero no en el hospedador. Las células del sistema inmunitario innato reconocen estos PAMPs mediante unos receptores de reconocimiento de patrones o **PRR** con los cuales fagocitan a los patógenos (Uematsu y Akira, 2006).

Los macrófagos y las células dendríticas son CPA que expresan los receptores **TLR** (Toll-Like Receptor, receptor tipo Toll). Estas proteínas, pertenecientes a uno de los principales grupos de PRR, juegan un papel muy importante en la respuesta protectora frente a infecciones micobacterianas (Ferwerda *et al.*, 2007; Mucha *et al.*, 2009). La interacción entre las proteínas (PRR) y los lípidos bacterianos (PAMP) induce la producción de citoquinas y reactivos derivados del oxígeno, iniciándose así una respuesta inmunitaria innata protectora frente a las micobacterias (Ferwerda *et al.*, 2007).

El papel concreto de los TLRs no está bien definido, ya que pueden ejercer funciones contradictorias. En el caso de los TLR 2, mientras que para algunos autores su activación inhibe la defensa inmunitaria frente a Map (Noss *et al.*, 2001; Alvarez *et al.*, 2003; Banaiee *et al.*, 2006), para otros ejercería un efecto bactericida (Thoma-Uszynski *et al.*, 2000; Stenger y Modlin, 2002). Determinadas mutaciones de los TLR 2 y TLR 4 incrementan la susceptibilidad a padecer tuberculosis (Ben-Ali *et al.*, 2004). En concreto, para el TLR 4 se han identificado dos polimorfismos de nucleótido simple (SNP) que incrementan el riesgo de infección por Map (Sharma *et al.*, 2015). Por otro lado, en los TLR 9, se han observado una sobreexpresión en ovejas asintomáticas pero positivas por PCR, cultivo y serología a Map, mientras que no se han observado esa sobreexpresión en ovejas con síntomas, destacando su papel protector (Nalubamba *et al.*, 2008).

Los receptores tipo NOD (**NLR**) también participan en la respuesta inmunitaria innata, siendo el gen CARD15/NOD2 el que presenta una relación positiva entre una de sus mutaciones con la posibilidad de desarrollar la paratuberculosis en bovinos naturalmente infectados (Pinedo *et al.*, 2009; Ruiz-Larranaga *et al.*, 2010), al igual que ocurre en el ser humano con la enfermedad de Crohn (Elguezabal *et al.*, 2012). En cambio otros autores rechazan esta relación positiva (Taylor *et al.*, 2006).

Otro gen que participa en la inmunidad innata es el que codifica la proteína macrofágica asociada a la resistencia natural (**Nramp1**). La expresión de esta proteína, expresada en la membrana de los lisosomas, conlleva una acción bacteriostática, participando en la eliminación de la micobacteria, ya que interviene en la maduración de los fagosomas (Frehel *et al.*, 2002). Sin embargo, se han encontrado niveles elevados de expresión de esta proteína en lesiones difusas multibacilares, con elevada cantidad de Map (Fernández *et al.*, 2016) lo que sugiere que o bien se está produciendo en gran cantidad por el estímulo que ejerce la presencia de Map, o que la proteína detectada por las técnicas inmunohistoquímicas no limita de manera efectiva la multiplicación de Map.

Los **linfocitos T $\delta\gamma$** parecen jugar un papel muy importante en las primeras fases de la respuesta innata frente a infecciones intracelulares (Pollock y Welsh, 2002) como es la propia infección paratuberculosa (Sohal *et al.*, 2008), en concreto en la organización de los granulomas (Tanaka *et al.*, 2000). Estas células son la población mayoritaria de linfocitos en sangre periférica en los terneros jóvenes (Hein y Mackay, 1991) y son muy abundantes en los epitelios, por lo que serían la primera línea de defensa frente a la entrada de microorganismos (Hein y Mackay, 1991; Hayday, 2000). Además, el subtipo WC1⁺ (Workshop Cluster 1⁺) expresa PRRs capaces de reconocer antígenos no asociados al complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) (Machugh *et al.*, 1997; Hayday, 2000). Por otro lado, la existencia de elevadas cantidades de este subtipo de linfocitos estaría relacionada con la producción de citoquinas implicadas en la respuesta inmunitaria celular adaptativa, como la IL-12, TNF- α o IFN- γ (Baldwin *et al.*, 2000; Baquero y Plattner, 2016). Sin embargo, otros

estudios han señalado que estas células tienen un papel inmunorregulador y una actividad citotóxica sobre los linfocitos Th CD4⁺, disminuyendo la respuesta adaptativa celular (Chiodini y Davis, 1992; Koets *et al.*, 2002).

Recientemente, se ha descrito un nuevo tipo de inmunidad innata, la **inmunidad innata entrenada** (“trained immunity”). En ella, se han observado propiedades de memoria en las células NK y en los macrófagos. Esta memoria de la inmunidad entrenada, provocaría una respuesta intensificada a una infección secundaria, pudiendo ser dirigida hacia el mismo organismo o hacia otro, provocando una reacción cruzada (Netea y van der Meer, 2017). Es menos específica que la respuesta adaptativa, aunque incrementa la resistencia del hospedador frente a una futura infección (Netea *et al.*, 2011).

La inmunidad entrenada ya había sido documentada en plantas (Durrant y Dong, 2004) e invertebrados (Kurtz, 2005), y recientemente se ha demostrado en mamíferos (Juste *et al.*, 2016a), donde comprobaron que este tipo de respuesta podía durar hasta 6 meses y que era independiente de las respuestas adaptativas humoral y celular.

Asimismo, se ha sugerido que este mecanismo podría estar también implicado en la respuesta protectora conferida por algunas vacunas. Por ejemplo, se ha observado que el empleo de la vacuna BCG frente a tuberculosis tiene efectos protectores no específicos frente a otras infecciones de origen no micobacteriano (Garly *et al.*, 2003; Andersen *et al.*, 2013), fenómeno que igualmente se ha señalado tras el empleo de la vacuna frente a sarampión (Benn *et al.*, 2013). Este efecto beneficioso también se observa con la propia vacunación frente a Map en animales infectados experimentalmente con el agente de la tuberculosis, donde se comprobó una reducción de la gravedad y una limitación de las lesiones causadas por la tuberculosis (Pérez de Val *et al.*, 2012; Serrano *et al.*, 2017).

3.3.2. Respuesta inmunitaria adaptativa

La respuesta adaptativa o adquirida se inicia cuando la infección se establece y se asienta en el hospedador. Es una respuesta evolucionada, eficiente y

sofisticada, al compararla con la respuesta innata. Está mediada por las células T y B que se caracterizan por su especificidad y por su capacidad de memoria (Medzhitov y Janeway, 1997). Hasta ahora, la respuesta inmunitaria innata ha sido considerada como secundaria y totalmente independiente de la respuesta adaptativa, pero se ha ido demostrando que ambas respuestas funcionan juntas con un objetivo común: la lucha antimicrobiana (Medzhitov y Janeway, 1997; Orme, 2004).

En el caso de Map, tras su fagocitosis por los macrófagos, la respuesta inmunitaria adaptativa comienza con la presentación de los antígenos a los linfocitos T de forma que estos provocan una cascada de citoquinas con dos funciones: la activación de los macrófagos y la estimulación de la proliferación de más linfocitos T (Stabel, 2000a; Coussens, 2001, 2004).

Los linfocitos T se pueden clasificar en linfocitos T citotóxicos (“cytolytic” - **Tc**) y en linfocitos T colaboradores (“helper” - **Th**). Los primeros tienen en su superficie el marcador CD8⁺ y reconocen antígenos asociados al CMH de clase I, mientras que los segundos presentan en su superficie el marcador CD4⁺, reconocen antígenos asociados al CMH de clase II y su principal función es amplificar la respuesta inmunitaria produciendo un incremento de las citoquinas (Kaufmann, 1991).

Las células Th CD4⁺ se pueden dividir en diferentes subtipos según las citoquinas que produzcan mayoritariamente. Los dos primeros subtipos en ser descritos, y que tienen gran relevancia en la respuesta inmunitaria frente a patógenos microbianos, son los subtipos Th1 y Th2. Los linfocitos **Th1** se caracterizan por la secreción de IFN- γ , IL-2 y TNF- α principalmente. Estas citoquinas se encuentran implicadas en la **respuesta inmunitaria de tipo celular** frente a microorganismos intracelulares como es el propio Map. Su secreción se cree que está regulada por la IL-12. Por otro lado, la población **Th2** se caracteriza por la secreción de IL-4, IL-5 y IL-10, las cuales inducen la producción de inmunoglobulinas por las células B implicadas en la **respuesta inmunitaria de tipo humoral**. A modo de resumen, las células Th1 se relacionan con una respuesta inmunitaria proinflamatoria y citotóxica mientras que las células Th2

son células estimuladoras de la producción de anticuerpos (Stabel, 2000b, 2006; Kidd, 2003).

En el caso particular de la paratuberculosis, la respuesta inmunitaria celular se ha relacionado con las primeras fases, subclínicas, de la infección, mientras que las fases clínicas están más relacionadas con la respuesta inmunitaria humoral (Begara-McGorum *et al.*, 1998; Burrells *et al.*, 1998; Stabel, 2000b; Ostrowski *et al.*, 2003). Otros estudios, por el contrario, no ven tan clara esta diferenciación, sugiriendo una coexistencia de ambos tipos de respuesta con independencia de la fase de la enfermedad (Begg *et al.*, 2011; Vázquez *et al.*, 2013). En un estudio llevado a cabo en ovinos infectados se observó que un 15 % de los animales presentaron una coexistencia de la respuesta humoral y celular; comprobando que en las lesiones multibacilares tanto la producción de IFN- γ como de anticuerpos frente a Map se encontraban disminuidas, lo que sugiere la existencia de un fallo de toda la respuesta inmunitaria en esos animales, la cual sería incapaz de controlar la infección (Begg *et al.*, 2011). Por el contrario, en un estudio realizado en el ganado bovino sacrificado debido a una disminución de la producción lechera, se observó que aquellos animales con lesiones más graves tenían una mayor producción de IFN- γ y de IL-10, esta última citoquina relacionada con la respuesta humoral, sugiriendo también una desregularización del sistema inmunitario global (Shu *et al.*, 2011). En un estudio más reciente llevado a cabo en vacas, presumiblemente infectadas, sacrificadas a los 24 meses (Vázquez *et al.*, 2013), se observaron diferencias en el tipo de respuesta inmunitaria según el tipo de lesión observada. En las lesiones focales la respuesta inmunitaria predominante era la respuesta celular, sin tener importancia la respuesta humoral. En cambio, en aquellos animales con lesiones multifocales o difusas, la respuesta humoral adquiría una mayor relevancia, aunque la respuesta celular seguía participando. Estos autores llegaron a la conclusión de que existía una respuesta mixta Th1 y Th2 que se incrementaba cuando las lesiones eran más graves y extensas.

Existe un tercer subtipo de linfocitos T CD4⁺, diferente a los Th1 y a los Th2, denominados **Th17**, que producen principalmente IL-17. Esta citoquina también

juega un papel en la inmunidad protectora frente a los patógenos intracelulares (Khader y Cooper, 2008; Curtis y Way, 2009). En pacientes humanos con tuberculosis latente (positivos a la IDTB) se ha observado una disminución en la expresión de IL-17 en comparación con individuos sanos (Babu *et al.*, 2010). Autores como Dudemaine *et al.* (2014) han demostrado que en vacas con paratuberculosis se observa un incremento en la expresión de IL-17 sugiriendo que, a medida que la enfermedad avanza, este tipo de respuesta adquiere mayor importancia. Por otra parte, en pacientes con la enfermedad de Crohn se ha detectado la presencia de células T reactivas a Map productoras de IFN- γ y de IL-17 (Olsen *et al.*, 2009).

3.3.2.1. Respuesta inmunitaria celular

Una vez se ha llevado a cabo la fagocitosis por parte de los macrófagos, estos procesan a Map y presentan los antígenos a los linfocitos T mediante la unión al CMH tipo II, desencadenando la respuesta inmunitaria celular (Koets *et al.*, 2015).

La principal citoquina proinflamatoria es el IFN- γ , la cual induce la activación de los macrófagos (Stabel, 2006; Arsenault *et al.*, 2014). El IFN- γ está producido principalmente por los linfocitos T CD4⁺ y también por linfocitos T CD8⁺ (Salgame *et al.*, 1991). En las infecciones micobacterianas, se observa que en las primeras fases son los linfocitos T CD4⁺ los que participan mayoritariamente en la producción de IFN- γ , mientras que en las fases más tardías son los linfocitos T CD8⁺ (Shams *et al.*, 2004). La secreción de otras citoquinas, como la IL-12, que participan en la producción de IFN- γ es muy importante. En la tuberculosis, se ha comprobado que la administración exógena de esta citoquina confiere resistencia a la infección mientras que la supresión de la misma provoca un aumento del crecimiento micobacteriano, al reducir la expresión de IFN- γ (Cooper *et al.*, 1995, 1997; Koets *et al.*, 2015). La IL-18 es otra de las citoquinas involucradas en la liberación de IFN- γ en animales infectados con Map (Sugawara *et al.*, 1999).

Un aumento en la producción de IFN- γ se ha relacionado con una respuesta protectora por parte del hospedador en las primeras fases de la infección por Map (Begg *et al.*, 2010). Debido a esto, se ha empleado la prueba de la valoración de la liberación de IFN- γ (IGRA) en sangre periférica tras su estimulación con antígenos de Map, como un método de diagnóstico para detectar animales en fases iniciales o subclínicas (Stabel, 1996; Pérez *et al.*, 1999; Gwozdz *et al.*, 2000b).

En infecciones experimentales con Map se ha observado que la producción de IFN- γ comienza a ser significativamente diferente a la de los animales control a partir de los 30 días post infección (dpi) en ovejas adultas (Delgado *et al.*, 2013); en el caso de corderos es un poco más tardía variando entre los 30 - 45 dpi (Verna *et al.*, 2007) y los 90 dpi (Delgado *et al.*, 2013). En cabras se encuentran aumentos con respecto a los grupos control a partir de los 63 - 70 dpi (9 - 10 semanas) (Storset *et al.*, 2001; Köhler *et al.*, 2015) y a los 60 dpi en el caso del ganado bovino (Muñoz, 2014). La persistencia de esta respuesta también se ha valorado, manteniéndose elevada y diferente de los grupos controles durante toda la duración de las infecciones experimentales: en el caso del ganado bovino continuó la respuesta hasta los 270 dpi (Muñoz, 2014); en el caso de corderos y ovejas infectadas hasta los 210 dpi (Delgado *et al.*, 2013) o durante 150 dpi, en corderos de otra infección experimental (Verna *et al.*, 2007). En el caso del ganado caprino, la duración varió entre las 26 semanas (Köhler *et al.*, 2015) y las 120 semanas (Storset *et al.*, 2001).

En las primeras fases, subclínicas, de la infección paratuberculosa hay un incremento en la secreción de esta citoquina, mientras que cuando la infección evoluciona a fases clínicas la producción tanto periférica como local, disminuye (Sweeney *et al.*, 1998; Stabel, 2000a). Otros autores, sin embargo, argumentan que un incremento en la producción de IFN- γ no es capaz de controlar la infección por Map (Billman-Jacobe *et al.*, 1992; Storset *et al.*, 2001; Uzonna *et al.*, 2003).

Una de las principales funciones del IFN- γ secretado por los linfocitos Th1 es la activación de los macrófagos por la vía clásica, polarizándolos hacia un tipo

denominado M1 o proinflamatorio, caracterizado por la secreción de citoquinas proinflamatorias (TNF- β , IL-1, IL-6 y la IL-23) (Mosser y Edwards, 2008) y óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS), como agente bactericida (Fernández *et al.*, 2017).

Además del IFN- γ , otras citoquinas como IL-1, IL-6 o IL-8 aumentan sus niveles en animales infectados con Map en contraposición a los animales sanos (Coussens, 2004; Whang *et al.*, 2011). Tanto la IL-1 como la IL-6 o el TNF- α , tienen propiedades proinflamatorias al estimular las células T (Alzuhri *et al.*, 1996). El TNF- α es considerada una de las citoquinas básicas en las fases subclínicas de la paratuberculosis, estando relacionada con la formación de granulomas (Kaneko *et al.*, 1999). La IL-1 participa en la expansión clonal de las células T, mientras que la IL-6 participa en la producción de proteínas de fase aguda (Alzuhri *et al.*, 1996; Dinarello, 1996).

La producción de las citoquinas proinflamatorias sería indispensable para el control de la infección en las primeras fases, pero una producción excesiva puede provocar daño a nivel tisular (Clarke, 1997). Para ello, las citoquinas de tipo Th2 como la IL-4 y la IL-10 ejercen un papel supresor sobre el IFN- γ (Peleman *et al.*, 1989; Ito *et al.*, 1999; Magombedze *et al.*, 2015). Además, existe una subpoblación de células T, denominadas células T reguladoras (T_{reg}) que tendrían también una función inmunosupresora para contener el daño tisular provocado por las citoquinas asociadas a la respuesta Th1, aunque su mecanismo de acción sobre la patogenia de la paratuberculosis aún no es bien conocido. La abundancia de dichas células va disminuyendo conforme va aumentando la gravedad de las lesiones (Roussey *et al.*, 2014). Estas células se caracterizan por expresar en su superficie los marcadores CD4⁺ y CD25⁺ (Beissert *et al.*, 2006; de Almeida *et al.*, 2008; Roussey *et al.*, 2014).

3.3.2.2. Respuesta inmunitaria humoral

La respuesta inmunitaria humoral está relacionada con las fases clínicas de la enfermedad, donde ya hay lesiones de tipo difuso multibacilar con excreción de bacterias al medio (Clarke, 1997; Pérez *et al.*, 1997; Storset *et al.*, 2001). Es por

ello, que la respuesta humoral parece no ofrecer ningún tipo de protección frente a Map en los animales infectados (Sohal *et al.*, 2008), aunque recientes trabajos ponen esta hipótesis en duda. Así, Achkar y Casadevall (2013) realizaron una revisión bibliográfica donde resumieron los efectos beneficiosos de la respuesta humoral, la cual mejoraría la eficacia de una vacuna. Entre estos efectos se encontraría, el efecto de los anticuerpos para promocionar la fagocitosis y modificar la intensidad de la respuesta inflamatoria en las fases tempranas de la infección.

En la mayor parte de los animales que se encuentran en fases clínicas se habría producido un cambio de la respuesta inmunitaria Th1 a Th2, comenzando la secreción de citoquinas de tipo Th2 y la inhibición de la respuesta previa Th1 (Stabel, 2000a, 2006). Las principales citoquinas de la respuesta Th2 son la IL-4 y la IL-10 (citoquinas antiinflamatorias), las cuales ejercen un papel supresor sobre el IFN- γ (Peleman *et al.*, 1989; Ito *et al.*, 1999; Magombedze *et al.*, 2015). Como efecto resultante de esa inmunosupresión, los macrófagos serían incapaces de contener las micobacterias, provocando la diseminación de la infección y su progresión hacia formas clínicas. Esta situación se asocia a un incremento de la secreción de la IL-10 y del TGF- β , que se ha observado en vacas en fases avanzadas de la enfermedad, al comparar la expresión con vacas sanas o en fases iniciales de la misma (Khalifeh y Stabel, 2004). También, en lesiones multibacilares asociadas a las formas clínicas, se observa un incremento de la expresión de las IL-4 y IL-10 comparada con lesiones paucibacilares (Tanaka *et al.*, 2005).

El TGF- β es otra de las citoquinas fundamentales de la respuesta humoral, al modular la respuesta inmunitaria frente al IFN- γ , ya que suprime su liberación (Sonawane y Tripathi, 2016a). Expresiones altas de esta citoquina estarían relacionadas con la inhibición de la capacidad de los macrófagos para limitar la multiplicación de Map (Muñoz *et al.*, 2009; Fernández *et al.*, 2017).

Al contrario de lo que sucedía con el IFN- γ , las citoquinas liberadas por los linfocitos Th2, principalmente la IL-4, dan lugar a una polarización de los macrófagos hacia un perfil antiinflamatorio o M2 (Mosser y Edwards, 2008).

Estos macrófagos ayudan en la función inmunosupresora sobre la respuesta celular, para evitar el posible daño generado por un exceso de células de tipo proinflamatorio. Los macrófagos M2 se caracterizan por la alta secreción de la IL-10 y la baja expresión de IL-12 (Martínez y Gordon, 2014).

Los linfocitos Th2 activados estimulan la diferenciación de los linfocitos B y como consecuencia, se producen anticuerpos IgM y IgG, que son específicos frente a antígenos de Map (Sohal *et al.*, 2008). Por ello, uno de los indicadores de que existe una respuesta Th2 activa, es la producción de anticuerpos frente al agente. En el caso de la paratuberculosis, se han realizado estudios, tanto en infecciones naturales como experimentales, y en aquellos animales que muestran signos clínicos se ha observado un aumento en la producción de linfocitos B (Waters *et al.*, 1999; Stabel y Khalifeh, 2008) y en la producción de anticuerpos específicos frente a Map conforme la infección va progresando (Pérez *et al.*, 1997; Burrells *et al.*, 1998; Storset *et al.*, 2001).

En el caso de ovinos infectados experimentalmente se han observado diferencias en la producción de anticuerpos específicos en relación con los animales control a partir de los 42 dpi, comenzando a disminuir a los 200 dpi (Juste *et al.*, 1994). En otros estudios, las diferencias aparecen entre los 110 dpi y los 145 dpi (Delgado *et al.*, 2012). Por el contrario, en una infección experimental en bovinos, no detectaron niveles significativamente altos comparados con el grupo control hasta pasados los 270 dpi (Muñoz, 2014). En el caso de cabras experimentalmente infectadas a diferentes edades (3 - 5 y 41 - 43 días después del nacimiento), se observaron diferencias con los grupos control a los 98 dpi (14 semanas), que se mantuvieron hasta los 154-182 dpi (22-26 semanas) (Köhler *et al.*, 2015).

En infecciones experimentales con Map realizadas en las tonsilas de bovinos, se detectaron anticuerpos a los 134 dpi en terneros, antes incluso de que llegue a detectarse la respuesta celular (Waters *et al.*, 2003). Estos niveles elevados de anticuerpos también se observan en animales vacunados (Juste *et al.*, 1994; Corpa *et al.*, 2000b; Gwozdz *et al.*, 2000a; Hines *et al.*, 2014; Muñoz, 2014).

4. SIGNOS CLINICOS Y LESIONES

4.1. Síntomas

La paratuberculosis es una enfermedad lenta en la cual, a pesar de que los animales se infectan en edades tempranas, los signos clínicos no se observan hasta la edad adulta. Los primeros síntomas aparecen, tras un largo periodo de incubación, a los 2 - 5 años, en forma de goteo, si bien es frecuente que en algunos animales se evidencien tras el parto o tras la segunda lactación (Chiodini *et al.*, 1984a; Valentin-Weigand y Goethe, 1999; Dennis *et al.*, 2011). En un estudio reciente se ha observado que tras el parto la excreción de Map al medio aumenta de un 13,9 % a un 59,5 %, detectado mediante una PCR a tiempo real a partir de heces (Mataragka *et al.*, 2017).

Se estima que el número de animales con signos clínicos de paratuberculosis en una explotación es muy pequeño, permaneciendo la mayoría de animales en estado subclínico, sin llegar a progresar la infección hacia formas clínicas, lo que se ha denominado presentación en “iceberg” (Pérez *et al.*, 2000), pero excretando Map al medio (Stabel *et al.*, 2014; Roy *et al.*, 2017). Los animales pueden permanecer en fase subclínica durante varios meses e incluso años, en muchas ocasiones sin que puedan ser detectados mediante las pruebas de diagnóstico (Whitlock y Buergelt, 1996).

La razón de que algunos animales pasen desde la fase subclínica a la fase clínica no se conoce con certeza. Se ha postulado que podría deberse a la aparición de circunstancias estresantes que, si bien no están del todo caracterizadas, se cree que pueden influir en este cambio: el parto, una mayor exigencia en la producción de leche, desnutrición, infecciones parasitarias, pastoreo en zonas deficitarias en nutrientes, etc. (Chiodini *et al.*, 1984a).

El signo característico de la paratuberculosis en los rumiantes es el adelgazamiento progresivo y como consecuencia, una pérdida de la condición corporal (Clarke, 1997; Pérez *et al.*, 2000). Los animales, a pesar ello, siguen manteniendo el apetito. La pérdida de peso estaría provocada por una

malabsorción y pérdida de las proteínas asociadas a la enteritis granulomatosa (Allen *et al.*, 1974), pero posiblemente también al gasto energético que comporta una inflamación difusa y crónica de tipo granulomatoso. Otro signo que se da en la mayoría de los animales es el edema hipoproteinémico en zonas declives del cuerpo, como la región submandibular (Clarke, 1997).

En el ganado bovino, la pérdida de peso se acompaña habitualmente de una abundante diarrea líquida, no sanguinolenta y que no responde a la antibioterapia ni a los cambios de alimentación. Este tipo de diarrea puede ser crónica o con períodos intermitentes, en relación con situaciones de estrés (Chiodini *et al.*, 1984a). Por el contrario, en el caso del ganado ovino y caprino, la diarrea no es un signo clínico tan frecuente. La diarrea que aparece en estas especies se caracteriza por la presencia de heces reblandecidas y de manera intermitente (Chiodini *et al.*, 1984a). El curso clínico habitual de la paratuberculosis en el ganado vacuno es de 3 a 6 meses, aunque en algunas ocasiones lo supere, mientras que en los pequeños rumiantes este período es aún más breve (Chiodini *et al.*, 1984a).

Otro signo que se puede producir es la disminución de la producción de leche, que también puede observarse durante las etapas subclínicas (Stabel, 1998; Losinger, 2005). Además, los animales infectados por Map son también más susceptibles a problemas reproductivos como la infertilidad y la mamitis (Merkal *et al.*, 1975; Stabel, 1998). La mayoría de los animales son enviados al matadero debido a estos otros signos inespecíficos, que provocan bajas prematuras por un bajo rendimiento productivo (Whitlock y Buergelt, 1996; Pérez *et al.*, 2000).

4.2. Lesiones

4.2.1. Lesiones macroscópicas

Como cualquier proceso caquetizante, al realizar la necropsia de animales en fases clínicamente avanzadas, las lesiones más evidentes están directamente relacionadas con este proceso: emaciación, atrofia muscular, pérdida de grasa

mesentérica y edemas en zonas declives (edema submandibular) (Chiodini *et al.*, 1984a; Clarke y Little, 1996).

Las lesiones macroscópicas características y específicas de la paratuberculosis se asientan en los tramos distales del intestino delgado (yeyuno, íleon, válvula ileocecal), e incluso, en tramos proximales del colon y ciego, además de en NLYC. En casos avanzados, las lesiones incluso pueden progresar a zonas de duodeno y recto (Chiodini *et al.*, 1984a; Carrigan y Seaman, 1990). La pared intestinal aparece engrosada, llegando a parecer un tubo de goma (Pérez *et al.*, 2000). Al corte, la zona afectada, tanto la mucosa como la submucosa, se encuentran tumefactas, engrosadas y aparecen unos pliegues que recuerdan a las circunvoluciones del cerebro, que no desaparecen al estirar el intestino (Buergelt *et al.*, 1978; Carrigan y Seaman, 1990; Pérez *et al.*, 2000; González *et al.*, 2005; Muñoz, 2014). En ovinos y caprinos se observan pliegues menos evidentes que en bovinos, ya que en estos animales el incremento de la pared intestinal es moderado o leve (Stamp y Watt, 1954). En el caso particular de las cabras, el engrosamiento es más evidente en yeyuno que en íleon (Corpa *et al.*, 2000a).

En animales en fase subclínica es muy complicado encontrar lesiones visibles macroscópicamente en intestino o en nódulos linfáticos. Aunque en algunas ocasiones, se puede observar un ligero engrosamiento de la pared y una tumefacción de los nódulos linfáticos asociados (Pérez *et al.*, 2000). Además, no existe una relación directa entre el grado de lesión a nivel macroscópico con la sintomatológica clínica del animal, hecho descrito especialmente en ovinos y caprinos en los que algunos animales muestran lesiones mínimas, pero con signos clínicos graves (Clarke, 1997; Brady *et al.*, 2008).

La linfangitis y linfangiectasia, caracterizadas porque los vasos linfáticos afectados llegan a verse como cordones blancos o transparentes que se elevan sobre la serosa intestinal e incluso, en casos muy graves, sobre el mesenterio, es una lesión que suele acompañar al engrosamiento de la pared intestinal. Suele ser más evidente en las especies ovina y caprina, mientras que en el ganado bovino, esta lesión es menos frecuente y si aparece, lo hace de forma focal

(Buergelt *et al.*, 1978; Corpa *et al.*, 2000a; Pérez *et al.*, 2000; Kurade *et al.*, 2004).

Los NL yeyunales e ileales se presentan edematosos, tumefactos y al realizar la sección se observa una coloración pálida (Chiodini *et al.*, 1984a; Carrigan y Seaman, 1990; Valheim *et al.*, 2002b). En los pequeños rumiantes, especialmente en el ganado caprino, se pueden observar focos de necrosis caseosa y calcificaciones en los NLYC (Clarke, 1997; Corpa *et al.*, 2000a; Tafti y Rashidi, 2000).

4.2.2. Lesiones microscópicas

La lesión característica de la paratuberculosis es una **enteritis y/o linfadenitis granulomatosa**, caracterizadas por un infiltrado focal o difuso, de células epitelioideas. Éstas tienen citoplasma abundante, ligeramente espumoso y núcleos con poca heterocromatina, y se corresponden con macrófagos modificados. También, pueden observarse en número variable: linfocitos, células plasmáticas y células gigantes multinucleadas tipo Langhans. Todas estas células constituyen los denominados granulomas, cuya presencia altera la estructura normal de la pared intestinal. En los casos avanzados, infiltran de forma difusa la LP, provocando su engrosamiento con atrofia y dilatación de las vellosidades intestinales, y pueden extenderse a otras zonas como a las capas muscular y serosa (Pérez *et al.*, 2000; Delgado *et al.*, 2013).

En los nódulos linfáticos se observan linfadenitis granulomatosas, con macrófagos y células gigantes localizados en la zona paracortical que, en los casos graves, llegan a alterar la estructura normal del órgano (Buergelt *et al.*, 1978; Pérez *et al.*, 2000; González *et al.*, 2005).

4.2.3. Lesiones extraintestinales

En casos clínicos graves y avanzados se han observado lesiones extraintestinales como la existencia de granulomas focales en el hígado (Buergelt *et al.*, 1978; Chiodini *et al.*, 1984a; Clarke, 1997), procesos degenerativos y fibrosis de las paredes arteriales y el endocardio (Majeed y Goudswaard, 1971;

Chiodini *et al.*, 1984a), granulomas focales en riñones y pulmones (Hines *et al.*, 1987) y degeneración axonal de nervios (Chiodini *et al.*, 1984a).

4.3. Clasificación lesional

Desde los primeros trabajos que estudiaron las lesiones microscópicas en paratuberculosis, se ha podido constatar que existe una variabilidad en su presentación entre los distintos animales (Stamp y Watt, 1954; Buergelt *et al.*, 1978; Tafti y Rashidi, 2000). Las primeras clasificaciones tomaron como principal criterio la intensidad de la lesión o incluso la cepa de Map infectante (Chiodini *et al.*, 1984a; Carrigan y Seaman, 1990; Clarke y Little, 1996). En años posteriores, Pérez *et al.* (1996) realizan una clasificación en la especie ovina en la que toman como referencia fundamental la localización de los granulomas, y que permitió establecer una relación entre el tipo de lesión y la fase de la enfermedad en la que se encontraba el individuo. Esta propuesta fue tomada como base para posteriores clasificaciones en bovinos (González *et al.*, 2005), cabras (Corpa *et al.*, 2000a), gamos (Balseiro *et al.*, 2008) y conejos (Maio *et al.*, 2011).

ESPECIE OVINA

Son numerosos autores los que han propuesto diferentes clasificaciones lesionales microscópicas (Stamp y Watt, 1954; Rajya y Singh, 1961; Carrigan y Seaman, 1990; Pérez *et al.*, 1996; Delgado *et al.*, 2013), basadas principalmente en la patogenicidad de las cepas, la gravedad de las lesiones, la presencia o no de BAAR y las relaciones entre las lesiones y el estado clínico del individuo. La clasificación que han propuesto Pérez *et al.* (1996) reconoce varios tipos de lesión según los granulomas estén asociados o no al tejido linfóide intestinal, la intensidad y distribución de las lesiones, los tipos celulares presentes y la presencia de BAAR. Según esta clasificación, se reconocen tres tipos principales:

- Lesiones tipo 1: se corresponden con pequeños granulomas focales bien definidos, localizados exclusivamente en el tejido linfóide de las placas de Peyer ileocecales y yeyunales, particularmente en la base del espacio

interfolicular, aunque en algunos casos, pueden extenderse a zonas apicales. Los granulomas están compuestos mayoritariamente por macrófagos mezclados con algunos linfocitos. Ocasionalmente, se pueden llegar a observar granulomas en los nódulos linfáticos asociados. La presencia de BAAR es infrecuente y no hay lesiones macroscópicas asociadas. Se relaciona con fases subclínicas de la enfermedad, sin que las lesiones microscópicas alteren la estructura normal de la pared intestinal.

- Lesiones tipo 2: este tipo de lesiones serían una progresión de las anteriores, siendo más graves, aunque sin existir lesiones macroscópicas. Los granulomas se pueden encontrar siempre en las zonas interfoliculares de las placas de Peyer, extendiéndose desde la zona basal hasta su ápice o incluso en la LP y las vellosidades. Estos granulomas de forma redondeada tienen sus bordes bien definidos. A pesar de que su número es variable, nunca llegan a causar una enteritis ni a alterar la estructura normal del intestino. En los nódulos linfáticos se observan lesiones similares, pero menos frecuentes y de tamaño más reducido.

- Lesiones tipo 3: este tipo de lesiones tiene, a su vez, tres subtipos de lesiones. Todos ellos comparten la existencia de lesiones granulomatosas en el tejido linfoide y también en la LP, tanto la relacionada como la no relacionada con las placas de Peyer.

o Lesiones tipo 3a: se caracterizan por la presencia de granulomas multifocales, más grandes que en el caso anterior, en tejido linfoide y en zonas de LP asociada pero que también aparecen, de forma multifocal, en zonas no asociadas a las placas de Peyer, tanto en íleon como en yeyuno. Aunque focalmente pueden causar un engrosamiento de la pared intestinal, no llegan a alterar notablemente su morfología. En algunos animales llegan a observarse lesiones macroscópicas, sobre todo linfangitis y linfangiectasias, en la serosa del íleon. En la submucosa y en la serosa se observan focos aislados de células inflamatorias (linfocitos y macrófagos en su mayoría), alrededor de los vasos linfáticos y sanguíneos.

También se pueden apreciar lesiones granulomatosas en el NLM. En este subtipo se distinguen micobacterias en LP.

○ Lesiones tipo 3b: la lesión microscópica más evidente es la enteritis granulomatosa difusa formada por células epitelioides que infiltran amplias zonas de la LP, a la que proporcionan un aspecto de mosaico. En el tejido linfoide, los granulomas aparte de encontrarse en áreas interfoliculares, invaden los folículos y cúpulas, provocando en consecuencia una modificación de la estructura normal de la pared. En la LP, que aparece notablemente engrosada, las vellosidades afectadas aumentan su grosor y llegan a confluir. El infiltrado inflamatorio es similar a las lesiones de tipo 3a. Se pueden llegar a observar células gigantes de tipo Langhans, pero de pequeño tamaño y en baja cantidad. En la serosa, se observan linfangitis y linfangiectasias en diferentes grados. Los principales nódulos linfáticos afectados son el mesentérico caudal y el ileocecal con una linfadenitis granulomatosa multifocal o difusa que llega a alterar la estructura normal del nódulo. Hay numerosos BAAR que son fácilmente detectables mediante la tinción de ZN e inmunohistoquímica. En estos casos, se observan lesiones macroscópicas evidentes, con un engrosamiento difuso de la pared intestinal, linfangiectasias en la serosa y tumefacción marcada de los nódulos linfáticos.

○ Lesiones tipo 3c: se sigue observando una enteritis granulomatosa difusa en la mucosa asociada o no a las placas de Peyer, aunque en este caso, el tipo celular predominante del infiltrado son los linfocitos, entre los que se observan macrófagos y una cantidad moderada o alta de células gigantes. Las lesiones en las placas de Peyer son parecidas a las del tipo anterior, con un mayor número de macrófagos picnóticos y células gigantes. En la submucosa se aprecia edema con un número variable de linfocitos y células plasmáticas, que también se observan en la serosa. En los nódulos linfáticos, los granulomas se localizan multifocalmente en zonas paracorticales e interfoliculares y presentan células de Langhans. Se pueden llegar a observar focos necróticos con o sin calcificar. Las

micobacterias se encuentran ausentes o en un número muy bajo. Las lesiones macroscópicas son similares a las lesiones del tipo 3b.

Posteriormente, Delgado *et al.* (2013) han modificado la clasificación anterior, de forma que consideran tres tipos: focales, equivalentes a las de tipo 1; multifocales, donde los granulomas se extienden a la LP asociada, a las que denominan multifocales a (equivalentes al tipo 2) y multifocales b, cuando se localizan también en zonas no relacionadas con las placas de Peyer (tipo 3a); difusas, equivalentes a los tipos 3b y 3c (Figura I.1.). Las primeras dos formas (focales y multifocales) estarían relacionadas con las fases subclínicas de la enfermedad, mientras que las formas difusas aparecerían en la enfermedad clínica.

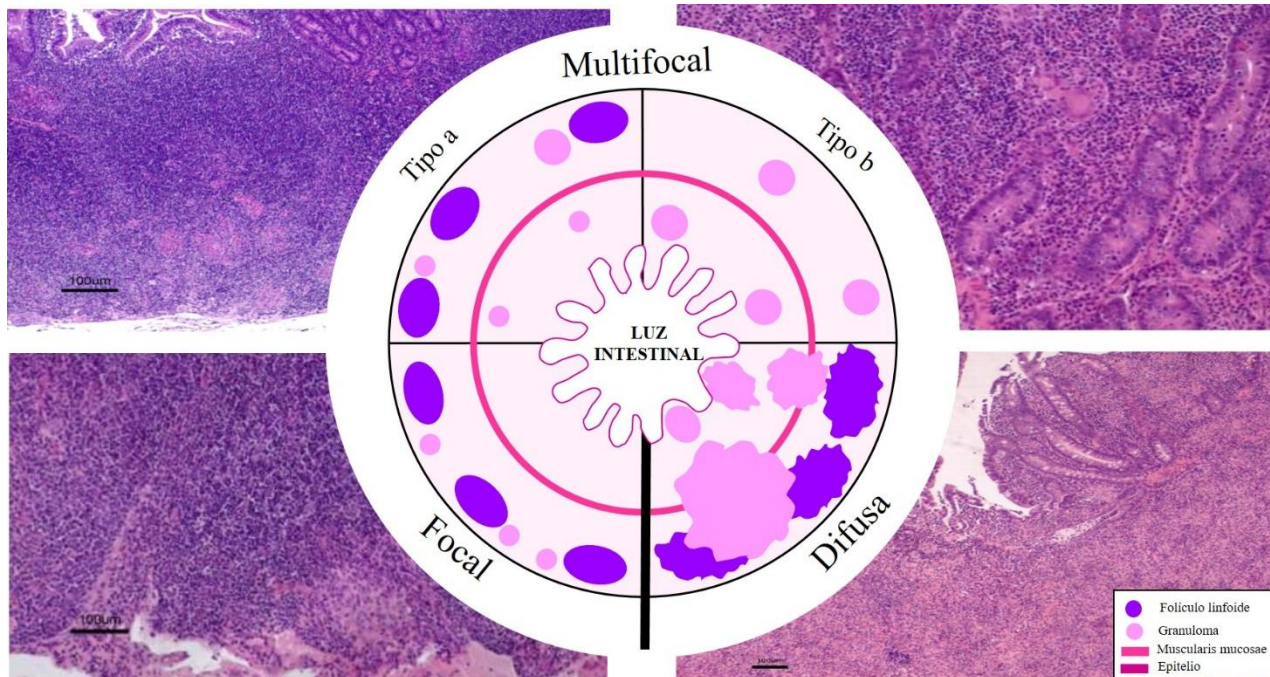


Figura I.1. Localización de las lesiones granulomatosas y evolución de las lesiones en el intestino. El dibujo representa una sección de intestino con y sin placa de Peyer. **LESIÓN FOCAL.** Pequeños granulomas restringidos al espacio interfolicular. **LESIÓN MULTIFOCAL.** Los granulomas se extienden hacia la LP adyacente al tejido linfoide (**Tipo a**) y hacia LP no asociada a tejido linfoide (**Tipo b**). **LESIÓN DIFUSA.** Los granulomas aumentan de tamaño y se produce una alteración de la estructura histológica normal de la mucosa y submucosa.

ESPECIE BOVINA

En esta especie no se han llevado a cabo tantas clasificaciones lesionales, destacando las realizadas por Buergelt *et al.* (1978) que clasificaron las lesiones según su gravedad, y la clasificación de González *et al.* (2005) que se basa en la llevada a cabo por Pérez *et al.* (1996) en la especie ovina. Para estos últimos autores, las lesiones se dividen en formas focales, multifocales y difusas (multibacilares, paucibacilares e intermedias), con un predominio de la localización en el íleon. En estudios más recientes se han propuesto nuevas clasificaciones prestando atención a las relaciones entre las formas lesionales con el sistema inmunitario (Vázquez *et al.*, 2013) o con los polimorfismos genéticos (Juste *et al.*, 2016). La presencia de células multinucleadas de Langhans son habituales en las formas difusas (Buergelt *et al.*, 1978; Clarke, 1997; González *et al.*, 2005).

ESPECIE CAPRINA

Al igual que en otras especies, también se han llevado a cabo diferentes clasificaciones atendiendo sobre todo a criterios de intensidad de la lesión (Paliwal y Rajya, 1982; Tafti y Rashidi, 2000). Autores como Corpa *et al.* (2000a) proponen una clasificación para el ganado caprino, basándose en la propuesta por Pérez *et al.* (1996) para el ganado ovino, que recoge los siguientes tipos:

- Lesiones focales: formadas por pequeños granulomas bien definidos cuyo componente celular mayoritario son los macrófagos. Los granulomas se encuentran ubicados en el espacio interfolicular de los folículos linfoides y en zonas de LP, pero siempre adyacente a tejido linfoide. A pesar de ello, los granulomas, independientemente de su número, no alteran significativamente la estructura normal del intestino. Solo se observaron micobacterias mediante ZN e inmunohistoquímica en los granulomas de la LP.

- Lesiones difusas: se caracterizan por enteritis granulomatosas difusas que afectan a amplias zonas del intestino. Los animales con estas lesiones microscópicas muestran emaciación y atrofia serosa. La pared intestinal, en ileon y yeyuno, está engrosada y se observan linfangiectasias en la serosa y el mesenterio. Los vasos linfáticos engrosados, como cordones blancos, muestran pequeños focos necróticos. Los nódulos linfáticos también están aumentados de tamaño. Las lesiones difusas se dividen a su vez en:

- Lesiones difusas multibacilares: se observan grupos de macrófagos distribuidos de manera difusa por toda la LP, tanto ileal como yeyunal. En las placas de Peyer también hay granulomas bien delimitados en el tejido linfoide. Relacionados con los vasos linfáticos de la submucosa, se observan focos de necrosis, que pueden estar o no calcificados. En la serosa, se observan linfangitis y linfangiectasias. En los nódulos linfáticos se detectan linfadenitis granulomatosas difusas o multifocales con focos necróticos caseosos. Siempre se observan abundantes BAAR tanto en intestino como en nódulos linfáticos.
- Lesiones difusas linfocíticas o paucibacilares: se caracterizan por una enteritis granulomatosa difusa en la que los tipos celulares mayoritarios que infiltran la LP son los linfocitos y células plasmáticas, entre los que se localizan macrófagos y células gigantes. Las lesiones de los nódulos linfáticos son similares a las del tipo anterior. También aparecen focos necróticos, calcificados o no, en la submucosa, serosa y en los nódulos linfáticos. No se detectan BAAR en los tejidos o aparecen en un pequeño número.
- Lesiones difusas intermedias: se trata de un tipo con características compartidas de los dos anteriores. En este caso, el infiltrado que forma la enteritis granulomatosa contiene números elevados y similares tanto de linfocitos como de macrófagos. Los BAAR, a pesar de ser escasos, siempre son detectables.

4.4. Relación entre las formas lesionales y la respuesta inmunitaria

Aunque no son completamente conocidos los factores que determinan que los animales desarrollen un tipo u otro de lesión, sí que se ha determinado que la respuesta inmunitaria del individuo está estrechamente relacionada con las formas lesionales (Pérez *et al.*, 1997, 1999; Kurade *et al.*, 2004; Delgado, 2010; Vázquez *et al.*, 2013; Fernández *et al.*, 2017). En la paratuberculosis, al igual que en otras micobacteriosis como la lepra humana y la tuberculosis, se ha descrito la existencia de un espectro inmunopatológico en el cual se pueden encuadrar los animales infectados en función del tipo de lesión y la respuesta inmunitaria periférica (Chiodini *et al.*, 1984a; Yamamura *et al.*, 1991; Orme *et al.*, 1993; Koets *et al.*, 2015).

En el **extremo tuberculoide** del espectro se situarían los animales con lesiones focales o multifocales, de acuerdo a las clasificaciones antes referidas, en los que la respuesta inmunitaria predominante sería de tipo celular o Th1, capaz de contener la progresión de la infección. Habría una ausencia de BAAR en las lesiones. Estas formas estarían relacionadas con fases iniciales o subclínicas que se producen tras la exposición a Map, por tanto, sin signos clínicos. En el extremo opuesto del espectro, se encontraría el **extremo lepromatoso**, donde la respuesta inmunitaria predominante es la humoral o Th2, la cual no puede controlar el crecimiento bacteriano, por lo que habría una gran cantidad de micobacterias en el citoplasma de macrófagos.

Entre los extremos, se encuentran las **formas intermedias**, caracterizadas por signos clínicos graves, asociados a inflamaciones difusas. Aquellos animales más cercanos al extremo tuberculoide presentarían las denominadas **formas intermedias-tuberculoides**, con respuestas inmunitarias celulares e intensas, siendo lesiones difusas linfocíticas o paucibacilares. Los que se localizarían en zonas próximas al extremo lepromatoso, mostrarían **formas intermedias-lepromatosas**, con lesiones difusas multibacilares y una respuesta inmunitaria humoral detectable (Buergelt *et al.*, 1978; Chiodini *et al.*, 1984a; Pérez *et al.*, 1996, 1999; Burrells *et al.*, 1998; García Marín *et al.*, 2000; González *et al.*,

2005; Tanaka *et al.*, 2005; Brady *et al.*, 2008). En el caso de la paratuberculosis, no se han encontrado lesiones que encajen completamente en este extremo (Pérez *et al.*, 1999).

Estos diferentes tipos de lesión se han asociado a distintas expresiones de citoquinas. Los linfocitos en las formas tuberculoides exhiben una mayor liberación de IFN- γ e IL-2 que los linfocitos de las formas lepromatosas, observándose las mayores diferencias en los obtenidos de los nódulos linfáticos (Burrells *et al.*, 1998, 1999). En bovinos con formas subclínicas de la enfermedad, presumiblemente con lesiones de tipo tuberculoide, se ha observado un incremento del IFN- γ en nódulos linfáticos ileales y cecales (Sweeney *et al.*, 1998). En cambio otros autores no han encontrado diferencias en la liberación de esta citoquina entre ambas formas (Tanaka *et al.*, 2005). En un estudio reciente (Fernández *et al.*, 2017) donde se evaluaba la producción de IFN- γ a nivel local mediante inmunohistoquímica, se observó un mayor número de células (morfológicamente linfocitos) produciendo IFN- γ en aquellas lesiones focales o difusas paucibacilares que en las formas difusas multibacilares. A pesar de ello, en este último caso el número de células inmuno-marcadas era superior al grupo control, encontrándose entremezcladas con los macrófagos.

Un estudio reciente ha demostrado que los macrófagos también muestran una expresión diferencial de citoquinas y otras proteínas relacionadas con la respuesta inmunitaria según el tipo de lesión (Fernández *et al.*, 2017), de forma que, en las lesiones focales, de tipo tuberculoide, los macrófagos están polarizados hacia un tipo **M1**. Estos macrófagos se caracterizan por una expresión de iNOS y citoquinas proinflamatorias como son TNF- α y las IL-6 e IL-12, consiguiéndose con ello una respuesta proinflamatoria, antimicrobiana y antitumoral. En las lesiones difusas multibacilares, los macrófagos mostrarían un fenotipo **M2**, con la síntesis de citoquinas antiinflamatorias como el TGF- β , la IL-10 o receptores de la manosa (CD163). Estos macrófagos M2 están involucrados en procesos alérgicos, en la contención de los parásitos, reparación tisular, promueven la actividad tumoral y participan en la modulación del sistema inmunitario. A modo de resumen, los M1 estarían involucrados en una respuesta

Th1 o proinflamatoria y los M2 en una respuesta Th2 o antiinflamatoria (Mantovani *et al.*, 2004; Martínez y Gordon, 2014).

5. INFECCIONES EXPERIMENTALES

La realización de infecciones experimentales, donde se pueden controlar distintos parámetros que influyen en la enfermedad, se constituye como un procedimiento indispensable para poder llevar a cabo estudios de patogenia en la infección por Map, incluyendo la respuesta inmunitaria, eficacia de distintas pruebas diagnósticas, o la influencia de posibles tratamientos o vacunas (Hines II *et al.*, 2007a). El principal inconveniente de este tipo de estudios son los largos tiempos de incubación de la enfermedad, ya que debido a su carácter lento, los signos clínicos no se manifiestan hasta pasados amplios periodos de tiempo, además del hecho de que la infección no progresa igualmente en todos los animales que se infectan (Clarke, 1997; Pérez *et al.*, 2000; Tiwari *et al.*, 2006; Dennis *et al.*, 2011; Roy *et al.*, 2017). Todo esto ocasiona que los experimentos deban ser prolongados en el tiempo, y que el número de animales a emplear sea también un factor importante a considerar, según la naturaleza del estudio. Por ello, la tasa de éxito de las distintas infecciones experimentales realizadas ha sido muy variable, lo que hace difícil su comparación (Beard *et al.*, 2001b; Storset *et al.*, 2001; Kurade *et al.*, 2004; Stewart *et al.*, 2006; Sweeney *et al.*, 2006).

Hines II *et al.* (2007) desarrollaron una guía para estandarizar los procedimientos a la hora de realizar las infecciones experimentales, recalando algunos factores que deben ser observados con detenimiento. Esta guía fue ampliada por Begg y Whittington (2008). Estos autores especificaron factores claves para desarrollar una correcta infección como son: la especie y raza animal a emplear, la edad de los individuos, la propia cepa que se emplea para infectar a los animales, el origen del inóculo, la ruta de inoculación o la dosis y el número empleado.

Las **especies** más utilizadas para llevar a cabo las infecciones experimentales son las de rumiantes, ya que son a las que principalmente afecta la paratuberculosis en condiciones naturales. Sin embargo, su empleo, aunque ha

demostrado ser exitoso en diversos estudios (Reddacliff y Whittington, 2003; Uzonna *et al.*, 2003; Waters *et al.*, 2003; Stewart *et al.*, 2006; Sweeney *et al.*, 2006; Mackintosh *et al.*, 2010; Muñoz, 2014), conlleva altos costes económicos tanto por el valor de los animales como por su prolongado mantenimiento. Para reducir costes, se han empleado otros animales de laboratorio que presentarían una mayor facilidad de manejo y un desarrollo más rápido de la infección (Begg y Whittington, 2008) como los ratones (Thomsen *et al.*, 2001; Shin *et al.*, 2015) y los conejos (Vaughan *et al.*, 2005; Arrazuria *et al.*, 2017). Sin embargo, en estos casos no se consigue reproducir la enfermedad tal y como sucede en rumiantes, si bien en el caso del modelo en conejos si podría aproximarse más. Los conejos han demostrado ser un modelo útil para el estudio de la paratuberculosis subclínica, ya que durante esta fase en esta especie, la eliminación fecal fue intermitente y la presencia de lesiones macroscópicas y microscópicas en el sistema digestivo y tejido linfoide asociado fueron similares a las descritas en rumiantes (Arrazuria *et al.*, 2017).

Algunas **razas** de las distintas especies de rumiantes también parecen ser más susceptibles a la infección por Map que otras. Entre el ganado ovino, parece ser más sensible a la infección la raza Merina (Lugton, 2004; Begg *et al.*, 2017). En el caso de la especie caprina, se han realizado infecciones experimentales en las razas Angora (Stewart *et al.*, 2006), Noruega (Sigurðardóttir *et al.*, 1999, 2001; Storset *et al.*, 2001) o Thuringian Forest (Köhler *et al.*, 2015; Krüger *et al.*, 2015), entre otras, sin que se refieran diferencias entre ellas en cuanto a la susceptibilidad a la infección.

Uno de los factores más importantes que condicionan el éxito de las infecciones experimentales con Map es la **edad de los individuos** (Hines II *et al.*, 2007a; Begg y Whittington, 2008). Así, se ha asumido que los animales se infectan en edades tempranas, ya que son más susceptibles a la infección, y no desarrollan los signos clínicos hasta la edad adulta, tras haber transcurrido un largo periodo de incubación (Chiodini *et al.*, 1984a; Clarke, 1997). Existen estudios que demuestran que los individuos adultos sí que pueden llegar a infectarse en condiciones experimentales, aunque las lesiones que se observan

en ellos nunca llegan a progresar hacia formas graves, mostrando una resistencia a la infección (Windsor y Whittington, 2010; Delgado *et al.*, 2013). Por ello, la mayor parte de los estudios experimentales se han realizado con animales jóvenes, durante el primer mes de vida (Gwozdz *et al.*, 2000a; Uzonna *et al.*, 2003; Waters *et al.*, 2003; Simutis *et al.*, 2005; Sweeney *et al.*, 2006) o en meses posteriores, pero siempre menores de un año (Juste *et al.*, 1994; Storset *et al.*, 2001; Reddacliff y Whittington, 2003; Kurade *et al.*, 2004; Stewart *et al.*, 2004, 2007; Begg *et al.*, 2005; Muñoz, 2014).

El **tipo de cepa** es otro factor que influye a la hora de realizar infecciones experimentales. Son muchos los artículos que no detallan el genotipo empleado en el diseño experimental, por lo que no hay demasiada información sobre cómo influye este aspecto en el éxito de la infección (Gwozdz *et al.*, 2000b; Kurade y Tripathi, 2008; Roy *et al.*, 2017). El efecto del tipo de cepa sobre la patogenia se ha comparado en las diferentes especies rumiantes. Algunos autores han observado que el ganado bovino, ovino y caprino puede infectarse con cepas tipo C y S, aunque con diferencias en la patogenicidad según la especie. En cuanto al desarrollo de la fase clínica, el ganado vacuno resultó ser más resistente que el ganado ovino a la infección por Map; mientras que el ganado caprino fue el más susceptible, independientemente del tipo de cepa con el que se hubiera infectado a las diferentes especies (Stewart *et al.*, 2004, 2006, 2007). El tipo de cepa también influye en la respuesta del hospedador frente al patógeno de forma que las cepas tipo S provocaron una respuesta inmunitaria mucho más débil que las cepas tipo C en cabras (Stewart *et al.*, 2004). En el caso de los cérvidos, al realizarse una infección experimental con ambas cepas, observaron que se infectan con las dos aunque son más susceptibles a las cepas bovinas (O'Brien *et al.*, 2006). Comparando los dos tipos de cepa en el ganado ovino, se demostró que cuando se infectan corderos con cepas de tipo S, las lesiones que se originan son mucho más graves y extensas que las ocasionadas por la cepa bovina (Verna *et al.*, 2007). Este aspecto se corroboró más recientemente por Fernández *et al.* (2014) al observar que las lesiones ocasionadas por la cepa bovina en corderos presentaron una mayor intensidad en las primeras etapas de la infección, pero posteriormente tendían a desaparecer; mientras que en los animales infectados

con cepas ovinas, las lesiones iban aumentando en gravedad, de forma progresiva.

En la especie caprina, se han realizado estudios experimentales empleando cepas obtenidas a partir de tejidos de cabras con signos clínicos, sin especificar de qué tipo de cepa se trataba (Sigurðardóttir *et al.*, 1999, 2001; Gwozdz *et al.*, 2000a; Storset *et al.*, 2001). En otros estudios emplearon las cepas tipo C (Köhler *et al.*, 2015; Krüger *et al.*, 2015) con éxito. Comparando ambas cepas en la especie caprina, las cepas tipo C presentaron una mayor patogenicidad y los animales infectados mayores tasas de excreción, mayor seroconversión y presentación clínica más grave que las cabras inoculadas con las cepas tipo S (Stewart *et al.*, 2006).

El **origen del inóculo** también influye a la hora de que Map se establezca en el hospedador. Existen diferentes procedencias que se han ido empleando a lo largo de los años, en las diferentes infecciones experimentales. Los primeros inóculos simulaban directamente la ruta fecal-oral y consistían en la administración de heces de animales infectados (Chiodini *et al.*, 1984a; Sweeney *et al.*, 1992). Posteriormente, se han empleado homogeneizados tisulares obtenidos de mucosa intestinal o micobacterias purificadas directamente de ellos (Gwozdz *et al.*, 2000b; Kurade *et al.*, 2004; Munjal *et al.*, 2005; de Silva *et al.*, 2010; Delgado *et al.*, 2013; Muñoz, 2014) o de nódulos linfáticos (Begg *et al.*, 2005; O'Brien *et al.*, 2006; Mackintosh *et al.*, 2007) o aislados obtenidos a partir de cultivos microbiológicos (Juste *et al.*, 1994; Storset *et al.*, 2001; Stewart *et al.*, 2006; Begg *et al.*, 2009; Watkins *et al.*, 2010).

En estudios previos se ha señalado que el empleo en infecciones experimentales de los homogeneizados o cepas obtenidas *in vivo* tiene una baja repetitividad, debido a la limitación de la cantidad producida y además, es imposible controlar todos los componentes del material infectante, por lo que se recomienda el empleo de inóculos procedentes de cultivo o cepas *in vitro* (Hines II *et al.*, 2007a). Estas son fácilmente almacenables y el recuento de las colonias de Map es más sencillo. Uno de los inconvenientes que se ha observado, es que

la virulencia de estas cepas puede descender tras múltiples pases en cultivo (Begg *et al.*, 2005; Radosevich *et al.*, 2007; Fernández *et al.*, 2015).

En general, en los rumiantes las cepas *in vivo* han mostrado una mayor patogenicidad que aquellas obtenidas de cultivos bacteriológicos (Stewart *et al.*, 2004, 2006, 2007; Begg *et al.*, 2005). Además de la pérdida de patogenicidad como consecuencia del cultivo en laboratorio, en estos trabajos se ha señalado que, en los inóculos procedentes de homogeneizados, podrían coexistir varias cepas diferentes de Map, diferente concentración de micobacterias, así como la cohabitación con otros microorganismos que favorecerían la infección (Stewart *et al.*, 2004; Begg *et al.*, 2005). En un estudio posterior, llevado a cabo por Fernández *et al.* (2015) se observó que la inoculación en corderos de micobacterias purificadas a partir de un homogeneizado de intestino o de las mismas micobacterias tras su crecimiento en medios de cultivo, permitió la reproducción de la infección paratuberculosa, aunque las lesiones y la respuesta inmunitaria fueron menos intensas en las ovejas inoculadas con el inóculo formado a partir de las cepas cultivadas. En cambio Begg *et al.* (2010) no encontraron diferencias significativas entre ambos tipos de inóculo (homogeneizados y micobacterias cultivadas), aunque los animales infectados con el homogeneizado de mucosa intestinal presentaron unos signos clínicos más precoces.

En el caso de las infecciones experimentales en cabras, el origen del inóculo varía entre los diferentes estudios: desde homogeneizados de nódulos linfáticos o fragmentos de intestino (Sigurðardóttir *et al.*, 1999, 2001; Gwozdz *et al.*, 2000a; Stewart *et al.*, 2006) a cepas cultivadas (Storset *et al.*, 2001; Hines II *et al.*, 2007b; Köhler *et al.*, 2015; Krüger *et al.*, 2015).

En cuanto a la **vía de inoculación**, en animales de laboratorio se han probado diferentes alternativas, como la subcutánea, intra-tonsilar, intraperitoneal, intrainestinal, intragástrica o intravenosa, que también se han empleado en rumiantes (Harding, 1957; Merkal *et al.*, 1968). La ruta más habitual en estos últimos ha sido la vía oral, ya que es la que asemeja con mayor fiabilidad a la ruta de entrada de Map al organismo (Hines II *et al.*, 2007a).

Otro aspecto importante a la hora de planificar las infecciones experimentales, es la **dosis óptima de inóculo** con la que se va a reproducir la infección. Debe ser una dosis suficiente pero no excesiva para que no llegue a sobrepasar la vacunación o la quimioprofilaxis que pueda evaluarse en un futuro estudio (Hines II *et al.*, 2007a). No existe una dosis estandarizada para llevar a cabo una infección experimental. La dosis mínima con la que se ha podido comprobar que un animal de la especie ovina se infecta fue de 10^3 unidades formadoras de colonias (UFC) (Brotherston *et al.*, 1961a). Otros autores en cambio, no detectaron ningún signo de infección en animales inoculados con una dosis de 10^4 UFC (Reddacliff y Whittington, 2003). La dosis más empleada es la situada entre 10^9 y 10^{12} UFC (Klausen *et al.*, 1997; Kurade *et al.*, 2004; Verna *et al.*, 2007; Begg *et al.*, 2017; Roy *et al.*, 2017). En el ganado caprino, las dosis más habituales varían desde los 3×10^7 (Sigurðardóttir *et al.*, 1999) hasta los 1×10^{10} (Stewart *et al.*, 2006; Hines II *et al.*, 2007b) y entre los 2.365 mg (Sigurðardóttir *et al.*, 2001) hasta los 20 gr (Stewart *et al.*, 2006) en el caso de inóculos a partir de mucosa intestinal.

Existe una relación entre la dosis empleada y el desarrollo de las lesiones o del cuadro clínico, de forma que animales infectados con dosis muy bajas pueden llegar a infectarse, pero tardan mucho tiempo en reproducir lesiones o signos clínicos; por el contrario, animales inoculados con dosis altas desarrollan una respuesta inmunitaria mucho más precoz y unas lesiones más graves que los infectados con dosis bajas (Brotherston *et al.*, 1961a; Nisbet *et al.*, 1962; O'Brien *et al.*, 2006; Delgado *et al.*, 2013).

El **número de dosis** en las que administrar el inóculo puede variar entre una y veinticinco y el tiempo entre dosis, de un día hasta un mes. El tiempo entre dosis puede alterar la progresión de la infección, ya que tiempos muy prolongados pueden conllevar que el sistema inmunitario del hospedador reaccione y desarrolle una respuesta efectiva contra la infección en progreso (Begg y Whittington, 2008). En el caso del ganado caprino, las infecciones experimentales realizadas han variado desde la administración del inóculo repartido en cuatro dosis administradas durante cuatro semanas (una dosis por

semana) (Stewart *et al.*, 2006) hasta las 25 dosis repartidas en 8 semanas (tres dosis por semana) (Storset *et al.*, 2001).

En la detallada revisión sobre infecciones experimentales de paratuberculosis que realizaron Hines II *et al.* (2007) recomendaban que, para reproducir la infección en caprinos, debería emplearse una dosis de 2×10^9 UFC de la cepa bovina denominada K10 de Map administrada en dos días consecutivos por vía oral.

6. MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO

El diagnóstico de la paratuberculosis está lastrado por la ausencia de métodos específicos y sensibles al cien por cien que detecten tanto los animales en estadios clínicos como subclínicos. Por ello, lo que se recomienda es el empleo de una combinación de varios métodos de diagnóstico, para poder detectar animales en todas las fases de la enfermedad (Garrido *et al.*, 2000; Olsen *et al.*, 2002; Windsor, 2015). El método ideal sería, por tanto, aquel rápido, sensible y específico que permita diferenciar a los animales infectados de los sanos.

El **diagnóstico clínico y epidemiológico** puede resultar de ayuda a la hora de establecer una sospecha pero debido a la inespecificidad de los signos clínicos, es necesario llevar a cabo una confirmación laboratorial para poder llegar al diagnóstico final (Juste y Adúriz, 1990).

6.1. Diagnóstico anatomopatológico

Las **lesiones macroscópicas**, tales como el engrosamiento de la pared intestinal, linfagiectasias y aumento del tamaño de los nódulos linfáticos asociados son hallazgos indicativos de un diagnóstico de paratuberculosis (Juste y Aduriz, 1990; Garrido *et al.*, 2000; Windsor, 2014). Sin embargo, solo permitirían diagnosticar individuos en fases avanzadas de la infección y no todos, ya que se ha descrito la existencia de animales con signos clínicos muy graves, pero con lesiones macroscópicas y microscópicas muy leves (Garrido *et al.*, 2000). Además, los individuos recientemente infectados y los subclínicos no

muestran lesiones macroscópicas en un primer momento (Juste y Aduriz, 1990; Pérez *et al.*, 1996, 2000; Clarke, 1997; Corpa *et al.*, 2000a; González *et al.*, 2005; Delgado *et al.*, 2013).

Sin embargo, con la valoración de las **lesiones microscópicas** mediante pruebas histológicas, si se hace de forma correcta y por personal cualificado, se pueden identificar individuos tanto en fases clínicas como subclínicas mediante la tinción de **hematoxilina-eosina (HE)** (Pérez *et al.*, 1996; Corpa *et al.*, 2000a; González *et al.*, 2005; Delgado *et al.*, 2013; Sonawane y Tripathi, 2016b). Además, los cortes histológicos teñidos mediante el método de **ZN**, permiten observar la presencia de BAAR en las lesiones (Pérez *et al.*, 1996; Corpa *et al.*, 2000a; González *et al.*, 2005). Las muestras que se recomiendan para valorar las lesiones microscópicas comprenden la válvula ileocecal e intestino delgado, especialmente si contiene PPY, ya que persisten en los animales adultos, así como los nódulos linfáticos asociados al intestino; el examen de estas zonas permitiría valorar la presencia tanto de lesiones focales o multifocales como difusas (Pérez *et al.*, 1996; Corpa *et al.*, 2000a; González *et al.*, 2005; Delgado *et al.*, 2013; Fernández *et al.*, 2014).

El gran inconveniente de estas técnicas es que requieren el sacrificio del animal, ya que son técnicas *post-mortem*; aunque se ha valorado el empleo de biopsias rectales, en animales vivos, no es un método muy recomendable, por su elevado precio y porque solo permite detectar animales con lesiones avanzadas, que hayan llegado a afectar al recto (Collins, 2011).

Existen otras técnicas complementarias a las técnicas histopatológicas como son la **inmunohistoquímica (IHQ)** y la **hibridación *in situ* (HIS)**, encaminadas a la detección de Map en los tejidos. La primera es un técnica sensible y específica, con buenos resultados en lesiones focales o con baja presencia de BAAR, en las cuales éstos se encuentren degradados (Coetsier *et al.*, 1998; Brees *et al.*, 2000; Delgado, 2010). La segunda es una técnica de alta especificidad, que se ha demostrado útil en la detección de aquellas formas de Map con pared incompleta o esferoplastos (Hulten *et al.*, 2000; Delgado *et al.*, 2009).

6.2. Diagnóstico microbiológico

6.2.1. Baciloscopia

La **baciloscopia** o valoración mediante microscopia de BAAR en frotis (heces, leche, calostro y tejidos) teñidos con ZN es una técnica muy útil para detectar animales excretores de bacilos, para confirmar casos con sintomatología clínica (Zimmer *et al.*, 1999). Sin embargo, la sensibilidad de esta prueba es baja, ya que solo detecta grandes excretores, y por otro lado, es poco específica, pudiendo aparecer teñidas micobacterias ambientales, no patógenas (Garrido *et al.*, 2000; Weber *et al.*, 2009; Sonawane y Tripathi, 2016b).

6.2.2. Cultivo bacteriológico

El aislamiento mediante **cultivo bacteriológico** es la técnica de referencia para el diagnóstico de la paratuberculosis, denominada por ello “gold standard” ya que proporciona el diagnóstico definitivo de la enfermedad (Chiodini *et al.*, 1984a; Garrido *et al.*, 2000; Arango-Sabogal *et al.*, 2017). Esta técnica se puede emplear en animales vivos, mediante el cultivo de las heces, aunque también puede realizarse a partir de tejido, en animales vivos de alto valor económico, mediante biopsias de nódulos linfáticos (Garrido *et al.*, 2000).

La sensibilidad del cultivo fecal en animales en fases clínicas que excretan micobacterias al medio es muy alta (dependiendo de la fase de la infección y de la muestra), aunque en aquellos animales en fases subclínicas que eliminan pocas micobacterias y de forma intermitente, disminuye (Whittington *et al.*, 2000a). Otro inconveniente de esta técnica es el largo periodo de incubación (6 meses) necesario para certificar que una muestra es negativa (Cousins *et al.*, 1995; Olsen *et al.*, 2002) lo que ocasiona un incremento del coste de la técnica. Para reducir el periodo de incubación se han desarrollado técnicas automatizadas basadas en sistemas radiométricos y no radiométricos que mantienen o mejoran la sensibilidad de la técnica y disminuyen a la mitad el periodo de incubación (Cousins *et al.*, 1995; Garrido *et al.*, 2000; Grant *et al.*, 2003). El aislamiento

positivo requiere una confirmación posterior mediante técnicas moleculares (Whittington *et al.*, 2013).

Las muestras empleadas en el aislamiento de Map, tanto las heces como los tejidos, están altamente contaminadas por lo que necesitan una descontaminación previa antes de proceder al cultivo (Garrido *et al.*, 2000; Olsen *et al.*, 2002). La sustancia anticontaminante más empleada es el cloruro de hexadecil piridinio (HPC) (Whipple *et al.*, 1991; Dundee *et al.*, 2001).

Los medios de cultivo específicos más empleados para el diagnóstico de la paratuberculosis son el HEYM (Garrido *et al.*, 2000; Whitlock, 2000; Kruze *et al.*, 2013), Löwestein-Jensen (Juste *et al.*, 1991b; de Juan *et al.*, 2006b; Whittington *et al.*, 2011) y los medios sintéticos (7H9, 7H10 y 7H11) (Adúriz *et al.*, 1995; Whittington *et al.*, 1999; Dimareli-Malli *et al.*, 2013). Estos medios deben suplementarse con sustancias antimicrobianas para evitar el crecimiento de microorganismos indeseados (anfotericina, cloranfenicol, penicilina) y, para conseguir el crecimiento de Map, se deben enriquecer con distintos componentes, como la micobactina J, oleico-albúmina-dextrosa-catalasa (OADC) o piruvato (Merkal y Curran, 1974; Adúriz *et al.*, 1995; Whittington *et al.*, 2011). Existen unas cuantas restricciones en cuanto a las cepas ovinas, ya que no crecen correctamente en medios a base de huevo (Whittington *et al.*, 2011; Dimareli-Malli *et al.*, 2013) y la adición de piruvato sódico puede inhibir su crecimiento (Juste *et al.*, 1991b; Whittington *et al.*, 2011).

El ganado caprino, como se ha explicado previamente, puede infectarse con cepas tipo C y S (Stewart *et al.*, 2006; Florou *et al.*, 2009) por lo que los medios de cultivo empleados deben cubrir las necesidades de ambos tipos para que puedan crecer, llegándose a recomendar el empleo de cuatro medios sólidos (de Juan *et al.*, 2006a). Ambas cepas crecen en medio Middlebrook 7H11 suplementado con micobactina J, medio que se recomienda para su uso en cabras (Dimareli-Malli *et al.*, 2013).

6.2.3. Detección del ADN micobacteriano

Gracias al descubrimiento de la secuencia de inserción IS900 (Green *et al.*, 1989), se ha puesto a punto la reacción en **cadena de la polimerasa** (PCR) con la cual se puede identificar al agente etiológico de una manera rápida y específica. La sensibilidad de la técnica es alta, permite detectar cantidades muy pequeñas de Map y los resultados se pueden obtener en un plazo de 24 horas (Garrido *et al.*, 2000). Se puede realizar la PCR a partir de muestras de heces (Vary *et al.*, 1990) con una alta especificidad pero una sensibilidad variable, desde el 3 (van der Giessen *et al.*, 1992) al 50 % (Sockett *et al.*, 1992; Mathevon *et al.*, 2017), aunque existe el inconveniente de la presencia de falsos negativos provocados por la presencia de inhibidores de la polimerasa en las muestras de origen sobre todo si estas son de suelo o heces (van der Giessen *et al.*, 1992; Englund *et al.*, 1999), siendo una de las razones por la que la PCR es considerada menos sensible que el cultivo (Englund *et al.*, 1999). Otro de los inconvenientes de esta técnica son las contaminaciones cruzadas que conllevan la aparición de falsos positivos. Para evitarlos se pueden emplear diferentes métodos como el empleo de radiaciones ultravioletas y tratamientos anti-ADNasas (Belák y Ballagi-Pordány, 1993), el empleo de la uracil-n-glicosilasa (Kox *et al.*, 1994) o un control interno (Ballagi-Pordány y Belák, 1996).

La sensibilidad de la prueba aumenta cuando se realiza la PCR a partir de tejidos (Garrido *et al.*, 2000). La válvula ileocecal y los nódulos linfáticos asociados son los tejidos con los cuales se obtienen unos resultados más óptimos en ovino (Gwozdz *et al.*, 1997). Las muestras de tejido pueden ser procesadas a partir secciones fijadas en formol e incluidas en parafina, procurando que la fijación no sea superior a las 24 horas para evitar la fragmentación de las cadenas de ADN (Greer *et al.*, 1991; Plante *et al.*, 1996; Miller *et al.*, 1999). Algunos autores han observado que fijaciones de 7 días provocan una pérdida de la reactividad del 70 % (Fiallo *et al.*, 1992). Asimismo, las muestras fijadas tienen una menor sensibilidad con respecto a las muestras de tejido fresco (Garrido *et al.*, 2000).

Además de muestras de heces y tejidos, la PCR se ha llevado a cabo en otras muestras como leche (Sevilla *et al.*, 1999; Djønné *et al.*, 2003; Kaur *et al.*, 2010) y preparados lácteos (Acharya *et al.*, 2017; Khol *et al.*, 2017). La PCR de sangre podría ser una herramienta muy útil para el diagnóstico de la paratuberculosis en animales jóvenes (Gwozdz *et al.*, 1997; Juste *et al.*, 2005), aunque otros estudios no confirman su validez en el diagnóstico de infecciones subclínicas (Gwozdz *et al.*, 2000c).

La secuencia de inserción IS900 que sirve de base para la PCR, se encuentra repetida en el genoma de Map unas 17 veces (Li *et al.*, 2005). Se han descubierto otras secuencias de inserción similares a la IS900 en otras especies de micobacterias, denominadas IS900like (Cousins *et al.*, 1999; Vansnick *et al.*, 2004), lo que ha llevado a investigar la existencia de secuencias específicas de Map como el gen *HpsX* (Ellingson *et al.*, 2000), la secuencia de inserción ISMap02 (Sevilla *et al.*, 2014) o el gen *F57* (Bosshard *et al.*, 2006). De cualquier manera, en este momento, la técnica más empleada sigue siendo la que detecta la IS900 (Alonso-Hearn *et al.*, 2012; Plain *et al.*, 2014; Sonawane y Tripathi, 2016b; Mathevon *et al.*, 2017).

Para mejorar la sensibilidad de la PCR, se desarrolló una **PCR anidada** (“nested PCR”) que consiste en una segunda reacción de amplificación sobre el segmento obtenido en la primera ronda (Englund *et al.*, 1999; Buergelt y Williams, 2004; Stabel y Bannantine, 2005). Esta técnica ha sido empleada con éxito en muestras de leche y sangre (Buergelt y Williams, 2004), heces y de tejidos (Englund *et al.*, 1999). La PCR anidada ha demostrado ser más sensible si se compara con la PCR convencional (Pierre *et al.*, 1991; Gao *et al.*, 2009) o con el cultivo (Bull *et al.*, 2003; Delgado *et al.*, 2013).

En los últimos años, se ha desarrollado la técnica de **qPCR** (quantitative-PCR), gracias a la cual se puede cuantificar la cantidad de Map presente en una muestra (Bosshard *et al.*, 2006; Donaghy *et al.*, 2011; Kawaji *et al.*, 2014; Bates *et al.*, 2018). En esta técnica también se han encontrado inconvenientes, como es la existencia de factores inhibidores de la propia PCR (Acharya *et al.*, 2017) y se ha propuesto como solución el empleo de un control interno de amplificación

(IAC) (Rodríguez-Lazaro *et al.*, 2004). La qPCR ha demostrado ser más sensible que la PCR convencional a la hora de detectar Map en muestras de leche (Albuquerque *et al.*, 2017).

Existen otras PCR denominadas **PCR multiplex** en las cuales se detectan más de una secuencia de inserción, incrementando las posibilidades de detectar al patógeno. La mayoría de ellas siguen empleando la secuencia IS900 como diana principal, debido al gran número de copias presente en el genoma de Map (Semret *et al.*, 2006). La combinación de tres dianas de amplificación (IS900, F57 y ISMap02) ha demostrado una alta sensibilidad y especificidad para el diagnóstico de Map a partir de heces (Sevilla *et al.*, 2014). También se ha demostrado su utilidad para la detección de Map en tanques de leche contaminada experimentalmente con Map (Tasara *et al.*, 2005). Recientemente se ha evaluado la ISMap04, que solo tiene cuatro copias repartidas en el genoma (Li *et al.*, 2005), mediante esta técnica y se ha comprobado que tiene un límite de detección similar a la ISMap02, aunque inferior a la IS900 (de Kruijf *et al.*, 2017). Esta técnica también permite la diferenciación de las diferentes especies y subespecies que forman el MAC en una sola reacción de amplificación, empleando en ella cebadores específicos de las diferentes especies micobacterianas (Al-Shamali *et al.*, 1997; Shin *et al.*, 2010).

6.3. Diagnóstico inmunológico

Como ya se ha visto, la infección paratuberculosa induce una respuesta inmunitaria adaptativa, tanto celular como humoral, en el hospedador. La respuesta celular se produciría en las fases iniciales y subclínicas de la infección que, conforme avanza hacia las fases clínicas, iría virando hacia una respuesta de tipo humoral (Chiodini *et al.*, 1984a; Burrells *et al.*, 1998; Ostrowski *et al.*, 2003; Stabel, 2006). Esta situación va a condicionar la eficacia de los métodos de diagnóstico inmunológico, de forma que, para poder detectar al mayor número de animales infectados, habría que emplear una combinación de test diagnósticos que evalúen ambos tipos de respuesta inmunitaria (Pérez *et al.*, 1997, 1999; Vázquez *et al.*, 2013).

6.3.1. Pruebas basadas en la respuesta inmunitaria celular

La respuesta celular se puede detectar tanto *in vivo* como *in vitro*. La prueba de la **intradermorreacción o intradermotuberculinización** (IDTB) es una de las técnicas *in vivo* para detectar animales que posean inmunidad celular. Esta prueba, que mide la hipersensibilidad retardada tipo IV desarrollada tras la infección por Map, consiste en la inoculación intradérmica de antígenos de Map y la posterior lectura del incremento de grosor cutáneo a las 48 - 72 horas tras la inoculación (Benedictus y Kalis, 2003; Fernández *et al.*, 2014). Los antígenos micobacterianos empleados son derivados proteicos purificados que pueden obtenerse a partir de Map, como es el caso de la PPD (Purified Protein Derivative o derivado proteico purificado) johnina o paratuberculina, o a partir de Maa como es el caso de la PPD aviar o tuberculina aviar (Juste y Aduriz, 1990; Garrido *et al.*, 2000). Esta técnica detecta animales en fases tempranas de la infección o en fases latentes, disminuyendo la positividad a esta prueba en individuos en fases clínicas (Pérez *et al.*, 1999; Köhler *et al.*, 2015). Además, se ha señalado que no sólo su sensibilidad, sino que también su especificidad es baja, en el diagnóstico de la paratuberculosis (Kreeger, 1991; Olsen *et al.*, 2002).

La tuberculosis bovina es la enfermedad en la cual se ha empleado la IDTB más extensamente y es el método estándar para la detección animales infectados, según la OIE (2012). Como antígeno, el más empleado ha sido la PPD o tuberculina bovina (Casal *et al.*, 2015; Goodchild *et al.*, 2015; Good *et al.*, 2018; McKinley *et al.*, 2018). Uno de los problemas que se suele presentar en las campañas de control de la tuberculosis es que animales infectados con Map pueden dar reacciones cruzadas, normalmente débiles, frente a la PPD bovina (Garrido *et al.*, 2007, 2013).

En la especie ovina, a pesar de ser susceptible (en un menor grado que la especie caprina) a la tuberculosis, los casos positivos son normalmente esporádicos, detectados en muchas ocasiones en matadero, y en animales que conviven con otras especies de rumiantes más sensibles a la tuberculosis (Marianelli *et al.*, 2010; van der Burgt *et al.*, 2013). En un estudio llevado a cabo

en 33 rebaños ovinos en Galicia en donde las ovejas coexistían con vacas y se había diagnosticado tuberculosis, se evaluaron diferentes técnicas diagnósticas para la detección de esta enfermedad, recomendándose la IDTB simple y el ELISA frente a la tuberculosis como las mejores pruebas diagnósticas. Mediante ELISA y qPCR para detectar paratuberculosis, se descubrió un 42.03% y un 63.93%, respectivamente, de ovejas infectadas por Map en esos mismos rebaños, sugiriendo que las reacciones cruzadas entre paratuberculosis y tuberculosis podrían ser la causa de la baja especificidad en el diagnóstico de esta última enfermedad (Muñoz-Mendoza *et al.*, 2016). También en la especie bovina, en el caso de la IDTB simple, se ha observado que casos clínicos de paratuberculosis pueden provocar interferencias diagnósticas con las pruebas de tuberculosis (Seva *et al.*, 2014). En un estudio realizado en un rebaño de cabras que tenían una infección mixta de tuberculosis y paratuberculosis, los animales mostraron una reacción positiva a la tuberculina bovina mucho mayor que a la aviar; cuando se empleó la IDTB comparada, su sensibilidad fue menor que empleando la simple en el diagnóstico de la tuberculosis, por lo que no es una técnica muy útil para detectar casos de tuberculosis en rebaños coinfectados con tuberculosis y paratuberculosis (Álvarez *et al.*, 2008).

La prueba inmunológica de tipo celular más empleada actualmente se realiza *in vitro* y es la prueba de la **liberación del gamma interferón** (IFN- γ) o “**Interferon Gamma Release Assay**” (IGRA). El IFN- γ es una citoquina producida por los linfocitos T de la sangre periférica, cuando, en animales previamente infectados, se estimulan con antígenos micobacterianos. La prueba se basa en la cuantificación *in vitro* de dicha citoquina en el plasma obtenido tras la incubación de las muestras de sangre unas 20 horas con antígenos como la PPD aviar, la PPD bovina u otros derivados proteicos y la posterior realización de un ELISA de captura frente a la citoquina. En aquellos animales inmunizados (sensibilizados, infectados o vacunados) frente a Map, las muestras estimuladas con la tuberculina aviar o con la johnina presentarían unos niveles elevados de la citoquina (García Marín *et al.*, 1999b; Corpa *et al.*, 2000a; Gwozdz *et al.*, 2000b; Arrazuria *et al.*, 2016; Fernández *et al.*, 2017). Originalmente, los test

comerciales eran para la tuberculosis pero posteriormente se emplearon con éxito en el diagnóstico de la paratuberculosis (Jungersen *et al.*, 2002).

Esta prueba es de gran utilidad en la detección de aquellos animales infectados en fases subclínicas, tanto en estado latente como en fases iniciales y se ha señalado que permite la identificación de animales infectados antes de que empiecen a excretar micobacterias al medio (Stabel, 1996; Gwozdz *et al.*, 2000b; Stabel y Whitlock, 2001). Su empleo tiene limitaciones debido a su alto coste económico, la necesidad de procesar la muestra de sangre poco tiempo después de su extracción y la poca práctica de su empleo en campañas de control ya que muchos animales positivos nunca van a desarrollar la enfermedad (Olsen *et al.*, 2002). Además, este test tiene problemas de especificidad, al presentar reacciones cruzadas con otras micobacterias y con bacterias estrechamente relacionadas con Map, como las del supergrupo *Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Nocardia* y *Rhodococcus* (CMNR) (Lauzi *et al.*, 2000; Olsen *et al.*, 2002). Para solucionar este inconveniente, se están intentando encontrar nuevos antígenos de *M. bovis* más específicos (Serrano *et al.*, 2017). En cabras se han llevado a cabo estudios donde se han probado nuevos antígenos de tuberculosis, en sustitución de las antiguas tuberculinas, para así evitar las posibles reacciones cruzadas con otras micobacterias (Bezós *et al.*, 2011, 2015; Pérez de Val *et al.*, 2012).

El efecto que ejerce la realización de la IDTB sobre la producción del IFN- γ a nivel sistémico es controvertido. Algunos autores opinan que no se producen cambios después de la inoculación (Doherty *et al.*, 1995; Ryan *et al.*, 2000; Gormley *et al.*, 2004; Delgado *et al.*, 2012) mientras que otros encuentran un estímulo de la producción de la citoquina después de la prueba (Rothel *et al.*, 1992; Whipple *et al.*, 2001).

En un estudio realizado en cabras procedentes tanto de explotaciones libres de tuberculosis como de rebaños con tuberculosis por Gutiérrez *et al.* (1998) se encontraron que las mayores especificidades (96 %) y sensibilidades (95.8 %) para el diagnóstico de tuberculosis se obtienen al emplear la IDTB comparada y el IGRA de forma simultánea. Otros estudios también han señalado que la

combinación de ambas técnicas permite identificar un mayor número de animales con infecciones tuberculosas tempranas (Gormley *et al.*, 2006; Álvarez *et al.*, 2008).

Existen otras pruebas para medir la inmunidad celular como son el test de **detección del receptor de la interleuquina 2** (Whist *et al.*, 2000), la **transformación linfocitaria** (de Lisle y Duncan, 1981; Milner *et al.*, 1981) y la **inhibición de la migración linfocitaria** (Sreenivasulu *et al.*, 1986) pero debido a los costes de realización y su grado de complejidad, no son muy empleados.

6.3.2. Pruebas basadas en la respuesta inmunitaria humoral

Las pruebas diagnósticas basadas en la respuesta inmune humoral se apoyan en la detección de anticuerpos, que aparecen mayoritariamente en fases avanzadas, asociadas a signos clínicos, de la enfermedad, por lo que no son de mucha utilidad en el diagnóstico de la mayor parte de animales infectados subclínicamente (Chiodini *et al.*, 1984a; Clarke, 1997; Harris y Barletta, 2016).

La principal técnica diagnóstica para la evaluación de la respuesta inmune humoral frente a Map es la **prueba ELISA**. La técnica consiste en la detección de los anticuerpos específicos frente a Map presentes en la sangre circulante (Nielsen y Toft, 2008). Esta técnica se ha empleado para detectar estos anticuerpos en leche, donde ha demostrado también ser útil y tener una buena correlación con los resultados en suero (Lombard *et al.*, 2006a), si bien otros autores han mostrado discrepancias sobre esta relación (Hardin y Thorne, 1996).

La técnica ELISA es barata, sencilla de realizar y se puede automatizar para grandes cantidades de muestras (Garrido *et al.*, 2000). La sensibilidad depende de la fase en la que se encuentre la infección en el animal variando, por tanto, su sensibilidad: en bovinos desde un 15 a un 94.4 % (Colgrove *et al.*, 1989; Sweeney *et al.*, 1995), ovinos desde un 35 a un 83 % (Dimareli-Malli *et al.*, 1992; Hope *et al.*, 2000) y en caprinos desde un 54 a un 87 % (Dimareli-Malli *et al.*, 1992; Burnside y Rowley, 1994). En cambio, la especificidad puede llegar a alcanzar el 100 % (Robbe-Austerman *et al.*, 2006; Nielsen y Toft, 2009). Para

reducir las reacciones cruzadas con otras bacterias ambientales, se lleva a cabo una etapa previa donde las muestras de suero son preadsorbidas con *Mycobacterium phlei*, incrementando la especificidad (Olsen *et al.*, 2002).

Al igual que ocurría con la prueba de la liberación del IFN- γ , la sensibilización previa que se realiza con la IDTB puede tener efectos sobre el ELISA, creando falsos positivos. Estas interferencias se han estudiado principalmente en las especies caprina y bovina, donde se observó un incremento en los niveles de anticuerpos tras la realización de la IDTB (Gutiérrez *et al.*, 1998; Vargas *et al.*, 2009; Delgado *et al.*, 2012), mientras que en otros estudios no aprecian ninguna diferencia (Muñoz, 2014).

Aparte del ELISA, existen otras técnicas para la evaluación de la respuesta humoral como es el caso del **test de la fijación del complemento** y la **prueba de inmunodifusión en gel de Agar**. El primero ha quedado en desuso debido a la poca repetitividad de los resultados (de Lisle *et al.*, 1980; Juste y Aduriz, 1990) y la segunda prueba tampoco se emplea debido a que su eficacia depende de la fase de la infección en la que se encuentre el individuo infectado (Shulaw *et al.*, 1993) y además su sensibilidad es inferior a la del ELISA (Pérez *et al.*, 1997; Whittington *et al.*, 2003).

Para poder detectar tanto a los animales en fases subclínicas como en fases clínicas, se deberían realizar las pruebas inmunológicas celulares y humorales complementariamente, lo que permitiría el diagnóstico del mayor rango de animales infectados (García Marín *et al.*, 1999a; Pérez *et al.*, 1999; Stabel y Whitlock, 2001).

7. TRATAMIENTO Y CONTROL

Las grandes pérdidas económicas que ocasiona la paratuberculosis han motivado que la industria ganadera siga estando muy interesada en buscar la forma de controlar la enfermedad para evitar, precisamente, estas pérdidas e incrementar la rentabilidad de las explotaciones.

El control de la paratuberculosis está enfocado hacia la búsqueda de la reducción en el número de casos clínicos o de animales infectados, sin llegar a la curación de los animales ya que actualmente no existe tratamiento efectivo (Stabel, 1998). Ninguno de los métodos que se van a explicar a continuación, funcionan de forma aislada individualmente; el éxito de un programa de control eficaz es la combinación de varios de ellos.

7.1. Quimioprofilaxis

El tratamiento farmacológico se usa raramente y solo se utiliza en animales de alto valor económico (St Jean, 1996). Los fármacos más empleados son aquellos que se emplean en el tratamiento de la tuberculosis: clofazimina, isoniazida, rifabutina, rifampicina y estreptomina (Stabel, 1998; Fecteau y Whitlock, 2011). En estudios *in vivo* realizados con estos fármacos, se ha demostrado que, si bien, existe una mejoría en los signos clínicos, los animales tratados siguen eliminando Map al medio. También se ha señalado que la combinación de varios fármacos es la mejor opción para realizar un tratamiento (Slocombe, 1982; Das *et al.*, 1992). Autores como Das *et al.* (1992) realizaron un estudio en cabras infectadas con Map con dos combinaciones de fármacos: estreptomina, rifampicina y levamisol frente a estreptomina, rifampicina y dapsona. Estos autores analizaron diferentes parámetros como la ganancia de masa corporal, la hemoglobina, hematocrito y niveles sanguíneos de albumina y globulinas. Analizando todos estos factores observaron una mejoría, con respecto a los animales no tratados, en el caso de las cabras tratadas con la combinación de los fármacos con levamisol, ya que los animales no presentaban BAAR en heces ni en tejidos, mientras que en el grupo tratado con la combinación de fármacos con dapsona, sí que encontraron Map en los tejidos. La falta de respuesta a los tratamientos puede ser debida a la dificultad que tienen los fármacos para acceder a Map, por su multiplicación dentro de los macrófagos y por la localización de las lesiones (Cocito *et al.*, 1994).

La terapia farmacológica no es una opción viable debido a su alto coste económico, el largo periodo de tratamiento y la recurrencia de la enfermedad,

una vez el tratamiento ha cesado; a pesar de ello, se ha indicado que podría ser útil para ayudar en la prevención de la infección de los animales y en la reducción de la excreción de Map al medio (Stabel, 1998; Fecteau y Whitlock, 2011).

Más recientemente, se está estudiando el papel que diferentes sustancias prebióticas pueden jugar en la infección por Map. Estos productos, como el aceite de naranja, el aceite de orégano y la canela poseen propiedades antimicobacterianas (Wong *et al.*, 2008; Crandall *et al.*, 2012). Además, también se han valorado las bacterias del género *Dietzia* como potenciales probióticos (Click, 2011). En conejos, se ha comprobado que la microbiota intestinal podría tener un efecto en la modulación de la infección por Map (Arrazuria, 2016) y que cambios en la dieta también podrían modular dicha infección (Arrazuria *et al.*, 2015a).

7.2. Medidas de control de la enfermedad

La introducción de medidas de control de la paratuberculosis en una explotación está enfocada a reducir las pérdidas económicas. Además de la vacunación, los otros procedimientos empleados han sido la identificación y eliminación de animales infectados (Kennedy y Benedictus, 2001) y las medidas higiénico sanitarias (Aduriz *et al.*, 2000; Groenendaal *et al.*, 2002). Uno de los aspectos más relevantes es la concienciación, por parte de los ganaderos y los veterinarios, para solucionar este problema (Benedictus y Kalis, 2003).

El **método de la detección y sacrificio de animales** (“test and cull”), es uno de los procedimientos de control más empleados con el que se consigue una reducción de la prevalencia de la enfermedad en el rebaño al eliminar los animales que son fuente de contagio. El objetivo final es la erradicación de la infección, pero los resultados que se han obtenido no son del todo satisfactorios (Aduriz *et al.*, 2000; Benedictus *et al.*, 2008). Para conseguir resultados óptimos, las pruebas de diagnóstico deben ser sensibles y específicas. Hasta el momento, la prueba de referencia y la más empleada, ha sido el cultivo fecal (Chiodini *et al.*, 1984a; Garrido *et al.*, 2000; Arango-Sabogal *et al.*, 2017). Sin embargo, debido a los largos periodos de incubación y a su coste económico, se ha

propuesto el empleo de técnicas serológicas (Bulaga y Collins, 1999; Kalis *et al.*, 2002) o pruebas moleculares (Sevilla *et al.*, 2014) para identificar a los animales infectados. La combinación de las pruebas serológicas y de cultivo fecal parece ofrecer buenos resultados (Bulaga y Collins, 1999). En cualquier caso, hay que tener en cuenta siempre el elevado coste económico de un programa de este tipo ya que es preciso repetir de forma continuada las pruebas diagnósticas y se tienen que eliminar de la explotación animales que económicamente son rentables.

Las **medidas higiénico-sanitarias** van encaminadas a evitar que el ciclo epidemiológico de Map continúe en una explotación por lo que se trata, con este conjunto de medidas, de evitar el contacto directo entre los animales que excretan Map y los animales sanos (Aduriz *et al.*, 2000; Kennedy y Benedictus, 2001). De hecho, se consideran una parte muy importante de cualquier programa de control de la paratuberculosis, debiendo formar parte de los análisis de peligros y puntos críticos (APPCC) de las explotaciones (McAloon *et al.*, 2015).

Una de las medidas más importantes y simples es la eliminación de los animales con signos clínicos (Juste y Saez de Ocariz, 1990), aunque el empleo exclusivo de este procedimiento en ningún momento garantiza la eliminación de Map del rebaño (Kirkeby *et al.*, 2016). Otras medidas, no menos importantes, son las encaminadas a evitar la transmisión fecal-oral. Para ello, hay que evitar que las heces de los individuos excretores de micobacterias entren en contacto con los alimentos, agua y pastos que vayan a ser empleados por los demás animales. También, se debe separar a las crías de las madres lo antes posible, ya que el contagio tiene lugar predominantemente durante los primeros días de vida (Goodger *et al.*, 1996; Aduriz *et al.*, 2000; Windsor y Whittington, 2010; Camanes *et al.*, 2018). La limpieza y desinfección de las instalaciones es otro punto relevante, ya que Map es un microorganismo muy resistente, como bien se ha explicado en el capítulo correspondiente. Además, a la hora de introducir nuevos animales a las explotaciones, deben ser provenientes de explotaciones libres de paratuberculosis (Carpenter *et al.*, 2004).

8. VACUNACIÓN

Las estrategias de control de la paratuberculosis mediante el método de detección-sacrificio y las medidas higiénico-sanitarias previamente descritas, no han logrado los resultados positivos esperados en los ensayos realizados hasta el momento, por lo que se ha renovado la atención en la vacunación frente a Map (Bastida y Juste, 2011; Juste y Pérez, 2011). Aunque la vacunación no previene la infección, ha demostrado ser un procedimiento útil, ya que disminuye la sintomatología clínica de los animales y la excreción de Map a través de las heces (Reddacliff *et al.*, 2006; Windsor, 2006; Bastida y Juste, 2011).

El **fundamento** del empleo de la vacunación se basa en que, tras su empleo, se desarrolla una respuesta inmunitaria de memoria que es capaz de actuar de forma mucho más rápida y efectiva que la que tiene lugar tras el primer contacto, y con ellos conseguir un efecto protector. La vacunación se fundamenta en los principios de la especificidad y la memoria de la respuesta inmunitaria adaptativa (Playfair, 2001). En el caso de la paratuberculosis, la respuesta inmunitaria celular de tipo Th1 es la que más interesaría activar, ya que es la que tendría un efecto protector, activando los macrófagos para intentar destruir los bacilos en el foco de infección (Collins, 1974; Chiodini, 1996; García-Pariente *et al.*, 2003; Begg y Griffin, 2005; Koets *et al.*, 2015).

Los primeros experimentos de vacunación se llevaron a cabo en Francia, en el ganado vacuno, a principios del siglo XX, cuando se empleó una vacuna inactivada en un estudio a gran escala, observándose sus efectos positivos (Vallée y Rinjard, 1926). Sin embargo, desde entonces y en comparación con otros aspectos de la enfermedad, la vacunación no ha sido objeto de un estudio exhaustivo. Es posible que la principal razón sea que, en el **ganado bovino**, su empleo esté prohibido en muchos países ya que causa interferencias con test de diagnóstico de la tuberculosis (Groenendaal *et al.*, 2015).

En el caso de los **pequeños rumiantes** tampoco se han realizado estudios muy amplios -salvo algunos trabajos desarrollados en España, Chipre, Nueva Zelanda, Noruega, Australia y Reino Unido- y eso que se estima en millones las

dosis vacunales empleadas cada año (Juste y Pérez, 2011). En el **ganado caprino** en concreto, a pesar de que, según fuentes comerciales, la vacuna es ampliamente usada, las publicaciones sobre los resultados obtenidos con la vacunación no son muy abundantes (Juste y Pérez, 2011). En **cabras y ovejas**, la vacunación se viene empleando desde hace varios años en muchos países como en Islandia (Fridriksdottir *et al.*, 2000), Noruega (Saxegaard y Fodstad, 1985) y Australia (Windsor, 2006) llegando a formar parte de los programas de control. En el caso de Islandia, se logró una disminución significativa de las pérdidas económicas provocadas por la paratuberculosis en el país mediante una campaña de vacunación masiva en ovejas (Fridriksdottir *et al.*, 2000). En Australia, también se han realizado campañas intensas de vacunación, con resultados muy satisfactorios en el control de la enfermedad y la reducción de pérdidas económicas (Windsor, 2006, 2013). En España, la vacunación en ovino se lleva practicando desde hace años, con resultados positivos (Adúriz *et al.*, 1992; Pérez *et al.*, 1995; García Marín *et al.*, 1999b; García-Pariente *et al.*, 2003; Juste y Pérez, 2011), al igual que en ganado caprino (García Marín *et al.*, 1999b; Corpa *et al.*, 2000c; Juste y Pérez, 2011), especie en la que últimamente se ha incrementado la recomendación de vacunar frente a paratuberculosis (Lozano de Arcenegui *et al.*, 2012).

La vacunación en la **especie caprina** ha sufrido varios contratiempos a lo largo de los años. Inicialmente, se pensaba que tanto las cabras como las ovejas se comportaban de la misma manera frente a la tuberculosis, considerándose relativamente resistentes (Pesciaroli *et al.*, 2014). En cambio, se demostró que la especie caprina es sensible tanto a la tuberculosis como a la paratuberculosis, por lo que, en aquellas zonas donde ambas enfermedades estaban presentes, se creó gran confusión, no siendo posible evaluar el efecto de la vacuna ni el control de la tuberculosis (Juste y Pérez, 2011).

El primer país donde se realizaron medidas para el control de la paratuberculosis en cabras a gran escala fue Noruega. Se comenzó con medidas higiénicas y de control, las cuales fallaron a la hora de disminuir la incidencia anual, por lo que se cambió a un control basado en la vacunación. Ello resultó en

una reducción de las lesiones que se observan en las necropsias, disminuyendo la prevalencia de la enfermedad de un 53 a un 1 %. Años después, la vacunación se volvió optativa y la prevalencia comenzó a aumentar (Saxegaard y Fodstad, 1985).

Además de Noruega, otros países han desarrollado estudios para evaluar el efecto de la vacunación sobre su ganado caprino. En Grecia, se ha llevado a cabo un estudio en campo durante 7 años donde se vacunaron 3.665 cabritas. En este estudio se observó como la mortalidad entre las cabras vacunadas era mucho menor que en aquellas cabras no vacunadas (Dimareli-Malli *et al.*, 2013b). India, uno de los países con una de las mayores poblaciones de cabras del mundo, está sustituyendo los métodos de identificación y sacrificio por la vacunación. Se han comparado dos tipos de vacunas en un modelo experimental en cabras: una comercial (Gudair®) y otra no comercial basada en la cepa Bison (ahora denominada sub-linaje del tipo C). Ambos tipos de vacunas han conseguido importantes incrementos de la ganancia media de peso y una reducción de la mortalidad, siendo más efectiva la vacuna no comercial para rebaños con una alta prevalencia en paratuberculosis (Singh *et al.*, 2007). Desde las autoridades sanitarias australianas (Animal Health Australia) se recomienda vacunar con la vacuna registrada Gudair® entre las 4 a 16 semanas de vida de los corderos y cabritas. En revisiones bibliográficas más recientes se ha señalado que se necesita seguir avanzando en la búsqueda de conocimientos específicos en la industria ganadera caprina, ya que hay muy pocas fuentes disponibles en comparación con las de ovino en relación a la vacunación (Windsor, 2015).

En España la vacunación frente a paratuberculosis está prohibida en el ganado bovino, pero las autoridades sanitarias españolas no prohíben la vacunación de ovejas y cabras. Según la bibliografía consultada existen estudios de campo (Corpa *et al.*, 2000c) y también experimentales (Pérez de Val *et al.*, 2012) en los que se han valorado los diferentes efectos de la vacunación en estas especies.

8.1. Tipos de vacunas y adyuvantes

La **primera vacuna** descrita fue desarrollada para el ganado vacuno en 1926 por Vallée and Rinjard (Vallée y Rinjard, 1926) a partir de una **cepa atenuada** (viva) de Map más tres adyuvantes (parafina líquida, aceite de oliva y polvo de piedra pómez). En el punto de inoculación estos autores observaron una lesión denominada nódulo vacunal que llegó a persistir un año. El resultado de la vacunación fue una disminución de la sintomatología clínica y del número de animales excretores. A partir de entonces, se han continuado realizando estudios con vacunas atenuadas en distintas especies animales (Juste y Pérez, 2011).

En los años 80 se comercializó en Francia una vacuna viva (Neoparasec®, Laboratorios Rhone-Merieux, Lyon, Francia), elaborada a partir de la cepa 316F (The Central Veterinary Laboratory, Weybridge, Inglaterra), con una concentración de 3×10^9 unidades viables por mililitro de vacuna y con un adyuvante oleoso. La eficacia de esta vacuna se evaluó principalmente en bovino (Köhler *et al.*, 2001; Klawonn *et al.*, 2002) pero también en ovinos (Hilbink y West, 1990; Juste *et al.*, 1994; Pérez *et al.*, 1995; Gwozdz *et al.*, 2000a; Begg y Griffin, 2005) y caprinos (Marly *et al.*, 1988; Molina *et al.*, 1996), con resultados positivos en todos los casos. En Noruega se comercializó una vacuna atenuada para el ganado caprino, Paratuberkulose-vaksine®, elaborada a partir de la cepa Oslo 316F y la 2E (Saxegaard y Fodstad, 1985; Hasvold *et al.*, 2002). Con esta vacuna se observó una disminución de la tasa de infección y un efecto sobre la respuesta inmunitaria.

Recientemente, las vacunas atenuadas han adquirido de nuevo una gran importancia, ya que se ha comprobado que inducen una respuesta protectora a nivel de las mucosas y del sistema inmunitario. Esto es debido a los diversos antígenos que incluye la propia vacuna que provocan una estimulación de ambas respuestas inmunitarias y una limitación de la colonización de los tejidos por parte de Map, lo que no se ha observado al emplearse con la vacuna inactivada Mycopar® (Boehringer Ingelheim Vetmedica) (Faisal *et al.*, 2013). Además, son mucho más baratas y fáciles de producir que las vacunas de subunidades (Ghosh

et al., 2015). La mayoría de las vacunas atenuadas elaboradas recientemente han sido producidas mediante mutagénesis para atenuar la virulencia de Map (Foley-Thomas *et al.*, 1995; Harris *et al.*, 1999; Park y Yoo, 2016), pero sin embargo, todas ellas siguen interfiriendo en el diagnóstico de la tuberculosis y, además, conllevan riesgos de bioseguridad.

Debido a razones de bioseguridad (del veterinario y de una posible reactivación de la vacuna) y a su escasa vida útil (Aduriz *et al.*, 2000), las vacunas atenuadas se fueron reemplazando por las vacunadas **inactivadas** (muertas) (Brotherston *et al.*, 1961b). Además, empleando vacunas inactivadas, se tiene la seguridad de que los bacilos aislados de distintos tejidos tienen su origen en la infección natural y no en la propia vacuna, duda que si podría existir a la hora de inmunizar con vacuna viva atenuada (Adúriz, 1993).

Las primeras vacunas inactivadas surgieron en Islandia, debido a la alta prevalencia de paratuberculosis ovina que existía en la isla. Gracias a la vacunación con una mezcla de cepas bovinas (cepa Teps y cepa 18) inactivadas por calor (Sigurdsson y Tryggvadóttir, 1949) se consiguió una reducción del 93-94 % de la mortalidad debida a la enfermedad (Sigurdsson, 1960). Posteriormente, esta vacunación fue obligatoria e incorporada a los programas de control de la enfermedad lo que causó una disminución significativa de las pérdidas económicas (Fridriksdóttir *et al.*, 2000).

En años sucesivos, se desarrollaron más vacunas inactivadas por calor en otros países como Holanda donde se empleó una con la cepa ID-Lelystad resuspendida en una emulsión de agua y aceite, la cual demostró su eficacia en el ganado vacuno (Huitema, 1967; Kalis y Benedictus, 1992; Wentink *et al.*, 1994; Koets *et al.*, 2002; Muskens *et al.*, 2002). En Estados Unidos se comercializó también otra vacuna inactivada (cepa 18, Laboratorios Fromm) para el ganado bovino en los años 70, con la cual se reducían un 90 % los casos clínicos en el rebaño y un 50 % los animales infectados (Chiodini *et al.*, 1984a). En Hungría también desarrollaron una vacuna (cepa 5889 Bergey) contra la paratuberculosis bovina, con la cual la excreción fecal de la bacteria fue disminuyendo año tras año (Körmendy, 1994).

Actualmente existen tres vacunas comerciales a partir de bacterias enteras inactivadas o muertas: Gudair® (CZ Veterinaria, Porriño, Spain), Mycopar® (Boehringer Ingelheim Vetmedica) y Silirum® (CZ Veterinaria, Porriño, Spain).

La vacuna **Gudair®** fue desarrollada en España en los años 90. La cepa empleada es la 316F de Weybridge inactivada por calor (2.5 mg de bacilos desecados) y con un adyuvante de aceite mineral. Esta vacuna ha sido ampliamente empleada en ovinos y caprinos (Corpa *et al.*, 2000c; Thompson *et al.*, 2002; García-Pariente *et al.*, 2003; Eppleston *et al.*, 2005; Reddacliff *et al.*, 2006; Griffin *et al.*, 2009; Dhand *et al.*, 2016). En el año 2016, se publicó un estudio de los resultados obtenidos después de más de una década de vacunación en 12 rebaños ovinos australianos, en el cual se observó que la prevalencia individual se reducía de un 7,64 % a un 0,12 % pasados los 10 años de estudio (Dhand *et al.*, 2016). Además, se llegó a la conclusión de que la vacunación ayudaba a la reducción de los animales excretores de Map al medio (Eppleston *et al.*, 2005; Dhand *et al.*, 2016). Por el contrario otros autores, también en Australia, han encontrado evidencias de que la vacunación con Gudair® favorece la persistencia de animales vacunados excretores de Map (Windsor *et al.*, 2014). La vacunación con esta vacuna provoca un incremento en la respuesta inmunitaria celular (Corpa *et al.*, 2000b; García-Pariente *et al.*, 2003; Reddacliff *et al.*, 2006; Windsor, 2006; Mercier *et al.*, 2014). Los animales vacunados ofrecen una respuesta positiva en pruebas diagnósticas empleando PPD bovina, por lo que interfieren con el diagnóstico inmunológico de la tuberculosis (López Cruz *et al.*, 1999; Köhler *et al.*, 2001; Klawonn *et al.*, 2002). También se ha señalado que la combinación de esta vacuna con la vacuna BCG frente a la tuberculosis, reduce la sensibilidad de los test de intradermorreacción frente al antígeno PPD bovino. En un reciente estudio, aún en fase de realización, se ha observado que la interferencia con las pruebas de diagnóstico de la tuberculosis se reduce con el tiempo de vacunación, siendo inexistente en animales vacunados con Gudair hace más de un año (Fernández *et al.*, 2018).

Mycopar® es una vacuna inactivada por calor comercializada en Estados Unidos, elaborada a partir de la cepa 18 del MAC (Bannantine *et al.*, 2014) y con

un adyuvante de aceite mineral. Esta vacuna se ha empleado con éxito en bovinos y pequeños rumiantes (Spangler *et al.*, 1991; Pérez *et al.*, 1995; Uzonna *et al.*, 2003; Nedrow *et al.*, 2007; Stabel *et al.*, 2011; Faisal *et al.*, 2013; Tewari *et al.*, 2014). En estudios previos se demostró que induce una rápida respuesta celular específica frente a Map tras la vacunación, que se mantenía estable a lo largo de los 12 meses que duró el experimento; además, a los 6 meses post-vacunación, también produce una respuesta humoral detectable (Stabel *et al.*, 2011). En otro estudio, aparte de las anteriores respuestas, se comprobó como la tasa de excreción de Map al medio disminuía significativamente (Tewari *et al.*, 2014). Esta vacuna puede interferir en los test diagnósticos de la tuberculosis, pero sería una interferencia muy baja en la IDTB comparada y en los test diagnósticos serológicos de *M. bovis* (Stabel *et al.*, 2011).

Por último, la vacuna **Silirum**® está elaborada con la cepa 316F inactivada por calor, al igual que la vacuna Gudair®, pero en este caso con un adyuvante de aceite mineral de alto refinamiento para reducir la formación de granulomas en el lugar de inoculación, y su uso está indicado para el ganado bovino (Sweeney *et al.*, 2009; Garrido *et al.*, 2012). Esta vacuna ha demostrado también ser útil para controlar la prevalencia de casos clínicos en ciervos jóvenes (Stringer *et al.*, 2013). En un estudio llevado a cabo en el País Vasco, se comprobó que menos del 0.5 % de los bovinos vacunados con Silirum® presentaron problemas de interferencia en el test de intradermorreacción frente a la tuberculosis bovina, empleando la IDTB comparada (Garrido *et al.*, 2012). En un estudio de campo realizado en ganado bovino, se observó que entre los animales vacunados el número de bajas asociadas a paratuberculosis era menor que en el grupo sin vacunar, en un periodo de 30 meses (García-Pariente *et al.*, 2006). Además, en un estudio experimental, se comprobó que la vacunación de terneros posteriormente infectados con Map provocaba una disminución de la tasa de excreción fecal, de la presencia de Map en los tejidos y de la gravedad de las lesiones, si bien no previene la infección (Muñoz *et al.*, 2005).

En un estudio realizado por Hines *et al.* (2014) en ganado caprino se valoró la eficacia de nuevas vacunas de administración oral frente a un control positivo,

que este caso era la vacunación subcutánea con Silirum®. A lo largo del estudio, se observó que ninguna de las vacunas previno la infección por parte de Map ni la completa eliminación de Map a través de las heces. Una de las vacunas mutantes que mejor resultado consiguió fue la vacuna 329, con la que se logró una menor prevalencia de la infección, reducción de la excreción fecal y de la colonización de los tejidos, y un menor índice de lesiones, aunque en ningún caso se igualaron los resultados logrados con Silirum®. En este trabajo también se comprobó que la administración subcutánea de Silirum® ocasionaba la formación de un nódulo en el punto de inoculación, que no se produjo, obviamente, en las vacunas orales.

A la hora de comparar la eficacia de las vacunas atenuadas e inactivadas, se ha observado que las respuestas inmunitarias celular y humoral, no varían significativamente entre ellas (Larsen *et al.*, 1964; García Marín *et al.*, 1999b). También se comprobó, en la especie ovina, que con ambas vacunas se consigue una disminución similar del número de casos clínicos en animales vacunados en la edad adulta, y que aquellos individuos vacunados con 3 - 4 meses de edad, no presentaron sintomatología clínica (Pérez *et al.*, 1995). En otro estudio (Adúriz, 1993), llevado a cabo en el País Vasco, se vacunaron corderas de reposición con una vacuna viva (cepa 316F) y con una cepa inactivada (cepa 18). En este caso, la respuesta humoral fue mucho más intensa en los animales vacunados con vacuna viva que con la inactivada, pero estas diferencias no se observaron en la respuesta celular. Además, con ambos tipos de vacuna, se consiguió una disminución del número de casos clínicos.

A continuación, se incluye la Tabla I.3. con un resumen de las diferentes vacunas empleadas en los últimos años.

Tabla I.3. Tabla resumen de vacunas. Datos tomados de Rosseels y Huygen (2008) y de Bastida y Juste (2011).

Tipo de vacuna	Especie	Tipo de infección	Edad de vacunación	Efecto de la vacuna en:		Interferencia diagnóstica con TB	Referencia
				Resultados clínicos	Respuesta inmunitaria		
Viva (Neoparasec®, cepa 316F)	Bovina	Seguimiento en campo	28 días	No excreción ni colonización en órganos de controles ni vacunados	Temprana respuesta celular y respuesta humoral transitoria	Positiva o dudosa IDTB	(Köhler <i>et al.</i> , 2001)
	Ovina	Experimental	1 mes	Aislamiento de bacterias. No excreción de Map al medio	Fuerte e inmediata respuesta humoral	ND	(Juste <i>et al.</i> , 1994)
	Ovina	Experimental	1,5 - 2 meses	Menor número de casos clínicos y de aislamientos en tejidos. No excreción	Temprana respuesta humoral y celular	ND	(Gwozdz <i>et al.</i> , 2000a)
	Ovina	-	3 meses	Protección parcial (lesiones)	Fuerte respuesta celular y humoral	Interferencia	(Begg y Griffin, 2005)
	Caprina	-	1 - 2 meses	ND	Respuesta celular específica, sin anticuerpos detectados	ND	(Molina <i>et al.</i> , 1996)
	Ciervo rojo	-	5 meses	ND	Respuestas celular y humoral observables	Temporal con la IDTB	(Mackintosh <i>et al.</i> , 2005)
Viva (Paratuberkulose vaksine®, cepas 316 y 2E)	Caprina	-	2 - 3 semanas	ND	Fuerte y específica respuesta celular.	ND	(Hasvold <i>et al.</i> , 2002)
	Caprina	Seguimiento en campo	2 - 4 semanas	Descenso de la tasa de infección	-	ND	(Saxegaard y Fodstad, 1985)

IDTB: Intradermotuberculinización; Map: *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis*; ND: No descrita; TB: Tuberculosis

Tabla I.3. Tabla Resumen de vacunas (continuación I)

Tipo de vacuna	Especie	Tipo de infección	Edad de vacunación	Efecto de la vacuna en:		Interferencia diagnóstica con TB	Referencia
				Resultados clínicos	Respuesta inmunitaria		
Inactivada (cepa Teps y cepa 18)	Ovina	Seguimiento en campo	8-10 meses	-	Títulos altos de anticuerpos tras la vacunación	ND	(Sigurdsson y Tryggvadóttir, 1949)
Inactivada (ID - Lelystad)	Bovina	Seguimiento en campo	Recién nacidos	Reducción del número de casos clínicos y menor número de lesiones	ND	ND	(Wentink <i>et al.</i> , 1994)
	Bovina	Seguimiento en campo	1 mes	Ningún caso nuevo detectado	Respuesta celular y humoral persistente	Anticuerpos detectables 3 años. Positividad 2 ^{os} años en la RIC frente a la PPD _b	(Muskens <i>et al.</i> , 2002)
	Bovina	Seguimiento en campo	1 mes	Reducción de los casos clínicos. Presencia de Map en los tejidos	ND	ND	(Kalis y Benedictus, 1992)
Inactivada (cepa 18, Laboratorios Fromm)	Bovina	Seguimiento en campo	1-35 días	Disminución casos clínicos y tasa infección	ND	ND	(Chiodini <i>et al.</i> , 1984a)
Inactivada (cepa 5889, Bergey)	Bovina	Seguimiento en campo	1 mes	Disminución de la tasa de excreción y muy pocos animales positivos a cultivo y microscopía	Títulos altos de anticuerpos durante 3 años luego descienden	ND	(Körmeny, 1994)

IDTB: Intradermotuberculinización; Map: *Mycobacterium avium* subespecies paratuberculosis; ND: No descrita; RIC: Respuesta inmunitaria celular; TB: Tuberculosis

Tabla I.3. Tabla Resumen de vacunas (continuación II)

Tipo de vacuna	Especie	Tipo de infección	Edad de vacunación	Efecto de la vacuna en:		Interferencia diagnóstica con TB	Referencia
				Resultados clínicos	Respuesta inmunitaria		
Inactivada (Gudair®, cepa 316F)	Ovina y Caprina	Seguimiento en campo	15 días o 5 meses	No lesiones compatibles. NV ulcerados a veces	Mejor respuesta celular y humoral en vacunados a los 5 meses.	ND	(Corpa <i>et al.</i> , 2000b)
	Ovina	Seguimiento en campo	Adultos	Disminución de los casos clínicos	Fuerte respuesta celular y humoral.	ND	(García-Pariente <i>et al.</i> , 2003)
	Ovina	Seguimiento en campo	1 - 4 meses	Disminución de la mortalidad y la tasa de excreción. Algún caso con lesiones multibacilares. NV observable 4 años.	Estimulación evidente de la respuesta celular y humoral.	ND	(Reddacliff <i>et al.</i> , 2006)
	Ovina	Seguimiento en campo	1 - 4 meses	Reducción de la excreción fecal. La prevalencia individual disminuyó. El 37,5% de los rebaños vacunados permaneció infectado varios años.	ND	ND	(Dhand <i>et al.</i> , 2016)
Inactivada (Mycopar®, cepa 18)	Bovina	ND	5-40 días	ND	Respuesta humoral.	Interferencia	(Spangler <i>et al.</i> , 1991)
	Bovina	Experimental	7 días	Ningún signo clínico. Lesión en el foco de vacunación. Lesiones histopatológicas variables. Sin excreción fecal	Aumento de la producción de IFN- γ	ND	(Uzonna <i>et al.</i> , 2003)
	Bovina	Experimental	Recién nacidos	ND	Robusta y rápida respuesta celular. Respuesta humoral a los 4 meses post-vacunación	Baja interferencia en.	(Stabel <i>et al.</i> , 2011)
	Bovina	Seguimiento en campo	menores de 35 días	Reducción en la excreción fecal	Respuesta humoral prolongada en suero	No reacción	(Tewari <i>et al.</i> , 2014)
	Ovina	Seguimiento en campo	3 meses	Histología negativa	Respuesta humoral.	Interferencia en la IDTB simple, se evitó con la IDTB comparada	(Nedrow <i>et al.</i> , 2007)

IDTB: Intradermotuberculinización; Map: *Mycobacterium avium* subespecies paratuberculosis; ND: No descrita; RIC: Respuesta inmunitaria celular; TB: Tuberculosis; NV: Nódulo vacunal

Tabla I.3. Tabla Resumen de vacunas (continuación III)

Tipo de vacuna	Especie	Tipo de infección	Edad de vacunación	Efecto de la vacuna en:		Interferencia diagnóstica con TB	Referencia
				Resultados clínicos	Respuesta inmunitaria		
Inactivada (Silirum®, cepa 316F)	Bovina	Experimental	2 meses	Reducción en el número de los granulomas, la mayoría de tipo focal restringidas al tejido linfóide. No se detectó excreción fecal	Respuesta celular y humoral	ND	(Muñoz <i>et al.</i> , 2005)
	Bovina	Seguimiento en campo	Adultos	Sin nuevos casos clínicos y un descenso en la gravedad de las lesiones	Persistente respuesta celular y humoral	ND	(García-Pariente <i>et al.</i> , 2006)
	Bovina	Experimental	14 días	Menor colonización de los tejidos	No se detectaron anticuerpos. La respuesta celular fue significativamente mayor	ND	(Sweeney <i>et al.</i> , 2009)
	Bovina	Seguimiento en campo	varias edades al principio del estudio, luego al mes de vida	ND	ND	La IDR comparada es un buen método de diferenciación de animales vacunados	(Garrido <i>et al.</i> , 2012)
	Caprino	Experimental (comparativa con vacunas orales y Silirum® vía subcutánea)	8 - 10 semanas	No existía diferencia en cuanto a la clínica entre grupos. En el grupo Silirum, lesiones mínimas en ganglios mesentérico e ileocecal con pocos BAAR	Títulos altos de anticuerpos tras la vacunación y que se mantenían durante el experimento.	IDTB observable en animales vacunados con Silirum®.	(Hines II <i>et al.</i> , 2014)
	Ciervo rojo	Seguimiento en campo	4 meses	Eficacia vacunal del 60%. Reducción de la excreción fecal.	ND	ND	(Stringer <i>et al.</i> , 2013)

IDTB: Intradermotuberculinización; Map: *Mycobacterium avium* subespecie paratuberculosis; ND: No descrita; RIC: Respuesta inmunitaria celular

El hecho de que todas las vacunas empleadas hasta el momento, tanto vivas como inactivadas, no tengan una eficacia completa, provoquen efectos adversos, como la aparición de nódulos vacunales o la imposibilidad de diferenciar animales vacunados de infectados, y causen interferencias en el diagnóstico de la tuberculosis, son aspectos que han favorecido el desarrollo de nuevas investigaciones para encontrar nuevos productos vacunales.

Una alternativa a las clásicas vacunas son las **vacunas de subunidades**, aún en fase de estudio y evaluación. Estas vacunas se han desarrollado para evitar las interferencias que se producen en las pruebas de diagnóstico de la tuberculosis y paratuberculosis con los animales vacunados frente a Map, ya que emplean proteínas específicas de Map o antígenos inmunogénicos (Rosseels y Huygen, 2008). Las proteínas que conforman estas vacunas deben inducir una fuerte respuesta Th1, que se supone crucial para controlar la infección por Map en las primeras fases (Rosseels y Huygen, 2008). Son varias las **proteínas** que se han identificado que podrían ser posibles candidatos vacunales para su uso como antígenos en vacunas de subunidades: Hsp70 (Koets *et al.*, 1999), lipoproteínas (Huntley *et al.*, 2005), proteínas del complejo antígeno 85 (Shin *et al.*, 2005), proteínas de la familia PPE (Nagata *et al.*, 2005), la enzima superóxido dismutasa (Shin *et al.*, 2005) y la alquil hidropéroxido reductasa (Olsen *et al.*, 2000). La vacuna a partir de la Hsp70 podría ser una candidata a ser empleada en la vacunación frente a la paratuberculosis según un estudio llevado a cabo por Koets *et al.* (2006) en ganado vacuno infectado experimentalmente. Según este estudio, el empleo de esta vacuna mostró una reducción en la excreción de Map en las heces durante dos años, si bien se observó un pequeño nódulo vacunal durante 3 semanas y la producción de IFN- γ no se vio afectada por la vacunación. En otro estudio se observó que no se producirían reacciones cruzadas en los test serológicos para detectar los animales infectados de paratuberculosis si se realizaba un paso previo de preabsorción con esta proteína (Santema *et al.*, 2009). Otros trabajos han demostrado que el efecto protector de esta vacuna se debe a la respuesta humoral que induce, mediante la activación de células B y producción de IgG específicas en vez de a la respuesta celular (IFN- γ) (Vrieling *et al.*, 2013).

También se ha explorado el uso de **vacunas de ADN**, que han sido empleadas únicamente en ratones, (Park y Yoo, 2016). Con su empleo se ha observado un incremento de ambas respuestas, celular y humoral en dicha especie (Bull *et al.*, 2007), por lo que podrían ser una alternativa a las vacunas clásicas, aunque se debe proseguir su estudio experimental, ya que se encuentra en una fase muy inicial.

Los **adyuvantes** son productos que, empleados en combinación con antígenos vacunales específicos, incrementan la inmunidad de la vacuna (Reyes, 2007; Lee y Nguyen, 2015). La función de los adyuvantes es la de proporcionar una respuesta inmunitaria rápida, duradera e intensa. Las nuevas vacunas que se desarrollan actualmente son cada vez menos inmunógenas, pero mucho más seguras, por lo que necesitan de adyuvantes para mejorar la respuesta inmunitaria inducida por los antígenos vacunales (Park y Yoo, 2016; Bastola *et al.*, 2017).

El uso de adyuvantes permite el empleo de menos dosis de antígeno y de pautas de vacunación con menores dosis de vacuna, reduciendo los costes y aumentando la bioseguridad; además ayudan a la estabilización de la propia vacuna (Coffman *et al.*, 2010; Schijns y Lavelle, 2011). Con los adyuvantes se consiguen respuestas Th1 o Th2 mucho más selectivas, además de evitar las revacunaciones (Gupta y Siber, 1995).

La mayoría de las vacunas que se han empleado frente a la paratuberculosis usan como adyuvante las emulsiones oleosas (Bastida y Juste, 2011). Estas emulsiones están compuestas de agua, donde generalmente van los antígenos vacunales, y aceite (normalmente aceite mineral), más un surfactante para estabilizar la emulsión (Aucouturier *et al.*, 2001). Las tres vacunas comerciales actuales frente a la paratuberculosis emplean aceite mineral como adyuvante. El Montanide® ISA (Seppic, Francia) es una de las gamas de emulsiones más empleadas en las preparaciones vacunales, ya que induce respuestas inmunitarias potentes pero con pocos efectos adversos (Reyes, 2007). El Montanide® ISA 266 es el adyuvante de la vacuna Silirum®.

En un estudio llevado a cabo por Reyes (2007) se compararon tres tipos de adyuvantes: los propios de la vacuna Gudair®, Montanide® ISA 266 y Montanide® IMS 1312. Estos dos últimos adyuvantes fueron añadidos a un preparado donde la concentración y el antígeno vacunal eran el mismo que en la vacuna. El Montanide® ISA 266 es un nuevo tipo de adyuvante que induce una respuesta humoral más rápida e intensa, sin inducir respuestas locales ni fiebre, a diferencia del Montanide® IMS 1312. Además, el Montanide® ISA 266 induce una respuesta celular más intensa y una mejor conformación de los nódulos vacunales: de tamaño medio, redondeados, móviles, fibrosos y con una distribución más homogénea del antígeno.

8.2. Pautas vacunales

Existen varios factores que determinan el éxito de la vacunación entre los que están la forma en que es administrada la vacuna, la vía y el lugar de inoculación, el número de dosis y la edad de vacunación.

Son varias las **vías de administración** que se han ensayado con diferentes vacunas: oral (Brotherston *et al.*, 1961a; Hines *et al.*, 2014), conjuntival (Marly *et al.*, 1988), intramuscular (Körmeny, 1994), intraperitoneal (Griffin *et al.*, 2009) y subcutánea (Aduriz *et al.*, 2000). Esta última es la más empleada debido al alto grado de protección asociado (Vallée y Rinjard, 1926; Juste y Saez de Ocariz, 1990; Pérez *et al.*, 1995; Corpa *et al.*, 2000c; Gwozdz *et al.*, 2000a; García-Pariente *et al.*, 2003; Muñoz *et al.*, 2005; Reyes, 2007; Alonso-Hearn *et al.*, 2012; Windsor, 2014; Arrazuria *et al.*, 2016; Ladero *et al.*, 2018).

Otro elemento importante a tener en cuenta es el **lugar de inoculación** de la dosis vacunal. Las localizaciones más habituales son: la zona de la espalda, cuello, región de la papada o base de la cola (Pérez *et al.*, 1995; Corpa *et al.*, 2000c, 2000b; Muskens *et al.*, 2002; García-Pariente *et al.*, 2003; Uzonna *et al.*, 2003; Reddacliff *et al.*, 2006; Juste *et al.*, 2009a; Alonso-Hearn *et al.*, 2012; Chartier *et al.*, 2012). En cuanto a la aplicación es recomendable que se lleve a cabo en el tejido subcutáneo laxo, para evitar posibles complicaciones futuras como cojeras, fistulizaciones o infecciones.

Por lo que se refiere al **número de dosis**, no se recomienda la revacunación, ya que se comprobó que no proporcionaba un aumento en la respuesta celular ni en la humoral (Sigurdsson y Tryggvadóttir, 1949) sino que incluso podría provocar un deterioro del sistema inmunitario, favoreciendo el desarrollo de la enfermedad (Gilmour y Angus, 1973; Juste y Saez de Ocariz, 1990).

Por último, y quizás el factor más importante y que más controversia ha generado es la **edad de vacunación** recomendada. La edad más lógica y recomendable de vacunación serían los días previos a que se produzca la infección, es decir, animales menores de un mes de vida, buscando establecer una respuesta inmunitaria con un **efecto protector** a largo plazo (Doyle, 1960; Chiodini *et al.*, 1984a; Saxegaard y Fodstad, 1985; Kalis y Benedictus, 1992; Wentink *et al.*, 1994; Juste *et al.*, 1994; Körmendy, 1994; García-Marín *et al.*, 1997; Köhler *et al.*, 2001; Hasvold *et al.*, 2002; Muskens *et al.*, 2002; Uzonna *et al.*, 2003; Sweeney *et al.*, 2009; Bastida y Juste, 2011; Stabel *et al.*, 2011; Tewari *et al.*, 2014). Sin embargo, el hecho de que la inoculación de la vacuna provoque la aparición de un nódulo subcutáneo que puede alcanzar un gran tamaño (Juste y Saez de Ocariz, 1990; Köhler *et al.*, 2001; Reyes, 2007), supone un importante efecto adverso en animales tan jóvenes. Esto, junto con el hallazgo de que la vacunación no previene la infección (Reddacliff *et al.*, 2006; Windsor, 2006; Bastida y Juste, 2011), son factores que han favorecido nuevos estudios sobre otras edades en las que se podría vacunar.

Los estudios de vacunación en animales presumiblemente infectados se han realizado en diferentes momentos: bien en animales menores de un año (Sigurdsson, 1960; Molina *et al.*, 1996; Begg y Griffin, 2005; Mackintosh *et al.*, 2005; Reddacliff *et al.*, 2006; Nedrow *et al.*, 2007; Stringer *et al.*, 2013; Dhand *et al.*, 2016) o incluso adultos (Crowther *et al.*, 1976; Pérez *et al.*, 1995; Corpa *et al.*, 2000c; García-Pariente *et al.*, 2003; Singh *et al.*, 2010; Alonso-Hearn *et al.*, 2012; Santema *et al.*, 2013). En ambos casos se observó una reducción del número de casos clínicos y un incremento de las respuestas celular y humoral tras la administración de la vacunación. El que la vacunación sea efectiva a edades mucho más tardías, en animales posiblemente infectados, indicaría una

modulación de la respuesta inmunitaria por parte de la vacuna y sugiere que podría tener un **efecto terapéutico**.

En un estudio llevado a cabo por Corpa *et al.* (2000b) se evaluó el efecto de la vacunación de corderos y cabritas, en condiciones de campo, sobre la respuesta inmunitaria con dos grupos de animales de 15 días y 5 meses, en cada especie. En todos los grupos al mes de la vacunación, aparecían nódulos con contenido caseoso en la zona de inoculación en algunos animales. Sin embargo, no se observaron signos clínicos de paratuberculosis durante el seguimiento del estudio (1,5 años). La producción de IFN- γ fue siempre mayor en el grupo vacunado a los 5 meses, al igual que los niveles de anticuerpos. Además, ambas respuestas fueron más tempranas y duraderas en los animales vacunados a los 5 meses. Estos resultados sugieren a los autores que la respuesta inmunitaria a la vacuna sería más favorable en los animales vacunados a los 5 meses, lo que podría ser debido a que, a esta edad, los animales habrían podido estar en contacto con más microorganismos ambientales, por lo que una segunda inmunización (antígenos vacunales) conllevaría una mejor respuesta inmunitaria (Corpa *et al.*, 2000b). Por otro lado, hay que considerar que el desarrollo de algunos órganos linfoides no se completa hasta meses después del nacimiento, como es el caso de las placas de Peyer, las cuales no alcanzan la madurez completa hasta los 8 meses (Reynolds y Morris, 1983). En este sentido, en un estudio previo (Watson *et al.*, 1994) donde se comparaban las diferentes poblaciones linfocitarias sanguíneas en corderos de 4 meses frente a ovejas adultas de más de tres años, se observó una menor proporción de linfocitos T CD4⁺ en los animales jóvenes con respecto a los adultos. Además, la producción de IFN- γ tras la estimulación con concanavalina A fue menor en los animales jóvenes que en los adultos; lo mismo ocurrió con la producción de anticuerpos frente a *Brucella*. Estos resultados, por tanto, podrían sugerir una menor capacidad de respuesta inmunológica en animales jóvenes. Sin embargo, en un estudio llevado a cabo por Geijo (2007) en explotaciones positivas o negativas a paratuberculosis, se obtuvieron unos resultados diferentes. En este estudio realizado en tres especies distintas de rumiantes (vacas, ovejas y cabras), que fueron vacunadas a tres edades diferentes (menores de 15 días, 3-6 meses y

animales adultos), no se encontró ningún efecto significativo de la edad sobre la evolución de las respuestas celular y humoral frente a la vacunación.

8.3. Efectos vacunales

Uno de los efectos de la vacunación frente a paratuberculosis, que se ha puesto de manifiesto tanto en estudios experimentales (Nisbet *et al.*, 1962; Juste *et al.*, 1994; Muñoz *et al.*, 2005; Reyes, 2007; Muñoz, 2014) como de campo (Körmendy, 1994; Pérez *et al.*, 1995; García-Pariente *et al.*, 2003, 2006; Windsor, 2006), es que no protege frente a la infección por Map. A pesar de ello, la vacunación ha mostrado ser una herramienta muy útil para el control de la enfermedad.

La **eficacia vacunal** se ha evaluado de diferentes formas, tanto en estudios de campo como experimentales. Son numerosos los trabajos en los que se ha comprobado que hay un **menor índice de casos clínicos** en los animales vacunados con respecto a las no vacunados (Chiodini *et al.*, 1984a; Wentink *et al.*, 1994; Pérez *et al.*, 1995; van Schaik *et al.*, 1996; Fridriksdottir *et al.*, 2000; García-Pariente *et al.*, 2003, 2006; Bastida y Juste, 2011; Alonso-Hearn *et al.*, 2012; Windsor *et al.*, 2014). Además, la vacunación **limita la extensión** de las lesiones y consigue que éstas puedan regresar y evolucionar a lesiones localizadas de tipo tuberculoide, caracterizadas por la presencia de pequeños granulomas formados por tejido conjuntivo y células gigantes, con una escasa necrosis y calcificación, y con un número muy bajo o nulo de micobacterias (Nisbet *et al.*, 1962; Juste *et al.*, 1994; Pérez *et al.*, 1995; Corpa *et al.*, 2000c; Reyes, 2007; Sweeney *et al.*, 2009; Hines *et al.*, 2014; Muñoz, 2014). La **excreción de Map** al medio se reduce con el empleo de la vacunación (Körmendy, 1994; Gwozdz *et al.*, 2000a; Muñoz *et al.*, 2005; Eppleston *et al.*, 2005; Reddacliff *et al.*, 2006; Koets *et al.*, 2006; Singh *et al.*, 2007, 2013, 2015; Sweeney *et al.*, 2009; Griffin *et al.*, 2009; Juste *et al.*, 2009a; Juste y Pérez, 2011; Cho *et al.*, 2012; Muñoz, 2014; Tewari *et al.*, 2014; Hines II *et al.*, 2014; Ghosh *et al.*, 2015; Dhand *et al.*, 2016), aunque otros autores no ven tan clara esta reducción, ya que no observaron diferencias entre animales vacunados o no

vacunados en cuanto a la excreción (Kalis *et al.*, 2001). También se observa una **disminución de la colonización** de los tejidos por parte de la bacteria (Juste *et al.*, 1994; Sweeney *et al.*, 2009; Alonso-Hearn *et al.*, 2012; Hines *et al.*, 2014; Muñoz, 2014; Arrazuria *et al.*, 2016). Por el contrario, otros autores observaron un incremento del aislamiento de Map en tejidos con respecto al grupo control (Kalis y Benedictus, 1992; Wentink *et al.*, 1994). Hay estudios que han valorado el efecto de la vacuna sobre la producción de leche con resultados contradictorios. Para unos autores existe una mejoría de la producción láctea en los animales vacunados (Juste *et al.*, 2009a) pero otros no detectaron esa mejoría (García-Pariente *et al.*, 2003).

Un efecto aún muy poco estudiado, y que por lo tanto necesita una mayor investigación, es el efecto de la vacunación sobre el desarrollo de la infección por tuberculosis. En una infección experimental con *M. caprae* en cabras que previamente habían sido vacunadas (Silirum®) (Pérez de Val *et al.*, 2012), se observó como algunas de las cabras vacunadas e infectadas tenían una reducción en la patología pulmonar en comparación con las cabras infectadas, pero no vacunadas. Además, las cabras vacunadas mostraron una menor dispersión de las lesiones, las cuales aparecían limitadas a los pulmones y nódulos linfáticos asociados. Hallazgos similares también se observaron en una infección experimental con *M. bovis* en terneros previamente vacunados con Silirum® (Serrano *et al.*, 2017). En aquellos terneros vacunados e infectados se comprobó una menor gravedad y una limitación de las lesiones, comparados con el grupo únicamente infectado.

Según la opinión de diversos autores todos estos efectos beneficiosos de la vacunación podrían estar asociados a que la inoculación subcutánea de la vacuna **induce**, de forma rápida, una **respuesta inmunitaria periférica celular y humoral** (Juste *et al.*, 1994; Corpa *et al.*, 2000b; Geijo, 2007; Muñoz, 2014; Tewari *et al.*, 2014; Ghosh *et al.*, 2015; Arrazuria *et al.*, 2016). En el caso de la paratuberculosis, se ha señalado que la respuesta protectora sería la de tipo celular, Th1, que es la que debe buscar cualquier vacuna frente a paratuberculosis (Chiodini, 1996; García-Pariente *et al.*, 2003; Begg y Griffin, 2005; Koets *et al.*,

2015) y que su potencia estaría relacionada con la capacidad de inducir una respuesta celular de hipersensibilidad retardada, medida mediante la prueba de IDTB (Chiodini, 1989).

La IDTB se realiza empleando bien la PPD aviar o la johnina y se ha comprobado que, tras la vacunación, se observan incrementos en el grosor cutáneo de la piel tras 48 - 72 horas post inoculación en el lugar donde se realiza la inoculación, en los animales vacunados (Sigurdsson y Tryggvadóttir, 1950; Pérez, 1992; Muñoz, 2014). Estudios experimentales previos en cabras vacunadas (Silirum®), mostraron cabras reaccionantes tras la inoculación subcutánea de la PPD aviar y de la johnina (antes de la infección con Map) en todos los animales vacunados durante al menos un año (Hines *et al.*, 2014). En ovinos y bovinos se ha observado una respuesta positiva frente a la PPD aviar al mes de la vacunación y hasta prácticamente un año post vacunación, aunque siempre dicha respuesta y el número de animales reaccionantes iban descendiendo con el tiempo post vacunación (Sigurdsson y Tryggvadóttir, 1950; Muñoz, 2014). Sin embargo, existe un estudio en terneros donde se demostró una respuesta positiva pasados dos años desde la vacunación con una vacuna viva (Neoparasec®) (Köhler *et al.*, 2001). Un resultado negativo a esta prueba indicaría que el animal no está inmunizado y tendría una mayor posibilidad de desarrollar la enfermedad (Wentink *et al.*, 1993).

Como ya se ha señalado, el IFN- γ es la principal citoquina implicada en la inmunidad celular frente a Map (Stabel, 2006; Begg *et al.*, 2009), por lo que la inducción temprana de niveles elevados de la misma es un efecto deseado en una vacunación, de forma que el IGRA, se emplea para conocer la capacidad de inducir una respuesta celular por parte de la vacuna (García Marín *et al.*, 1999b; Corpa *et al.*, 2000a; Gwozdz *et al.*, 2000b; Arrazuria *et al.*, 2016). Los niveles de IFN- γ aumentan al mes de la vacunación tanto en vacas, ovejas, cabras como en conejos (Corpa *et al.*, 2000b; Gwozdz *et al.*, 2000a; García-Pariente *et al.*, 2006; Muñoz, 2014; Arrazuria *et al.*, 2016). Además, esos niveles elevados se mantienen de forma prolongada, con variaciones según los estudios: 2 meses post vacunación (mpv) en cabras (el experimento duró 10 semanas) (Valheim *et al.*,

2002a), 4 mpv también en cabras (Faisal *et al.*, 2013), 7,5 mpv en corderos (Gwozdz *et al.*, 2000a), 9 mpv en terneros (Muñoz, 2014), 24 meses en terneros (Köhler *et al.*, 2001) o 30 mpv en terneros (García-Pariente *et al.*, 2006). En un estudio llevado a cabo por García Marín *et al.* (1999b), compararon el efecto de dos vacunas, una inactivada y otra atenuada, en el IGRA y no observaron diferencias entre ellas. El efecto de la vacuna desaparecería, según algunos autores, a los 3,5 años tras la administración de la vacuna (Gudair®) en cabras de un mes de edad ya que no se observaron incrementos en la producción de la citoquina a esa edad (Chartier *et al.*, 2012).

La inducción de la producción de anticuerpos frente a Map es también otra consecuencia de la vacunación. Para cuantificar esta producción, se ha empleado principalmente la técnica del ELISA indirecto. En la mayoría de los estudios se detectaron valores más altos de anticuerpos, con respecto a los animales control, durante el primer mes tras la vacunación de terneros, corderos y cabras (Pérez, 1992; Juste *et al.*, 1994; Corpa *et al.*, 2000b; Gwozdz *et al.*, 2000a; Muñoz *et al.*, 2005; Reyes, 2007; Hines *et al.*, 2014). La producción de anticuerpos también se mantiene elevada durante 6 meses en cabras (Corpa *et al.*, 2000b), a los 6 mpv en corderos (Reyes, 2007), 7,5 mpv en cabras (Faisal *et al.*, 2013), 12 mpv en ovino (Corpa *et al.*, 2000b; Gwozdz *et al.*, 2000a) y 11 mpv en terneros (Muñoz *et al.*, 2005).

En las infecciones por Map, la producción de anticuerpos es mucho más tardía y se ha asociado con las fases avanzadas o clínicas de la enfermedad, caracterizadas siempre por la existencia de una gran cantidad de bacterias en los tejidos (Clarke, 1997; Koets *et al.*, 2015). La inoculación, con la vacuna, de niveles muy elevados de bacterias, podría ser la responsable de la aparición de una respuesta humoral tan intensa, de forma simultánea a la respuesta celular (Corpa *et al.*, 2000b; Gwozdz *et al.*, 2000a; Köhler *et al.*, 2001; Muñoz *et al.*, 2005; Reyes, 2007).

Aunque se ha señalado que la producción de anticuerpos no tendría un efecto protector, a diferencia de la respuesta celular (Ostrowski *et al.*, 2003), recientemente algunos autores (Achkar y Casadevall, 2013) han señalado que sí

podría tenerlo. Esta hipótesis se vería apoyada por el hecho de que se han encontrado animales infectados donde ambas respuestas coexisten en el tiempo (Begg *et al.*, 2011; Vázquez *et al.*, 2013; Fernández *et al.*, 2014).

En un estudio llevado a cabo por Hasvold *et al.* (2002) se caracterizaron las subpoblaciones linfocitarias de sangre periférica tras la inmunización con una vacuna inactivada en cabritas. Las cabritas fueron vacunadas a las 2 - 3 semanas de edad y las poblaciones fueron examinadas antes de la vacunación y a las 12 y 24 semanas post-vacunación, comparando entre las cabritas vacunadas y las no vacunadas. Para ello, se llevó a cabo una estimulación *in vitro* de sangre con johnina para observar la expresión del INF- γ y posteriormente se extrajeron las PBMCs para analizar las poblaciones linfocitarias mediante una citometría de flujo. La producción de la citoquina se incrementó a las 12 semanas tras la vacunación y dicha producción se mantuvo en el tiempo (hasta las 24 semanas). La población mayoritaria productora de interferón fueron las células T CD4⁺ mientras que los linfocitos T CD8⁺ se encontraron en pequeño número, y tampoco se observaron niveles elevados de linfocitos $\delta\gamma$. Otros autores detectaron incrementos en el porcentaje de linfocitos CD45R en animales vacunados y, especialmente, en zonas de tejido linfoide intestinal asociado y el nódulo vacunal (Mateo *et al.*, 1997; Corpa, 1999), mientras que las demás poblaciones de linfocitos - CD4, CD8, $\delta\gamma$ y B - no variaron significativamente (Corpa, 1999).

El efecto favorable más importante de la vacunación es el **beneficio económico**. La paratuberculosis ocasiona más de 200 millones de dólares anuales de pérdidas económicas en la industria ganadera estadounidense (Cho, 2008). Según se ha comprobado, la vacunación reduce la prevalencia de la enfermedad en un periodo de tiempo mucho más breve que las medidas de manejo o el sacrificio de los animales (Bastida y Juste, 2011; Juste y Pérez, 2011). Aunque, como luego se indica, uno de los efectos adversos de la vacunación es la interferencia con las pruebas de diagnóstico de la tuberculosis, se ha cuantificado que los beneficios directos por la aplicación de una supuesta vacunación ascenderían a 8,03 dólares (6,94 €) por animal y año, mientras que

los costes por la pérdida de especificidad de los test de diagnóstico de la tuberculosis bovina serían de 2,14 dólares (1,85 €) por animal y año (Groenendaal *et al.*, 2015), por lo que los beneficios de la vacunación exceden los costes provocados por las reacciones cruzadas (Dressler *et al.*, 2010).

8.4. Efectos adversos

Las vacunas frente a la paratuberculosis, tanto las atenuadas como las inactivadas, están compuestas por el bacilo paratuberculoso (vivo o muerto) y un adyuvante oleoso. El adyuvante oleoso sería el principal responsable de la aparición de un **nódulo vacunal subcutáneo** de tamaño y persistencia variable, nódulo que se produce en el lugar de la inoculación de la vacuna y es uno de los principales efectos adversos de la vacunación (Juste y Saez de Ocariz, 1990; Köhler *et al.*, 2001). Este nódulo puede complicarse con cojeras, fistulizaciones o incluso, con infecciones musculares.

Otro de los inconvenientes es la **autovacunación** por parte del personal responsable de la vacunación, lo que provocaría una lesión granulomatosa en la zona de inoculación. Esta lesión puede conllevar incluso un tratamiento quirúrgico del tejido dañado o un drenaje del material vacunal, para evitar la progresión a una necrosis (Patterson *et al.*, 1988; Juste y Saez de Ocariz, 1990; Windsor *et al.*, 2005). El tratamiento con corticoides suele ser bastante efectivo (Aduriz *et al.*, 2000).

La vacunación también **interfiere** a la hora de diagnosticar casos de **animales infectados con paratuberculosis** ya que, como se ha señalado, induce una intensa respuesta inmunitaria celular y humoral, indistinguible con las técnicas diagnósticas actuales, de la que ocurre en la infección por Map (Juste *et al.*, 1994; Corpa *et al.*, 2000c; Geijo, 2007; Muñoz, 2014; Tewari *et al.*, 2014; Ghosh *et al.*, 2015; Arrazuria *et al.*, 2016).

Sin embargo, el principal efecto adverso de la vacunación frente a la paratuberculosis es la **interferencia con los test de diagnóstico de la tuberculosis**. Este hecho tiene consecuencias importantes sobre el comercio y

sobre los programas nacionales de erradicación de la tuberculosis y es el motivo de que esté prohibida en muchos países (Bastida y Juste, 2011).

8.5. Interferencias diagnósticas con la tuberculosis

El agente infeccioso de la paratuberculosis pertenece al género *Mycobacterium*, al igual que el agente etiológico de la tuberculosis bovina (*M. bovis*) y caprina (*M. caprae*), por lo que estas especies micobacterianas comparten antígenos comunes (Rogall *et al.*, 1990; Pitulle *et al.*, 1992). Esta cualidad es la causa de que existan interferencias con el diagnóstico de la tuberculosis cuando se emplean pruebas de diagnóstico inmunológico en animales sensibilizados frente a otras micobacterias. Estas interferencias se han descrito, en varias especies rumiantes, como en bovinos (Garrido *et al.*, 2013), ovinos (Nedrow *et al.*, 2007), caprinos (Álvarez *et al.*, 2008; Pérez de Val *et al.*, 2012) o ciervo rojo (Mackintosh *et al.*, 2005; Stringer *et al.*, 2011).

En la especie bovina existe actualmente un Plan Nacional de Erradicación de Tuberculosis Bovina (PNETB) en España en el cual a “todos los bovinos de abasto y reproducción o de producción”, se les deben practicar las pruebas diagnósticas para la detección de la tuberculosis. Dentro de ese mismo plan se especifica que aquellos rebaños caprinos que “conviven o aprovechan pastos comunes o mantienen relación epidemiológica con rebaños de ganado bovino, en el caso de que alguna de las dos especies se detecte como no libre de la enfermedad, y de aquellos rebaños que, aunque no cumpliendo con el requisito de convivencia, se detecten mediante la encuesta epidemiológica y/o la Base de Espoligotipos como fuentes de la enfermedad para los rebaños de bovino del área de explotación” también están sometidos al mismo plan de erradicación (MAPA, 2018).

Existe, además, un Plan de Actuación sobre Tuberculosis en Especies Silvestres (PATUBES) donde se pretende evaluar el “papel como reservorio de la enfermedad” de este tipo de animales, como posible fuente de contagio para los animales domésticos (MAPA, 2018).

En el caso del ganado caprino, aunque no hay actualmente un plan nacional en marcha, sí que existe una campaña de saneamiento para la erradicación de la tuberculosis caprina en Castilla y León promovida desde la Junta de Castilla y León que se aplica en “todas las explotaciones caprinas, localidades y municipios” de Castilla y León (Consejería de Agricultura y Ganadería de la Junta de Castilla y León).

Debido a las interferencias en el diagnóstico de la tuberculosis bovina, las autoridades sanitarias españolas han prohibido la vacunación frente a la paratuberculosis en el ganado bovino. Aunque en algunas Comunidades Autónomas donde la prevalencia de rebaño de tuberculosis es muy baja, como es el caso del País Vasco (0,16% en el año 2016) (MAPA, 2018) y donde se ha observado un incremento de los casos clínicos de paratuberculosis (Garrido *et al.*, 2013), se ha permitido la vacunación en condiciones controladas y experimentales, siempre bajo la supervisión y permiso de la Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios y de las autoridades en Sanidad Animal.

Sin embargo, en los pequeños rumiantes, tanto cabras como ovejas, se permite, e incentiva, la vacunación de los animales para lograr una reducción de los casos clínicos y de las tasas de excreción de Map al medio (Tewari *et al.*, 2014; Windsor *et al.*, 2014).

La vacunación frente a paratuberculosis induce una intensa respuesta inmunitaria de tipo celular (Chiodini *et al.*, 1984a), que puede ser detectada mediante la **IDTB** y el **IGRA** (Pérez, 1992; Köhler *et al.*, 2001; Muñoz *et al.*, 2005; Chartier *et al.*, 2012; Arrazuria *et al.*, 2016). Precisamente la primera de ellas es la prueba de referencia en el diagnóstico de la tuberculosis según el PNETB para aquellos bovinos mayores de 6 semanas, utilizando la **IDTB simple** con la PPD bovina como antígeno (Downs *et al.*, 2013; Good *et al.*, 2018). Un animal será reaccionante positivo a la IDTB simple (diagnóstico positivo de tuberculosis) (OIE, 2012) cuando el aumento del espesor del pliegue de piel sea igual o superior a 4 mm (Manual para el procedimiento de realización de la prueba IDTB y del gamma-interferon 2015-2016, 2018). Por ello, se pueden encontrar animales vacunados frente a paratuberculosis positivos a la misma,

que, sin estar infectados de tuberculosis y a causa de la reacción cruzada, de un resultado a esta prueba.

En un estudio experimental (Pérez de Val *et al.*, 2012), donde las cabras fueron vacunadas con Silirum® previamente a una infección experimental con *M. caprae*, se realizó a los 3 mpv una comparación entre la IDTB simple con la IDTB comparada (PPD bovina y aviar) en diez cabras vacunadas. Al realizarse la IDTB a los 6 mpv, todas las cabras vacunadas, resultaron positivas para el diagnóstico de tuberculosis mediante la IDTB simple y nueve de las diez vacunadas lo fueron también mediante la IDTB comparada. En este estudio, se observó cómo animales vacunados que fueron negativos a la tuberculosis cuando se realizó la IDTB comparada, hubieran sido considerados animales positivos a tuberculosis si se hubiera empleado únicamente la IDTB simple. Esto sugiere que, en cabras, la vacunación frente a paratuberculosis compromete seriamente el diagnóstico de tuberculosis mediante la IDTB.

En otro estudio posterior llevado a cabo por Garrido *et al.* (2013) se vacunaron cinco rebaños bovinos de leche con la vacuna inactivada (Silirum®), dejando dos rebaños sin vacunar. Cuando se realizó la IDTB simple antes de la vacunación se observó que la tasa de animales positivos a la prueba fue del 2,40 % en todos los rebaños estudiados. Dos años después de la vacunación, se realizó la misma prueba, IDTB simple, resultando en un 20,42 % de animales positivos en los rebaños vacunados, mientras que en los rebaños control no vacunados esa cifra era mucho más baja (0,75 %). Por el contrario, si se realizaba la IDTB comparada en esos mismos rebaños, las cifras de positividad a la tuberculosis disminuían hasta los 0,58 % en los vacunados y al 0,25 % en los rebaños control. En otro trabajo realizado en cabras vacunadas al mes de edad con la vacuna Gudair® (Chartier *et al.*, 2012), cuando se realizó la IDTB simple y comparada, se observaron resultados similares a los obtenidos por Garrido *et al.* (2013) así como diferencias según la edad a la que se realizó la prueba. Se siguieron dos patrones de positividad: uno más estricto, en el que incrementos del espesor de la piel de 2 mm con la PPD bovina eran considerados positivos en la IDTB simple e incrementos mayores de 2 mm de diferencia entre la PPD bovina y aviar eran

considerados positivos a la IDTB comparada; y el patrón de la OIE (2012), en el cual todos animal con un incremento superior o igual a 4 mm, era considerado como reaccionante positivo a la tuberculosis bovina. A todas las edades a las que se midió la prueba, el mayor espesor se correspondía a la PPD aviar. Cuando se seguía el patrón más estricto, se encontraban más animales positivos a la tuberculosis bovina en todas las edades y pruebas. A los 8 meses de edad de las cabras, los animales positivos a la IDTB simple eran un 50 % (estricto) versus 27,7 % (OIE), pero cuando se realizaba la comparada esos valores descendían drásticamente a un 2,6 % (estricto) y 0 % (OIE). A los 3,5 años de edad de las cabras, estos valores descendían hasta un 2,7 % (estricto) y 0 % (OIE) en la IDTB simple, mientras que con la comparada ambos valores eran cero. Este estudio también insistía en la necesidad del empleo de la IDTB comparada, ya que si se realizaba la IDTB simple existían de un 23,7 a un 50 % de falsos positivos a la prueba.

También se han observado estas diferencias en ciervos vacunados con Silirum® en rebaños con un 5 % de incidencia de paratuberculosis (Stringer *et al.*, 2011), donde al realizar la IDTB simple, un 44 % de los ciervos vacunados y un 23 % de los controles fueron positivos a la prueba. Esta cifra disminuía cuando se realizaba la IDTB comparada con la PPD aviar y la PPD bovina; el número de animales positivos a la prueba era de un 1,11 % en los ciervos vacunados, mientras que, en los ciervos sin vacunar, era de un 0,5 %.

Como se ha observado en los estudios anteriores, la interferencia en el diagnóstico de tuberculosis, debido a la vacunación frente a paratuberculosis, podría solventarse con la utilización de la **IDTB comparada**, en la cual además de emplear la tuberculina bovina, se emplea la tuberculina aviar o la johnina (Pérez, 1992; Garrido *et al.*, 2007, 2013). Un animal será positivo a la prueba (con un diagnóstico positivo a tuberculosis) cuando la reacción a la tuberculina bovina sea superior en 4 mm a la reacción de la tuberculina aviar (MAPA, 2018). La utilización de la IDTB comparada viene contemplada en el mismo Plan Nacional, siempre empleada bajo criterio de la autoridad competente en base a una evaluación de riesgos y en la Directiva del Consejo Europeo 64/432/EEC.

Siguiendo el protocolo de la IDTB comparada, una mayor reacción a la tuberculina aviar indicaría una infección con Map o una vacunación frente a la paratuberculosis (Bastida y Juste, 2011). Son numerosos los estudios donde se ha comprobado la eficacia de esta prueba para diferenciar animales vacunados frente a Map (Chartier *et al.*, 2012; Lozano de Arcenegui *et al.*, 2012; Garrido *et al.*, 2013; Muñoz, 2014).

En un estudio en ovejas vacunadas con la vacuna inactivada Mycopar® (Nedrow *et al.*, 2007), se llevó a cabo una IDTB comparada a los tres años post vacunación. En este caso emplearon como PPDs, la bovina y la johnina. Estos autores observaron unos incrementos mucho mayores en el espesor de la piel en aquellos animales vacunados en reacción a la johnina (18,2 mm) que a la tuberculina bovina (9,1 mm), por lo que al realizarse la IDTB comparada no se observaron interferencias en el diagnóstico de la tuberculosis. En un estudio previo en terneros vacunados a los 28 días con una vacuna viva (Neoparasec®) Köhler *et al.* (2001) obtuvieron unos resultados similares. Estos autores realizaron la IDTB comparada 4 meses después de la vacunación con tres PPD diferentes: aviar, bovina y johnina y observaron los mayores incrementos en el grosor de la piel con la johnina (rangos entre 8,2 - 26,9 mm), seguido de la aviar (5,6– 11,4 mm) y, por último, la PPD que dio menores grosores, fue la bovina (4,7– 6,9 mm).

En el propio Plan Nacional de erradicación se contempla la utilización del **IGRA** como técnica complementaria a la IDTB. Es también una de las pruebas oficiales que se emplea en bovinos mayores de 6 meses y se realiza de manera paralela a la IDTB simple en rebaños positivos considerados infectados. Este test permitiría discernir entre las infecciones de tuberculosis y paratuberculosis (Gutiérrez *et al.*, 1998; Álvarez *et al.*, 2008) aunque no en todos los casos, ya que en rebaños con una coinfección entre ambas micobacterias se observa una reducción en la sensibilidad de este test en el diagnóstico de la tuberculosis (Aranaz *et al.*, 2006; Álvarez *et al.*, 2008).

Cuando se evaluó el IGRA sobre cabras vacunadas frente a paratuberculosis y posteriormente infectadas con tuberculosis (Pérez de Val *et al.*, 2012), se pudo

constatar que hasta la 4ª semana post infección, la producción de IFN- γ era superior cuando se incubaba la sangre con la PPD aviar, pero posteriormente la respuesta viraba hacia una mayor producción frente a la PPD bovina. En otra vacunación con Neoparasec® (Köhler *et al.*, 2001), esta vez en terneros, se observó como la producción de IFN- γ frente a la PPD bovina era igual de elevada que la producción frente a la PPD aviar. Los resultados obtenidos en otro trabajo sobre vacunación también en bovinos, pero con otra vacuna (ID-Lelystad®), confirmaron una progresión similar entre la producción del IFN- γ frente a la PPD bovina y la johnina, aunque siempre fue inferior frente a la PPD bovina (Muskens *et al.*, 2002).

Dado que la interferencia diagnóstica con la tuberculosis es una de las principales limitaciones de la vacunación, como ya se ha señalado, se han intentado desarrollar nuevos productos vacunales buscando protección, pero sin que existan reacciones cruzadas, aunque hasta el momento ninguno parece haber satisfecho estas características de forma plena (Park y Yoo, 2016). Por otro lado, también se han ido probando diferentes antígenos más específicos que puedan sustituir a las tuberculinas aviar y bovina (Vordermeier *et al.*, 2011; Pérez de Val *et al.*, 2012) y así poder diferenciar entre animales infectados de tuberculosis de aquellos infectados o vacunados frente a la paratuberculosis. Para detectar animales con tuberculosis se han probado diferentes reactivos más específicos que las tuberculinas (Aagaard *et al.*, 2003, 2010). Entre ellos, destacan como los más prometedores, los péptidos sintéticos CFP-10, ESAT-6 y Rv3615c (Aagaard *et al.*, 2010; Casal *et al.*, 2012; Pérez de Val *et al.*, 2012; Serrano *et al.*, 2017), propios de *M. bovis*, los cuales se han evaluado utilizando las pruebas de IDTB e IGRA (Flores-Villalva *et al.*, 2012; Andersen *et al.*, 2013; Meng *et al.*, 2015; Serrano *et al.*, 2017). Las proteínas ESAT-6 y CFP-10 son importantes objetivos de las células T en animales infectados con tuberculosis y, además, están ausentes en muchas micobacterias ambientales que causan reacciones cruzadas en los test IDTB (Andersen *et al.*, 2000). Además, estimulan la producción de IFN- γ por parte de las células T en aquellos animales infectados de tuberculosis (Shams *et al.*, 2004). La combinación de cocteles de péptidos a partir de ESAT-

6 y CFP-10 ha demostrado ser una de las más eficaces a la hora de detectar animales infectados con *M. bovis* en un rebaño bovino experimentalmente infectado de tuberculosis y posteriormente vacunado con BCG (Vordermeier *et al.*, 2001). En este estudio, se observó que la sensibilidad del coctel peptídico fue de un 77,9 % frente a un 88,2 % de las tuberculinas, mientras que la especificidad fue del 100% ya que no produjo una respuesta del IFN- γ en aquellos animales no infectados pero sí vacunados con BCG ni en los animales control, a diferencia de las tuberculinas. Estos resultados fueron corroborados en otro estudio con un esquema experimental similar, aunque en este caso la sensibilidad del coctel fue superior a la de las tuberculinas (Cockle *et al.*, 2006). Estos péptidos han demostrado tener una especificidad similar a las PPDs en el caso de cabras infectadas con *M. caprae* (Bezós *et al.*, 2011).

La proteína denominada Rv3615c también ha demostrado su utilidad como reactivo para los test DIVA (test que diferencian animales infectados de animales vacunados), ya que se encuentra en bovinos infectados de tuberculosis, pero no en bovinos vacunados frente a tuberculosis ni en animales control (Sidders *et al.*, 2008). De hecho, esta proteína mostró ser más sensible que la combinación ESAT-6 y CFP-10, al detectar más animales infectados que estos últimos cuando se realizó el IGRA (Sidders *et al.*, 2008). La aplicación combinada en diferentes cocteles de estos antígenos ha demostrado que conlleva una mejoría en la sensibilidad y en la especificidad tanto de los test intradérmicos como en el IGRA (Sidders *et al.*, 2008; Vordermeier *et al.*, 2011; Serrano *et al.*, 2017).

En el caso de cabras vacunadas con Silirum® y posteriormente infectadas con *M. caprae* (Pérez de Val *et al.*, 2012), se comprobó que todas las cabras fueron negativas al IGRA cuando se estimularon con el coctel peptídico ESAT-6/CFP-10 junto a Rv3615c antes de la infección. Cuando se realizó el IGRA en posteriores muestreos tras la infección, y con una combinación de todos los preparados, la sensibilidad se incrementó hasta el 80 % - 100 % en los grupos de cabras vacunadas e infectadas y en el grupo no vacunado, pero sí infectado. Esta sensibilidad fue similar a la obtenida con las tuberculinas.

Las reacciones cruzadas que no permiten diferenciar los animales infectados con tuberculosis de aquellos animales vacunados frente a paratuberculosis podrían solucionarse con la aplicación de estos reactivos DIVA ya que únicamente los animales infectados de tuberculosis estarían sensibilizados frente a ellos, no así los animales vacunados frente a Map, ya que esos antígenos estarían ausentes en esta micobacteria. En un estudio donde un grupo de terneros fue vacunado con Silirum® e infectado, otro sólo vacunado y otro sólo infectado con *M. bovis*, se llevó a cabo una comparación entre la respuesta al IGRA y al IDTB con las tuberculinas clásicas y con la combinación de diferentes antígenos ESAT-6/CFP-10 junto a Rv3615c (Serrano *et al.*, 2017). Los antígenos específicos demostraron una mejor sensibilidad y especificidad que la obtenida con las tuberculinas clásicas. Estos antígenos no produjeron ningún tipo de respuesta al IGRA en aquellos animales únicamente vacunados. La sensibilidad y especificidad de la prueba IDTB fue del 100 % con los antígenos específicos, superior a la encontrada con las tuberculinas clásicas.

La introducción de estos antígenos supondría una mejora en el diagnóstico de la tuberculosis al mostrar una mayor especificidad en la detección de los animales con tuberculosis (Aagaard *et al.*, 2003; Pérez de Val *et al.*, 2012). Estos cocteles se podrían utilizar en combinación con las pruebas oficiales que se describen en el PNETB, si bien hasta el momento no se emplean, posiblemente tanto por la falta de datos más exhaustivos sobre su idoneidad (Vordermeier *et al.*, 2011), como por su elevado precio.

9. Map EN LA SALUD PÚBLICA

La enfermedad inflamatoria intestinal o IBD (Inflammatory Bowel Disease) es un término empleado para describir un grupo de enfermedades que tienen una característica común: son enfermedades crónicas que afectan localmente al intestino. En la especie humana, son la Enfermedad de Crohn, la colitis ulcerativa y la colitis indeterminada (Juste *et al.*, 2009b). La etiología de la IBD es aún desconocida, pero la hipótesis más extendida es que son enfermedades de causa

multifactorial donde una respuesta inmunitaria anómala induce una inflamación en el intestino (Grant, 2005; Juste *et al.*, 2009b).

La **enfermedad de Crohn** (EC) (Crohn *et al.*, 1932) es la que se cree que tiene una mayor relación con la paratuberculosis, por las semejanzas que existen, sobre todo, en las lesiones (Chiodini, 1989; Grant, 2005; Freeman, 2014). El número de casos de EC va en aumento año tras año (Molodecky *et al.*, 2012; Aniwaniwa *et al.*, 2017; Gajendran *et al.*, 2017) y la edad a la que se diagnostica es cada vez menor (Armitage *et al.*, 2001; Freeman, 2014; Ghione *et al.*, 2017). Es una de las enfermedades de nuestro tiempo, ya que se da mayoritariamente en países industrializados (Naser *et al.*, 2014), sugiriendo que los factores ambientales (Cho, 2008) y las dietas occidentalizadas podrían influir en la enfermedad (Burisch *et al.*, 2014). La predisposición genética por parte del hospedador está universalmente aceptada como una causa crítica para el desarrollo de la enfermedad (Quirke, 2001). Por lo que se refiere a su etiología se han estudiado muchos agentes infecciosos para comprobar si son los causales de la EC: Map, *Clostridium difficile*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter concisus* y virus como el citomegalovirus (Azimi *et al.*, 2018).

Las similitudes existentes entre ambas enfermedades (Enfermedad de Johne y EC), sugieren que su agente causal podría ser Map (Chiodini, 1989). Las lesiones que se observaron en las primeras descripciones de la enfermedad (Dalziel, 1913) y las descritas en la paratuberculosis (Johne y Frothingham, 1895), apoyaban esta posibilidad. La zona de lesión, en la EC, se sitúa a lo largo de todo el tubo digestivo, aunque la zona del íleon distal es la que más comúnmente se encuentra afectada (Grant, 2005), como en la paratuberculosis. Los signos clínicos también son parecidos: malestar general, pérdida de peso, dolor abdominal y diarrea (Chiodini, 1989). La dificultad en el cultivo de Map provocó que esta hipótesis cayera en el olvido hasta que Chiodini *et al.* (1984b) aislaron micobacterias sin identificar de tejidos de pacientes con EC. Estos autores propusieron que estos aislados eran formas de *Mycobacterium* con una pared celular defectiva (esferoplastos), que posteriormente fueron caracterizadas como Map (Yoshimura *et al.*, 1987). El hecho de que Map se encuentre en forma

de esferoplasto conlleva que el aislamiento bacteriológico sea aún más complicado (Markesich *et al.*, 1988). Además, se llevó a cabo una infección experimental en cabritos empleando la cepa aislada del caso de EC, lográndose reproducir las lesiones típicas de paratuberculosis y aislar Map de los tejidos (Van Kruiningen *et al.*, 1986).

Actualmente y gracias al avance de las técnicas bacteriológicas (cultivo y PCR), se han realizado más estudios que han apoyado la hipótesis de la relación entre ambos procesos ya que se ha detectado Map con mayor frecuencia en pacientes con EC que en individuos sanos (Naser *et al.*, 2000, 2014; Schwartz *et al.*, 2000; Bentley *et al.*, 2008; Kirkwood *et al.*, 2009; Mendoza *et al.*, 2010; Oken *et al.*, 2017), llegándose incluso a aislar micobacterias (Map) viables de sangre circulante de pacientes con EC (Naser *et al.*, 2004).

Todo ello ha hecho que, en los últimos años, se haya observado un creciente interés en comprobar si Map interviene realmente como agente causal en la EC, si bien son aún muchos investigadores que se muestran críticos y escépticos ante esta posibilidad (Naser *et al.*, 2014). Se apoyan en que hay muchos estudios donde no se ha conseguido aislar Map de pacientes enfermos (Bull *et al.*, 2003; Baksh *et al.*, 2004; Autschbach *et al.*, 2005; Parrish *et al.*, 2009) o se ha hecho en una muy baja proporción (Juste *et al.*, 2009b; Sasikala *et al.*, 2009; Ricanek *et al.*, 2010; Elguezabal *et al.*, 2012). Según Naser *et al.* (2014) estos resultados podrían ser debidos al empleo de metodología estándar que había fallado a la hora de recuperar Map o ADN de Map de las muestras recogidas. Por otra parte, también se ha restado importancia a la presencia de Map o su ADN en muestras de heces o de tejidos de personas sanas ya que al tratarse de una micobacteria muy ubicua, que puede encontrarse en la cadena alimentaria (leche, carne y agua), es plausible que se produzcan contaminaciones accidentales (National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods, 2010). Por ello, se ha propuesto que se debería emplear una metodología más sofisticada y optimizada para poder detectar y aislar con más precisión Map en pacientes con EC (Naser *et al.*, 2014).

Por otra parte, se han realizado varios ensayos en los que los medicamentos empleados en el tratamiento para la EC han mostrado un efecto anti-Map (Greenstein *et al.*, 2007, 2008) y se ha observado que pacientes que estaban siendo tratados frente a la enfermedad, mostraron una menor capacidad de detección de Map (Elguezabal *et al.*, 2012).

Otra evidencia, en este caso, en contra de esta relación, es el hecho de que no se ha encontrado una mayor proporción de individuos enfermos de EC entre ganaderos y veterinarios que tratan animales con paratuberculosis (Jones *et al.*, 2006), aunque en otros estudios, en India, se ha señalado que aquellos cuidadores de explotaciones caprinas con paratuberculosis han mostrado una mayor riesgo de desarrollar problemas digestivos (Singh *et al.*, 2011).

Si se llegara confirmar a Map como agente etiológico de la EC, la **transmisión de Map por la cadena alimentaria** cobraría una gran importancia. Por ello, y en previsión de esta posible asociación, se ha señalado que es esencial conocer si Map se encuentra en los diversos productos de consumo humano como carne, leche o agua potable (National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods, 2010; Waddell *et al.*, 2016; Espeschit *et al.*, 2017).

Como se ha descrito previamente, Map es un microorganismo que sobrevive a la pasteurización de la leche (Chiodini y Hermon-Taylor, 1993; Rowan *et al.*, 2001). Además existen estudios en los cuales se han aislado bacilos en leche cruda (Bharathy *et al.*, 2017) y también pueden detectarse en quesos (Donaghy *et al.*, 2004; Galiero *et al.*, 2016) o incluso en formulaciones de leche en polvo para bebés (Botsaris *et al.*, 2016).

La carne también es un foco de transmisión de Map a la cadena alimentaria, al haberse detectado en canales destinadas al consumo humano (Meadus *et al.*, 2008; Okura *et al.*, 2011; Lorencova *et al.*, 2014) y en derivados cárnicos (Alonso-Hearn *et al.*, 2009), por lo que se debe cuidar al máximo la higiene y evitar la contaminación de las canales o derivados por parte de las heces de aquellos animales excretadores del bacilo.

Debido a que Map se excreta a través de las heces (Chiodini *et al.*, 1984a), puede llegar a contaminar aguas que van a ser consumidas por los seres humanos y por otros animales (Villarreal *et al.*, 2010; Aboagye y Rowe, 2011; Pistone *et al.*, 2012). El tratamiento de esterilización del agua potable no elimina completamente a Map (Whan *et al.*, 2001).

CAPÍTULO II

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

La paratuberculosis es una enfermedad descrita por primera vez a finales del siglo XIX (Johne y Frothingham, 1895) en la que, a pesar de su enorme importancia económica en la industria ganadera (Groenendaal *et al.*, 2015) y la reciente preocupación que está causando en salud pública humana por su posible relación con la enfermedad de Crohn (Freeman, 2014), aún se desconocen muchos aspectos relacionados con su patogenia. En concreto, el conocimiento de los mecanismos que determinan las diferentes respuestas que puede ofrecer el hospedador tras su contacto con Map, es uno de los aspectos más relevantes, por estar relacionado directamente con la evolución que va a seguir la infección (Clarke, 1997; Arsenault *et al.*, 2014). Es un hecho conocido que no todos los animales que entran en contacto con Map desarrollan la enfermedad clínica, sino que, en algunos, a pesar de estar infectados, aparecen formas de latencia o resistencia (García-Marín *et al.*, 2000; de Silva *et al.*, 2018). Distintos estudios han puesto de manifiesto que la respuesta inmunitaria que se desencadena en el animal infectado, tanto a nivel periférico como local, juega un papel clave en la aparición de unas u otras formas (Delgado, 2010; Vázquez *et al.*, 2013; Fernández, 2017). El conocimiento de estos factores constituye una herramienta fundamental con la que poder avanzar en el conocimiento de su patogenia y poder diseñar estrategias adecuadas para el control de la paratuberculosis.

Dentro de estas estrategias, la vacunación ha sido la que ha demostrado ofrecer un mejor resultado en términos coste-beneficio (Bastida y Juste, 2011), ya que consigue lograr una disminución relativamente rápida de la aparición de nuevos casos clínicos (Wentink *et al.*, 1994; Pérez *et al.*, 1995; van Schaik *et al.*, 1996; Fridriksdottir *et al.*, 2000; García-Pariente *et al.*, 2003, 2006; Alonso-Hearn *et al.*, 2012; Windsor *et al.*, 2014). También reduce la excreción de micobacterias al exterior (Reddacliff *et al.*, 2006; Ghosh *et al.*, 2015; Singh *et al.*, 2015), disminuye la colonización de los tejidos (Hines *et al.*, 2014; Arrazuria *et al.*, 2016) y logra una disminución de las lesiones (Juste *et al.*, 1994; Hines II *et al.*, 2014). Además, numerosos estudios han puesto de manifiesto que la vacunación tiene un efecto sobre la respuesta inmunitaria periférica, tanto celular como humoral (Juste *et al.*, 1994; Hines II *et al.*, 2014; Mercier *et al.*, 2014; Muñoz, 2014; Tewari *et al.*, 2014) que se ha considerado responsable de sus

efectos beneficiosos, sin que se haya podido demostrar dicha asociación. De hecho, hay varios estudios que recogen la existencia de fallos vacunales en individuos con respuestas inmunitarias periféricas bien desarrolladas (Windsor, 2006; Mercier *et al.*, 2014; Muñoz, 2014), e incluso evidencias en la propia paratuberculosis de que una respuesta celular periférica intensa no tiene siempre ese carácter protector (Pérez *et al.*, 1997; Burrells *et al.*, 1998; Vázquez *et al.*, 2013). Todo lo anteriormente expuesto indica que aún son muchos los efectos que la vacunación ejerce sobre los animales que no son bien conocidos.

El trabajo desarrollado en esta Tesis Doctoral se enmarca dentro de la línea de investigación ya establecida en el grupo en el que se ha realizado, centrada en el estudio de la patogenia de la paratuberculosis en los rumiantes y de aquellos factores que pueden influir en la misma.

La hipótesis que se pretende analizar en este trabajo sería la de que la vacunación frente a paratuberculosis tiene efectos sobre distintos factores que intervienen en la patogenia de la infección por Map. Por ello, el **objetivo general** de la presente Tesis Doctoral ha sido **estudiar el efecto que ejerce la vacunación y algunas variables como la edad de inmunización, sobre la respuesta inmunitaria, local y periférica, el desarrollo de lesiones o la colonización de los tejidos por Map.**

Dentro de aquellos factores que pueden jugar un papel en el éxito de la vacunación, la **edad del animal** en el momento de la inmunización, y su **estado de infección previo**, serían de los más importantes. Al tratarse de una enfermedad contagiosa, la opción más lógica sería vacunar antes de que se produzca el primer contacto con el agente causal, durante los primeros días de vida del animal (Körmeny, 1994; Reddacliff *et al.*, 2006; Mercier *et al.*, 2014; Tewari *et al.*, 2014). Sin embargo, hay estudios previos que señalan que, debido a que el sistema inmunitario no madura por completo hasta meses después del nacimiento, una vacunación demasiado temprana podría no ser completamente efectiva y sería más adecuado esperar a que el sistema inmunitario del hospedador haya terminado de desarrollarse (Reynolds y Morris, 1983; Corpa *et al.*, 2000b). Además, otros estudios han demostrado que la vacunación en edades

más avanzadas logra también un efecto beneficioso, tanto en animales de varios meses (Muñoz *et al.*, 2005; Reddacliff *et al.*, 2006; Dhand *et al.*, 2016) como en adultos (Pérez *et al.*, 1995; Corpa *et al.*, 2000c; Alonso-Hearn *et al.*, 2012; Santema *et al.*, 2013). En muchos de estos últimos estudios la vacunación se realizó sobre animales ya presumiblemente infectados, consiguiendo una reducción del número de bajas, lo que ha sugerido un posible efecto terapéutico de este procedimiento. Teniendo todo esto en cuenta, el **primer objetivo** de este trabajo ha sido evaluar el **efecto de la vacunación en función de la edad de los animales sobre la respuesta inmunitaria y el control de la enfermedad, en una explotación comercial caprina con casos clínicos de paratuberculosis**. Para ello, se elaboró un experimento de vacunación de animales a tres edades diferentes (1,5 meses, 5 meses o cabras mayores de 1,5 años), por lo que algunos de los individuos vacunados ya podrían haber estado infectados, y en el que se valoró periódicamente la respuesta inmunitaria periférica y se analizó el número de bajas tras la vacunación.

Las infecciones experimentales, llevadas a cabo bajo condiciones controladas, son uno de los principales métodos para el estudio de la patogenia de distintas enfermedades y de los factores que pueden influir, como la vacunación (Hines II *et al.*, 2007). En el caso de la paratuberculosis, el estudio en condiciones experimentales del efecto que tiene la vacunación cobra especial relevancia, ya que aún se desconocen los mecanismos concretos por los cuales logra un **efecto protector** frente al desarrollo de la enfermedad. A este respecto, se ha podido comprobar que la vacunación, si bien no previene la entrada de Map al organismo (Juste *et al.*, 1994; Muñoz, 2014), sí que es capaz de lograr una limitación de la extensión e intensidad de las lesiones provocadas tras la infección (Juste *et al.*, 1994; Reyes, 2007; Hines II *et al.*, 2014; Muñoz, 2014), así como una reducción de la excreción de Map al medio (Juste *et al.*, 1994; Hines II *et al.*, 2014). Por otro lado, como ya se ha señalado, también existen diversos estudios en condiciones de campo (Crowther *et al.*, 1976; Pérez *et al.*, 1995; Corpa *et al.*, 2000c; García-Pariente *et al.*, 2006; Singh *et al.*, 2010; Alonso-Hearn *et al.*, 2012; Santema *et al.*, 2013) que han sugerido que la vacunación podría tener un **efecto terapéutico** al lograr una reducción de la

aparición de nuevos casos clínicos tras vacunar animales adultos, presumiblemente ya infectados, en rebaños con casos clínicos de paratuberculosis. Sin embargo, esta hipótesis no ha sido comprobada en condiciones controladas. Únicamente hay un estudio (Gwozdz *et al.*, 2000a) realizado en corderos pero que valora el efecto de la vacunación solo dos semanas tras la infección, y no en casos comprobados de infección instaurada.

En la paratuberculosis, el estudio del tipo de lesiones que aparecen tras la infección por Map y su evolución ha demostrado ser un procedimiento de gran utilidad como indicador del desarrollo de la infección, ya que distintas formas lesionales se pueden asociar a momentos concretos, subclínicos o clínicos (Pérez *et al.*, 1997; Delgado, 2010; Vázquez *et al.*, 2013; Fernández *et al.*, 2017) y además, también se ha encontrado una relación entre ellas y la respuesta inmunitaria periférica (Pérez *et al.*, 1997; Kurade *et al.*, 2004), que podría emplearse como indicador de protección. Sin embargo, esta relación aún no ha podido ser confirmada de forma precisa, ya que existe disparidad entre los diversos estudios realizados hasta la fecha, posiblemente debido a los diferentes diseños experimentales empleados, así como a la metodología aplicada para valorar la respuesta inmunitaria o caracterizar las lesiones en el aparato digestivo. A este respecto, nuestro grupo de investigación ha desarrollado un procedimiento basado en clasificar las lesiones según su progresión y un recuento del número de granulomas, como indicativo de su gravedad, que ha demostrado su utilidad en la valoración de distintos aspectos que influyen en la patogenia como la dosis infectante o edad de los animales (Delgado *et al.*, 2013), el tipo de cepa (Fernández *et al.*, 2014) o procedencia del inóculo (Fernández *et al.*, 2015) o también la vacunación (Muñoz, 2014).

Considerando todo lo anterior, un **segundo objetivo** de esta Tesis Doctoral ha sido emplear un modelo experimental caprino para **valorar el efecto de la vacunación, previa o posterior a la infección experimental con Map, sobre la patogenia de la paratuberculosis, valorando el desarrollo de lesiones, la respuesta inmunitaria periférica y local o la colonización de Map en tejidos y heces**. Para su logro, se diseñó una infección experimental en cabritos,

vacunados antes y después de su desafío con Map por vía oral, y de 360 días de duración, a los que se les fue tomando muestras de sangre y heces periódicamente, y se procedió a su eutanasia en dos momentos en los que se tomaron muestras para estudios histopatológicos, inmunológicos y bacteriológicos.

A pesar de los muchos beneficios que tiene la vacunación frente a la paratuberculosis, esta presenta un gran inconveniente que ha motivado su prohibición de uso en varios países (Bastida y Juste, 2011) ya que origina la aparición de **reacciones cruzadas** con las pruebas diagnósticas empleadas en las campañas de erradicación de la tuberculosis (Nedrow *et al.*, 2007; Pérez de Val *et al.*, 2012; Garrido *et al.*, 2013). Estas reacciones cruzadas se producen porque Map y los agentes etiológicos de la tuberculosis bovina o caprina pertenecen al mismo género, por lo que las bacterias comparten antígenos comunes (Pitulle *et al.*, 1992) presentes en los extractos proteicos purificados (PPDs) que se emplean en dichas campañas, que adolecen de falta de especificidad.

En España, la especie bovina está sujeta a un Plan Nacional de Erradicación de la Tuberculosis (PNETB), donde se especifica que se deben realizar pruebas diagnósticas frente a esta enfermedad a todos los bovinos y a aquellos caprinos que compartan pastos con éstos. Además, la Junta de Castilla y León ha desarrollado un plan propio de erradicación de la tuberculosis caprina, empleando los mismos procedimientos que en el caso de la especie bovina (Consejería de Agricultura y Ganadería de la Junta de Castilla y León). En esas campañas, se emplea como prueba principal de diagnóstico la IDTB simple, y de forma complementaria el IGRA en algunas situaciones. En ambos casos se utiliza la PPD bovina, derivada de *M. bovis* (Good y Duignan, 2011), como antígeno que se inyecta por vía intradérmica en el caso de la IDTB o se emplea en la estimulación de las células sanguíneas en el IGRA. Debido a esa similitud antigénica entre Map y *M. bovis* (Rogall *et al.*, 1990), aquellos animales infectados o vacunados frente a paratuberculosis, pueden ofrecer reacciones positivas inespecíficas cuando se realizan las pruebas referidas con PPD bovina (Aranaz *et al.*, 2006; Álvarez *et al.*, 2008). Este inconveniente se puede solventar

en la mayor parte de los casos empleando la IDTB o la prueba de IGRA comparada, utilizando tanto la PPD bovina como aviar, y comparando la reacción que se produce, que en el caso de los animales con tuberculosis será siempre superior en el caso de la PPD bovina (OIE, 2012). Sin embargo, la especificidad de esta prueba no es del 100% (Chartier *et al.*, 2012; Garrido *et al.*, 2013) y además supone un incremento en el coste económico del proceso diagnóstico y complica el procedimiento. Por ello, en los últimos años se está desarrollando un considerable esfuerzo investigador con el fin de encontrar nuevos antígenos que sean capaces de evocar una respuesta inmunitaria más específica, evitando de este modo la aparición de reacciones cruzadas en las pruebas diagnósticas (Vordermeier *et al.*, 2002, 2011; Aagaard *et al.*, 2010; Pérez de Val *et al.*, 2012; Lyashchenko *et al.*, 2017; Serrano *et al.*, 2017).

En el caso de la paratuberculosis, aunque la PPD aviar es ampliamente utilizada en su diagnóstico, también se ha elaborado la johnina, una PPD propia de *Map*. En los últimos años, se han ido desarrollando nuevos antígenos, con el objetivo de mejorar no solo la especificidad, sino sobre todo la sensibilidad de los test diagnósticos de la infección por *Map* (Mikkelsen *et al.*, 2011; Hughes *et al.*, 2013, 2017).

Teniendo esto en cuenta, el **tercer objetivo** de este trabajo de investigación ha sido **analizar la respuesta inmunitaria celular desarrollada por animales sensibilizados frente *Map* cuando eran expuestos a nuevos antígenos específicos de *M. bovis* y *Map***, empleando el test IGRA, con el fin de valorar su posible uso como método DIVA, capaz de diferenciar animales vacunados de paratuberculosis de los infectados de tuberculosis. Para ello, se diseñó un ensayo empleando muestras de los animales de los dos estudios anteriores, tomadas en distintos momentos tras la vacunación.

Para la realización de todos estos estudios se ha empleado la **especie caprina** como el modelo experimental más cercano a la bovina, por ser ambas hospedadores naturales de la paratuberculosis que además muestran una gran sensibilidad a la infección por tuberculosis (Daniel *et al.*, 2009; Napp *et al.*, 2013) a diferencia del ganado ovino. Por otra parte, en la especie caprina se

realizan también campañas de saneamiento de la tuberculosis (Consejería de Agricultura y Ganadería de la Junta de Castilla y León) y la vacunación frente a paratuberculosis está permitida, con lo que se espera que los resultados obtenidos puedan tener una repercusión directa y mejoren los conocimientos sobre la sanidad animal de esta especie, de gran importancia económica en España.

CAPÍTULO III
EFECTO DE LA VACUNACIÓN FRENTE A
PARATUBERCULOSIS EN UN REBAÑO
CAPRINO DE LECHE: SEGUIMIENTO
DURANTE 2 AÑOS

1. INTRODUCCIÓN

La vacunación es la herramienta más efectiva para el control de la paratuberculosis, al conseguir una reducción de los casos clínicos en el rebaño en el que se practica (Wentink *et al.*, 1994; Pérez *et al.*, 1995; van Schaik *et al.*, 1996; Fridriksdottir *et al.*, 2000; García-Pariente *et al.*, 2003, 2006; Alonso-Hearn *et al.*, 2012; Windsor *et al.*, 2014). Se han realizado estudios donde se han vacunado animales jóvenes, alrededor del mes de edad (Mercier *et al.*, 2014) y otros, animales adultos (Corpa *et al.*, 2000c). En todos ellos se citan efectos beneficiosos, pero son trabajos en los no se ha comprobado cuál es la edad más aconsejable para realizar la vacunación. Si se persigue evitar la transmisión de Map, lo más lógico sería vacunar al animal en los primeros días de vida (Chiodini *et al.*, 1984a; Barkema *et al.*, 2009). Para otros autores, al tratarse de una vacuna que induce una reacción local intensa en el punto de inoculación (Juste y Saez de Ocariz, 1990; Köhler *et al.*, 2001) y al no prevenir la infección, convendría usarla en animales mayores, incluso adultos (Crowther *et al.*, 1976; Pérez *et al.*, 1995; Corpa *et al.*, 2000c; García-Pariente *et al.*, 2006; Santema *et al.*, 2013). Además, existe un trabajo previo (Corpa *et al.*, 2000b) donde se compara la respuesta inmunitaria periférica a la vacunación entre corderos y cabritos de 15 días y 5 meses de edad, que es significativamente más intensa y duradera en los animales de más edad, posiblemente por un mayor grado de maduración del sistema inmunitario, si bien en él no se comprueba su eficacia real en la protección frente a la paratuberculosis.

Teniendo lo anteriormente expuesto en cuenta, se diseñó este estudio en un rebaño comercial con antecedentes clínicos y serológicos de paratuberculosis, con el **objetivo** de valorar el efecto de la vacunación sobre el control de la enfermedad, evaluando el número de bajas, y sobre la respuesta inmunitaria periférica asociada, en función de la edad a la que se administró la vacuna a los animales.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Selección de animales y protocolo de vacunación

Este estudio se realizó en una explotación intensiva caprina de leche, formada aproximadamente por 800 animales adultos de la raza murciano-granadina, y situada en la localidad de Aguilar de Campos (Valladolid). Este rebaño tenía el estatus de libre de tuberculosis, al no haber presentado reaccionantes positivos en las campañas de saneamiento realizadas en, al menos, los últimos cinco años. Tenía un historial de casos clínicos de paratuberculosis que habían sido observados por el ganadero y la veterinaria encargada, en forma de goteo, en los últimos cinco años. Además, la presencia de la infección se había confirmado mediante la realización de estudios serológicos, con resultados positivos, en varios animales en los últimos años. La seropositividad osciló entre el 0,1 y el 0,7 % de las cabras muestreadas.

El manejo de la explotación era el habitual de este tipo de granjas: los animales estaban alojados en naves de reciente construcción, la alimentación era proporcionada por la cooperativa a la que estaba asociada, estando formulada para cada tipo de animales según su momento de producción y la reposición se obtenía a partir de las propias hembras, sin que se introdujeran animales del exterior. Los programas sanitarios incluían desparasitaciones anuales y vacunaciones frente a clostridiosis y agalaxia contagiosa. Nunca se había llevado a cabo una vacunación frente a paratuberculosis.

Para realizar este estudio, se seleccionaron 190 hembras de la raza murciano-granadina de diferentes edades, en función de la disponibilidad de animales en el momento de realizar el estudio:

- 77 cabras adultas, de más de 1,5 años.
- 79 cabritas alrededor de los 5 meses.
- 34 cabritas alrededor de 1,5 meses.

La mitad de los animales de cada uno de los tres grupos fue vacunada (V), permaneciendo la otra mitad como control sin vacunar (NV), de forma que los grupos de trabajo quedaron de la siguiente forma:

- AdultasV: 39 cabras adultas, vacunadas.
- AdultasNV: 38 cabras adultas, no vacunadas.
- 5MV: 40 cabritas de 5 meses, vacunadas.
- 5MNV: 39 cabritas de 5 meses, no vacunadas.
- 1,5MV: 19 cabritas de 1,5 meses, vacunadas.
- 1,5MNV: 15 cabritas de 1,5 meses, no vacunadas.

Las cabras fueron inmunizadas con la vacuna inactivada comercial Gudair® (Vetia Animal Health, S.A., Madrid), formada a partir de la cepa 316 de Weybridge inactivada por calor, con un adyuvante de aceite mineral. Se inoculó 1 ml del producto vacunal por vía subcutánea, tal y como recomienda el fabricante, en la zona de la espalda.

2.2. Duración y estudios realizados

El estudio se realizó durante 21 meses post vacunación (mpv). A lo largo de este periodo, se analizaron los siguientes aspectos.

2.2.1. Seguimiento clínico y necropsias

Se llevó a cabo una evaluación del número de bajas durante el periodo de estudio independientemente de la causa, en las 190 cabras que formaban parte del estudio. En un total de 5 animales se pudo realizar un estudio *post mortem*: 1 cabrito del grupo 1,5MNV, 2 cabras del grupo AdultasNV y dos del AdultasV. En ellos, se realizó la necropsia, valoración de lesiones y toma de muestras, especialmente de las zonas de intestino delgado, con tejido linfoide intestinal, y nódulos linfáticos, para valorar la presencia de lesiones asociadas a la infección por Map. En el resto de los animales que cursaron baja, se consideró la información proporcionada por el ganadero, que incluía los signos clínicos en algunos casos, o incluso los resultados de la necropsia que normalmente era practicada por la veterinaria clínica de la explotación.

2.2.2. Valoración de la respuesta inmunitaria periférica

Para su valoración, además de la prueba de intradermotuberculinización (IDTB), se recogieron muestras de sangre de cada cabra, tanto vacunada como no vacunada, de todos los grupos de investigación, cada tres meses, en un total de 8 muestreos, denominados: M0 al que tuvo lugar en el día de la vacunación, y con números consecutivos hasta M7, el practicado a los 21 mpv (Figura III.1.). Las muestras de sangre se obtuvieron mediante una extracción en la vena yugular, empleando tubos Vacutainer® (Becton Dickinson, Plymouth, Reino Unido) de 10 ml con heparina (para la obtención de sangre entera) y sin heparina (para la obtención del suero). Tras la recogida, las muestras fueron transportadas hasta el laboratorio para proceder a su procesado.

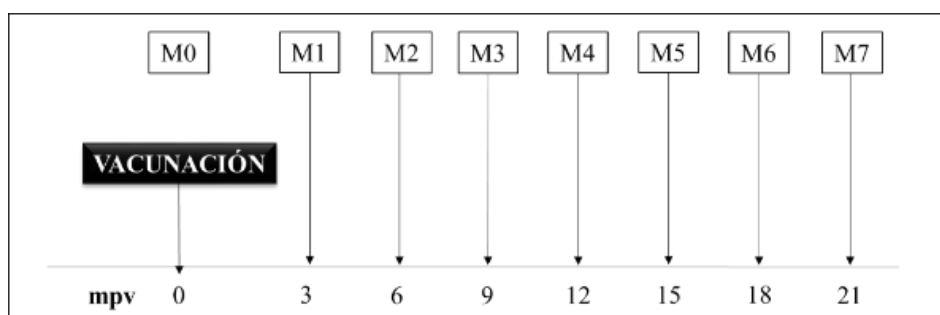


Figura III.1. Esquema del diseño del estudio y momentos de toma de muestras de sangre (M0 a M7). mpv: meses post vacunación.

2.2.2.1. Valoración de la respuesta inmunitaria celular

La respuesta inmunitaria celular se valoró mediante dos pruebas: la prueba de la liberación del gamma interferón (IGRA) y la IDTB.

El **IGRA** valora los niveles de producción del IFN- γ por los linfocitos sanguíneos, tras la incubación de las muestras con antígenos micobacterianos (Rothel *et al.*, 1990; Delgado *et al.*, 2013; Muñoz, 2014). Para ello, se emplearon las muestras de sangre extraídas en los tubos con heparina, que fueron procesadas dentro de las 4 horas posteriores a su recogida. Como antígenos para la estimulación *in vitro* de las células sanguíneas, se emplearon las PPD aviar y

bovina (CZ Veterinaria, Porriño, Pontevedra). Cada muestra de sangre completa se alicuotó en un volumen de 1,5 ml tubos de microcentrífuga de 2 ml (Eppendorf, Alemania) y cada alícuota se incubó con 100 μ l de PBS (control), 100 μ l de PPD aviar (20 μ g/ml) y con 100 μ l de PPD bovina (20 μ g/ml), respectivamente. Posteriormente, las muestras se homogeneizaron y se incubaron en una estufa a 37 °C en atmósfera humidificada durante un período de 20 - 22 horas. Tras este período de tiempo, se centrifugaron durante 5 minutos a 6000 revoluciones por minuto (rpm) y se recogió el plasma sobrenadante. Los plasmas fueron congelados a -20 °C hasta su posterior procesado.

En cada muestra, la cuantificación de la producción *in vitro* de IFN- γ se realizó por duplicado mediante un kit comercial de ELISA de tipo sándwich (doble anticuerpo monoclonal) (BOVIGAM®, Thermo Fisher Scientific, Waltham, EE.UU.). La realización de esta técnica se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante. A continuación, se detallan, brevemente, los pasos de los que constó esta técnica (Figura III.2.):

1. Se dispensaron 50 μ l de diluyente verde a todos los pocillos de la placa adsorbida con el anticuerpo monoclonal frente a IFN- γ (**anticuerpo de captura**). Después, se dispensaron 50 μ l de las muestras, 50 μ l de control positivo y 50 μ l de control negativo. Tanto las muestras como los controles se analizaron por duplicado.
2. Se homogeneizaron las muestras y se incubaron a temperatura ambiente (22 °C) en una cámara húmeda durante 60 minutos.
3. La placa se lavó 6 veces con la solución de lavado a 20X.
4. Se dispensaron 100 μ l de solución de trabajo de **conjugado** a 1X en cada pocillo. El conjugado a 100X (anticuerpo monoclonal anti-IFN- γ) fue diluido en el diluyente azul hasta obtener la dilución de 1X.
5. Se homogeneizaron las muestras y se incubaron a temperatura ambiente en una cámara húmeda durante 60 minutos.
6. La placa se lavó, nuevamente, 6 veces con la solución de lavado a 20X.

7. Se dispensaron 100 µl de solución de trabajo de **cromógeno** a 1X en cada pocillo. Previamente, el cromógeno suministrado a 100X fue diluido en el buffer substrato hasta la dilución de 1X.
8. Se homogeneizaron las muestras y se incubaron a temperatura ambiente en una cámara húmeda y en oscuridad durante 30 minutos.
9. Se dispensaron 50 µl de solución de frenado en cada pocillo.

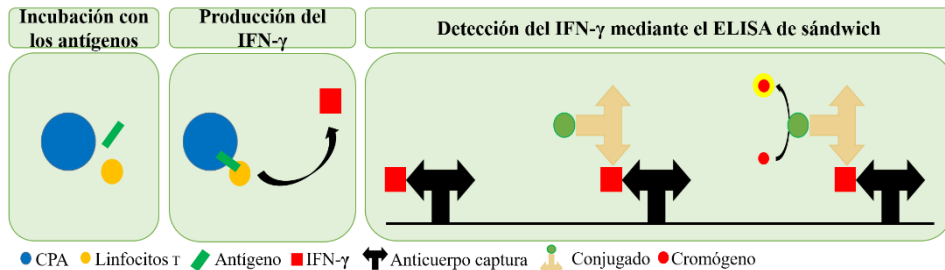


Figura III.2. Esquema representativo del procedimiento seguido en la técnica IGRA.

Finalmente, dentro de los 20 minutos posteriores a la aplicación de la solución de frenado, se procedió a la lectura de la absorbancia (DO) en un lector de placas (ELx800 Universal Microplate Reader®) con un filtro de lectura de 450 nm.

Una vez realizada la lectura, se validó el ensayo siguiendo las indicaciones del fabricante. El valor de absorbancia (DO) medio de los controles positivos debía ser superior a 0,700 y la de los controles negativos menor a 0,130. En aquellas dúPLICAS donde la diferencia entre ambas medidas fue superior al 30 %, se volvió a realizar la prueba.

Los resultados se expresaron como un “**índice de IFN-γ**” que se obtuvo mediante la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{DO media de cada muestra estimulada con la PPD}}{\text{DO media de cada muestra estimulada con el PBS}}$$

Para cada muestra, se obtuvieron dos índices de la producción de IFN-γ, uno frente a la PPD aviar y otro frente a la PPD bovina.

La otra prueba que se llevó a cabo para evaluar la respuesta inmunitaria celular fue la **IDTB comparada**. Esta prueba se realizó dos veces, a los 6 mpv y a los 18 mpv en todos los animales que participaban en el ensayo y fue practicada por los Servicios Veterinarios Oficiales siguiendo la normativa vigente y empleando como antígenos también, las PPD aviar y bovina (CZ Veterinaria, Porriño, Pontevedra). Antes de la inoculación, se medía el grosor de la piel en las tablas del cuello; una vez medido, se procedió a inyectar por vía intradérmica, 0,1 ml de cada una de las tuberculinas. El punto de inoculación de la PPD bovina y la aviar se situó a unos 12,5 cm y a unos 10 cm, respectivamente, de la línea superior del cuello, en el lado derecho del animal. A las 72 horas tras la prueba, se volvió a medir el grosor de la zona de la inoculación. Se consideraron animales positivos aquellos en los que la reacción frente a la PPD bovina fue superior en más de 4 mm a la reacción de la PPD aviar, dudosos aquellos en los que la diferencia era de entre 1 y 4 mm y negativos cuando el incremento de grosor de la piel en la zona de inoculación de la PPD bovina era menor al de la PPD aviar (MAPA, 2018).

2.2.2.2. Valoración de la respuesta inmunitaria humoral

La valoración de la producción de anticuerpos séricos frente a Map se analizó mediante una prueba de **ELISA indirecto**, siguiendo el protocolo descrito por Pérez *et al.* (1997). Esta prueba se realizó en las muestras de sangre obtenidas en tubos sin anticoagulante. Para ello, se empleó el antígeno protoplasmático PPA-3 de Map (Allied Monitor Lab Inc., EE.UU.) como diana de los anticuerpos frente a Map.

Tras la extracción de la sangre, las muestras se mantuvieron a temperatura ambiente durante 24 horas para facilitar la formación del coágulo. Posteriormente, se extrajo el suero que se almacenó en tubos de microcentrífuga de 2 ml a - 20 °C hasta su uso.

Tabla III.1. Soluciones de trabajo empleadas para la realización de la prueba ELISA indirecto.

Solución de trabajo	Reactivos	Solución de trabajo	Reactivos
Tampón carbonato pH 9,6	5,3 g de Na ₂ CO ₃	Solución de conjugado	8 µl de proteína G marcada con peroxidasa de rábano (Bio-Rad Laboratories. S.A., Barcelona)
	1000 ml de agua destilada		12 ml de PBS-TG
Solución del antígeno	0,04 mg de PPA-3	Tampón citrato pH 4	3,8 g de C ₆ H ₈ O ₇ x H ₂ O
	1 ml de tampón carbonato		3,52 g de C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇ x 2 H ₂ O
Solución salina de lavado	8,5 g de NaCl		500 ml de agua destilada
	5 ml de Tween 80	5,48 mg de ABTS (Sigma-Aldrich, España)	
	1000 ml de agua destilada	50 ml de tampón citrato	
Suspensión de <i>M. phlei</i>	5 g de <i>M. phlei</i>	Solución de sustrato	19 µl de agua oxigenada 1:25
	1000 ml de solución salina (NaCl al 0,85 %)		889,33 µl de 0,1 M HF (45%)
	1,8 g de H ₂ NaO ₄ P x H ₂ O		20 ml de agua destilada
PBS-TG pH 7,6	12,36 g de Na ₂ PO ₄	Solución de frenado	
	8,5 g de NaCl		
	993 ml de agua destilada		
	0,5 ml de Tween 80		

Previamente a comenzar el ELISA, se prepararon los diferentes reactivos que se emplearon en la técnica (Tabla III.1). Los sueros fueron descongelados y homogeneizados antes de su empleo. Los pasos de los que constó esta técnica fueron los siguientes (Figura III.3):

1. Se dispensó el **antígeno protoplasmático PPA-3** en la placa, de polietileno de fondo plano. Para ello, se dispensaron 100 µl en cada pocillo de la solución del antígeno. La placa adsorbida (placa final) se mantuvo en refrigeración a 4 °C durante toda la noche.
2. Mientras tanto, las muestras se diluyeron 1:1 (50 µl) con la suspensión de *Mycobacterium phlei* (con el fin de evitar posibles reacciones cruzadas), en una placa diferente a la placa adsorbida con el antígeno (placa inicial) que se dejaba incubar toda la noche en refrigeración a 4 °C.

3. Al día siguiente, la placa adsorbida con PPA-3 se lavó tres veces con la solución salina de lavado.
4. También al día siguiente, se tomaron 20 μl de las muestras incubadas con *M. phlei* (placa inicial) y se mezclaron con 180 μl de PBS-TG en otra placa no adsorbida (placa intermedia).
5. Se recogieron 20 μl de la solución de la placa intermedia que se dispensaron junto a 80 μl de PBS-TG en la placa final (adsorbida). De este modo, la dilución final de los sueros fue de 1:100.
6. Las muestras en la placa final (adsorbida) estaban por duplicado, además de los controles, positivo y negativo, sueros de valor conocido que se habían estandarizado previamente. La placa se incubó dos horas a temperatura ambiente (22 °C) en cámara húmeda.
7. La placa se lavó 3 veces con PBS-TG.
8. Se dispensaron 100 μl de solución de **conjugado** a cada pocillo.
9. Se incubaron las muestras durante 2 horas a temperatura ambiente en una cámara húmeda.
10. Se lavó la placa 3 veces con PBS-TG.
11. Se dispensaron 100 μl de la solución sustrato (**Cromógeno**) a cada pocillo.
12. Se incubaron las muestras de 15 a 20 minutos a temperatura ambiente en cámara húmeda a oscuras y en agitación.
13. Se añadieron 100 μl por pocillo de solución de frenado.

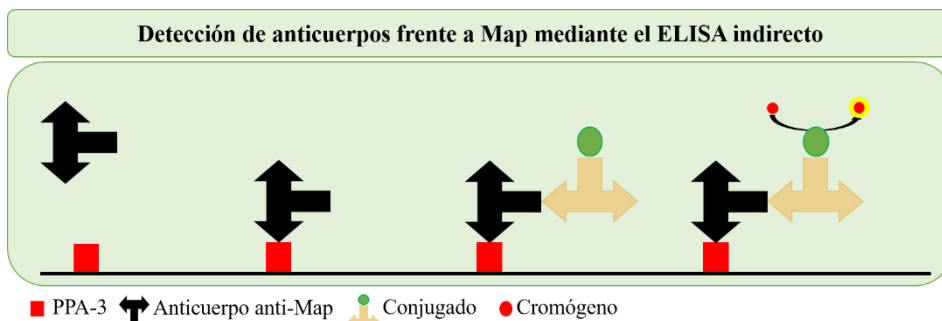


Figura III.3. Esquema representativo del procedimiento seguido en la técnica ELISA indirecto

Una vez realizado el procedimiento, se procedió a la lectura de los valores de la absorbancia (DO) en un lector de placas (ELx800 Universal Microplate Reader®) con un filtro de lectura de 405 nm.

Una vez realizada la lectura y obtenidos los valores de absorbancia, se calculó el “**índice de ELISA**” de cada muestra:

$$\frac{\text{DO media de cada muestra}}{\text{DO media del control positivo}} \times 1000$$

2.3. Análisis estadístico

Los datos de la producción de IFN- γ y de anticuerpos fueron sometidos a un análisis de varianzas empleando el método GLM (General Linear Model) del paquete estadístico SAS package (SAS Institute Inc., Cary, NC, Estados Unidos de América, 9.1). Para ello, se llevó a cabo la transformación logarítmica de los resultados de los índices ELISA e IFN- γ para que los mismos se ajustaran a una distribución normal. Las diferencias entre cada grupo experimental en cada muestreo fueron evaluadas mediante una prueba de t de Student para las medias ajustadas, empleando la corrección Tukey-Kramer para múltiples comparaciones. Los datos de tipo frecuencia referentes al número de bajas de animales en los distintos grupos experimentales, se analizaron mediante la prueba de chi-cuadrado y el test exacto de Fisher (si algún resultado esperado en el test de chi-cuadrado era inferior a 5). En todos los casos, se consideró un nivel de significación estadística del 0,05.

3. RESULTADOS

3.1. Evaluación del número de bajas

A lo largo del estudio (Tabla III.2.), se produjo un total de 19 bajas (un 10 % del total de animales controlados), repartidas en: 11 cabras que fueron baja el primer año (5.79 %) y 8 el segundo (4,47 %).

Tabla III.2. Número de bajas y porcentajes, distribuidos de acuerdo a cada grupo experimental y el período en el que se produjeron (1° o 2° año, y el total). AdultasV: vacunadas > 1,5 años; AdultasNV: no vacunadas > 1,5 años; 5MV: vacunadas a los 5 meses; 5MNV: no vacunadas a los 5 meses; 1,5MV: vacunadas a los 1,5 meses; 1,5MNV: no vacunadas a los 1,5 meses.

Grupos	N° animales 1° año	N° Bajas 1° año	% Bajas 1° año	N° animales 2° año	N° Bajas 2° año	% Bajas 2° año	Total bajas	% Total bajas
AdultasV	39	2	5,13	37	1	2,70	3	7,69
AdultasNV	38	3	7,89	35	4	11,43	7	18,42
5MV	40	2	5,00	38	1	2,63	3	7,50
5MNV	39	1	2,56	38	2	5,26	3	7,69
1,5MV	19	0	0,00	19	0	0,00	0	0,00
1,5MNV	15	3	20,00	12	0	0,00	3	20,00
Total	190	11	5,79	179	8	4,47	19	10,00

Cuando se considera el total de bajas de animales durante el periodo de estudio, en los grupos vacunados se produjeron 6 (6,12 %), mientras que en los no vacunados fueron 13 (14,13 %). Esta diferencia fue estadísticamente significativa al 90% ($p=0,0659$). Como pudo apreciarse, las pérdidas en todos los grupos no vacunados, tanto en el primer año como en el segundo, fueron superiores a las acontecidas en los grupos no vacunados, excepto en el grupo de cabras vacunadas a los 5 meses. En el segundo año, no hubo baja alguna en ninguno de los dos grupos de 1,5 meses de edad, vacunado (1,5MV) o no (1,5MNV). Sin embargo, fue en este mismo grupo (1,5M) donde existieron diferencias significativas ($p<0,05$) entre los lotes vacunados y los no vacunados, en el primer año, y en el cómputo total, ya que en el grupo 1,5MV no se produjo ninguna baja durante todo el estudio. En el resto de grupos, las diferencias no fueron significativas en ningún caso.

Respecto a la causa de las bajas, en el caso de los cabritos del grupo 1,5MNV, fueron procesos neumónicos, confirmados mediante necropsia, realizada en un caso, en la Facultad de Veterinaria, y en el resto por la veterinaria clínica. En el grupo de los 5 meses, en 3 animales (2 del grupo 5MV muertos durante el primer año), se confirmó muerte por septicemia hemorrágica (mannheimiosis), y otros dos por clostridiosis, muertos durante el segundo año (grupo 5MNV); en el

restante no se conoce la causa. Nunca se identificó paratuberculosis como causa de eliminación de animales en ningún grupo y solamente se encontraron lesiones macroscópicas subclínicas, asociadas a la infección por Map en dos cabras del grupo AdultasNV, de tipo focal o multifocal a, y en una cabra del grupo AdultasV, de tipo focal. En 4 cabras examinadas del grupo Adultas, se diagnosticó la muerte por una toxemia de gestación (V), o el desecho por mamitis (V y NV), y causa no identificada (NV). Las características de estas formas lesionales se han descrito en trabajos previos (Pérez *et al.*, 1996) y la metodología empleada para su caracterización se detallan en el siguiente Capítulo IV, apartado 2.4.1. (página 156)

3.2. Valoración de la respuesta inmunitaria periférica

3.2.1. Valoración de la respuesta inmunitaria celular.

La Figura III.4. muestra la evolución de la producción de IFN- γ tras la estimulación de la sangre con la **PPD aviar** a lo largo de los 21 mpv (8 muestreos) medida mediante el **IGRA**. Los valores obtenidos están expresados como el valor medio de los animales que formaban parte de cada grupo experimental. Los patrones de producción entre los tres grupos vacunados fueron similares. En los grupos de estudio existieron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre todos los grupos vacunados con los grupos no vacunados desde los 3 mpv hasta los 18 mpv, momento a partir del cual desaparecen. El nivel máximo de producción de esta citoquina se alcanzó a los 6 mpv en todos los grupos vacunados y fue diferente, a un nivel significativo ($p < 0,05$), de los grupos no vacunados.

En cuanto a los resultados en los distintos grupos, los niveles más elevados de IFN- γ se observaron entre los 6 y los 9 mpv en el grupo vacunado a los 5 meses, siendo estos valores diferentes significativamente del resto de grupos vacunados ($p < 0,05$), desapareciendo dichas diferencias a partir de los 9 mpv. También se dieron en este grupo las mayores diferencias con su respectivo lote no vacunado entre los 3 y los 12 mpv ($p < 0,001$) y a los 15 mpv ($p < 0,05$). Respecto al resto de grupos, la producción de IFN- γ en el grupo 1,5MV no

mostró diferencias significativas con el grupo 5MV a los 3 mpv, pero sí las hubo entre los 6 y 9 mpv ($p < 0,05$). El grupo AdultasV presentó niveles más bajos de esta citoquina que el grupo 1,5MV a los 3 mpv ($p < 0,05$) y que el lote 5MV desde los 6 a los 9 mpv ($p < 0,05$). A partir de los 9 mpv, no se observan diferencias.

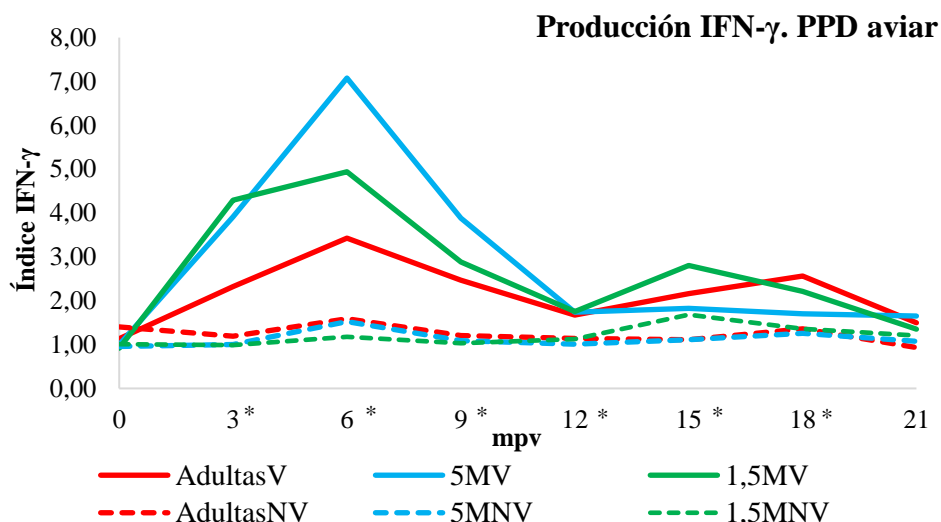


Figura III.4. Evolución de la producción de IFN- γ tras la estimulación de la sangre con la PPD aviar según cada grupo experimental. AdultasV: 1,5 años vacunadas; 5MV: 5 meses vacunadas; 1,5MV: 1,5 meses vacunadas; AdultasNV: 1,5 años no vacunadas; 5MNV: 5 meses no vacunadas; 1,5MNV: 1,5 meses no vacunadas. mpv: meses post vacunación. * diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los grupos vacunados y los no vacunados.

Cuando las muestras fueron estimuladas con la **PPD bovina**, la producción de IFN- γ siguió un patrón similar al observado tras la incubación con PPD aviar (Figura III.5.), pero siempre con valores significativamente más bajos en los grupos vacunados en todo el experimento ($p < 0,05$). En todos los lotes de cabras vacunados, los niveles de esta citoquina fueron significativamente más altos que en los no vacunados, entre los 3 y 21 mpv ($p < 0,05$). Respecto a los grupos de edad, también fue el 5MV el que mostró una mayor producción, con diferencias significativas con el lote AdultasV entre los 3 y 9 mpv, y con el 1,5MV a los 6 mpv ($p < 0,05$). Entre los grupos 1,5MV y AdultasV, solo hubo diferencias significativas ($p < 0,05$) en los muestreos realizados a los 3 y 9 mpv.

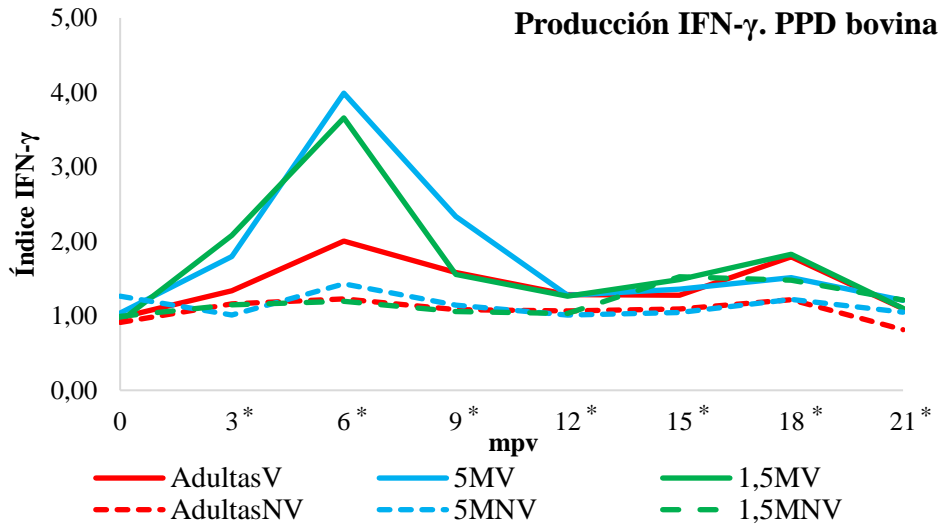


Figura III.5. Evolución de la producción del IFN- γ tras la estimulación de la sangre con la PPD bovina según cada grupo experimental. AdultasV: 1,5 años vacunadas; 5MV: 5 meses vacunadas; 1,5MV: 1,5 meses vacunadas; AdultasNV: 1,5 años no vacunadas; 5MNV: 5 meses no vacunadas; 1,5MNV: 1,5 meses no vacunadas. mpv: meses post vacunación. * diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los grupos vacunados y los no vacunados.

En cuanto a la prueba **IDTB comparada**, que se llevó a cabo en dos periodos de tiempo, a los 6 y a los 18 mpv, no se detectó ningún animal positivo en todo el estudio. En los animales vacunados, el incremento de grosor de la piel en la zona de inoculación de la PPD bovina fue inferior al incremento de la PPD aviar en un 96 % de los animales, y sin diferencias en el resto. Cuando solo se consideraba la medida del grosor cutáneo en el punto de inoculación de la PPD bovina, ningún animal llegó a alcanzar los 4 mm necesarios para ser considerado positivo en la IDTB simple.

3.2.2. Valoración de la respuesta inmunitaria humoral

La respuesta inmunitaria humoral se valoró mediante una técnica de **ELISA indirecto** (Figura III.6). Mediante esta técnica se pudo observar como la respuesta serológica se vio afectada por la vacunación, ya que los niveles de anticuerpos en los grupos vacunados fueron significativamente más elevados ($p < 0,05$) que, en los grupos no vacunados durante todo el experimento, desde los 3 mpv hasta los 21 mpv. Aunque, dentro de los grupos vacunados, los niveles de anticuerpos fueron también más elevados en el grupo 5MV, en este caso solo se

observaron diferencias significativas con el grupo 1,5MV, entre los 3-6 mpv ($p < 0,05$), y entre los 12-15 mpv ($p < 0,05$), y con el lote AdultasV a los 9-12 mpv ($p < 0,05$).

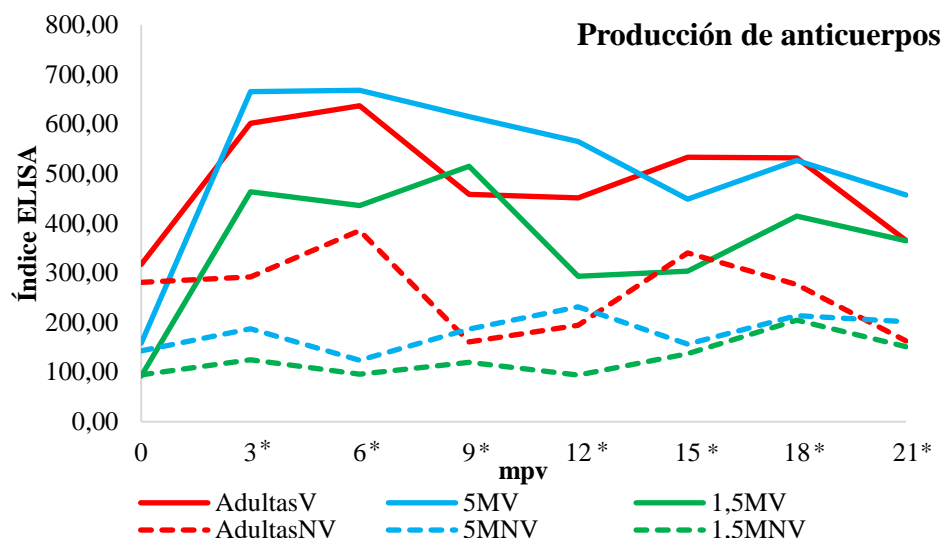


Figura III.6. Evolución de la producción de anticuerpos frente a Map según cada grupo experimental. AdultasV: 1,5 años vacunadas; 5MV: 5 meses vacunadas; 1,5MV: 1,5 meses vacunadas; AdultasNV: 1,5 años no vacunadas; 5MNV: 5 meses no vacunadas; 1,5MNV: 1,5 meses no vacunadas. mpv: meses post vacunación. * diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los grupos vacunados y los no vacunados.

4. DISCUSIÓN

Ante la escasez de trabajos que evalúen el empleo de la vacunación frente a paratuberculosis en condiciones de campo en la especie caprina, se planteó este estudio para conocer la respuesta inmunitaria periférica que ofrecen los animales vacunados y su efecto sobre el control de la enfermedad, en función de la edad de vacunación. El empleo de vacunas inactivadas ya había demostrado su eficacia al conseguir una disminución en el número de casos clínicos y una reducción en la excreción fecal de Map (Corpa *et al.*, 2000c; Fridriksdottir *et al.*, 2000; García-Pariente *et al.*, 2003; Alonso-Hearn *et al.*, 2012; Mercier *et al.*, 2014; Dhand *et al.*, 2016). En este estudio, no se observaron casos clínicos de paratuberculosis ni entre los animales vacunados ni entre los no inmunizados, por lo que no se puede afirmar que dicho efecto beneficioso se haya producido.

El hecho de que los índices ELISA de los animales estudiados al inicio del estudio no fuera muy elevado, sugiere que la prevalencia de la infección por Map en este rebaño concreto no fuera muy elevada, y por lo tanto no se pueda apreciar ese efecto de control de la enfermedad.

Aún teniendo lo anteriormente dicho en cuenta, hay que señalar que únicamente entre los animales de los grupos AdultasV y AdultasNV, a los que se les pudo hacer la necropsia, se observaron lesiones leves, bien focales o multifocales en dos cabras no vacunadas, y focal en una vacunada. En los animales examinados de otros grupos no se encontraron lesiones asociadas a la infección por Map. Estos resultados, apoyarían el efecto beneficioso de la vacunación en el control de la infección por Map, de forma que, como se ha señalado (Juste *et al.*, 1994; Pérez *et al.*, 1995; Corpa *et al.*, 2000c), se provocaría una limitación en la progresión de las lesiones hacia formas limitadas (focales), mientras que en los no vacunados podría seguir progresando. Debe tenerse en cuenta que el bajo número de animales examinados hace que la significación de estos resultados sea limitada. Además, la existencia de animales con lesiones focales que persisten durante incluso toda la vida productiva del animal, sin que intervenga la vacunación, se ha señalado repetidamente (García-Marín *et al.*, 1992; Corpa *et al.*, 2000a; González *et al.*, 2005; Delgado *et al.*, 2013).

Sin embargo, un resultado interesante de este estudio ha sido el efecto positivo que ha tenido la vacunación sobre la reducción general del número de bajas, por cualquier causa, que han sucedido en el rebaño durante el tiempo de estudio, de forma que, tras los 21 mpv, habían causado baja un 6,12 % de los animales vacunados, mientras que en el grupo no vacunado fueron baja el 14,13 %. En el seguimiento que Mercier *et al.* (2014) hacen de cabritas vacunadas al mes de edad, encontraron una reducción del 38 % en la eliminación de animales vacunados frente a los controles sin inmunizar, a lo largo de los 4 años tras la vacunación, si bien esa diferencia no es estadísticamente significativa y la asocian principalmente a la reducción del número de casos de paratuberculosis en el primer grupo. En nuestro estudio, sin embargo, no hubo casos clínicos de paratuberculosis en ninguno de los dos grupos, y fue entre los cabritos vacunados

a los 1,5 meses donde las diferencias fueron significativas, no así en los otros dos lotes. No se pudo comprobar la causa de muerte en todos los animales, si bien en el caso de las bajas sucedidas en el grupo 1,5MNV, ocurrieron durante los primeros 5 meses y se debieron a procesos neumónicos. En los animales que se pudieron examinar del resto de grupos, también había un número importante de individuos con procesos infecto-contagiosos (septicemia hemorrágica, clostridiosis, etc.).

En la especie humana, y en relación con la vacunación frente a tuberculosis con BCG, se observó también la existencia de una protección heteróloga (Kleinnijenhuis *et al.*, 2015), cuya duración se pudo comprobar que era más intensa los primeros 3 meses tras la vacunación y que iba disminuyendo con el tiempo, al menos hasta el año post vacunación (Kleinnijenhuis *et al.*, 2014). Se trataba de niños vacunados con BCG en los que se apreció una reducción general de la mortalidad no asociada a tuberculosis (Garly *et al.*, 2003; Vaugelade *et al.*, 2004) y en concreto, se ha señalado el menor número de muertes por neumonía en niños vacunados menores de un año (Niobey *et al.*, 1992). Estos resultados estarían completamente de acuerdo con los encontrados en nuestro estudio, en el cual el grupo de cabritos vacunados al mes y medio (1,5MV) es el que muestra una reducción más evidente de la mortalidad, en concreto, se comprobó que las bajas del grupo 1,5MNV se debían a neumonías.

Para explicar este fenómeno, se ha propuesto que la vacunación con BCG induciría lo que se ha denominado una respuesta inmunitaria “aprendida” o “entrenada” (Kleinnijenhuis *et al.*, 2015), que combinaría una inducción de la respuesta inmunitaria innata junto con la mediada por linfocitos T que responderían de forma heteróloga. Dicha respuesta se debería a una reprogramación epigenética de los monocitos y una mayor producción de algunas citoquinas como el factor de crecimiento epidérmico (EGF), IL-6 o el PDGF o factor de crecimiento derivado de plaquetas (Kleinnijenhuis *et al.*, 2012, 2014; Smith *et al.*, 2017). Recientemente, se han aportado evidencias de la existencia de este tipo de respuesta en tuberculosis bovina (Juste *et al.*, 2016a) pero esta aproximación no ha sido analizada en rumiantes, y menos aún en

relación con la vacunación frente a paratuberculosis. Por lo tanto, la implicación de este mecanismo, que podría ser lo que explicara los resultados de nuestro estudio, debería ser investigada en profundidad en un futuro.

Es de destacar que, en la especie humana, la existencia de esa inmunidad “entrenada” se ha comprobado en niños vacunados con BCG a los pocos meses (Netea *et al.*, 2011) y que en nuestro caso, el único grupo donde las diferencias en los animales muertos han sido estadísticamente significativas, fue en los vacunados a los 1,5 meses (1,5MV). Este resultado sugiere que este tipo de respuesta sucedería únicamente en animales muy jóvenes, con un sistema inmunitario no completamente desarrollado (Corpa *et al.*, 2000b). Esta hipótesis debería ser comprobada en, teniendo en cuenta que, en el resto de grupos, aunque las diferencias no fueron significativas, el número de cabras eliminadas fue mayor en los no vacunados.

Lo que sí se ha confirmado en este trabajo es que la vacunación induce una intensa respuesta inmunitaria periférica, tanto celular como humoral, medida por las técnicas IGRA y ELISA indirecto, respectivamente, como ya ha sido puesto de manifiesto previamente en diversos estudios, tanto en la especie caprina (Corpa *et al.*, 2000b; Hines II *et al.*, 2014; Mercier *et al.*, 2014) como en otros ruminantes (Juste *et al.*, 1994; Muñoz, 2014; Tewari *et al.*, 2014). En cuanto a la producción de IFN- γ tras la estimulación de los linfocitos sanguíneos con la PPD aviar, ya a los 3 mpv se observaron niveles significativamente superiores en los animales vacunados, que persistieron hasta los 18 mpv, y alcanzaron los niveles más elevados a los 6 mpv. Estos resultados estarían de acuerdo con los encontrados por Mercier *et al.* (2014), en cuyo estudio los niveles más altos aparecen a los 8,5 mpv, cuando se realizó su primer muestreo, y donde las diferencias desaparecieron a partir de los 23 mpv. Sin embargo, empleando la misma vacuna y pruebas de evaluación de la inmunidad periférica que en nuestro caso, Corpa *et al.* (2000a) encontraron que, a partir de los 9 meses ya no existieron diferencias asociadas a la vacunación en la producción de IFN- γ . La única diferencia respecto a nuestro trabajo es la raza de cabras empleada, Alpina en dicho estudio y Murciano-Granadina en nuestro caso. En otras especies, se ha

encontrado que la duración de la respuesta inmunitaria periférica celular fue de 7,5 mpv en corderos (Gwozdz *et al.*, 2000a), 9 mpv en terneros (Muñoz, 2014), 24 mpv en terneros (Köhler *et al.*, 2001) o 30 mpv en terneros (García-Pariente *et al.*, 2006). Respecto al tiempo que tarda en ser detectable dicha respuesta, en estudios experimentales también se ha comprobado que ya, al mes de la vacunación (Gwozdz *et al.*, 2000a; Muñoz, 2014), existe una mayor producción de IFN- γ .

Algo similar sucede con la respuesta inmunitaria humoral. En nuestro experimento se pudo observar como la producción de anticuerpos en los grupos vacunados fue significativamente superior a la de los grupos no vacunados a lo largo de todo el período de estudio. Estos resultados también estarían de acuerdo con los obtenidos por Mercier *et al.* (2014), donde a los 23 mpv ya no encontraron diferencias asociadas a la vacunación; en nuestro caso el estudio finalizó a los 21 mpv, antes de ese tiempo. Respecto al inicio de una respuesta inmunitaria humoral detectable, ya a los 3 mpv se detectó una mayor tasa de anticuerpos, al igual que se ha observado en otros estudios (Gwozdz *et al.*, 2000a; Hines II *et al.*, 2014).

En relación con el diagnóstico de la paratuberculosis en animales vacunados, nuestros resultados indican que la vacuna interfiere en las pruebas de diagnóstico, mediante el empleo de los test IGRA o ELISA indirecto, por lo menos hasta los 18 o 21 mpv, respectivamente. Resultados similares han sido también señalados previamente (Chartier *et al.*, 2012; Mercier *et al.*, 2014). En cuanto a la asociación entre la respuesta inmunitaria y la capacidad protectora de la vacuna, se considera que la respuesta de tipo celular sería la efectiva frente a Map (Chiodini, 1996; Begg y Griffin, 2005; Koets *et al.*, 2015), por lo que, al menos durante casi 2 años tras la vacunación, los animales estarían protegidos, según nuestros resultados. Sin embargo, hay numerosos estudios que señalan que la protección conferida por la vacuna dura mucho más tiempo, al menos toda la vida productiva del animal (Corpa *et al.*, 2000c; Eppleston *et al.*, 2005; Reddacliff *et al.*, 2006; Windsor, 2014; Dhand *et al.*, 2016), por lo que dicha capacidad no estaría en relación directa con la presencia valores altos de IFN- γ

producidos por linfocitos sensibilizados en sangre. Se sabe que la vacunación modifica la respuesta inflamatoria local, a nivel intestinal, hacia formas de protección (Juste *et al.*, 1994; García-Marín *et al.*, 1997), lo cual no tiene por qué estar necesariamente asociado a niveles elevados de IFN- γ en sangre circulante ya que, de hecho, muchos animales con lesiones focales asociadas a un control de la infección paratuberculosa y similares a las que ocasionaría el uso de vacunas, no ofrecen respuesta positiva al test IGRA (Vázquez *et al.*, 2013; Fernández *et al.*, 2014). En cualquier caso, en nuestro estudio, al no haberse encontrado efectos directos sobre una reducción de los casos de paratuberculosis, todo lo anteriormente explicado queda en el terreno de la especulación. En cuanto a la presencia de anticuerpos, en el caso de la administración de la vacuna, se han asociado a la presencia en el nódulo vacunal de gran cantidad de micobacterias, al igual que sucede en casos naturales de paratuberculosis, donde la respuesta inmunitaria de tipo humoral periférica se relaciona con las formas multibacilares, con gran cantidad de bacilos en el intestino y nódulos linfáticos (Chiodini *et al.*, 1984a; Pérez *et al.*, 1996, 1999; Burrells *et al.*, 1998; García-Marín *et al.*, 2000; Tanaka *et al.*, 2005; Brady *et al.*, 2008). Por ello, tradicionalmente, este tipo de respuesta no se ha asociado a protección frente a la infección por Map, a diferencia de la celular (Chiodini, 1996; Koets *et al.*, 2015), aunque recientemente, hay algún estudio que indica que sí podría jugar un cierto papel protector (Achkar y Casadevall, 2013).

Otro de los objetivos de este estudio ha sido conocer la influencia que tiene la edad de los animales, en el momento de vacunación, sobre la respuesta inmunitaria que ésta induce. Así, se ha comprobado que el grupo vacunado a los 5 meses fue el que manifestó una respuesta inmunitaria periférica más intensa, especialmente la de tipo celular, entre los 6 y 9 mpv, igualándose posteriormente con el resto de grupos. Estos resultados concuerdan con los encontrados por Corpa *et al.* (2000a), en un estudio en la misma especie, aunque con un menor número de animales. A continuación, son los cabritos del grupo 1,5MV los que ofrecieron una mejor respuesta, y la más baja se observó en el grupo AdultasV. Corpa *et al.* (2000a) señalaron que el mayor grado de maduración que alcanza el sistema inmunitario sería la posible causa de la mejor respuesta observada en los

individuos vacunados a los 5 meses que cuando tenían 15 días, lo que puede también haber ocurrido en nuestro estudio. Sin embargo, eso no explicaría los menores niveles encontrados en el grupo de cabras adultas vacunadas. En este sentido, resultados similares se han encontrado al emplear la vacuna BCG, y se ha postulado que sensibilizaciones previas por micobacterias ambientales, o en nuestro caso incluso Map, al tratarse de una explotación infectada, que ocurrirían con más frecuencia en animales adultos, podrían dar lugar a mecanismos de bloqueo o un enmascaramiento del efecto de la vacuna (Andersen y Doherty, 2005) que hacen que la respuesta frente a la vacunación en este tipo de individuos sea menor, lo que podría suceder en el caso de la paratuberculosis. Estos mecanismos serían tan intensos que mitigarían la mejor respuesta que podría dar un sistema inmunitario más maduro, presente en los animales adultos.

Teniendo en cuenta estos resultados, y considerando que una respuesta inmunitaria celular elevada se asociaría a una mejor respuesta protectora de la vacuna, la edad más recomendable para vacunar estaría en torno a los 5 meses. En nuestro estudio, no hemos podido comprobar si había diferencias en efectividad asociadas a la edad de vacunación, ya que en ningún grupo ha habido casos clínicos de paratuberculosis. Los estudios realizados hasta el momento han demostrado que la vacuna es efectiva si se administra en animales de alrededor de un mes, con la misión de conferir una protección a los animales ante los primeros contactos con Map, tanto en estudios experimentales (Juste *et al.*, 1994; Hasvold *et al.*, 2002) como de campo (Mercier *et al.*, 2014; Tewari *et al.*, 2014). Autores como Mercier *et al.* (2014), en un seguimiento de 4 años en cabritos vacunados al mes de edad, comprobaron que la vacunación inducía una reducción de casos clínicos y de la excreción fecal de Map. Resultados similares se han logrado también al vacunar cabras adultas ya infectadas (Corpa *et al.*, 2000c), donde la vacunación tendría un posible efecto terapéutico. Si bien en el ganado caprino no hay estudios de efectividad referenciados durante largo tiempo, en ganado ovino si existen, con resultados beneficiosos, tras el seguimiento de animales vacunados a los 5-6 meses, habiéndose recomendado en Australia la vacunación entre los 3 y los 8 meses de edad, por cuestiones de manejo (Windsor, 2006). Aunque la vacunación parece ser efectiva empleando

cualquier pauta, se desconoce si mejoran los efectos sobre el control si se vacunan animales alrededor de los 5 meses, ya que no se han llevado a cabo estudios comparativos en las mismas condiciones con distintos grupos de edad. En nuestro caso, donde sí se ha realizado esta comparación, no se han encontrado diferencias entre grupos, lo que apoyaría el uso de la vacuna en cualquier momento, si bien hay que tener en cuenta que tampoco en los grupos no vacunados se han encontrado casos clínicos de paratuberculosis.

Uno de los efectos perjudiciales de la vacunación frente a paratuberculosis es que ocasiona reacciones cruzadas en las pruebas de diagnóstico de la tuberculosis (Nedrow *et al.*, 2007; Pérez de Val *et al.*, 2012; Garrido *et al.*, 2013). En consonancia con este hecho, en nuestro estudio, se ha confirmado que la vacunación también induce la producción de IFN- γ tras la estimulación de los linfocitos sanguíneos con PPD bovina, como también se había observado en estudios previos (López Cruz *et al.*, 1999; Köhler *et al.*, 2001; Mercier *et al.*, 2014). Sin embargo, aunque la dinámica de producción de esta citoquina a lo largo de todo el estudio fue similar para la estimulación con PPD aviar o bovina, siempre los niveles fueron inferiores en el último caso. En otros estudios (Köhler *et al.*, 2001; Muskens *et al.*, 2002; Pérez de Val *et al.*, 2012), los resultados fueron similares, si bien en el de Mercier *et al.* (2014), durante los primeros 15,5 mpv, los niveles de IFN- γ alcanzados tras la estimulación con los dos antígenos fueron similares o incluso ligeramente superiores en el caso de la PPD bovina. Estas diferencias posiblemente puedan deberse a las distintas condiciones epidemiológicas del rebaño, con diferencias en cuanto a los niveles de infección por Map entre las explotaciones de ambos estudios, menor en nuestro caso.

El principal inconveniente de esta respuesta de los animales vacunados frente a paratuberculosis ante el estímulo con PPD bovina es la capacidad de ofrecer falsos positivos en las pruebas empleadas en las campañas de erradicación de la tuberculosis, principalmente la IDTB. En nuestro estudio, esas interferencias no se han producido en ningún caso, ya que ni en el primer análisis efectuado por parte de los equipos oficiales de saneamiento a los 6 mpv o el posterior a los 18 mpv, utilizando los criterios señalados por la OIE de otorgar un resultado

positivo si el incremento de grosor cutáneo era superior a los 4 mm (MAPA, 2018). Si bien se llevó a cabo la prueba de IDTB comparada, con la simple tampoco hubo reaccionantes. En un estudio realizado en Francia, también en la especie caprina (Chartier *et al.*, 2012), se comprobó que a los 8 mpv la media de incremento de grosor de la zona de inoculación de la PPD bovina era de 3 mm, aunque había animales que llegaban a alcanzar los 10 mm, por lo que, empleando la IDTB simple, hasta un 23 % de las cabras vacunadas fueron positivas, mientras que con la IDTB comparada, todas fueron negativas. Estos resultados indican que, si bien la vacunación puede interferir con la IDTB simple para el diagnóstico de la tuberculosis, lo haría en un número reducido de casos (que en nuestro estudio no hubo) y además esas reacciones irían disminuyendo con el tiempo. Como ya se ha señalado, la IDTB comparada puede ser una herramienta eficaz para diferenciar animales vacunados de paratuberculosis frente a animales infectados con tuberculosis (Garrido *et al.*, 2013), pero en las condiciones de este estudio, a partir de los 6 mpv, esas interferencias no se darían. Hay que tener en cuenta que en los trabajos anteriores (Chartier *et al.*, 2012; Garrido *et al.*, 2013) el número de animales que se estudian son notablemente superiores a los de este estudio, lo que posiblemente pueda haber influido en los resultados.

CAPÍTULO IV

**ESTUDIO DE LOS EFECTOS DE LA
VACUNACIÓN ANTES O DESPUÉS DE UNA
INFECCIÓN EXPERIMENTAL CON
Mycobacterium avium subspecies
paratuberculosis (Map) EN LA ESPECIE
CAPRINA**

1. INTRODUCCIÓN

La vacunación ha demostrado ser el método más efectivo en términos coste-beneficio para el control de la paratuberculosis (Bastida y Juste, 2011). Aunque ya en los primeros ensayos se realizó una vacunación masiva de animales de todas las edades (Vallée y Rinjard, 1926) con resultados satisfactorios, comúnmente se ha recomendado su aplicación durante los primeros meses de vida del animal, con el objetivo de buscar un efecto protector en los animales vacunados frente a los primeros contactos que se produzcan con Map (Juste *et al.*, 1994; García-Marín *et al.*, 1997; Sweeney *et al.*, 2009; Mercier *et al.*, 2014; Tewari *et al.*, 2014). Por otro lado, hay varios estudios, en las especies ovina y caprina, en los que se han vacunado animales adultos, presumiblemente ya infectados, donde también se ha conseguido una reducción de la aparición de nuevos casos clínicos (Crowther *et al.*, 1976; Pérez *et al.*, 1995; Corpa *et al.*, 2000c; García-Pariente *et al.*, 2003; Alonso-Hearn *et al.*, 2012; Santema *et al.*, 2013), lo que unido a que haya evidencias experimentales de que la vacunación no previene la infección por Map, pero sí modifica el curso de la infección, de manera que los animales vacunados muestran formas latentes asociadas a protección frente al desarrollo de la enfermedad clínica (Juste *et al.*, 1994; Pérez *et al.*, 1995; Windsor, 2006; Juste y Pérez, 2011; Muñoz, 2014), ha permitido proponer la hipótesis de que la vacunación tendría un efecto terapéutico (Pérez *et al.*, 1995; Corpa *et al.*, 2000c; Alonso-Hearn *et al.*, 2012; Santema *et al.*, 2013). Sin embargo, este posible efecto no se ha demostrado en condiciones experimentales controladas, empleando las vacunas comerciales que se utilizan en la actualidad.

Por ello, se diseñó este estudio experimental en cabritas, con el **objetivo** de evaluar el efecto que ejerce la vacunación de paratuberculosis antes o después de la infección por Map, sobre la respuesta inmunitaria periférica y local, el desarrollo de lesiones y la colonización de tejidos y heces por esta micobacteria.

Como modelo experimental se empleó la especie caprina, por ser (al igual que la especie bovina) muy sensible, no solo a la infección por Map, sino también a

otras micobacterias como *M. caprae*, agente causal de la tuberculosis caprina (Napp *et al.*, 2013). Se empleó como agente inmunógeno Silirum®, vacuna inactivada registrada para su uso en la especie bovina. El diseño experimental constó de una primera vacunación en cabritos de 1-1,5 meses de edad y una infección 30 días después. Se llevaron a cabo dos sacrificios, uno a los 120 dpi (150 dpv) y un segundo a los 330 dpi (360 dpv). El primer sacrificio tuvo como objetivo comprobar el efecto de la vacunación antes del desafío con Map, ya que, en estudios previos (Juste *et al.*, 1994; Hines II *et al.*, 2007b; Verna *et al.*, 2007) se había observado que, a los 120 dpi, ya se puede detectar una respuesta inmunitaria en los animales y lesiones microscópicas. Posteriormente, en animales ya infectados a los 0 dpi, se realizó una segunda vacunación, a los 150 dpi, con el fin de valorar su efecto sobre ellos.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Selección de animales y diseño experimental

Para llevar a cabo el desafío con Map y la vacunación en condiciones experimentales, se seleccionaron 35 cabritos de entre 1 mes (30 días) y un mes y medio (45 días) de vida, de una explotación caprina de la raza murciano-granadina, en régimen intensivo de producción láctea, libre de tuberculosis en la cual todas las cabras madres de los cabritos incluidos en el estudio fueron negativas a las pruebas IGRA y ELISA indirecto frente a paratuberculosis.

Los cabritos fueron alojados en las instalaciones del Instituto de Ganadería de Montaña (IGM)-CSIC-ULE destinadas al mantenimiento de animales en condiciones experimentales. Durante 15 días fueron sometidos a un proceso de aclimatación a su nuevo alojamiento. Los animales fueron alimentados con una dieta adecuada a su edad.

Previamente a la realización del desafío los animales se separaron en 6 lotes experimentales que se alojaron en boxes independientes (Tabla IV.1.):

–VI: 8 cabritos vacunados a los -30 dpi e infectados a los 0 dpi.

- VNI: 4 cabritos vacunados a los -30 dpi, pero no infectados.
- NVI: 9 cabritos no vacunados, pero sí infectados a los 0 dpi.
- IV: 5 cabritos infectados a los 0 dpi y vacunados a los 150 dpi.
- NIV: 2 cabritos no infectados, pero sí vacunados a los 150 dpi.
- NVNI: 7 cabritos no vacunados no infectados

Tabla IV.1. Distribución de los animales en los distintos grupos experimentales según el momento en el que fueron vacunados, desafiados o sacrificados.

Grupo	Nº total de cabritos	Vacunados -30 dpi	Infectados 0 dpi	1º Sacrificio 120 dpi	Vacunados 150 dpi	2º Sacrificio 330 dpi
VI	8	8	8	3	-	4 ^A
VNI	4	4	-	2	-	1 ^B
NVI	9	-	9	5 ^C	-	3
IV	5	-	5	-	5	5
NIV	2	-	-	-	2	2
NVNI	7	-	-	2	-	1 ^D
Total	35	12	22	12	7	16

^A 1 cabrito de este grupo fue baja a los 245 dpi. ^B 1 cabrito de este grupo se retiró del estudio el día 186 dpi. ^C 1 cabrito de este grupo se retiró del estudio el 96 dpi. ^D 4 cabritos de este grupo se retiraron del estudio a los 238 dpi, 277 dpi, 302 dpi y 315 dpi.

El diseño experimental del estudio se detalla en la Figura IV.1., donde se observan las dos vacunaciones que se realizaron, a los -30 dpi y 150 dpi, y el desafío experimental a los 0 dpi, así como los momentos de los diferentes muestreos *in vivo* y los sacrificios.

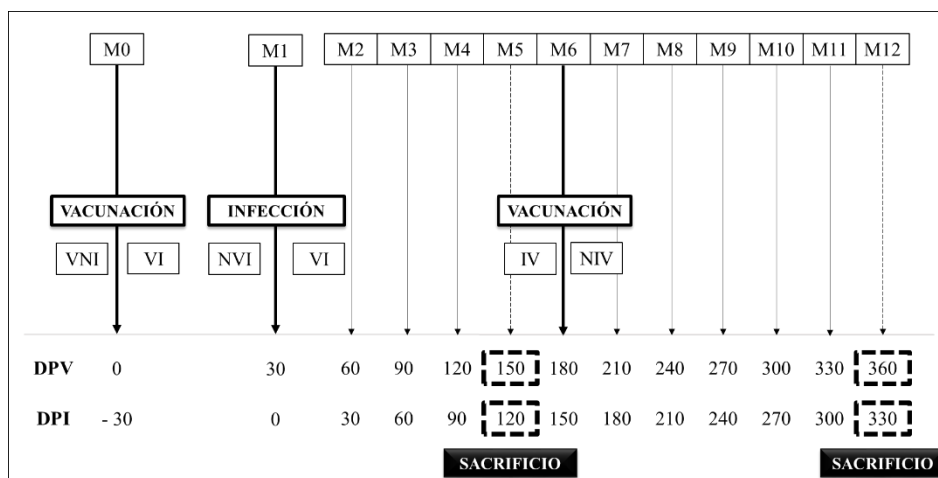


Figura IV.1. Esquema del diseño experimental. M: muestreo; DPV: días post vacunación; DPI: días post infección; VNI: vacunado a los -30 dpi y no infectado; VI: vacunado a los -30 dpi e infectado; NVI: no vacunado, pero sí infectado; IV: infectado y vacunado a los 150 dpi; NIV: no infectado, pero sí vacunado a los 150 dpi.

A lo largo del estudio se tomaron muestras de sangre para los estudios *in vivo*, que se detallan posteriormente, encaminados fundamentalmente a valorar la respuesta inmunitaria periférica, a los 0 y 30 dpv, y posteriormente cada treinta días. Hasta el momento de la segunda vacunación a los 150 dpi, los 5 cabritos del grupo IV estaban incluidos dentro del grupo NVI y los 2 cabritos del grupo NIV estaban incluidos dentro del grupo NVNI.

Además, se llevaron a cabo dos sacrificios, el primero a los 120 dpi y el segundo a los 330 dpi, en los que se procedió a la necropsia completa y a la toma de muestras de tejido para su examen histológico, cultivo bacteriológico y detección de ácidos nucleicos de Map mediante PCR, así como a la extracción de linfocitos para la valoración de la respuesta inmunitaria local. Cada técnica y las muestras recogidas van a ser descritas en su correspondiente apartado.

Como se señala en la Tabla IV.1., en total hubo 7 cabritos que causaron baja en diferentes momentos debido a la aparición de signos clínicos graves no asociados al desafío con Map y que tuvieron que ser sacrificados por razones humanitarias. A pesar de ello, se les realizó una necropsia completa para determinar la causa de la muerte (urolitiasis en la mayor parte de los casos), pero

las muestras de tejido obtenidas no fueron tomadas en cuenta para los resultados del experimento.

Todos los procedimientos experimentales llevados a cabo se ajustaban a las recomendaciones de la directiva 2010/63/UE del Parlamento Europeo y al RD 53/2013 por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos y fueron revisados por el Comité de Bioética y Experimentación Animal del IGM. Tras su evaluación positiva por parte del Subcomité para la Experimentación y Bienestar Animal de la Universidad de León, fueron aprobados por la Junta de Castilla y León. Todos los animales empleados en este estudio fueron manejados de acuerdo a los protocolos clínicos ya establecidos y tratando en todo momento de minimizar su sufrimiento.

2.2. Vacunación y desafío

Las dos **vacunaciones** se realizaron con la vacuna inactivada Silirum® (CZ Veterinaria, Porriño, Pontevedra) elaborada a partir de la cepa 316F inactivada por calor y con un adyuvante de aceite mineral de alto refinamiento. Los animales fueron inmunizados según el diseño experimental (Tabla IV.1.) con 1 ml del producto vacunal por vía subcutánea en la zona de la espalda, como recomienda el fabricante.

El **inóculo** empleado para el desafío se elaboró en el Departamento de Sanidad Animal de Neiker-Tecnalia (Derio, Vizcaya/Bizkaia), por los Dres. Elguezabal y Sevilla, y fue obtenido a partir de un cultivo de la cepa de referencia K-10 de Map, que se engloba dentro de las cepas de origen bovino o de tipo C. Tras su siembra en el medio Middlebrook 7H9 suplementado con OADC (Becton Dickinson, Franklin Lakes, EE.UU.), Tween 80, glicerol y micobactina J (Allied Monitor, Fayette, EE.UU.) durante 4-5 semanas a 37 °C, se recogió el cultivo por centrifugación a 2.800 g durante 1 minuto. El sedimento se lavó dos veces en PBS y se resuspendió en PBS. En total, se consiguió un inóculo que contenía 10⁹ micobacterias/ml, cuya concentración fue medida valorando la turbidez de la suspensión (unidades de McFarland), empleando el densitómetro

Densimat (BioMérieux, Marcy l'Etoile, Francia) y considerando una unidad de McFarland como 10^8 células/ml (Hughes *et al.*, 2001). La cantidad total a inocular fue de $1,2 \times 10^{10}$ micobacterias por animal. Esta dosis total fue dividida en cuatro tomas de 10 ml cada una con una concentración de $0,3 \times 10^{10}$ micobacterias por animal suspendidas en 10 ml de PBS. El inóculo se administró por vía oral, mediante una sonda esofágica acoplada a una jeringa automática (Hauptner, Alemania).

2.3. Estudios *in vivo* realizados

2.3.1. Valoración de la respuesta inmunitaria periférica

Con el fin de evaluar la respuesta inmunitaria específica frente a Map, se recogieron muestras de sangre de todos los cabritos, en un total de 13 muestreos mensuales, denominado M0 al que tuvo lugar treinta días antes de la infección (-30 dpi), y con números consecutivos hasta M12, el practicado a los 330 dpi (Figura IV.1.). Estas muestras se tomaron mediante la punción en la vena yugular, empleando tubos Vacutainer® (Becton Dickinson, Plymouth, Reino Unido) de 10 ml con heparina (para la obtención del plasma) y sin heparina (para la obtención del suero tras la coagulación). Tras la recogida, las muestras fueron transportadas hasta el laboratorio para proceder a su procesado.

2.3.1.1. Valoración de la respuesta inmunitaria celular

La respuesta inmunitaria celular se evaluó en todos los cabritos mediante dos técnicas diferentes, IGRA y la IDTB comparada. El **IGRA** se empleó para valorar los niveles de producción del IFN- γ por los linfocitos sanguíneos, tras la incubación de las muestras con antígenos micobacterianos (Pérez *et al.*, 1999; Delgado *et al.*, 2013; Muñoz, 2014; Fernández *et al.*, 2015). El protocolo detallado de la técnica se explica en el Capítulo III apartado 2.2.2.1. (página 118). Brevemente, las muestras de sangre extraídas en los tubos con heparina fueron procesadas dentro de las 4 horas posteriores a su recogida y se incubaron con los antígenos PPD aviar y bovina (CZ Veterinaria, Porriño, Pontevedra), a 37 °C en atmósfera humidificada durante un período de 20-22 horas. Tras ello, el plasma

sobrenadante fue congelado a -20 °C hasta su posterior procesado. La cuantificación de la producción *in vitro* de IFN- γ se realizó mediante un kit comercial de ELISA de tipo sándwich o de captura (BOVIGAM®, Thermo Fisher Scientific, Waltham, EE.UU.). Los resultados se expresaron como un “índice de IFN- γ ”, obtenido tal y como se explica en el Capítulo III apartado 2.2.2.1. (página 118) de esta Tesis Doctoral.

En el caso de la **IDTB comparada**, se realizó en todos los cabritos a los 90 dpi (120 dpv), un mes antes del primer sacrificio (120 dpi). Esta prueba fue practicada bajo la supervisión de los servicios veterinarios del IGM (CSIC-ULE) siguiendo la normativa vigente (MAPA, 2018) y empleando como antígenos también las PPD aviar y bovina (CZ Veterinaria, Porriño, Pontevedra) y la johnina (Neiker-Tecnalia, Derio, Vizcaya/Bizkaia). Antes de la inoculación, se midió el grosor de la piel en las tablas del cuello con un cutímetro; una vez valorado y por vía intradérmica, se procedió a inyectar 0,1 ml de los diferentes antígenos. El punto de inoculación de la PPD bovina se situó a unos 12,5 cm de la línea superior del cuello y la PPD aviar a unos 10 cm, ambas tuberculinas se inocularon en el lado derecho del animal. La johnina se inoculó en el lado izquierdo en la misma posición que la PPD bovina. A las 72 horas tras la prueba, se volvió a medir el grosor de la zona de la inoculación. Un animal se considera como positivo a la IDTB comparada cuando la reacción frente a la PPD bovina es superior en más de 4 mm a la reacción de la PPD aviar, dudoso cuando la diferencia es de entre 1 y 4 mm y, por último, negativo cuando el incremento de grosor en la zona de inoculación de la PPD bovina es menor al de la PPD aviar. Con respecto a la IDTB simple, un animal sería considerado como reaccionante positivo cuando el incremento de la PPD bovina fuera igual o superior a 4 mm; dudoso cuando ese incremento oscila entre 2 y 4 mm; y negativo, cuando el incremento fuera como máximo 2 mm (MAPA, 2018).

2.3.1.2. Valoración de la respuesta inmunitaria humoral

El análisis de la respuesta humoral se realizó mediante la detección de anticuerpos serológicos específicos frente a Map que fueron cuantificados empleando la técnica **ELISA indirecto**, siguiendo el protocolo descrito por Pérez *et al.* (1997) y que se detalla en el Capítulo III apartado 2.2.2.2. (página 121). Brevemente, las muestras de sangre recogidas en los tubos sin anticoagulante fueron almacenadas a temperatura ambiente durante 24 horas para que se formara el coágulo. Al día siguiente, se extrajo el suero que se almacenó en tubos de microcentrífuga a -20 °C hasta su uso. En esta técnica, se empleó el antígeno protoplasmático PPA-3 de Map (Allied Monitor Lab Inc., EE.UU.) y una adsorción previa de los sueros con *Mycobacterium phlei* para evitar inespecificidades. Los resultados se expresaron como un “índice ELISA”, obtenido tal y como se explica en el Capítulo III apartado 2.2.2.2. (página 121) de esta Tesis Doctoral.

2.3.1.3. Caracterización de las subpoblaciones linfocitarias en sangre periférica

La **citometría de flujo** es una técnica que permite clasificar y cuantificar las poblaciones celulares según su tamaño y complejidad. Además, mediante el uso de anticuerpos específicos y el marcado fluorescente de antígenos concretos, se puede conocer el porcentaje de cada una de las subpoblaciones celulares presentes en la muestra. En este estudio se realizó una extracción de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) para su posterior análisis mediante citometría de flujo y cuantificación de subpoblaciones linfocitarias.

2.3.1.3.1. Toma de muestras

Una semana antes de cada sacrificio, se recogieron 20 ml de sangre de la vena yugular, en tubos Vacutainer® con heparina (Becton Dickinson, Plymouth, Reino Unido), de los 12 animales que fueron eutanasiados en el primer sacrificio a los 120 dpi y de los 14 cabritos que se examinaron a los 330 dpi. En el segundo

de los sacrificios, no fue posible realizar la prueba de citometría de flujo a dos animales del grupo VI.

2.3.1.3.2. Extracción de PBMCs

Los 20 ml de sangre heparinizada se mezclaron con 25 ml de PBS y se homogeneizaron. A continuación, se describen los pasos que se siguieron en la técnica de extracción de PBMCs:

1. La mezcla se centrifugó durante 20 min, a 1800 rpm a 21 °C.
2. Después de la centrifugación, se recogió la capa de células blancas (5 ml aproximadamente) con una pipeta Pasteur estéril y se añadió cuidadosamente sobre el tubo con 7 ml de Lymphoprep® (Stemcells Technologies, Canadá). Para que no se mezclasen las fases, el tubo se inclinó hasta ponerlo más o menos horizontal y la mezcla se fue echando sobre el lateral del tubo.
3. La suspensión se centrífugo durante 30 minutos a 2100 rpm, a 21°C, desactivando los frenos de la centrifuga, de forma que la desaceleración se produjera de forma suave y sin vibraciones.
4. Con una pipeta Pasteur estéril, se recogió la capa de células blancas (5 ml aproximadamente) y se pasó a un tubo con 25 ml de medio HBSS (Tabla IV.2.) (Solución de lavado) a 4 °C.
5. Las muestras se lavaron mediante una centrifugación durante 10 minutos a 1100 rpm a 4 °C.
6. Se tiró el sobrenadante y se agitó el pellet para disgregarlo. Si el pellet contenía muchas células rojas, se añadían 10 ml de agua destilada con bicarbonato (Tabla IV.2.) y se completó hasta los 25 ml con el HBSS.
7. Se centrifugó durante 10 minutos, a 1100 rpm a 4 °C. Se repitió el lavado con 25 ml de HBSS y la centrifugación dos veces más. Antes de cada lavado, se homogeneizaba el pellet.

Finalmente, el pellet, con los PBMCs, se resuspendió en una cantidad entre 3 y 5 ml de RPMI-SFB (Tabla IV.2.), dependiendo del tamaño del pellet de forma que cuanto mayor fuera, más cantidad de RPMI-SFB se añadía. El número de PBMCs se cuantificó mediante un sistema automático de recuento celular

(TC10™System, BIORAD). Finalmente, se ajustó la concentración de la suspensión celular a 2×10^6 células/ml.

Tabla IV.2. Soluciones de trabajo empleadas en la extracción de PBMCs.

Solución de trabajo	Reactivos
RPMI-SFB 100 ml	89 ml de RPMI (Axis-Shield, Oslo, Noruega)
	10 ml de Suero fetal bovino (Gibco®, Invitrogen™, EEUU)
	1 ml de una mezcla comercial de antibióticos+ antimicóticos (Gibco®, Invitrogen™, EE.UU) (10000 U/ml Penicilina, 1000 µg/ml Estreptomicina, 25 µg/ml Anfotericina)
Medio HBSS 550 ml	50 ml de medio HANKS (Sigma Aldrich, Sant Louis, EE.UU.)
	450 ml de agua destilada + bicarbonato.
Agua destilada + Bicarbonato 1000 ml	5 ml de antibiótico + antimicótico (10000 U/ml Penicilina, 1000 µg/ml Estreptomicina, 25 µg/ml Anfotericina) (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, EE.UU.)
	1000 ml de agua destilada
	0,35 g de bicarbonato sódico

2.3.1.3.3. Marcado inmunofluorescente de los linfocitos

Se emplearon 4 anticuerpos primarios monoclonales (AbD Serotec, Reino Unido) frente a diferentes antígenos linfocitarios: el 17D1 para la caracterización de linfocitos T CD4⁺, MCA2216GA frente al antígeno presente en linfocitos T CD8⁺, MCA838G para la detección de linfocitos T δγ (WC1) y el anticuerpo MCA1195 frente al receptor CD21 de los linfocitos B. Cada anticuerpo fue empelado a una concentración diferente (previamente comprobadas): la empleada para detectar linfocitos T CD4⁺ y T CD8⁺ fue de 1:500, para el anticuerpo frente a WC1 fue 1:50 y el CD21, 1:5. Posteriormente, se empleó un anticuerpo secundario marcado con un fluorocromo FITC (Dako Agilent, Santa Clara, EE.UU.) a una concentración de 1:50. En cada ensayo se incluían dos controles de la prueba: un “blanco” (sólo de células) y un control de la fluorescencia (únicamente con el anticuerpo secundario). El desarrollo de esta técnica se realizó siguiendo el protocolo descrito por Corpa *et al.* (2001), que se detalla a continuación:

1. Se dispensó 1 ml de la mezcla de PBMCs con RPMI-SFB a la concentración indicada previamente (2×10^6), a cada uno de los tubos de citometría (Dako Agilent, Santa Clara, EE.UU.). Se emplearon un total de 6 tubos (uno por cada anticuerpo más los dos controles).
2. Las muestras se centrifugaron a 800g, a 4°C durante 3 minutos tras lo que se eliminó el sobrenadante y se homogeneizó el sedimento.
3. Para la incubación con los anticuerpos primarios, se emplearon 50 µl de cada uno de los anticuerpos en su correspondiente tubo de citometría, a la concentración previamente descrita. A los dos controles se les añadieron 50 µl PBS en sustitución del anticuerpo primario.
4. Las muestras se incubaron una hora a 4 °C en oscuridad y posteriormente se centrifugaron a 800 g durante 3 minutos, a 4°C.
5. Se procedió a dos lavados de 500 µl de PBS, con una posterior centrifugación a 800 g durante 3 minutos a 4 °C. Después de cada lavado, se eliminó el sobrenadante y se homogeneizó el pellet.
6. Se añadieron 50 µl de anticuerpo secundario en cada tubo, realizándose una incubación de 30 minutos a 4°C en oscuridad.
7. Las muestras se centrifugaron a 800 g durante 3 minutos a 4 °C, se lavaron dos veces con 500 µl de PBS y se centrifugaron a 800g durante 3 minutos a 4 °C. Después de cada lavado, se eliminó el sobrenadante y se homogeneizó el sedimento.
8. Finalmente, se resuspendió en 150 µl de PBS para su inmediata lectura en el citómetro de flujo CyAn ADP con el empleo del software Summit (Dako, Santa Clara, EE.UU.).

2.3.1.3.4. Caracterización de subpoblaciones linfocitarias en el citómetro de flujo

El recuento de células y su separación se realizó empleando el citómetro de flujo CyAn ADP (Beckman Coulter) disponible en el Servicio de Microscopía de la Universidad de León. Para la adquisición de las células y posterior análisis de los datos, se empleó el programa informático Summit 4.3 (Dako, Dinamarca). Las células se identificaron por sus características de tamaño (Forward scatter,

FSC) y complejidad o granularidad (Side scatter, SSC), mostrándose los resultados en una gráfica de puntos. Una vez identificada la región correspondiente a los linfocitos, se realizaba el recuento de un total de 10.000 de estas células. Posteriormente, el porcentaje de células (linfocitos) marcadas por cada anticuerpo monoclonal sobre el total de PBMCs, se calculaba en función de la fluorescencia que emitían, que era analizada mediante un histograma que recogía la intensidad de fluorescencia emitida por el fluorocromo FITC (eje de abscisas) y el número de células contadas (eje de ordenadas). Para ello, se seleccionaban las zonas que delimitaban la fluorescencia inespecífica y la específica, y el porcentaje de cada subpoblación linfocitaria se obtenía al restar la fluorescencia inespecífica obtenida en cada muestra, de la fluorescencia específica de cada población de células marcadas con el anticuerpo. La interpretación de los datos se llevó a cabo mediante el Flowing Software 2.5.1 proporcionado de manera gratuita por la Universidad de Turku (Turku, Finlandia).

2.3.2. Cultivo de Map en muestras de heces

El estudio de la excreción fecal de Map se realizó mediante el aislamiento y la identificación de bacterias viables en cultivo bacteriológico a partir de las muestras de heces recogidas directamente del recto de cada cabrito tres veces a lo largo del experimento: treinta días antes de la infección (-30 dpi, M0) y en los muestreos previos a los sacrificios, 120 dpi (M5) y 330 dpi (M12). Las heces se recogieron empleando guantes y se conservaron -20 °C hasta su posterior procesado, que se llevó a cabo en las instalaciones de Neiker-Tecnalia (Derio, Vizcaya/Bizkaia).

2.3.2.1. Medios de cultivo empleados

Las muestras se sembraron por duplicado en dos tipos de cultivo diferentes: Middlebrook 7H9 y en el HEYM, ya que son los medios más empleados para el aislamiento de Map, especialmente de las cepas de tipo C o bovinas. Ambos medios fueron suplementados con micobactina J (Allied Monitor, Inc., Fayette,

EE.UU.). La cantidad y tipos de reactivos empleados en la fabricación de cada medio de cultivo, se describe en la Tabla IV.3.

Para la elaboración del medio **Middlebrook 7H9**, se mezclaron la glicerina, el bacto Agar, el medio base 7H9 y el agua destilada en una botella de 2 litros que fue calentada, para una correcta dilución. Después se autoclavó a una temperatura de 120 °C durante 15 minutos y se dejó atemperar a 70 °C durante todo un día. Al día siguiente, la botella con el medio de cultivo se introdujo en un baño maría, para lograr una temperatura de 60 °C y que los antibióticos no dejaran de ser efectivos. Como antibióticos, se añadieron la anfotericina y el cloranfenicol que se mezclaron bien y finalmente, se añadieron el OADC, la micobactina J (previamente resuspendida en etanol) y la penicilina.

A continuación, se dispensaron 8,5 ml del medio de cultivo en los tubos de cristal estériles donde se iba a sembrar Map, evitando la formación de burbujas. Los tubos se trasladaron a una estufa a 90 °C donde se dejó solidificar el medio, sin llegar a cerrar los tapones, para evitar la condensación. A los dos días, se procedió al cerrado completo, hasta su posterior empleo.

El medio de cultivo **HEYM** es a base de huevo. Dicho medio se compone de: agua destilada, glicerina, bacto Agar, peptona, cloruro sódico, extracto de buey y piruvato sódico. Estos reactivos se mezclaron y calentaron, para conseguir una correcta disolución de los mismos en el agua destilada. Posteriormente, se ajustó el pH a 7,0 - 7,2 y la botella se autoclavó con todos los componentes durante 15 minutos a 121 °C. Mientras tanto, se sumergieron los huevos frescos durante dos horas en etanol para conseguir su esterilización y finalmente, se recogieron las yemas. Tras el autoclavado, la botella se atemperó durante todo un día a 70 °C. y, al día siguiente, se introdujo en un baño maría para conseguir una temperatura de 60 °C, y se añadieron los antibióticos: la anfotericina, el cloranfenicol y la penicilina. Una vez disueltos, se incorporaron las yemas y se agitó hasta que el medio de cultivo quedó correctamente homogeneizado. A esta solución, se añadió la micobactina J previamente resuspendida en etanol y, finalmente, el verde de malaquita. El proceso de dispensar el medio en los tubos estériles, fue similar al caso anterior.

Tabla IV.3. Reactivos y cantidades empleadas para la elaboración de los medios de cultivo en un volumen final de 2 litros.

Reactivos	Middlebrook 7H9	HEYM
Medio Base (Difco Laboratories, EE.UU)	9,4 g	-
Glicerina (Panreac Quimica, S.A., Barcelona)	4 ml	63 g
Micobactina J (Allied Monitor, Fayette, EE.UU.)	2 mg	4 mg
Agua Destilada	800 ml	1740 ml
Huevos	-	12 yemas
Penicilina sódica (Difco Laboratories, EE.UU)	2 ml	2 ml
Anfotericina B (Sigma-Aldrich, Madrid)	100 mg	100 mg
Peptona (Difco Laboratories, EE.UU)	-	18 g
Cloranfenicol (Sigma-Aldrich, Madrid)	200 mg	200 mg
NaCl (Panreac Quimica, S.A., Barcelona)	-	9 g
Bacto Agar (Difco Laboratories, EE.UU)	30 g	30,6 g
Piruvato Sódico (Sigma-Aldrich, Madrid)	-	8,2 g
Verde malaquita 2% (Sigma-Aldrich, Madrid)	-	10 ml
OADC (Difco Laboratories, EE.UU)	200 ml	-
Extracto de Buey (Difco Laboratories, EE.UU)	-	5,4 g

2.3.2.2. Siembra de las muestras y cultivo bacteriológico

Tras su descongelación, se tomó una muestra de heces de 2 gramos que se descontaminó mediante la adición de 38 ml de cloruro de hexadecil piridinio (HPC) (Whipple *et al.*, 1991; Dundee *et al.*, 2001). Dicha muestra se homogeneizó mediante agitación durante 10 minutos en un Stomacher 80® (Seward Ltd, Worthing, Reino Unido). Posteriormente, se recogió el sobrenadante y se volvió a dejar reposar durante 24 horas en posición vertical, en tubos de 15 ml. Cada muestra se sembró en ambos medios de cultivo y por duplicado.

El protocolo de cultivo fue diferente según el medio de cultivo a emplear, con el objetivo de inactivar el HPC, con yemas de huevo en el caso del medio HEYM o lavados con agua destilada en el medio Middlebrook.

Para el medio HEYM, se recogieron 0,4 ml del inóculo a sembrar (heces + HPC) situados lo más cerca posible del pellet que se había formado durante la noche y se añadieron cuatro gotas por cada tubo. Después, se homogeneizaron y se esterilizaron los tubos mediante el flambeado de su boca y de los tapones, para evitar contaminaciones. Los tubos se almacenaron una semana en una estufa a 37 °C sin humedad, con el tapón parcialmente cerrado tras lo que se cerraron totalmente y se trasladaron a una estufa, en este caso con humedad controlada, a la misma temperatura.

En el caso del medio de cultivo Middlebrook 7H9, el tubo de 15 ml que contenía la mezcla de heces con HPC, se centrifugó durante 15 minutos a 2880 g. El contenido se decantó con cuidado para no perder el sedimento, que se homogeneizó con 5 ml de agua destilada y se volvió a centrifugar en las mismas condiciones. Finalmente, el sedimento obtenido se decantó y homogeneizó con 2 ml de agua estéril, se dejó reposar durante 10 minutos y se sembró siguiendo el mismo procedimiento que para el medio HEYM.

El periodo de incubación de las muestras se prolongó durante un año, debido al largo período de incubación de Map (Chiodini *et al.*, 1984a; Valentin-Weigand y Goethe, 1999; Dennis *et al.*, 2011), con revisiones semanales de los tubos sembrados con ambos medios de cultivo para la identificación y detección de las colonias de Map. Una muestra fue considerada positiva cuando se observó la presencia de colonias características de Map (colonias de pequeño tamaño de 1 a 5 mm- con una superficie lisa, blanquecina y brillante) en al menos uno de los dos duplicados de cada medio de cultivo, y tras su posterior confirmación mediante tinción de Ziehl-Neelsen.

2.4. Estudios *post mortem* realizados

2.4.1. Estudios anatomopatológicos

2.4.1.1. Necropsia, examen macroscópico y toma de muestras

Tras su sedación mediante la inoculación intramuscular de xilacina (Rompun®, Bayer Animal Health, Mannheim, Alemania), se procedió a la eutanasia de los animales con una inyección intravenosa de una solución eutanásica (T61®, MSD Animal Health, Salamanca) y posterior desangrado mediante la sección de las venas yugulares y arterias carótidas. Posteriormente se realizó una necropsia sistemática y completa.

El **examen macroscópico** se realizó sobre todo el intestino y nódulos linfáticos asociados para valorar las posibles lesiones relacionadas a la infección por Map. También, se inspeccionaron el resto de órganos para comprobar la ausencia de otros procesos patológicos.

La recogida de muestras de tejido para los estudios *post-mortem* se realizó siguiendo el mismo protocolo propuesto por nuestro grupo de investigación en trabajos previos sobre en infecciones experimentales con Map (Verna *et al.*, 2007; Delgado *et al.*, 2013; Fernández *et al.*, 2014; Muñoz, 2014), prestando especial atención al tejido linfoide. En total, se tomaron muestras de: válvula ileocecal (VIC), tres tramos de íleon (distal -ILD-, medio -ILm- y proximal -ILp), placas de Peyer yeyunales aisladas de tres zonas (distal -PPYd-, media -PPYm- y proximal -PPYp), así como tramos de yeyuno sin tejido linfoide de las mismas regiones, nódulos linfáticos (NL) ileocecales, yeyunales (en su porción más caudal -NLYC- y media), duodeno, ciego, colon, recto y el nódulo linfático preescapular (NLP). A continuación, para cada uno de los estudios, se indica qué muestras se emplearon.

2.4.1.2. Estudio histopatológico

Para realizar el **examen microscópico**, muestras de todas las localizaciones indicadas en el apartado anterior fueron fijadas en formol tamponado al 10 %

durante 24-48 h. De cada muestra se tallaron al menos tres secciones diferentes que se colocaron en casetes de plástico (Tesda, Giessen, Alemania) y fueron incluidas en parafina (Histo-comp®, Casa Álvarez, Madrid) previa deshidratación en alcoholes de graduación creciente y xilol, empleando un procesador de tejidos automático (Myr® modelo STP-120). Los bloques de parafina se montaron en una unidad formadora de bloques (Myr® AP280) y las secciones de 4 µm de grosor se obtuvieron en un microtomo de rotación (Finesse®, Thermo Shandon). Dichas secciones tisulares se recogieron en un portaobjetos y se secaron en una estufa a 37 °C durante 24 horas. Posteriormente, se tiñeron empleando las tinciones de hematoxilina-eosina (HE), Ziehl-Neelsen (ZN) y tinción tricrómica de Masson (Tabla IV.4.). Finalmente, las secciones teñidas se cubrieron con un portaobjetos utilizando el DPX (Sigma, San Luis, EE.UU.) como medio de montaje.

Tabla IV.4. Etapas de las tinciones llevadas a cabo en las secciones de tejido para los estudios histopatológicos.

Tinción de Hematoxilina - Eosina	Tinción de Ziehl - Neelsen	Tinción tricrómica de Masson
Desparafinar e hidratar	Desparafinar e hidratar	Desparafinar e hidratar
Lavar en agua corriente 10 min	Lavar en agua corriente 10 min	Teñir con hematoxilina férrica de Weigert 20 min
Teñir con hematoxilina (Thermo Fisher Scientific, Loughborough, Reino Unido) de 3 a 5 min	Teñir con carbolfucsina (WWR International Ltd, Poole, Reino Unido) 1 h a 37 °C	Lavar en agua corriente 30 min
Lavar en agua corriente 10 min	Lavar en agua corriente 10 min	Teñir con fucsina ácida (Merck, Darmstadt, Alemania) mediante inmersión 30 s
Teñir con eosina (Thermo Fisher Scientific, Geel, Bélgica, Reino Unido) de 30 a 60 s	Decolorar en alcohol-ácido	Lavar en agua destilada
Deshidratar y montar	Lavar en agua corriente 8 min	Tratar con ácido fosfomolibdico mediante inmersión 5 min
	Contrastar con azul de metileno (Panreac Química S.A., Barcelona) 15 s	Teñir con verde luz (Fluka, Suiza) 10 min
	Deshidratar y montar	Lavar con agua destilada
		Tratar con ácido acético al 1 % 2 min
		Deshidratar y montar

Todas las secciones teñidas con HE se examinaron al microscopio y las lesiones asociadas a la infección por Map se clasificaron de acuerdo a los criterios establecidos previamente para la especie ovina (Pérez *et al.*, 1996; Delgado *et al.*, 2013; Fernández *et al.*, 2014), que valoran la presencia de granulomas y su localización en el intestino y nódulos linfáticos asociados, la extensión de las lesiones, los tipos celulares que conforman la lesión granulomatosa, la cantidad de BAAR (evaluada mediante la técnica de ZN) y la presencia de tejido conjuntivo (valorada mediante las tinciones de HE y tricrómico de Masson).

Además, con el objetivo de conocer la intensidad de las lesiones y poder llevar a cabo una comparación entre los resultados de los grupos experimentales, se ha llevado a cabo su valoración cuantitativa mediante el recuento de granulomas.

Para ello, se emplearon tres secciones de tejido de cada localización elegidas al azar y se procedió al recuento de todos los granulomas presentes en cada una de ellas. Posteriormente, se calculó la media del número de granulomas contados por sección. En las zonas de intestino con placa de Peyer, se diferenció entre las áreas con tejido linfoide y la lámina propia adyacente. La valoración y recuento de las lesiones se llevó a cabo en un microscopio Nikon Eclipse 2000.

2.4.2. Estudios bacteriológicos

2.4.2.1. Detección de Map mediante cultivo bacteriológico a partir de tejidos

Esta parte del estudio se llevó a cabo en las instalaciones de Neiker-Tecnalia (Derio, Vizcaya/Bizkaia). Para el cultivo bacteriológico se emplearon las muestras de VIC, ILd, PPYm, Ym, y NLYC, muestras que se habían conservado a -20 °C hasta su procesado. El protocolo empleado fue el mismo que el descrito para las muestras de heces, ya detallado en la sección de estudios *in vivo* de este mismo Capítulo (apartado 2.3.2.2.; página 154). Debido a la escasez de muestra en el caso de la VIC, se optó por homogeneizarla junto al ILd y sembrar en un mismo tubo ambas muestras, al tratarse de dos regiones contiguas.

2.4.2.2. Detección de Map mediante PCR anidada de tejidos en parafina

La detección de Map mediante la PCR anidada se llevó a cabo a partir de tres muestras que habían sido previamente fijadas en formol y que se encontraban incluidas en parafina, empleadas para los estudios histopatológicos. Para este estudio se empleó una sección de VIC, PPYm y NLYC de todos los animales.

2.4.2.2.1. Extracción de ADN micobacteriano

La extracción del ADN se llevó a cabo con el kit de extracción de ADN de Speedtools Tissue (Biotools®, B&M Labs SA, Madrid). Para ello, se obtuvo una sección de 10 µm de cada muestra anteriormente citada en un micrótopo (Finesse®, Thermo Shandon) previamente limpio y desinfectado, que fue

recogida en un tubo de microcentrífuga de 2 ml libre de ADNAsas (Qiagen, Madrid). Antes de proceder a la sección de la siguiente muestra, el micrótomo, la cuchilla y las diferentes herramientas empleadas se limpiaron con xilol, para eliminar los restos de parafina, y se desinfectaron con lejía. En cada extracción se incluía un bloque de parafina sin tejido alguno como control negativo de extracción. Además, se emplearon dos bloques de tejido intestinal de cabra incluido en parafina, uno como control positivo y otro como control negativo, procedentes de experimentos anteriores y ya previamente analizados.

Posteriormente, las secciones de parafina fueron sometidas a un desparafinado, con la adición de 1 ml de xilol, durante 30 minutos, tras lo cual se procedió a su centrifugación durante 3 minutos a 11.000 rpm y el sobrenadante fue eliminado. Las muestras se lavaron dos veces mediante la adición de 1 ml de etanol, posterior centrifugación y eliminación del sobrenadante. Los tubos finalmente se llevaron a una estufa a 37 °C, con la tapa abierta para que se evaporase todo el etanol. Al comienzo de cada extracción de ADN, se incluyó una muestra con agua destilada que siguió todo un procesado similar y que sirvió como control negativo adicional de la extracción.

Para realizar la extracción de ADN, se siguieron las instrucciones del fabricante. Todos los reactivos utilizados eran proporcionados en el propio kit. La primera vez que se abrió, se mezclaron los reactivos BB1 y BB2, para formar el nuevo reactivo BB3. Se reconstituyó la proteinasa K con su tampón PB y se mantuvo en el congelador a -20 °C, hasta su uso. Los demás reactivos se almacenaron a temperatura ambiente. Antes de comenzar la extracción, se equilibró el BBE a 70 °C. A continuación, se detallan brevemente los pasos de los que consta la extracción de ADN a partir de muestras de tejido incluidas en parafina:

1. A cada vial, se le añadieron 180 µl del buffer BT1 y 25 µl de proteinasa K para realizar una pre-lisis de las muestras, y se agitaron e incubaron a 65 °C en una placa de calor durante todo un día.

2. Seguidamente, una vez retiradas de la placa, se añadieron 200 µl del reactivo BB3 a cada tubo, con el que se homogeneizaron las muestras e incubaron a 70 °C durante 10 minutos para conseguir su lisis.
3. A continuación, se centrifugaron durante 1 minuto a 11.000 rpm y se añadieron 210 µl de etanol. Se homogeneizaron las muestras y el sobrenadante se pasó a una columna de PCR que se centrifugó durante 1 minuto a 11.000 rpm.
4. Los restos de etanol de la parte inferior de la columna se eliminaron y se llevó a cabo un primer lavado con 500 µl de tampón BBW. Para ello, se centrifugaron las muestras durante 1 minuto a 11.000 rpm y se eliminaron los restos que habían quedado en el tubo colector. Se procedió a un segundo lavado con 600 µl del reactivo BB5, con el que se centrifugaron durante 1 minuto a 11.000 rpm y los restos del tubo colector, fueron eliminados.
5. Las muestras se centrifugaron durante 1 minuto sin ninguna solución de lavado, para que la membrana se secase, y se cambió el tubo colector por un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml libre de ADNAsas.
6. Finalmente, se añadieron 100 µl del reactivo BBE y se dejó reposar 1 minuto a temperatura ambiente, tras lo que las muestras se centrifugaron 1 minuto a 11.000 rpm y el ADN quedó eluido en el BBE. Las muestras se congelaron a -20 °C hasta su posterior amplificación.

2.4.2.2.2. Amplificación de ADN micobacteriano

A continuación, las muestras se sometieron a la **amplificación del ADN micobacteriano** mediante una **PCR anidada**, técnica que conlleva dos rondas de amplificación, de forma que la segunda ronda se realiza sobre el fragmento obtenido en la primera.

Tabla IV.5. Reactivos para la realización de la mezcla para la amplificación de las secuencias en las rondas 1 y 2.

Reactivos	Concentración	Concentración final en reacción de PCR	Volumen añadido (µl)
Agua DEPC			21,8
dNTP's	2,5 mM	0,25 mM	5
Buffer 10xNH ₄	10 X	1 X	5
Cebador "forward"	10 µM	1 µM	5
Cebador "reverse"	10 µM	1 µM	5
MgCl ₂	50 mM	3 mM	3
Taq polimerasa	5 U	1 U	0,2
TOTAL			45

En la **primera ronda** de amplificación, se emplearon cebadores que amplifican un fragmento de 381 pares de bases de la IS900, propia de Map (Sanderson *et al.*, 1992; Garrido *et al.*, 2000b). Para ello, se preparó una mezcla de reactivos (Tabla IV.5.), de la cual se recogieron 45 µl en tubos de microcentrífuga especiales de PCR de 0,2 ml. Estos cebadores habían sido empleados anteriormente con éxito (Delgado, 2010): el cebador "forward": 5'- GTT CGG GGC CGT CGG CCT TAG G - 3' y el cebador "reverse": 5'- CCC ACG TGA CCT CGC CTC CA - 3'. Esta mezcla se preparó en una cabina especialmente adecuada para ello. En otra sala, se adicionaron 5 µl de ADN extraído y se trasladaron al termociclador (GeneAmp® PCR System 2700, Applied Biosystems). El programa de amplificación de la ronda 1, se encuentra especificado en la Tabla IV.6.

Una vez finalizado el programa de la primera ronda, se volvió a preparar la misma mezcla empleada anteriormente y en las mismas condiciones ya explicadas, para preparar la **segunda ronda** de amplificación. En este caso los cebadores eran otros: "forward": 5' - GTC GGG TAT GGC TTT CAT GT - 3' y "reverse": 5' - AGT AAT GGT CGG CCT TAC CG - 3' (Delgado *et al.*, 2012) que amplificaban un fragmento interno de 226 pares de bases del primer

fragmento amplificado. Para ello, se añadieron 45 µl de la nueva mezcla con los nuevos cebadores y 5 µl del ADN amplificado en la primera ronda. El programa de amplificación de la segunda ronda, se encuentra especificado en la Tabla IV.6

Tabla IV.6. Etapas de la primera y la segunda ronda de amplificación en la PCR anidada para detectar ácidos nucleicos de Map

CICLOS	Primera ronda		Segunda ronda	
	Tª °C	TIEMPO	Tª °C	TIEMPO
Desnaturalización	96	3 min	96	3 min
Amplificación	95	1 min	95	40 s
1ª ronda - 38 ciclos	65	1 min	60	40 s
2ª ronda - 35 ciclos	72	2 min	72	1 min
Extensión	72	8 min	72	8 min
Enfriado	4	Infinito	4	Infinito

Tanto en la primera ronda como en la segunda, se empleó el mismo control positivo de Map y se prepararon dos controles negativos, con todos los componentes de la mezcla, pero sin ADN, para cada una de las dos rondas. También se sometió a la PCR al control de la extracción. Una vez finalizado el segundo programa de amplificación, las muestras fueron refrigeradas hasta su posterior identificación.

2.4.2.2.3. Identificación de ADN micobacteriano

Los fragmentos amplificados se detectaron mediante una **electroforesis en un gel de agarosa** al 1,5 % (Biotools, Madrid) en tampón TAE 0,5X (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Alemania). Para la elaboración del gel, se calentó la mezcla de agarosa y TAE 0,5X en el microondas hasta que los componentes se hubieron homogeneizado y una vez atemperados, se añadió el GelRed (Biotium, Fremont, EE.UU.). Tras su solidificación, se cargaron en el gel 5 µl de las muestras amplificadas junto a 0,5 µl del tampón de carga ((Panreac AppliChen, Barcelona). En el primer pocillo se cargó 1 µl del marcador

molecular (Biotools, Madrid) para poder comprobar el tamaño de los “amplicones” obtenidos en la PCR anidada. El gel fue sometido a un voltaje de 95 voltios durante 45 minutos y finalmente se observó bajo luz ultravioleta en un lector de geles (GelDoc XR+, BioRad). Para la interpretación de los resultados, se comprobó la existencia de una banda de 226 pares de bases en las muestras, que determinaba que el resultado era positivo. En los controles negativos no debería aparecer ninguna banda.

2.4.3. Valoración de la respuesta inmunitaria local

La respuesta inmunitaria local en el intestino y nódulos linfáticos, se llevó a cabo mediante la valoración de la producción de IFN- γ por parte de los leucocitos extraídos de las muestras de tejido (NLP, NLYC, NLYM, PPYm y ILd), tras su estimulación específica con PPD aviar, y tras la caracterización diferencial de las subpoblaciones linfocitarias presentes en las mismas muestras, mediante su marcado específico con anticuerpos frente a receptores de membrana y posterior análisis por citometría de flujo.

Esta valoración se llevó a cabo en muestras de ILd, PPYm, NLYC y NLP, de 3 cabritos del grupo VI, de 2 del VNI, de 5 del NVI y de 2 del NVNI en el primer sacrificio (120 dpi), y de 2 cabritos del grupo VI, 1 del VNI, 3 del NVI, 3 del IV, 2 del NIV y 1 del NVNI, en el segundo (330 dpi). Tras su extracción, las muestras se lavaron en PBS y se sumergieron en 10 ml de medio RPMI hasta su inmediato procesado.

2.4.3.1. Extracción de leucocitos mononucleares a partir de los tejidos.

En una cabina de flujo laminar y con material estéril, se eliminó la grasa adherida de las muestras seleccionadas y se trocearon los nódulos linfáticos, mientras que la mucosa intestinal con placas de Peyer se raspó y sumergió en RPMI. La mezcla resultante fue vertida en una bolsa de Stomacher (Seward Stomacher®, Worthing, Reino Unido) y procesada en un homogeneizador de tejidos Stomacher 80 (Seward Stomacher®, Worthing, Reino Unido) durante 2,5

minutos a velocidad máxima. Seguidamente, las muestras se filtraron a través de lana de vidrio (Merck, Darmstadt, Alemania) y la mezcla ya filtrada se vertió cuidadosamente para que no se mezclaran las fases, en tubos de 50 ml con 7 ml de Lymphoprep™ (Alere Technologies, Oslo, Noruega). A partir de este momento, el protocolo fue similar a la extracción de PBMCs que se detalla en el apartado 2.3.1.3.2. (Extracción de PBMCs punto 3, página 149).

2.4.3.2. Valoración de la secreción *in vitro* de IFN- γ

La valoración de la secreción *in vitro* de IFN- γ se llevó a cabo tras la estimulación de los leucocitos extraídos con antígenos específicos de Map. Para ello, se empleó una placa de 48 pocillos (Corning Incorporated, Corning, EE.UU.) por cada animal, de forma que en cada pocillo se dispensaron 500 μ l de la mezcla de medio de cultivo RPMI más células. La disposición de las distintas muestras en las placas se muestra en la Figura IV.2. Cada muestra se procesó por duplicado y se incubó con 30 μ l de PBS (control sin estimular), con 30 μ l de PPD aviar (20 μ g/ml) (CZ Veterinaria, Porriño, Pontevedra) o con 20 μ l de concanavalina A (5 μ g/ml) (Sigma-Aldrich, Lyon, Francia) como control positivo de la estimulación. La incubación tuvo lugar en una estufa de atmósfera al 5 % de CO₂ durante 48 horas a 37°C. Después, las placas se centrifugaron durante 10 minutos a 3700 rpm, se recogió el sobrenadante de cada pocillo y se trasvasó a placas “Deep-Well” (Thermo Fisher Scientific, Illkirch, Francia), donde se conservaron a -20 °C hasta la realización del ELISA de captura frente a IFN- γ (BOVIGAM®, Thermo Fisher Scientific, EE.UU.)

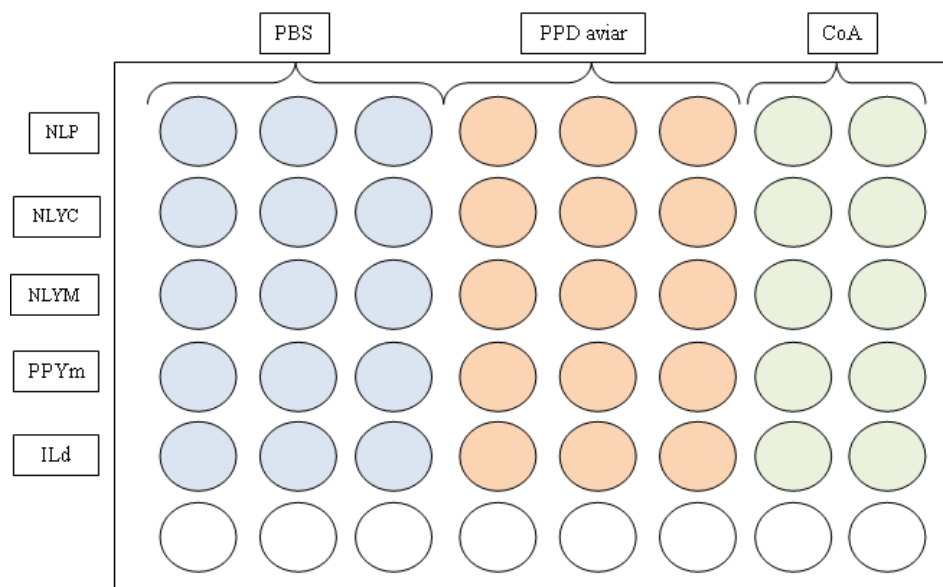


Figura IV.2. Representación esquemática de la disposición de las muestras para su incubación con PBS, con PPD aviar y con CoA (concanavalina A). NLP: nódulo linfático preescapular; NLYC: nódulo linfático yeyunal caudal; NLYM: nódulo linfático yeyunal medio; PPYm: placa de Peyer yeyunal de la zona media. ILd: Íleon distal.

2.4.3.3. Caracterización de las subpoblaciones linfocitarias en tejidos

Estas poblaciones se determinaron mediante el empleo de la **citometría de flujo** y anticuerpos específicos frente a receptores de superficie linfocitarios, en las muestras de leucocitos mononucleares extraídos de los tejidos arriba indicados (NLP, NLYC, PPYm y ILd), excepto el NLYM. Los anticuerpos empleados fueron los mismos que se citan en el análisis de subpoblaciones linfocitarias realizado a partir de PBMCs (apartado 2.3.1.3.3. página 150), siguiendo un procedimiento similar al explicado en el apartado 2.3.1.3.4. (página 151).

2.5. Análisis estadístico

Los datos de los índices IFN- γ y ELISA, incremento del grosor cutáneo en la IDTB, así como del recuento de granulomas y de los valores de las distintas subpoblaciones linfocitarias, fueron sometidos a un análisis de varianza empleando el método GLM (General Linear Model) del paquete estadístico SAS

package (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA, 9.1). Previamente, se llevó a cabo la transformación logarítmica de los resultados de los índices IFN- γ , ELISA y del recuento de granulomas, para que se ajustaran a una distribución normal. Con el mismo objetivo, los datos de las subpoblaciones linfocitarias, obtenidos como porcentajes, se sometieron a una transformación del tipo arco seno raíz cuadrada de la proporción. Las diferencias entre cada grupo experimental en cada muestreo fueron evaluadas mediante una prueba de t de Student para las medias ajustadas, empleando la corrección Tukey-Kramer para múltiples comparaciones. Se consideró un límite de significación estadística del 0,05. Los datos fueron analizados usando el software SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC, EE.UU.).

3. RESULTADOS

3.1. Estudios *in vivo* realizados

Ninguno de los animales que formaron parte del estudio experimental evidenció **signos clínicos** de la paratuberculosis.

3.1.1. Valoración de la respuesta inmunitaria periférica

3.1.1.1. Valoración de la respuesta inmunitaria celular

La Figura IV.3. representa la **evolución de la producción de IFN- γ** empleando la técnica **IGRA** tras la estimulación de las muestras de sangre con la PPD aviar a lo largo de los diferentes muestreos que se realizaron. Los patrones de producción de esta citoquina fueron diferentes según el tipo de tratamiento administrado..

Entre los **grupos vacunados a los -30 dpi** (VI y VNI) se observó un incremento significativo ($p < 0,05$) en la producción del IFN- γ con respecto a los otros grupos no vacunados (NVI y NVNI) entre los 0 dpi (30 dpv) y los 180 dpi (210 dpv). No se observaron diferencias significativas entre ambos grupos vacunados, aunque los valores netos del grupo VNI fueron superiores en todos

los muestreos - excepto en el 90 dpi - al grupo VI. Los niveles más elevados de IFN- γ se alcanzaron a los 30 dpi (60 dpv) en el caso del grupo VNI, mientras que en el grupo VI se observaron mucho más tarde, a los 120 dpi (150 dpv).

En el caso de los **grupos vacunados a los 150 dpi** (IV y NIV), se pudo apreciar un aumento significativo en el índice de IFN- γ medio ($p < 0,05$) de ambos grupos respecto a los no vacunados (NVI y NVNI), entre los días 210 dpi (60 dpv) y los 300 dpi (150 dpv). Los niveles más elevados se encontraron a los 240 dpi (90 dpv) en el caso del grupo IV, los cuales fueron significativamente mayores que en el grupo NIV. En el grupo NIV, estos valores más elevados de IFN- γ aparecieron de forma más temprana, a los 210 dpi (60 dpv). El cabrito con la lesión difusa presentó unos elevados niveles de IFN- γ en los últimos muestreos.

El grupo infectado, pero no vacunado (NVI) tuvo una progresión similar al grupo control hasta los 210 dpi, a partir de ese período la producción de interferón en los dos muestreos siguientes (240 y 270 dpi) fue significativamente ($p < 0,05$) superior al muestreo inmediatamente anterior. En el último muestreo, a los 330 dpi se observó como la producción neta de IFN- γ en el grupo NVI comenzaba a distanciarse del grupo NVNI.

Si se comparan los **índices medios de IFN- γ post vacunación** entre los grupos vacunados a los -30 dpi (VI y VNI) y los grupos vacunados a los 150 dpi (IV y NIV), se observa que en estos últimos grupos la respuesta fue menos intensa, apareció más tardíamente (60 dpv frente a 30 dpv) y las diferencias con los grupos no vacunados persistieron durante menos tiempo (3 mpv frente a 6 mpv).

Para conocer el posible efecto que la realización de la IDTB comparada pudo haber tenido sobre la producción de IFN- γ , se compararon los índices de los 90 dpi (momento en que se llevó a cabo la prueba) y de los 120 dpi en los animales de todos los grupos, vacunados (VI y VNI) y no vacunados (NVI y NVNI), sin que se encontraran diferencias significativas.

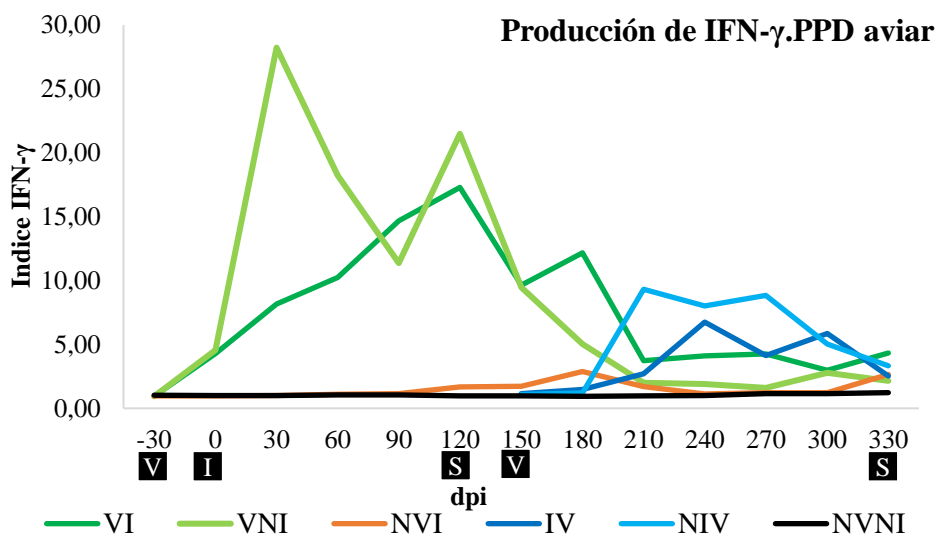


Figura IV.3. Evolución del índice IFN- γ de los diferentes grupos experimentales cuando las muestras de sangre fueron estimuladas con la PPD aviar. V: vacunación, I: infección; S: sacrificio; VI: vacunado a los -30 dpi e infectado; VNI: vacunado a los -30 dpi y no infectado; NVI: no vacunado e infectado; IV: infectado y vacunado a los 150 dpi; NIV: no infectado y vacunado a los 150 dpi; NVNI: no vacunado no infectado. dpi: días post infección.

La evolución del índice de IFN- γ medio de cada grupo cuando la sangre se estimuló con PPD bovina se observa en la Figura IV.4. La producción de esta citoquina siguió un patrón similar al de la PPD aviar, pero los valores medios de los diferentes grupos experimentales siempre fueron significativamente más bajos ($p < 0,05$). Entre los 0 dpi (30 dpv) y los 180 dpi (210 dpv), los **grupos vacunados** (VI y VNI) a los -30 dpi mostraron una producción significativamente ($p < 0,05$) superior a los grupos no vacunados (NVI y NVNI). Al igual que en el caso anterior, el índice de IFN- γ fue superior en el grupo VNI que en el grupo VI, pero sólo a los 30 dpi (60 dpv) la producción fue significativamente superior ($p < 0,05$). Los niveles más elevados se alcanzaron a los 30 dpi (60 dpv) para el grupo VNI, mientras que en el grupo VI fue más tarde, a los 120 dpi (150 dpv).

En el caso de la **vacunación a los 150 dpi**, los grupos vacunados en esta fecha (IV y NIV) mostraron una producción significativamente superior de esta citoquina ($p < 0,05$) entre los 210 dpi (60 dpv) y los 270 dpi (120 dpv) en comparación con los grupos no vacunados (NVI y NVNI), desapareciendo las diferencias a partir de este período.

En el grupo NVI, no se observaron diferencias en el índice medio de IFN- γ tras la estimulación de la sangre con PPD bovina, con el grupo NVNI a lo largo de todo el experimento. Tampoco se encontraron diferencias en el índice en los animales de los grupos vacunados (VI y VNI) y los grupos no vacunados (NVI y NVNI) entre los 90 dpi (momento de realización de la IDTB) y los 120 dpi.

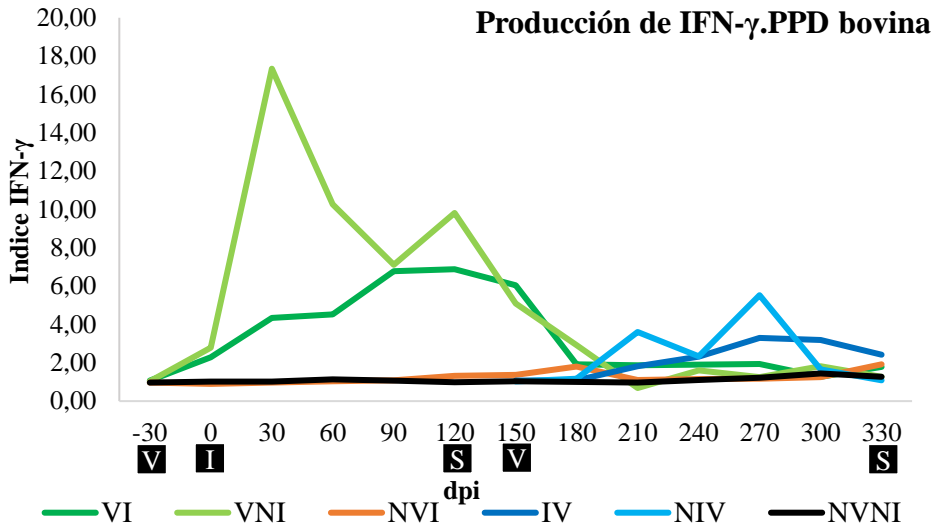


Figura IV.4. Evolución del índice IFN- γ de los diferentes grupos experimentales cuando las muestras de sangre fueron estimuladas con la PPD bovina. V: vacunación, I: infección; S: sacrificio; VI: vacunado a los -30 dpi e infectado; VNI: vacunado a los -30 dpi y no infectado; NVI: no vacunado e infectado; IV: infectado y vacunado a los 150 dpi; NIV: no infectado y vacunado a los 150 dpi; NVNI: no vacunado no infectado. dpi: días post infección.

Otra prueba empleada para valorar la respuesta inmunitaria celular fue la **IDTB comparada** que se llevó a cabo únicamente a los 90 dpi (120 dpv), momento en el que la vacunación a los 150 dpi aún no se había realizado. Los resultados se muestran en la Figura IV.5. En los grupos vacunados (VI y VNI), el incremento de grosor cutáneo fue significativamente superior ($p < 0,05$) al observado en los grupos no vacunados (NVI y NVNI) para todas las PPDs empleadas, a las 72 horas de su inyección intradérmica. En el grupo NVI se encontraron diferencias significativas con el grupo NVNI ($p < 0,05$) únicamente para la PPD aviar.

Al comparar el incremento del pliegue cutáneo en función del antígeno empleado, en los tres grupos tratados (NVI, VI, VNI) fue significativamente superior ($p < 0,05$) para la PPD aviar respecto de la PPD bovina o la johnina, entre las que no hubo diferencias.

Al analizar estos resultados con los criterios oficiales de interpretación de la prueba de IDTB, en el caso de la comparada, no se encontró ningún animal positivo a tuberculosis en ninguno de los grupos vacunados o infectados con Map. Sin embargo, cuando se aplicaron los criterios de la IDTB simple, hubo 7 cabritos positivos en los grupos vacunados (58,3 %). De ellos, 3 presentaban un incremento de grosor de 4 mm, dos de 7 mm y uno de 9 mm.

IDTB

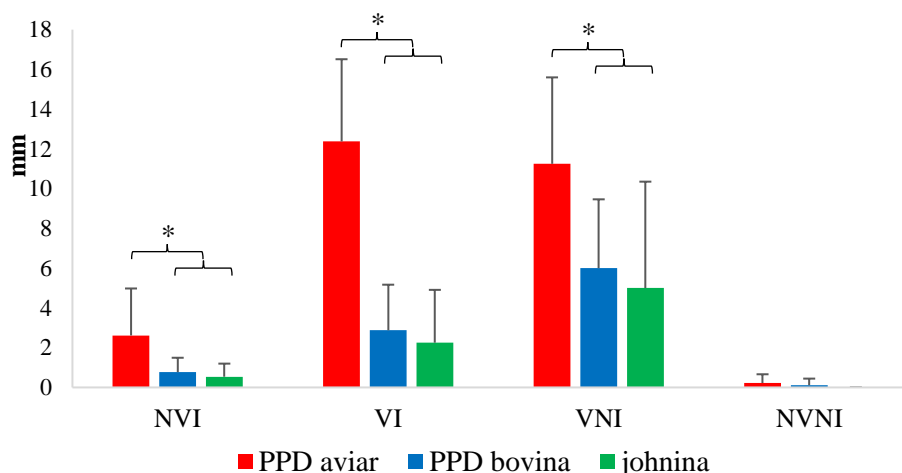


Figura IV.5. Incremento medio del grosor cutáneo, en mm, de los animales de los distintos grupos experimentales tras la ejecución de la IDTB a los 90 dpi, tras la inoculación de PPD aviar, PPD bovina y johnina. VI: vacunado a los -30 dpi e infectado; VNI: vacunado a los -30 dpi y no infectado; NVI: no vacunado e infectado; NVNI: no vacunado, no infectado.

3.1.1.2. Valoración de la respuesta inmunitaria humoral

En la Figura IV.6., se observa la evolución del índice ELISA que indica el **nivel de los anticuerpos** serológicos en los diferentes grupos experimentales a lo largo del estudio. Los valores están expresados como la media de dicho índice para cada grupo experimental. Los **grupos vacunados a los -30 dpi** (VI y VNI) mostraron unos niveles superiores de anticuerpos ($p < 0,05$) que los grupos no vacunados (NVI y NVNI) entre los 30 dpi (60 dpv) y los 240 dpi (270 dpv). En

ambos grupos vacunados, los niveles más elevados se han encontrado a los 180 dpv (150 dpi). Aunque en los primeros meses los valores del índice ELISA fueron superiores en el grupo VNI, a los 150 dpi fueron superados por los del grupo VI, si bien esas diferencias no fueron estadísticamente significativas.

En el caso de los **grupos vacunados a los 150 dpi** (IV y NIV), los índices ELISA medios fueron significativamente superiores a los de los no vacunados (NVI y NVNI) entre los 210 dpi (60 dpv) y los 300 dpi (150 dpv). Los niveles más elevados se observaron en ambos grupos vacunados a los 150 dpv y fueron siempre más elevados en el grupo IV que en el NIV, si bien tampoco fueron las diferencias significativas. El cabrito con lesiones difusas presentó una mayor producción de anticuerpos séricos que el resto de los animales del grupo.

Al comparar los grupos vacunados a los -30 dpi o a los 150 dpi, en ambos casos las diferencias en el índice ELISA con sus respectivos grupos no vacunados se mantuvieron durante 7 meses tras la vacunación a los -30 dpi y 3 meses tras la vacunación a los 150 dpi.

Respecto al grupo NVI, solo se observó un incremento significativo de los valores medios del índice ELISA con el grupo NVNI a partir de los 300 dpi ($p < 0,05$), manteniéndose el incremento en el siguiente muestreo, aunque sin ser significativo (330 dpi).

La prueba de **IDTB comparada** que se llevó a cabo a los 90 dpi (120 dpv), no produjo ningún cambio significativo en la producción de anticuerpos al mes de su realización. Sin embargo, a los dos meses (150 dpi), sí que hubo un incremento en la producción de anticuerpos en los grupos VI, NVI y NVNI con respecto al mes anterior, con una producción significativa, pero al 90 %.

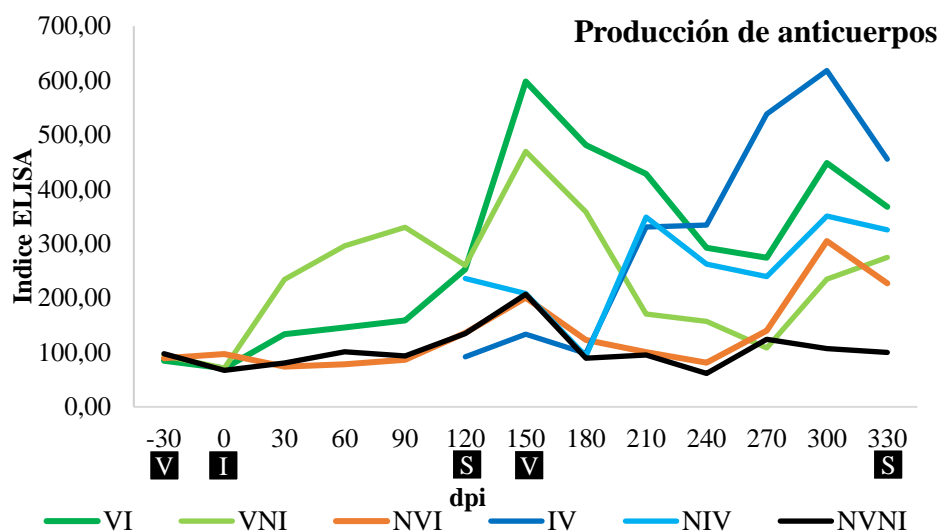


Figura IV.6. Evolución de los niveles medios del índice ELISA (anticuerpos séricos) en los diferentes grupos experimentales. V: vacunación, I: infección; S: sacrificio; VI: vacunado a los -30 dpi e infectado; VNI: vacunado a los -30 dpi y no infectado; NVI: no vacunado e infectado; IV: infectado y vacunado a los 150 dpi; NIV: no infectado y vacunado a los 150 dpi; NVNI: no vacunado no infectado. dpi: días post infección.

3.1.1.3. Caracterización de las subpoblaciones linfocitarias en sangre periférica

En la Figura IV.7 y IV.8. se muestran los porcentajes medios de cada tipo linfocitario en las muestras de sangre periférica de los distintos grupos experimentales a los 120 y 330 dpi. Aunque no se muestran los datos individuales, se observó una gran variabilidad entre los animales de todos los grupos. Tras el análisis estadístico de los resultados, se pudo apreciar que, en todos los grupos experimentales y en los dos muestreos, la subpoblación mayoritaria eran los linfocitos $\delta\gamma$ (inmunomarcados con el anticuerpo WC1⁺). No se pudo observar ningún patrón definido de variaciones asociadas a los tratamientos. Únicamente se encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre el grupo VNI respecto al NVNI, de forma que a los 120 dpi el primero presentaba niveles más elevados de linfocitos CD4⁺ y CD8⁺. También, el grupo VNI mostraba una menor proporción ($p < 0,05$) de linfocitos $\delta\gamma$ a los 120 dpi que el grupo NVNI.

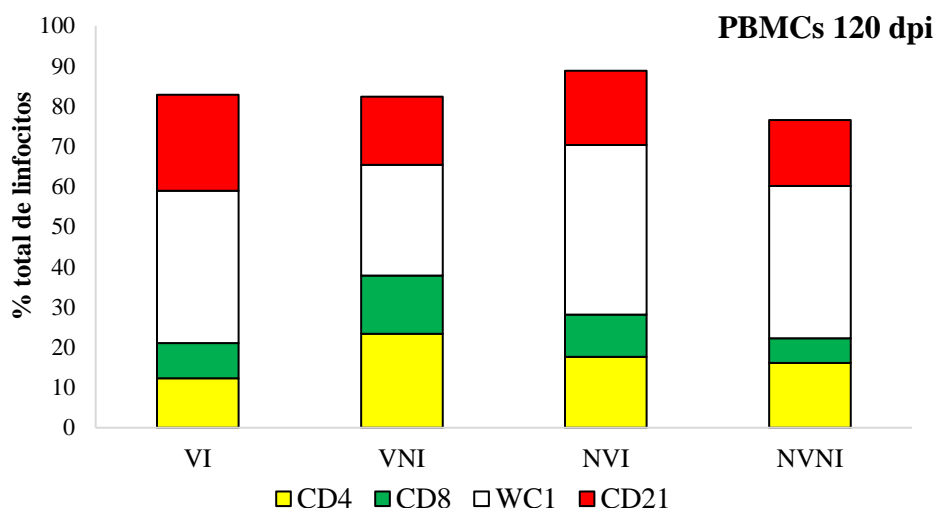


Figura IV.7. Porcentaje medio de las diferentes subpoblaciones linfocitarias inmunomarcadas con los anticuerpos CD4, CD8, WC1 y CD21 en los diferentes grupos experimentales en sangre a los 120 dpi. PBMCs: células mononucleares de sangre periférica. VI: vacunado a los -30 dpi e infectado; VNI: vacunado a los -30 dpi y no infectado; NVI: no vacunado, infectado; NVNI: no vacunado no infectado.

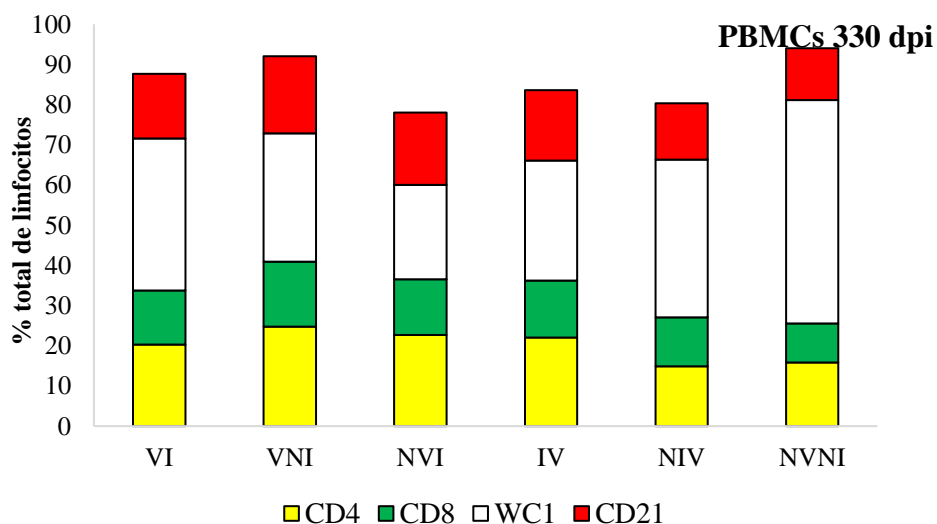


Figura IV.8. Porcentaje medio de las diferentes subpoblaciones linfocitarias inmunomarcadas con los anticuerpos CD4, CD8, WC1 y CD21 en los diferentes grupos experimentales en sangre a los 330 dpi. PBMCs: células mononucleares de sangre periférica. VI: vacunado a los -30 dpi e infectado; VNI: vacunado a los -30 dpi y no infectado; NVI: no vacunado, infectado; NVNI: no vacunado no infectado.

3.1.2. Cultivo de Map en muestras de heces

No se obtuvieron aislamientos positivos a partir de las heces de ningún animal de los grupos vacunados (VI, VNI, IV y NIV), independientemente de que se desafiaron o no, en cualquiera de los muestreos en los que se realizó el

cultivo (-30, 120 y 330 dpi). Tampoco se obtuvo ningún cultivo positivo en las muestras del grupo NVNI. Sólo se observaron aislamientos positivos en el medio de cultivo HEYM a partir de las muestras de un cabrito del grupo no vacunado, pero sí infectado (NVI) a los 330 dpi.

3.2. Estudios post-mortem realizados

3.2.1. Estudios anatomopatológicos

El único animal donde se observaron **lesiones macroscópicas** pertenecía al grupo infectado y vacunado a los 150 dpi (IV) y que fue sacrificado a los 330 dpi. La principal lesión observada se encontró en el yeyuno, donde se apreciaba un engrosamiento difuso de la mucosa (Figura IV.9.). Los nódulos linfáticos mesentéricos se encontraban aumentados de tamaño y a la sección presentaban un engrosamiento difuso de la cortical.



Figura IV.9. Sección de yeyuno del animal del grupo VI que mostraba un engrosamiento difuso de la mucosa intestinal.

En relación a las **lesiones microscópicas**, se realizó un estudio histopatológico y una clasificación de las lesiones de acuerdo a criterios previos ya establecidos (Pérez *et al.*, 1996; Delgado *et al.*, 2013; Fernández *et al.*, 2014) para la especie ovina, que clasifican las lesiones de paratuberculosis en el intestino y nódulos linfáticos asociados atendiendo a la presencia, extensión y

localización de los granulomas, a los tipos celulares presentes y a la cantidad de BAAR.

Sólo se encontraron lesiones granulomatosas asociadas a la infección por Map en animales de los grupos infectados, vacunados o no, como se detalla posteriormente en el análisis pormenorizado por grupo. Las lesiones encontradas en este estudio se clasificaron, atendiendo a los criterios anteriormente expuestos, como: **lesiones focales** en las que los granulomas eran de pequeño tamaño, bien delimitados y estaban formados por macrófagos y células gigantes que se localizaban exclusivamente en el tejido linfoide intestinal, preferentemente en las zonas interfoliculares; **lesiones multifocales**, donde además de en el tejido linfoide intestinal, también se observaban granulomas, también bien definidos y sin alterar notablemente la arquitectura intestinal, bien en la lámina propia asociada al tejido linfoide (**lesión multifocal a**) o en zonas sin tejido linfoide adyacente (**multifocal b**); por último, en **lesiones difusas**, de tipo **multibacilar** o histiocítico, se observaba un infiltrado inflamatorio formado mayoritariamente por macrófagos, tanto en el tejido linfoide, donde invadía los folículos linfoides y alteraba su estructura microscópica normal, como en la lámina propia asociada o no al tejido linfoide. En estas últimas localizaciones, se producía un engrosamiento de las vellosidades, con separación de las glándulas intestinales. En el citoplasma de los macrófagos, se observaron BAAR en cantidad variable, mediante la tinción de ZN. La localización de las lesiones en las diferentes regiones del intestino, se explica a continuación.

Los grupos control no infectados, vacunados o no, no presentaron ninguna lesión microscópica compatible con paratuberculosis en las muestras tomadas en los dos sacrificios.

Para una mejor comprensión de los datos obtenidos, se detallan las lesiones observadas en cada grupo experimental y en cada sacrificio (120 dpi y 330 dpi).

Resultados del estudio histológico en los cabritos del primer sacrificio a los 120 dpi

El 100 % (5/5) de los cabritos sacrificados del grupo NVI y el 66.66 % de los cabritos sacrificados del grupo VI (2/3) mostraron lesiones compatibles con paratuberculosis (Tabla IV.7.).

Tabla IV.7. Distribución del número de animales en función del tipo de lesión, pertenecientes a los dos grupos infectados, sacrificados a los 120 dpi. NVI: no vacunado e infectado; VI: vacunado a los -30 dpi e infectado.

Tipo de lesión	NVI	VI
Sin lesión	-	1/3
Focal	2/5	1/3
Multifocal a	2/5	1/3
Multifocal b	1/5	-
Difusa	-	-

En el grupo **NVI**, se observaron lesiones **focales** (Figura IV.10.a) en dos animales, en las que los granulomas estaban poco delimitados, mostrando un carácter infiltrativo. Otros dos cabritos presentaron lesión de tipo **multifocal a** (Figura IV.10.c), con granulomas semejantes a los anteriores en la lámina propia asociada, pero más abundantes. El animal restante mostraba lesión de tipo **multifocal b** (Figura IV.10.d), en la que, junto con una lesión grave en la placa de Peyer, también se observaron granulomas focales, de escasa entidad, en zonas de yeyuno proximal sin tejido linfoide e íleon proximal. Además, en los cabritos de este grupo con lesión multifocal (a o b), también se encontraron granulomas de distribución multifocal, bien delimitados, en los nódulos linfáticos (**linfadenitis granulomatosa**), localizados principalmente en la región paracortical y aunque a veces confluían, no llegaban a alterar la estructura normal del órgano.

Sin embargo, en el grupo **VI**, un cabrito no mostró lesiones, en otro fueron de tipo **focal** (Figura IV.10.a; 10.e) con granulomas bien delimitados formados por macrófagos y células gigantes; y en el animal restante **multifocal a**. Además, especialmente los granulomas situados en el tejido linfoide, la mayor parte de los granulomas mostraban fibrosis, de forma que se observaban abundantes fibras de colágeno entre las células que formaban el granuloma (Figura IV.10.f).

La tinción de ZN, realizada en todas las muestras que presentaron lesión, no demostró la presencia de BAAR en ningún granuloma, independientemente del tipo de lesión, y en ningún grupo experimental.

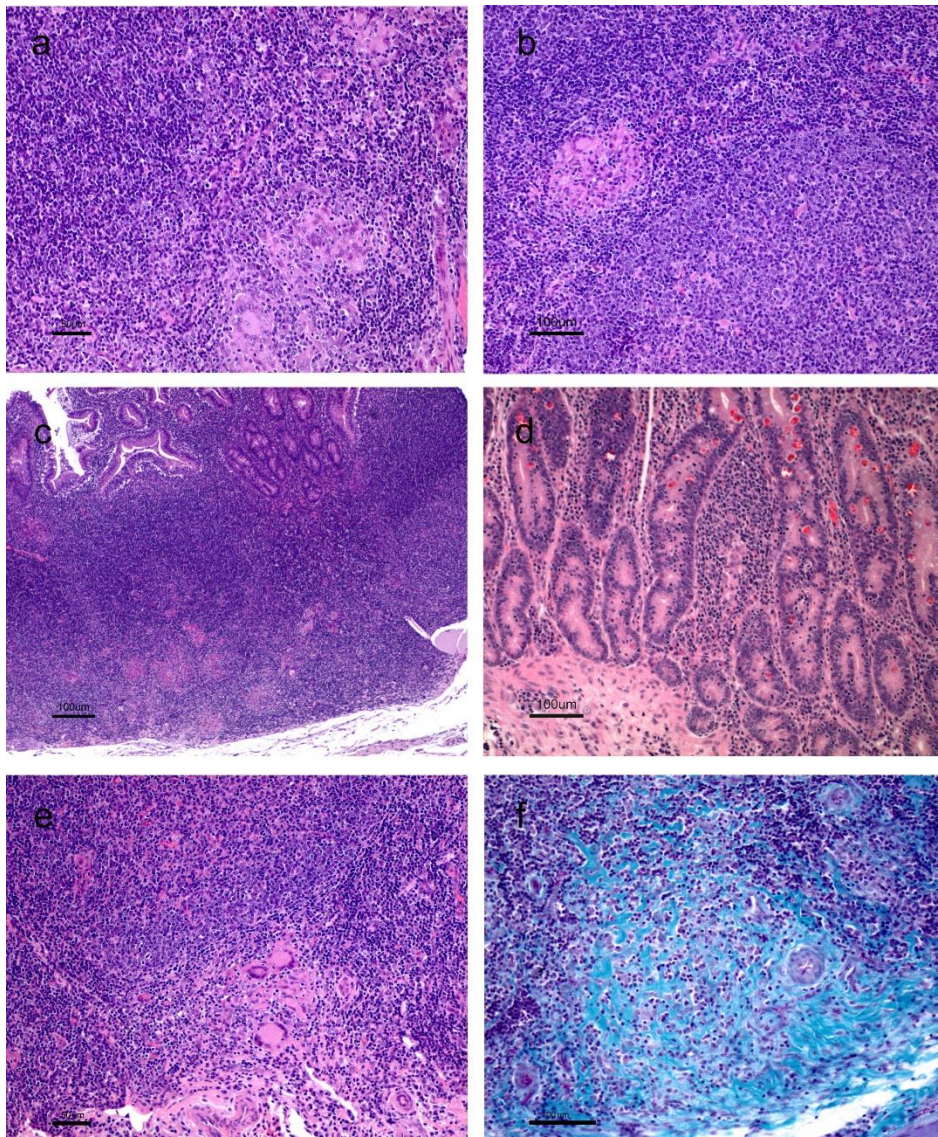


Figura IV.10 (página anterior). **a. Lesión focal del grupo NVI.** Granuloma poco delimitado, con carácter infiltrativo. Yeyuno. HE. **b. Lesión focal del grupo VI.** Granuloma bien delimitado formado por macrófagos y células gigantes. Yeyuno. HE. **c. Lesión multifocal a del grupo NVI.** Varios granulomas localizados en la zona interfolicular de placa de Peyer yeyunal, que comienzan a invadir los folículos linfoides. Se aprecian granulomas en la lámina propia adyacente al tejido linfoide. Yeyuno. HE. **d. Lesión multifocal b del grupo NVI.** Granuloma en lámina propia no adyacente a tejido linfoide. Yeyuno. HE. **e y f. Lesión focal del grupo VI.** Detalle de un granuloma con HE y con tinción tricrómica de Masson donde se puede observar gran cantidad de tejido conjuntivo, infiltrando el granuloma. Yeyuno.

Resultados del estudio histológico en los cabritos del segundo sacrificio a los 330 dpi

Al igual que en el caso anterior, se encontraron lesiones asociadas a la infección por Map en todos los grupos infectados (Tabla IV.8.) y no en los controles (VNI, NIV y NVNI). En el grupo VI solamente 2 de los 4 animales examinados (50 %) presentaron lesiones, mientras que en el grupo NVI aparecieron en el 100% de los cabritos (3/3), y en el grupo VI en 4 de 5 animales (80 %).

Tabla IV.8. Distribución de los animales en función del tipo de lesión encontrado en el intestino durante el segundo sacrificio realizado a los 330 dpi, y del grupo experimental. NVI: no vacunado, infectado. VI: vacunado a los -30 dpi e infectado; IV: Infectado y vacunados a los 150 dpi.

Tipo Lesión	NVI	VI	IV
Sin lesión	-	2/4	1/5
Focal	-	2/4	1/5
Multifocal a	1/3	-	-
Multifocal b	2/3	-	2/5
Difusa	-	-	1/5

En el grupo **NVI**, un cabrito presentó una lesión **multifocal a**, con abundantes granulomas, en general de mayor tamaño que los encontrados en el primer sacrificio, y que confluían en el tejido linfoide, invadiendo los folículos (Figura IV.11.a). Los dos restantes mostraron lesión de tipo **multifocal b** (Tabla IV.8.), con mayor número de granulomas en zonas de yeyuno sin placa de Peyer que en el animal del primer sacrificio (Figura IV.11.b; 11c). En los tres animales se pudo

diagnosticar una linfadenitis granulomatosa, de intensidad moderada, con numerosos granulomas en las zonas paracortical y cortical de los nódulos linfáticos yeyunales (Figura IV.11.d). Además, uno de ellos, mostraba también una serositis, con linfangitis granulomatosa, en la capa más externa del intestino (Figura IV.11.e). No se observaron BAAR mediante la tinción de ZN.

En los dos animales que presentaron lesión microscópica del grupo **VI**, ésta era de tipo **focal** (Tabla IV.8.). Se caracterizaba por la presencia de granulomas de pequeño tamaño, bien delimitados, ubicados exclusivamente en la lámina propia en la zona interfolicular de los folículos linfoides de las placas de Peyer yeyunales (Figura IV.11.f). Al igual que en el grupo anterior, también se observaba abundante tejido conjuntivo entre las células que los constituían.

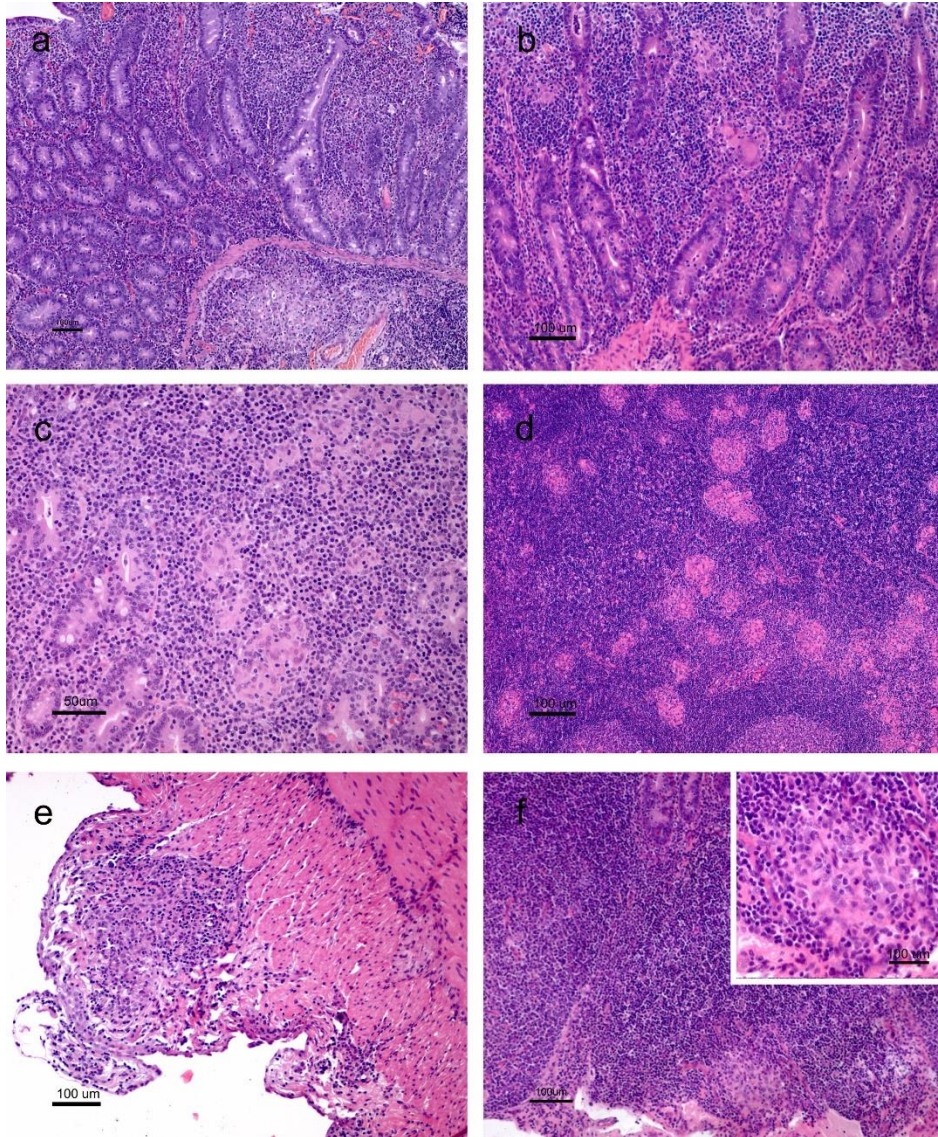


Figura IV.11. a Lesión multifocal a del grupo NVI. Granulomas de mayor tamaño en el tejido y algunos invaden la lámina propia adyacente. Yeyuno. HE. **b. Lesión multifocal b del grupo NVI.** Granulomas localizados en la lámina propia no adyacente a tejido linfoide. Yeyuno. HE. **c. Lesión multifocal b del grupo NVI.** Granuloma a mayor detalle donde se puede ver el carácter infiltrativo. Yeyuno. **d. Lesión multifocal del grupo NVI.** Nódulo linfático con múltiples granulomas en su cortical. HE. **e. Serositis granulomatosa del grupo NVI.** Granuloma localizado en la serosa del yeyuno. HE. **f. Lesión focal del grupo VI.** Granulomas de pequeño tamaño y bien delimitado, como se puede observar a mayores aumentos.

Por último, en el grupo **IV** se observó una gran variabilidad en relación con el tipo de lesión entre los animales (Tabla IV.8.). En uno de ellos, la lesión **focal**, con granulomas de pequeño tamaño y bien delimitados (Figura IV.12.a), también fibrosados, en el tejido linfoide yeyunal. Otros dos animales presentaron lesiones **multifocales b** (Figura IV.12.b; 12.c) en las cuales los granulomas ya se habían extendido a zonas de la lámina propia yeyunal adyacente o no al tejido linfoide, si bien estos eran de escasa entidad y no alteraban significativamente la estructura de la pared intestinal. En estos dos cabritos también se pudo observar una linfadenitis granulomatosa en los nódulos linfáticos asociados con zonas de necrosis (Figura IV.12.d). Por último, el animal restante mostraba una **lesión difusa** de tipo **multibacilar** caracterizada por un infiltrado difuso de macrófagos en algunas placas de Peyer yeyunales, que alteraba por completo su estructura. Las mismas células se encontraron en zonas de lámina propia de varias zonas de yeyuno e íleon (Figura IV.13.a; 13.b; 13.c) sin tejido linfoide, provocando un engrosamiento de las vellosidades (Figura IV.13.b, 13.d). Este animal fue el único que mostró un engrosamiento multifocal de la mucosa yeyunal visible macroscópicamente (Figura IV.9.). En este animal también se observaron lesiones granulomatosas de carácter difuso en toda la sección de los nódulos linfáticos regionales, donde los granulomas confluían y alteraban la estructura histológica normal (Figura IV.13.e), tanto de la cortical como de la medular, y presentaban incluso zonas de necrosis en su interior (Figura IV.13.f). Al realizar la tinción de ZN en secciones de intestino de este cabrito, se detectó la presencia de BAAR en el interior de los macrófagos (Figura IV.13.g; 13.h). Cabe añadir, que fue en este cabrito donde se observó un incremento de la producción de IFN- γ frente a la PPD aviar y de la producción de anticuerpos séricos en los meses previo al sacrificio.

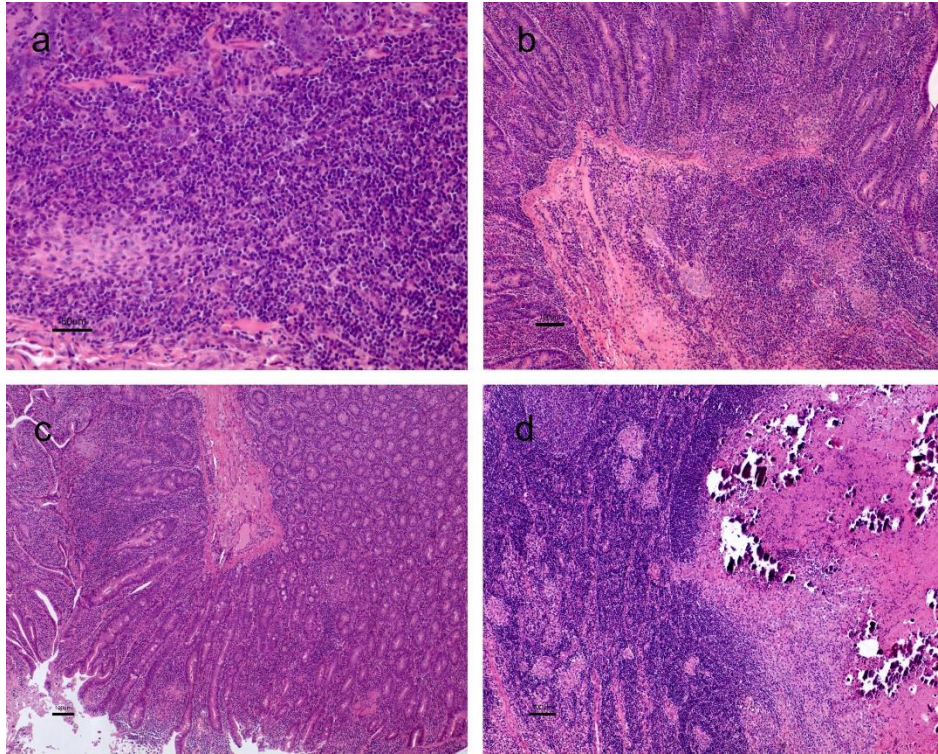
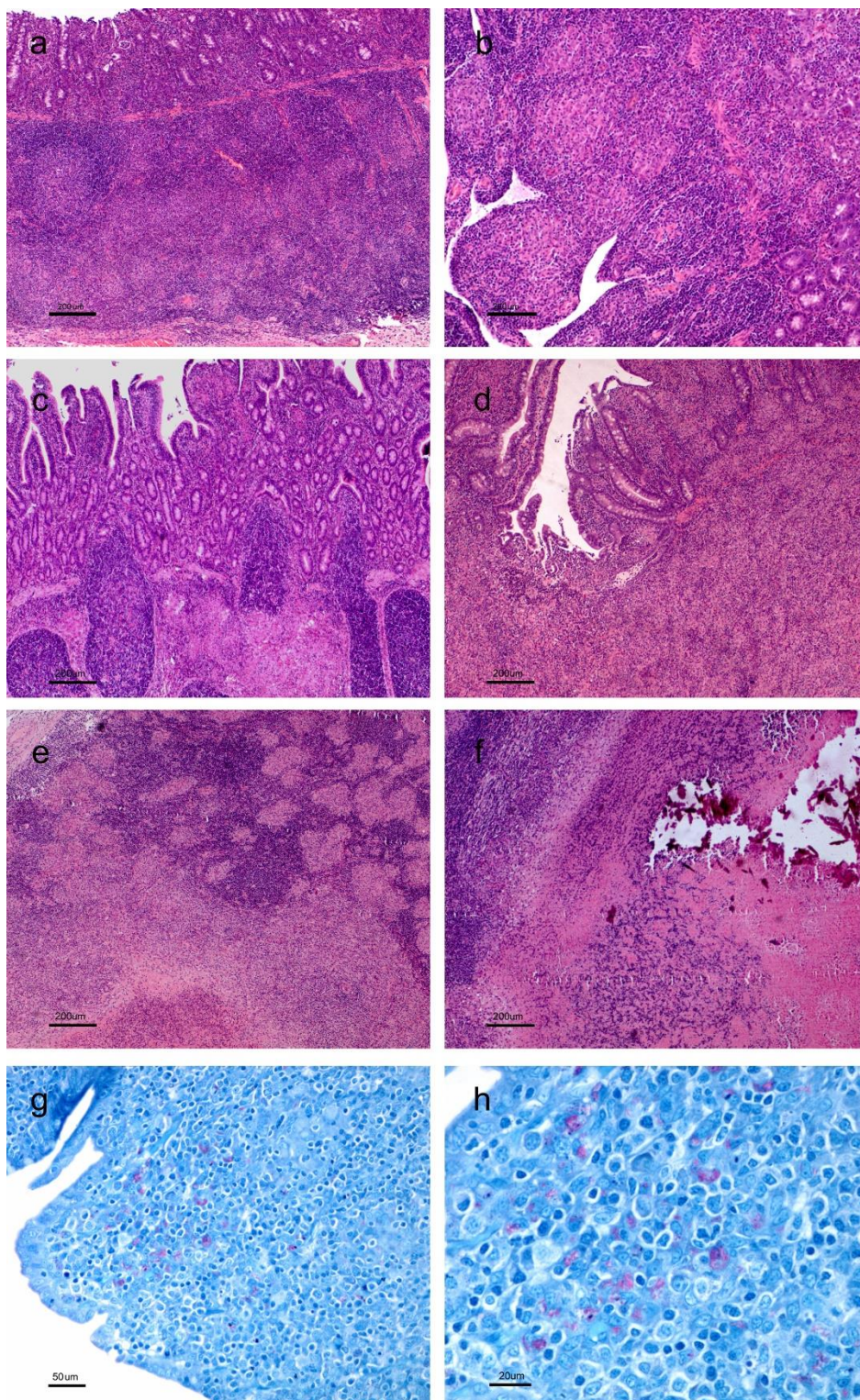


Figura IV.12. a. Lesión focal del grupo VI. Granuloma poco delimitado y de carácter infiltrativo localizado en el espacio interfolicular de una placa de Peyer del yeyuno HE. **b. Lesión multifocal a del grupo VI.** Granulomas de mayor tamaño. Un número escaso de granulomas invaden la lámina propia adyacente al tejido linfoide. Yeyuno HE. **c. Lesión multifocal b del grupo VI.** Granulomas localizados en la lámina propia no adyacente a tejido linfoide. Yeyuno. HE. **d. Lesión multifocal del grupo VI.** Nódulo linfático yeyunal con múltiples granulomas en su cortical y áreas de necrosis. HE.

Figura IV.13 (siguiente página). **a. Lesión difusa del grupo IV.** Granulomas alterando la estructura normal de la submucosa del íleon. HE. **b. Lesión difusa del grupo IV.** Detalle de un engrosamiento de las microvellosidades del íleon. HE. **c. Lesión difusa del grupo IV.** Granuloma alterando la estructura normal de la submucosa del íleon y dilatación de los vasos linfáticos. HE. **d. Lesión difusa del grupo IV.** Los granulomas alteran la estructura tanto de la mucosa como submucosa de la VIC, provocando un engrosamiento de las microvellosidades. HE. **e. Lesión difusa del grupo IV.** Múltiples granulomas en la cortical y medular de un nódulo linfático yeyunal. **f. Lesión difusa del grupo IV.** Los granulomas confluyen la zona derecha de la imagen, formando un granuloma de gran tamaño que presenta necrosis caseosa y áreas de mineralización en su centro. HE. **g. Lesión difusa del grupo VI.** Presencia de BAAR en el citoplasma de los macrófagos asociados a una lesión difusa en yeyuno. ZN. **h. Lesión difusa del grupo VI.** Presencia de BAAR a mayores aumentos.



Resultados del recuento del número de granulomas

Para conocer la intensidad de las lesiones asociadas a Map, y poder establecer su comparación estadística entre los diferentes grupos y sacrificios, se realizó un recuento del número de los granulomas en el intestino y nódulos linfáticos yeyunales. Los resultados del **número total de granulomas por animal**, expresados como el valor promedio para cada grupo experimental, se muestran en la Figura IV.14. En el primer sacrificio (120 dpi), el número medio de granulomas de cada animal del grupo NVI (42) fue significativamente ($p < 0.05$) superior al número medio de granulomas en los cabritos del grupo VI (7). Un resultado similar, aunque en este caso con diferencias estadísticamente muy significativas ($p < 0,0001$), se observó en el segundo sacrificio (330 dpi) al comparar ambos grupos (130 granulomas en el grupo NVI por 1 del VI). Al comparar, en el segundo sacrificio, el número medio de granulomas de los animales del grupo IV, no se encontraron diferencias significativas con el grupo NVI, pero sí con el grupo VI. Aunque el número promedio era muy elevado, la desviación estándar también, debido a la gran variabilidad entre animales, con cabritos en los que no se observó ningún granuloma frente a otros con 1197.

Cuando se estudió la **evolución del número de granulomas** dentro de los animales de cada grupo experimental, entre ambos sacrificios, pudo observarse como en el grupo NVI estos aumentaban de forma significativa ($p < 0,05$), ya que en el primer sacrificio (120 dpi) el número medio de granulomas/animal era de 42 mientras que, a los 330 dpi, fue de 130. En el caso del grupo VI, el número de granulomas medio por animal descendió de 7 granulomas de media en el primer sacrificio a 1 en el segundo.

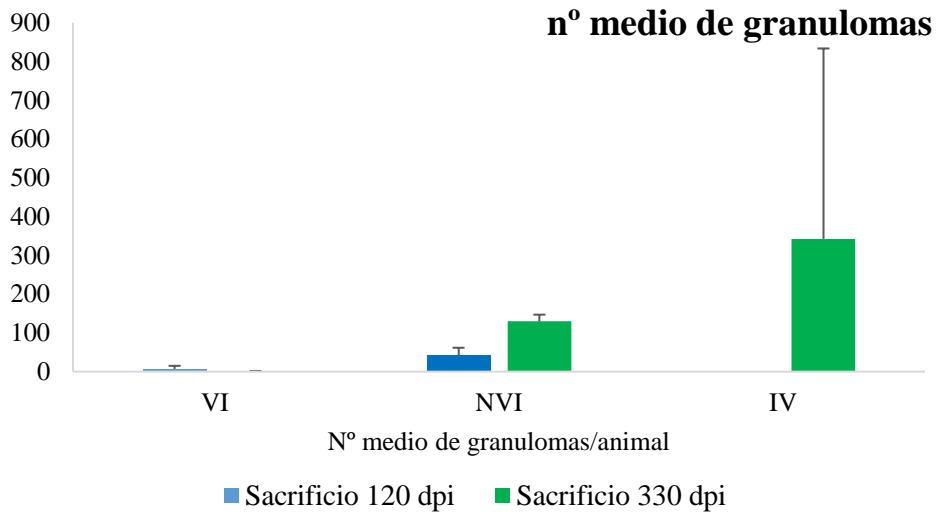


Figura IV.14. Evolución del número medio de granulomas por animal en los distintos grupos experimentales, según el momento de sacrificio de los cabritos. VI: vacunado a los -30 dpi e infectado; NVI: No vacunado, infectado; IV: infectado y vacunado a los 150 dpi.

En las Figuras IV.15. y IV.16., se muestra la **distribución** media del número de granulomas de cada animal de los distintos grupos experimentales según su **localización** en los diferentes tramos de intestino y nódulos linfáticos examinados.

En el **primer sacrificio**, a los 120 dpi, (Figura IV.15.) los granulomas observados tanto en los animales de los grupos NVI como VI se localizaron mayoritariamente en el tejido linfoide yeyunal (PPY), pero fueron siempre más numerosos ($p < 0,05$) en el grupo NVI, sin diferencias entre la zonas de yeyuno. A continuación, también se encontraron, pero en menor número que en las PPY ($p < 0,05$), en la válvula ileocecal, donde también fueron significativamente más numerosos ($p < 0,05$) en el grupo NVI. En el nódulo linfático yeyunal, sólo se encontraron lesiones en el grupo NVI.

Los cabritos del grupo NVI en el **segundo sacrificio**, a los 330 dpi (Figura IV.16.), mostraban lesiones granulomatosas en todas las localizaciones con tejido linfoide (VIC, IL PPY, NL), siendo significativamente más numerosas en las PPY y NL que en la VIC ($p < 0,05$). Además, también se detectaron en la lámina propia de muestras de yeyuno distal sin placa de Peyer (Yd) y de íleon

proximal, en número menor que en las PPY. Sin embargo, en el grupo VI sólo se encontraron granulomas, en cantidad significativamente menor a los animales del grupo NVI ($p < 0,05$), en el tejido linfoide del yeyuno medio (PPYm). En el caso del grupo IV, se encontraron granulomas en todos los tejidos muestreados, si bien no se detectaron diferencias significativas con el grupo NVI. No se observaron granulomas en duodeno, ni tampoco en recto ni en ciego.

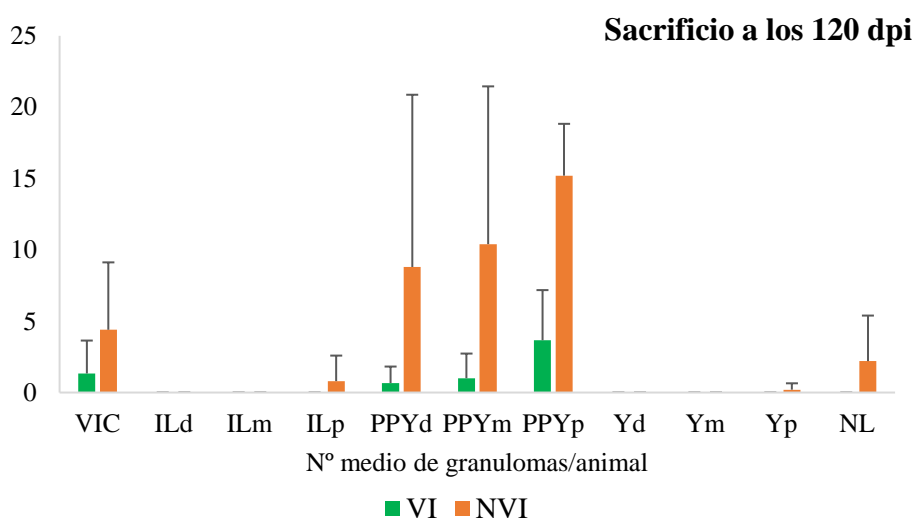


Figura IV.15. Número medio de granulomas por animal encontrado en el primer sacrificio (120 dpi) para cada una de las diferentes localizaciones del intestino delgado y nódulos linfáticos yeyunales examinadas, según el grupo experimental. VI: vacunado a los -30 dpi e infectado; NVI: No vacunado, infectado. VIC: válvula ileocecal; ILd: íleon distal; ILm: íleon medio; ILp: íleon proximal; PPYd: placa de Peyer del yeyuno distal; PPYm: placa de Peyer del yeyuno medio; PPYp: placa de Peyer del yeyuno proximal; Yd: yeyuno distal; Ym: yeyuno medio; Yp: yeyuno proximal; NL: nódulos linfáticos asociados.

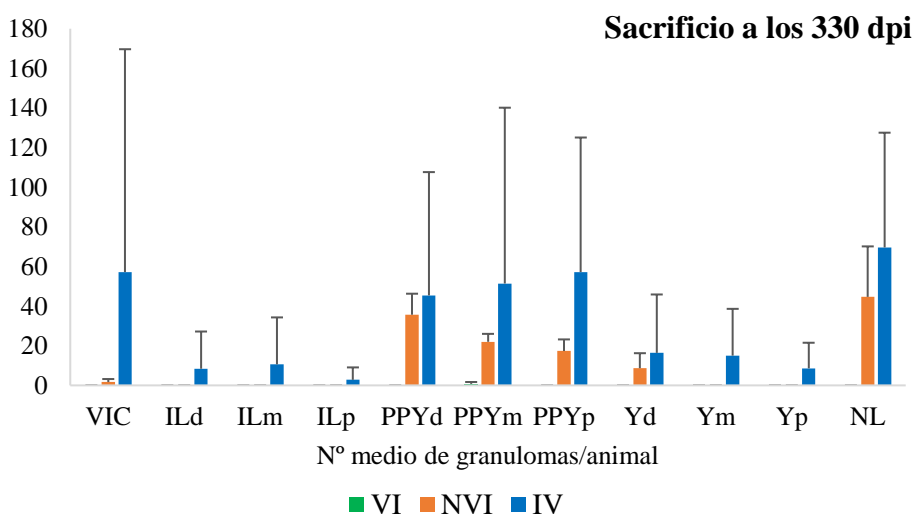


Figura IV.16 (página anterior). Número medio de granulomas por animal encontrado en el segundo sacrificio (330 dpi) para cada una de las diferentes localizaciones del intestino delgado y nódulos linfáticos yeyunales examinadas, según el grupo experimental. VI: vacunado a los -30 dpi e infectado; NVI: No vacunado, infectado; IV: infectado y vacunado a los 150 dpi. VIC: válvula ileocecal; ILd: íleon distal; ILm: íleon medio; ILp: íleon proximal; PPYYd: placa de Peyer del yeyuno distal; PPYm: placa de Peyer del yeyuno medio; PPYp: placa de Peyer del yeyuno proximal; Yd: yeyuno distal; Ym: yeyuno medio; Yp: yeyuno proximal; NL: nódulos linfáticos asociados.

3.2.2. Estudios bacteriológicos

3.2.2.1. Aislamiento e identificación de Map mediante cultivo bacteriológico a partir de tejidos

Sólo se consiguieron aislamientos positivos en un animal del **grupo IV**, que presentaba lesiones difusas y únicamente en los tubos sembrados con el medio HEYM. El mayor número de aislamientos (16 colonias) se logró en las muestras de yeyuno (con y sin tejido linfoide), seguidas por la de válvula ileocecal-íleon (12 colonias), y el menor en las de nódulo linfático yeyunal (2 colonias).

3.2.2.2. Detección de ácidos nucleicos de Map mediante PCR de tejidos incluidos en parafina

No se detectó ADN de Map en ningún animal de los grupos no infectados (VNI, NIV y NVNI) en todo el estudio. En el **primer sacrificio** (120 dpi), en el grupo NVI, se identificó la presencia de ADN micobacteriano de una muestra de yeyuno de un cabrito con lesión multifocal a, mientras que en el grupo VI resultaron positivas las muestras de VIC y NL de un cabrito con lesión multifocal a y de otro con lesión de tipo focal, respectivamente.

En el **segundo sacrificio** (330 dpi), se pudo identificar ADN de Map en el 100 % de los cabritos de los grupos NVI y VI (incluyendo los dos animales sin lesiones), si bien en el primer grupo en al menos dos de las tres muestras analizadas mientras que solamente en una de las tres en el segundo grupo. Las localizaciones donde se lograron resultados positivos con más frecuencia fueron PPYm y NL. En el caso del grupo IV, se logró identificar ADN de Map en el 80 % de los cabritos en al menos dos muestras analizadas. El único animal de este

grupo donde no se pudo identificar Map, fue el que no presentó lesiones histológicas. Al igual que en el sacrificio anterior, las localizaciones con una mayor frecuencia de resultados positivos fueron el yeyuno medio con placas de Peyer y los nódulos linfáticos.

3.2.3. Valoración de la respuesta inmunitaria local

El estudio de la respuesta inmunitaria local se llevó a cabo mediante la cuantificación de la producción específica de IFN- γ y la caracterización de las subpoblaciones linfocitarias presentes en zonas de tejido linfoide intestinal y nódulos linfáticos, previa extracción de leucocitos mononucleares de las mismas.

3.2.3.1. Valoración de la secreción *in vitro* de IFN- γ

La determinación de la producción *in vitro* de IFN- γ se llevó a cabo en cinco muestras de tejido (NLP, NLYC, NLYM, PPY e íleon). Aunque las cinco muestras se procesaron individualmente, con el objetivo de simplificar el análisis de resultados, aquellos resultados obtenidos en las placas de Peyer de yeyuno e íleon se agruparon en un único dato (denominado PP), al igual que los valores obtenidos de los nódulos linfáticos yeyunal caudal y yeyunal medio, que se analizaron de forma conjunta (NL). Los resultados obtenidos se muestran en las Figura IV.17. y IV.18.

Los valores del índice de IFN- γ tras estimular con PPD aviar los leucocitos mononucleares extraídos del nódulo linfático preescapular (NLP), no mostraron diferencias significativas entre los animales de los distintos grupos sacrificados a los 120 dpi (150 dpv). Sin embargo, en aquellos sacrificados a los 330 dpi, los valores eran más elevados ($p < 0,05$) en las muestras del grupo VI (360 dpv) respecto a las del grupo NVI. En el resto de grupos no se pudo hacer el análisis estadístico debido a que sólo existía un dato de cada animal o una gran variabilidad en el caso del grupo IV.

Respecto a las muestras de intestino y nódulos linfáticos, en el grupo NVI solo se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$) con el resto de grupos en la muestra de NL, tanto en el primer como en el segundo sacrificio (excepto con

el NIV en este segundo sacrificio). En el caso de los resultados obtenidos a partir de las muestras de PP, no se observaron diferencias en los animales examinados en el primer ni en el segundo sacrificio, debido probablemente a la gran variabilidad lesional.

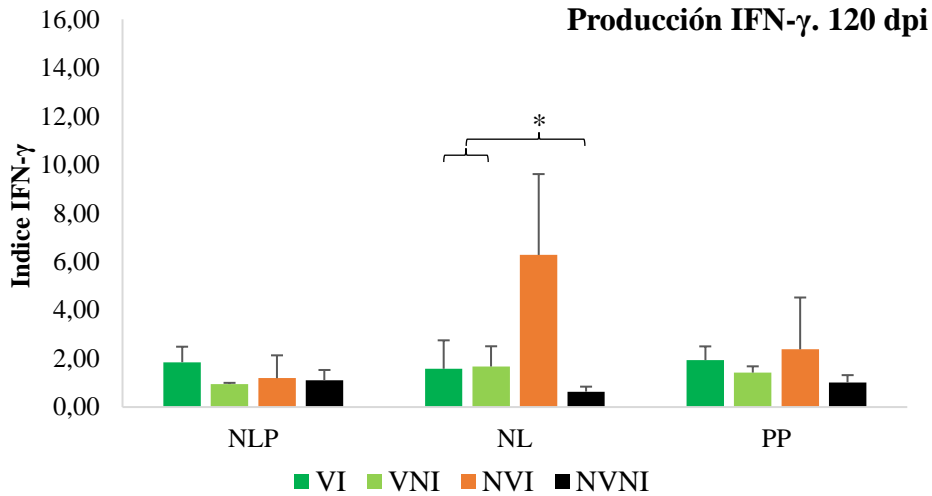
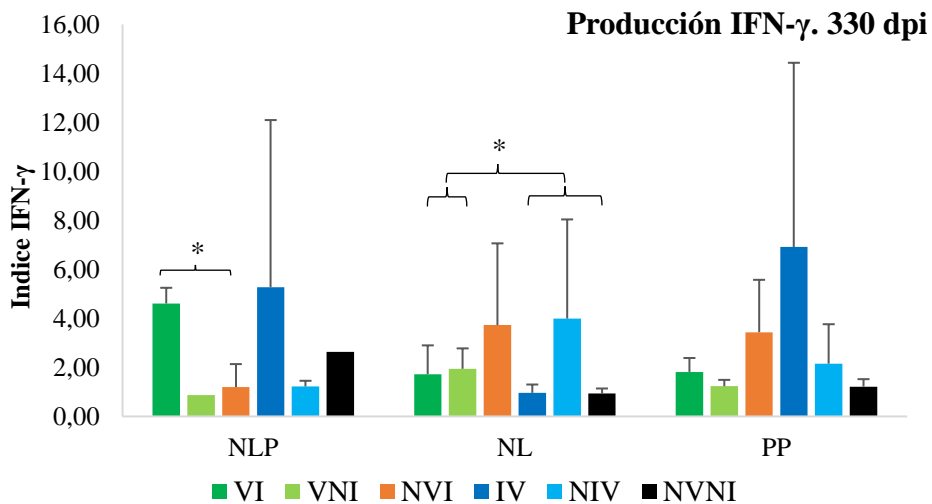


Figura IV.17. Resultados de los valores medios del índice de IFN- γ en las distintas muestras de tejido analizadas, según los grupos experimentales, a los 120 dpi de los diferentes grupos experimentales en las tres muestras de tejidos tras la estimulación con PPD aviar. NLP: nódulo linfático preescapular; NL: nódulos linfáticos asociados; PP: placas de Peyer de yeyuno e íleon. VI: vacunado a los -30 dpi e infectado; VNI: vacunado a los -30 dpi y no infectado; NVI: no vacunado, infectado; IV: infectado y vacunado a los 150 dpi; NIV: no infectado, vacunado a los 150 dpi; NVNI: no vacunado no infectado.



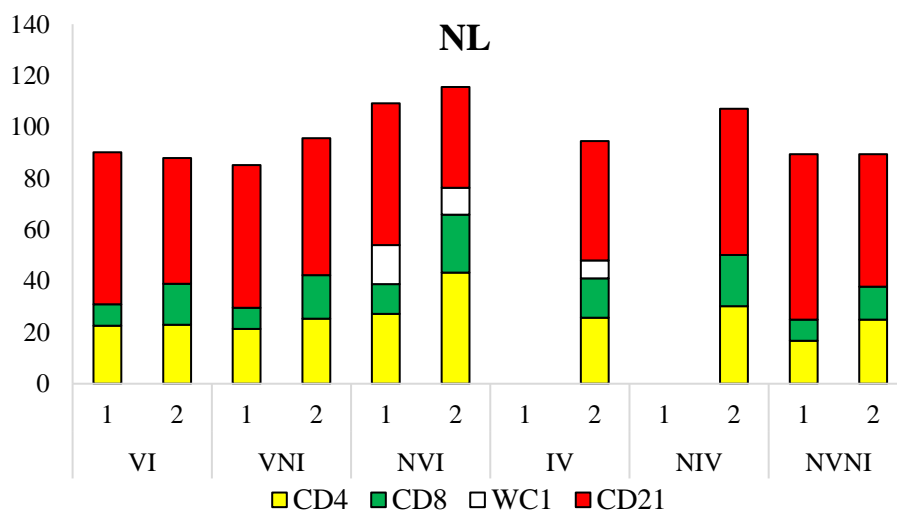
Figuras IV.18. Resultados de los valores medios del índice de IFN- γ en las distintas muestras de tejido analizadas, según los grupos experimentales, a los 330 dpi de los diferentes grupos experimentales en las tres muestras de tejidos tras la estimulación con PPD aviar. NLP: nódulo linfático preescapular; NL: nódulos linfáticos asociados; PP: placas de Peyer de yeyuno e íleon. VI: vacunado a los -30 dpi e infectado; VNI: vacunado a los -30 dpi y no infectado; NVI: no vacunado, infectado; IV: infectado y vacunado a los 150 dpi; NIV: no infectado, vacunado a los 150 dpi;

3.2.3.2. Caracterización de las subpoblaciones linfocitarias en los tejidos

Los porcentajes de cada tipo linfocitario en las distintas muestras y periodos analizados, se muestran en las Figuras IV.19. y IV.20. Al igual que en el caso anterior y para facilitar el análisis de los resultados, los datos del tejido linfoide ileal y yeyunal se analizaron conjuntamente (placa de Peyer).

En todas las muestras de tejido analizadas, la población linfocitaria predominante fue la que ofreció inmunofluorescencia positiva para el antígeno CD21 (linfocitos B). En el caso del NLP, no se encontraron diferencias ni entre grupos ni entre los dpi en que se muestrearon los animales, por eso no se muestra.

En las muestras de PP y NL, se observa que, entre el primer y segundo sacrificio, y en todos los grupos, independientemente del tratamiento, hay un incremento de las poblaciones de linfocitos CD4⁺ y CD8⁺. Sin embargo, ni la vacunación ni la infección parecen tener un efecto sobre los porcentajes de los distintos linfocitos presentes en los tejidos examinados. Aunque los resultados detallados no se muestran en las gráficas, en todas las muestras y para todos los anticuerpos empleados, se observó una variabilidad individual muy alta.



Figuras IV. 19. Porcentaje del total de linfocitos expresando los CD4, CD8, WC1 y CD21 en los diferentes grupos experimentales en el NL (Nódulo linfático yeyunal caudal y medio) en el primer sacrificio (1) (120 dpi) y en el segundo (2) (330 dpi). dpi: días post infección. VI: vacunado a los -30 dpi e infectado; VNI: vacunado a los -30 dpi y no infectado; NVI: no vacunado, infectado; IV: infectado, vacunados a los 150 dpi; NIV: no infectado, vacunado a los 150 dpi; NVNI: no vacunado no infectado.

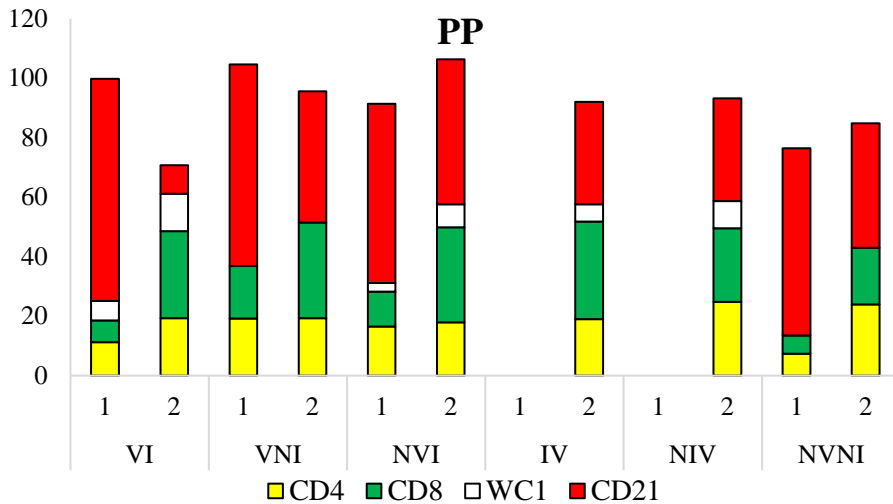


Figura IV.20. Porcentaje del total de linfocitos expresando los CD4, CD8, WC1 y CD21 en los diferentes grupos experimentales en las PP (Placas de Peyer del yeyuno e ileon) en el primer sacrificio (1) (120 dpi) y en el segundo (2) (330 dpi) dpi. VI: vacunado a los -30 dpi e infectado; VNI: vacunado a los -30 dpi y no infectado; NVI: no vacunado, infectado; IV: infectado, vacunados a los 150 dpi; NIV: no infectado, vacunado a los 150 dpi; NVNI: no vacunado no infectado.

3.3. Resultados globales de los animales estudiados en los dos sacrificios

En las Tabla IV.9. y IV. 10 se muestran los datos individuales de los resultados de la respuesta inmunitaria periférica, del tipo de lesión o estudios bacteriológicos, en los animales sacrificados en los dos periodos de estudio. Los datos de los índices ELISA y IFN- γ fueron obtenidos en el muestreo antes del primer sacrificio, y los demás datos fueron obtenidos durante el propio sacrificio. En la técnica IGRA, un índice IFN- γ aviar por encima de 2 se ha considerado positivo, entre 1,7 y 2 dudoso, y por debajo de 1,7, negativo cuando esta prueba se ha utilizado con fines diagnósticos (Pérez *et al.*, 1999; Delgado, 2010). Para la técnica ELISA, y también cuando se usa como herramienta diagnóstica, índices entre 700 y 900 se han considerado dudosos y por encima de 900 positivos.

Cuando se analiza la relación entre el tipo de lesión y las respuestas inmunitarias periféricas, en el grupo NVI, solamente un animal con lesión focal (nº 6) y otro con lesión multifocal b (nº 9) muestran un índice de IFN- γ positivo. Ninguno lo hace en la prueba ELISA. En los grupos vacunados, se observa una

gran variabilidad individual. Dentro de los cabritos del lote VI, todos presentaban una respuesta positiva a la técnica IGRA, excepto dos animales, uno con lesión focal y otro sin lesiones. En el grupo IV, que llevaba menos tiempo vacunado, sólo dos animales, uno con lesión focal y otro multifocal b, presentaban un resultado considerado dudoso, y destaca el animal nº 5, que presenta el índice IFN- γ más elevado encontrado en el estudio entre los animales infectados, y había desarrollado una lesión difusa. Respecto a la prueba ELISA, ningún cabrito excepto el nº 5, con lesión difusa, que tiene un valor considerado dudoso, llega a los niveles de positividad.

En cuanto a la asociación entre aislamiento de Map en heces o tejidos y el tipo de lesión, los dos animales positivos presentaban lesión de tipo multifocal b y difusa. En relación con la detección de ADN mediante PCR, en el grupo NVI aumenta el grado de colonización en los animales sacrificados a los 330 dpi, y el mayor número de muestras positivas se observa en aquellos cabritos con lesiones de tipo multifocal, preferentemente de tipo b, y que no se detecta en dos animales. En el grupo VI, destaca un animal sin lesiones donde no se detecta presencia de Map, y en el resto, excepto en un cabrito con lesión focal, solo es positiva una única muestra de las tres analizadas. Por último, en el grupo IV, también fue negativo un animal sin lesión, y el mayor número de muestras positivas se logró en los cabritos con lesión multifocal b y difusa, donde todas las muestras fueron positivas.

Tabla IV.9. Resumen de todos los estudios *in vivo* y *post mortem* realizados antes o en el primer sacrificio a los 120 dpi en los cabritos de los diferentes grupos estudiados. VI: vacunado -30 dpi e infectado; VNI: vacunado a los -30 dpi, pero no infectado; NVI: no vacunado, pero sí infectado; NVNI: no vacunado no infectado. dpi: días post-infección

Crotal	Grupos	Obtenidos en el muestreo anterior al sacrificio			Incrementos en mm en la IDTB		Sacrificio dpi	Cultivo		PCR anidada tejidos	Lesiones
		Índice ELISA	Índice IFN- γ aviar	Índice IFN- γ bovino	PPD aviar	PPD bovina		Heces	Tejidos		
16	VI	141	4,54	2,94	9	4	120	No	No	1/3	Multifocal a
20	VI	154	13,32	5,21	10	4	120	No	No	1/3	Focal
21	VI	264	19,87	8,40	15	2	120	No	No	0/3	Sin lesión
25	VNI	191	49,09	20,62	5	1	120	No	No	0/3	Sin lesión
26	VNI	90	1,01	1,00	0	0	120	No	No	0/3	Sin lesión
2	NVI	117	1,73	1,28	1	1	120	No	No	0/3	Multifocal a
3	NVI	143	1,71	1,32	2	0	120	No	No	1/3	Multifocal b
6	NVI	142	2,00	1,20	0	0	120	No	No	0/3	Focal
7	NVI	130	1,35	1,00	0	0	120	No	No	1/3	Multifocal a
13	NVI	498	0,89	1,03	7	2	120	No	No	0/3	Focal
31	NVNI	135	1,25	1,17	1	0	120	No	No	0/3	Sin lesión
32	NVNI	103	0,98	0,92	0	0	120	No	No	0/3	Sin lesión
1	NVI	nd	nd	nd	3	1	A	nd	nd	nd	nd

Tabla IV.10 (página siguiente). Resumen de todos los estudios *in vivo* y *post mortem* realizados antes o en el segundo sacrificio a los 330 dpi en los cabritos de los diferentes grupos estudiados. VI: vacunado -30 dpi e infectado; VNI: vacunado a los -30 dpi, pero no infectado; NVI: no vacunado, pero sí infectado; IV: infectado y vacunado a los 150 dpi; NIV: no infectado, vacunado a los 150 dpi. NVNI: no vacunado no infectado.

Crotal	Grupos	Obtenidos en el muestreo anterior al sacrificio			Incrementos en mm en la IDTB		Sacrificio dpi	Cultivo		PCR anidada tejidos	Lesiones
		Índice ELISA	Índice IFN- γ aviar	Índice IFN- γ bovino	PPD aviar	PPD bovina		Heces	Tejidos		
15	VI	337	4,28	1,67	6	1	330	No	No	1/3	Focal
17	VI	454	1,37	1,80	18	4	330	No	No	2/3	Focal
19	VI	441	10,46	2,78	17	7	330	No	No	1/3	Sin lesión
22	VI	239	1,20	0,90	15	9	330	No	No	1/3	Sin lesión
23	VNI	275	2,15	1,27	13	7	330	No	No	0/3	Sin lesión
9	NVI	472	5,22	3,55	7	1	330	Sí	No	2/3	Multifocal b
11	NVI	105	1,54	1,07	1	1	330	No	No	2/3	Multifocal a
14	NVI	104	1,18	1,14	11	1	330	No	No	2/3	Multifocal b
4	IV	495	2,89	2,05	1	1	330	No	No	0/3	Sin lesión
5	IV	777	28,56	5,58	4	1	330	No	Sí	3/3	Difusa
8	IV	242	1,90	1,58	3	0	330	No	No	1/3	Focal
10	IV	378	1,87	1,22	4	2	330	No	No	2/3	Multifocal b
12	IV	386	3,45	1,70	1	0	330	No	No	2/3	Multifocal b
27	NIV	387	4,78	1,10	0	0	330	No	No	0/3	Sin lesión
28	NIV	265	1,89	1,08	1	1	330	No	No	0/3	Sin lesión
34	NVNI	100	1,23	1,27	0	0	330	No	No	0/3	Sin lesión
18	VI	nd	nd	nd	13	0	B	nd	nd	nd	nd
24	VNI	nd	nd	nd	12	7	C	nd	nd	nd	nd
29	NVNI	nd	nd	nd	0	0	D	nd	nd	nd	nd
30	NVNI	nd	nd	nd	0	0	E	nd	nd	nd	nd
33	NVNI	nd	nd	nd	0	0	F	nd	nd	nd	nd
35	NVNI	nd	nd	nd	nd	nd	G	nd	nd	nd	nd

nd:no disponible. A: animal retirado del estudios a los 96 dpi. B: cabrito retirado a los 245 dpi. C: cabrito retirado del estudio el 186 dpi. D: cabrito retirado a los 238 dpi. E: cabrito retirado a los 277 dpi. F: cabrito retirado a los 302 dpi. G: cabrito retirado a los 315 dpi. dpi: días post-infección

4. DISCUSIÓN

El presente estudio ha evaluado el efecto de la vacunación frente a paratuberculosis en condiciones experimentales en un modelo en cabras, con el objetivo de analizar tanto su posible efecto protector (inmunización antes de la infección) como terapéutico (vacunación de animales ya infectados), valorando su acción sobre la patogenia, incluyendo la respuesta inmunitaria local y periférica. El modelo experimental empleado solo permite valorar estos efectos en las fases iniciales de la infección por Map, y se ha elegido por motivos económicos y de bienestar animal, ya que en la duración planteada, no se van a producir casos clínicos de la enfermedad entre los animales infectados. Sin embargo, son varios los estudios donde se ha empleado con éxito y se ha demostrado que el periodo de estudio (330 dpi) es suficiente para conocer la influencia que diferentes factores, incluida la vacunación, pueden ejercer sobre la patogenia de la paratuberculosis (Delgado *et al.*, 2013; Fernández *et al.*, 2014; Muñoz, 2014). Además, se ha elegido la especie caprina al tratarse de un modelo ya contrastado en otros estudios experimentales (Corpa *et al.*, 2000b; Hines II *et al.*, 2014) y que presenta similitudes en su respuesta a las infecciones micobacterianas con la especie bovina, al ser las dos sensibles a la tuberculosis (Napp *et al.*, 2013), lo que, teóricamente, permitiría extrapolar a ella los resultados. En cuanto a la vacuna utilizada, la mayor parte de los estudios realizados en la especie caprina han empleado vacunas inactivadas, los más reciente Gudair®, registrada para su uso en esta especie. Sin embargo, en este trabajo se ha empleado una vacuna que está registrada para su uso en ganado bovino (Silirum®), aunque emplea la misma cepa y dosis de Map que la anterior, y su efecto beneficioso ya había sido probado en la especie caprina (Hines II *et al.*, 2014), estimándose que los resultados obtenidos puedan ser aplicados en la especie bovina.

Los resultados de este estudio confirman la validez del modelo empleado, al ser capaz de reproducir la infección, con animales que han desarrollado lesiones características y en los que se ha identificado Map en tejidos, y al mismo tiempo, encontrar variaciones asociadas a los tratamientos efectuados.

Actualmente la vacunación está considerado el mejor procedimiento de control de la paratuberculosis en términos de coste-beneficio (Bastida y Juste, 2011; Groenendaal *et al.*, 2015), pero se conoce que no protege de la infección y que, aunque se consigue una reducción en el número de casos clínicos y de la excreción de Map, no todos los animales vacunados responden de la misma forma, llegando algunos, incluso, a desarrollar formas avanzadas de la infección (Reddacliff *et al.*, 2006; Muñoz, 2014; de Silva *et al.*, 2015; Windsor, 2015). Estos resultados se han confirmado en nuestro estudio donde se ha observado, en términos generales, que la vacunación induce protección, ya que los individuos vacunados han desarrollado menos lesiones (o incluso ninguna) y han evolucionado hacia su reducción frente a los que únicamente habían sido infectados. Pero la variabilidad individual ha sido alta, con cabritos sin lesiones hasta otros con formas multifocales a (grupo VI) o incluso con formas difusas con abundantes BAAR (grupo IV), lo que reproduciría lo que ocurre en condiciones de campo (Pérez *et al.*, 1995; Corpa *et al.*, 2000c; Reddacliff *et al.*, 2006; de Silva *et al.*, 2015; Windsor, 2015). En ningún caso se detectaron signos clínicos, algo esperable dado que los sacrificios más tardíos tuvieron lugar a los 330 dpi y dado el curso prolongado de la infección por Map que hace que antes de los 1,5-2 años no se observen (Chiodini *et al.*, 1984a; Clarke, 1997; Dennis *et al.*, 2011). Sin embargo, uno de los cabritos (grupo IV) desarrolló lesiones difusas que se han asociado a la presencia de adelgazamiento o incluso diarrea (Corpa *et al.*, 2000a; Pérez *et al.*, 2000; González *et al.*, 2005). Aunque en este caso, desde el punto de vista histológico, esta fue la calificación otorgada, el hecho de que aún estuviera la lesión localizada en zonas concretas del yeyuno, permite suponer que la funcionalidad del intestino delgado no se haya visto resentida todavía a niveles clínicos.

En el presente estudio, de acuerdo con lo demostrado en otros trabajos experimentales en la especie ovina (Juste *et al.*, 1994), caprina (Storset *et al.*, 2001) o bovina (Muñoz, 2014), la vacunación 1 mes antes de la infección (VI), ha demostrado que no protege de la infección por Map a la mayoría de los animales, pero si les otorga una marcada protección, tomando como indicador la gravedad y el tipo de lesión encontrado, en comparación con los animales del

grupo NVI. Del total de 7 cabritos sacrificados del grupo VI, en 3 no se encontraron lesiones (42,8%), uno a los 150 dpv (120 dpi) y los dos restantes a los 360 dpv (330 dpi). Del resto, tres presentaban lesiones focales y uno multifocal a (encontrado en el primer sacrificio), es decir, restringidas al tejido linfoide, lo que se ha asociado, en paratuberculosis, a formas de latencia o protección (Pérez *et al.*, 1996; Sigurðardóttir *et al.*, 1999; Corpa *et al.*, 2000a; Storset *et al.*, 2001; Krüger *et al.*, 2015b; Arrazuria *et al.*, 2016; de Silva *et al.*, 2018). Además, se ha observado una disminución de la gravedad de las lesiones valorada mediante el recuento del número de granulomas, que se redujo significativamente a lo largo del estudio, frente a lo que ocurre en los animales del grupo NVI, así como una diferente morfología de los granulomas localizados en el tejido linfoide, que aparecían bien delimitados e incluso con fibrosis, en los animales del grupo VI frente a los del grupo NVI que presentaban un carácter infiltrativo.

Los granulomas bien delimitados del tejido circundante se han asociado con formas de protección tanto en paratuberculosis (Juste *et al.*, 1994; García-Marín *et al.*, 1997; Delgado *et al.*, 2013; Fernández *et al.*, 2014) como en tuberculosis (Wangoo *et al.*, 2005; Johnson *et al.*, 2006; García-Jiménez *et al.*, 2012). Además, su fibrosis, se ha relacionado con formas regresivas, de involución de los mismos (Juste *et al.*, 1994; Johnson *et al.*, 2006; Delgado *et al.*, 2013; Fernández *et al.*, 2014).

Teniendo todo esto en cuenta, los resultados de este estudio indicarían que la acción de la vacuna sobre las lesiones asociadas a la infección por Map es provocar, por un lado, su contención en formas focales, localizadas en el tejido linfoide, evitando su progresión hacia formas más graves (como sucede en el curso normal de la infección de acuerdo a lo encontrado en el grupo NVI), pero por otro su regresión, como se ha comprobado en el segundo sacrificio, donde el número de lesiones fue significativamente menor. Incluso, cabe la posibilidad de que en algún animal que, si hubiera desarrollado lesiones, éstas hubieran llegado a desaparecer, ya que no se encontraron en el 50% de los animales sacrificados a los 330 dpi.

Este hallazgo ya se ha sugerido en trabajos previos, tanto experimentales como de campo, tanto en cabras (Corpa *et al.*, 2000b; Hines II *et al.*, 2014), como en vacas (Sweeney *et al.*, 2009; Muñoz, 2014) y en ovejas (Nisbet *et al.*, 1962; Juste *et al.*, 1994; Pérez *et al.*, 1995; Reyes, 2007), y en este estudio parece que quedaría comprobado.

Los mecanismos que inducen esos cambios en las lesiones granulomatosas en función de la vacunación no se han investigado en este trabajo. Hay estudios previos (Fernández *et al.*, 2017) que han encontrado una expresión diferencial de citoquinas y otros mediadores de la inflamación en los macrófagos que forman los granulomas según el tipo de lesión, de forma que en los localizados en las lesiones focales producirían mayores niveles de iNOS o TNF- α , sugiriendo una polarización hacia formas M1, mientras que en formas difusas, asociadas a progresión clínica, lo estarían hacia el polo M2, con mayores niveles de TGF- β y otros productos. En el caso de la tuberculosis se ha observado la misma polarización que en el caso de la paratuberculosis, aunque no está tan clara la diferenciación entre los estadios y se observa una coexistencia de ambos tipos M1 y M2, dejando claro, eso sí, que los M1 promueven la formación de los granulomas delimitados mientras que los M2 lo inhiben, mediante la expresión de la IL-4 (Huang *et al.*, 2015). De acuerdo a estos resultados, es posible que la vacunación induzca cambios en la respuesta que ofrecen las células inflamatorias en los propios granulomas, que pudieran modular su evolución hacia formas regresivas. Esta hipótesis debe ser confirmada con futuros estudios comparativos de ambos tipos de granulomas.

En conclusión, y según todos estos hallazgos, la vacunación frente a paratuberculosis antes de la infección por Map tiene un claro efecto protector en cuanto a conseguir una reducción del número de lesiones.

Otro de los objetivos de este estudio era evaluar un posible efecto terapéutico. Diferentes estudios realizados en campo, donde se han vacunado animales en rebaños con casos clínicos de paratuberculosis, han mostrado también una notable reducción de la aparición de casos clínicos (Crowther *et al.*, 1976; Pérez *et al.*, 1995; Corpa *et al.*, 2000c; Windsor, 2006; Alonso-Hearn *et al.*, 2012), si bien parece que la protección no era completa ya que incluso hasta pasado el año

o más tras la vacunación seguían apareciendo animales con lesiones graves y signos clínicos (Corpa *et al.*, 2000c; García-Pariente *et al.*, 2003; Windsor, 2006), lo que se achacaba a que posiblemente se tratara de individuos con formas avanzadas de la infección en el momento de la vacunación (Corpa *et al.*, 2000c; García-Pariente *et al.*, 2003). Los resultados de este estudio han puesto de manifiesto una marcada variabilidad en el efecto de la vacunación en cabritos inmunizados tras 150 días de su infección experimental con Map, por lo que dicho efecto terapéutico no ha podido ser confirmado con rotundidad. Si bien, tras 180 dpv, y 330 dpi, hubo un animal sin lesión y otro con una lesión focal, lo que podría sugerir una positiva acción de la vacuna, el hecho de que los otros tres animales mostraran lesiones avanzadas (incluso uno una forma difusa grave), de intensidad superior a las mostradas por el grupo NVI, indicaría no sólo que ese efecto terapéutico no existiría, sino que incluso se habría producido una exacerbación de la infección. Esta afirmación debe ser pronunciada con reservas ya que se debe tener en cuenta que el número de animales examinados ha sido bajo y que una de las características de la paratuberculosis es la gran variabilidad de respuestas que muestran los animales a la infección (Buergelt *et al.*, 1978; Pérez *et al.*, 1996; Tafti y Rashidi, 2000). Con el objetivo de minimizar dichas variaciones, los animales empleados en este trabajo se supone que tienen la base genética semejante (proceden del mismo rebaño) y han estado sometidos a condiciones similares de manejo.

En línea con esta conclusión, en paratuberculosis, en un estudio de revacunación en corderos (Gilmour y Angus, 1973), se encontró que la administración de una nueva dosis vacunal en animales previamente vacunados, causaba una exacerbación en la infección paratuberculosa. En tuberculosis humana, donde también se ha propuesto el empleo terapéutico de la vacunación con BCG, su uso es motivo de controversia porque existen casos documentados donde se ha observado un agravamiento de la enfermedad (Gröschel *et al.*, 2014), asociados a la liberación de una cascada de citoquinas proinflamatorias, como TNF- α (Prabowo *et al.*, 2013). Otra hipótesis, ya mencionada previamente en el estudio 1 de esta tesis, sería que la vacunación de animales donde hubieran ocurrido sensibilizaciones previas (en nuestro caso el desafío por Map) habría

inducido la activación de mecanismos de bloqueo de la acción de la vacuna, o un enmascaramiento de su efecto, como se ha sugerido para la BCG (Andersen y Doherty, 2005).

Sin embargo, tampoco puede descartarse del todo que justamente esos tres animales mostraran ya, en el momento de la vacunación, formas lesionales avanzadas cuya progresión la vacunación no ha podido frenar, hipótesis que ya se había planteado (Corpa *et al.*, 2000c; García-Pariente *et al.*, 2003), si bien parece poco probable dado que transcurrieron 6 meses entre la vacunación y el sacrificio. Tampoco debe obviarse que los otros dos animales de este grupo habían presentado o una lesión focal, o ninguna, hecho que solo ha ocurrido en el grupo VI. Esto apoyaría que la vacunación si pudiera tener ese efecto terapéutico. Gwozdz *et al.* (2000a) llevaron a cabo la vacunación de corderos previamente infectados y concluyen que sí se consigue una notable reducción en la aparición de casos clínicos en comparación con los animales únicamente infectados, si bien entre los 14 corderos vacunados, dos desarrollaron casos clínicos. En cualquier caso, este estudio es difícilmente comparable con el nuestro, ya que estos autores inmunizan a los corderos solamente 15 días tras la infección, momento en que aun posiblemente no hubiera tenido lugar una colonización definitiva del intestino (Reyes, 2007; Verna *et al.*, 2007; Delgado *et al.*, 2013). A la vista de la gran variabilidad encontrada, parece necesario desarrollar estudios a mayor escala, para ver si ese efecto terapéutico realmente se consigue.

Otro de los efectos estudiados de la vacunación es el que tiene sobre la respuesta inmunitaria específica frente a Map. Tras la inmunización de los animales, tanto a los -30 dpi como a los 150 dpi, se desencadenó una intensa respuesta celular y humoral. Este hecho ha sido ya previamente descrito, tanto en cabras (Corpa *et al.*, 2000c; Chartier *et al.*, 2012), como en conejos (Arrazuria *et al.*, 2016), bovinos (Muñoz, 2014; Tewari *et al.*, 2014) y ovejas (Juste *et al.*, 1994; Corpa *et al.*, 2000b; Begg y Griffin, 2005).

La respuesta inmunitaria celular fue evaluada a los 120 dpv (90 dpi), mediante la IDTB comparada. Al realizarse esta prueba, ninguna cabra fue positiva en el diagnóstico de tuberculosis, demostrando su validez en su uso para diferenciar

animales vacunados, al menos en explotaciones libres de tuberculosis (Chartier *et al.*, 2012; Coad *et al.*, 2013; Garrido *et al.*, 2013). Sin embargo, si se empleara solamente la IDTB simple, sí se hubiera producido dicha interferencia, ya que 7 de los cabritos vacunados hubieran sido positivos a tuberculosis a los 120 dpv (4 meses post-vacunación). En un estudio de campo, también en cabras (Chartier *et al.*, 2012) a los 8 mpv encontraron que disminuían esas interferencias, aunque todavía se producían en algunos animales. A la vista de estos resultados, y aún considerando que el número de animales estudiados no es muy elevado, debería emplearse la IDTB comparada, en la especie caprina, en las campañas de erradicación de tuberculosis, al menos en los primeros meses tras la vacunación, tal y como se ha señalado para la especie bovina (Coad *et al.*, 2013; Garrido *et al.*, 2013; Muñoz, 2014). También se valoró la johnina, a la vez que la PPD aviar, y, al contrario de lo que se ha observado en otros estudios (Köhler *et al.*, 2001; Nedrow *et al.*, 2007), no ha ofrecido mejores resultados.

Además de la IDTB comparada, la respuesta inmunitaria celular se estudió mediante el test de la liberación del IFN- γ (IGRA), ya que esta citoquina es una de las más importantes en la respuesta celular frente a Map (Stabel, 2006; Begg *et al.*, 2009), y niveles elevados en sangre periférica se han asociado a protección frente a la infección por Map (de Silva *et al.*, 2010). Ambas vacunaciones, a los -30 y 150 dpi, lograron inducir un incremento en la secreción de IFN- γ en esta prueba, de forma similar a lo demostrado en estudios previos tanto en intensidad (Gwozdz *et al.*, 2000b; Valheim *et al.*, 2002b; García-Pariente *et al.*, 2006; Muñoz, 2014; Ghosh *et al.*, 2015), como en el momento de aparición, aproximadamente entre los 1 y 2 meses post vacunación (Corpa *et al.*, 2000b; Gwozdz *et al.*, 2000a; García-Pariente *et al.*, 2006; Muñoz, 2014; Arrazuria *et al.*, 2016). Este incremento fue siempre superior cuando las muestras de sangre se estimularon con la PPD aviar que con la PPD bovina, resultado que concuerda con lo indicado en estudios anteriores (Muskens *et al.*, 2002; Geijo, 2007; Pérez de Val *et al.*, 2012; Arrazuria *et al.*, 2016).

La vacunación a los -30 dpi produjo un efecto prolongado y significativo en la liberación del IFN- γ que duró 6 meses, similar a lo observado cuando se ha empleado una vacuna viva atenuada (Gwozdz *et al.*, 2000a), aunque otros

estudios en ganado vacuno señalan que el efecto permaneció durante 30 mpv (García-Pariente *et al.*, 2003). Sin embargo, en los animales vacunados a los 150 dpi, las diferencias significativas con el grupo no vacunado solo se mantuvieron durante 3 meses, y los niveles de IFN- γ fueron menores. Se trata de un hallazgo interesante de difícil explicación. No parece que la diferencia de edad sea un factor determinante, ya que los cabritos del grupo IV, en el momento de la vacunación, tenían entre 7-8 meses, cuando su sistema inmunitario debería estar desarrollado y ofrecer una respuesta inmunitaria más intensa que en animales más jóvenes (Corpa *et al.*, 2000b). En vacunación con BCG frente a tuberculosis humana, se ha propuesto que sensibilizaciones previas (en este caso la infección con Map) por micobacterias ambientales, podrían dar lugar a mecanismos de bloqueo o un enmascaramiento del efecto de la vacuna (Andersen y Doherty, 2005), que se traduciría en una menor producción de IFN- γ . También en paratuberculosis se ha señalado que la revacunación, que supondría un segundo contacto del animal con Map, produce un deterioro del estado inmunológico del animal (Gilmour y Angus, 1973; Bendixen, 1978). Este fenómeno podría haber ocurrido en estos animales, donde la vacunación habría actuado como un segundo contacto.

La respuesta inmunitaria celular periférica, y en concreto los niveles elevados de IFN- γ , se han asociado tradicionalmente a las formas de protección en paratuberculosis (Stabel, 2000a; Begg y Griffin, 2005; Koets *et al.*, 2015). De forma global, los resultados obtenidos apoyarían esta hipótesis, ya que se ha observado que en el grupo VI, donde los niveles de esta citoquina fueron más elevados, la protección alcanzada fue mayor, mientras que en el grupo IV es donde aparecieron animales con lesiones más graves.

Sin embargo, cuando se analizan los resultados de forma más detallada, se aprecia que en el grupo NVI, varios animales han presentado lesiones focales a los 120 dpi, asociadas a fases iniciales (Juste *et al.*, 1994; Fernández *et al.*, 2014) o de latencia-protección (Pérez *et al.*, 1996; Corpa *et al.*, 2000a; Vázquez *et al.*, 2013) de la infección por Map, sin que hayan mostrado niveles elevados de IFN- γ . Este hecho ha sido ya previamente señalado tanto en casos naturales como experimentales por varios autores (Begg *et al.*, 2011; Vázquez *et al.*, 2013;

Fernández *et al.*, 2017). Por otro lado, el cabrito número 5, que desarrolló lesiones difusas con bastantes BAAR, fue el que mostró, en el momento del sacrificio, los niveles más elevados de IFN- γ tras la estimulación de la sangre. Un hallazgo similar lo encontró Muñoz (2014) en su estudio experimental, donde un ternero vacunado con lesiones difusas multibacilares también presentó niveles elevados de esta citoquina. A la vista de estos resultados, parece que una respuesta celular periférica elevada sería más bien un indicador de que el animal ha estado en contacto con antígenos de Map, bien por una infección (se han encontrado niveles elevados en animales del grupo NVI) o la vacunación. Sin embargo, no necesariamente estaría asociada a protección frente a la infección. Si se analiza la relación con las lesiones, los hallazgos de este estudio sugieren que la intensidad de dicha respuesta está en relación con la extensión de la lesión, ya que en el grupo NVI se observa un incremento conforme avanza la infección, coincidiendo con la existencia de formas multifocales a y sobre todo b en los animales, y el cabrito con lesión difusa es el que muestra la mayor reacción a la prueba IGRA, a pesar de estar vacunado.

Este estudio también ha valorado la influencia que la vacunación tiene sobre la respuesta inmunitaria humoral específica, que se ha analizado mediante una técnica de ELISA indirecto. En todos los grupos vacunados se observó un incremento en los niveles de anticuerpos séricos, que aparecieron a los 60 dpv y se mantuvieron elevados, por encima de los controles, durante 7 y 3 meses, en los grupos VI y IV, respectivamente. Son numerosos los estudios que han señalado que la vacunación induce una intensa respuesta humoral (Muskens *et al.*, 2002; García-Pariente *et al.*, 2003, 2006; Begg y Griffin, 2005; Geijo, 2007; Hines II *et al.*, 2007b, 2014; Reyes, 2007; Gillan *et al.*, 2010; Coad *et al.*, 2013; Tewari *et al.*, 2014), como la observada en este trabajo. En algunos estudios en la especie caprina la duración de dicha respuesta fue similar a nuestro caso, como en el realizado por Corpa *et al.* (2000b), si bien en el mismo se empleó una vacuna diferente, aunque con el mismo antígeno (Gudair®) y en esos animales no se realizó desafío con Map. En otro trabajo llevado a cabo en cabras con la misma vacuna que en este mismo estudio (Hines II *et al.*, 2014), la duración se prolongó durante 13 meses e incluso mucho más tiempo e incluso más de un año,

con la vacuna Gudair® (Singh *et al.*, 2007). Ahora bien, si se considera el punto de corte en el cual un índice ELISA se considera positivo cuando la prueba empleada en este estudio se usa con fines diagnósticos, solamente un animal hubiera sido positivo en el momento de su sacrificio. En cualquier caso, esta ha sido una medición puntual, y considerando que la respuesta humoral ha sido más elevada en los grupos vacunados que en sus controles, estos resultados confirmarían el hecho conocido de que el diagnóstico serológico de paratuberculosis no es fiable en animales vacunados, al menos durante los primeros meses tras la vacunación.

Al igual que en la producción de IFN- γ en sangre periférica, en los niveles de anticuerpos también se han observado diferencias en función del momento en que los animales fueron vacunados, tanto en su intensidad como en su duración. Por ello, de ser ciertos los mecanismos propuestos de interferencia en la respuesta a la vacunación en animales previamente sensibilizados (Andersen y Doherty, 2005), estos actuarían de forma general sobre la respuesta inmunitaria tanto celular como humoral.

Respecto al papel que la respuesta inmunitaria humoral pudiera jugar en la infección por Map, un número muy elevado de estudios señalan que su aparición está relacionada con fases avanzadas de la enfermedad y especialmente con la presencia de abundantes BAAR (Clarke, 1997; Pérez *et al.*, 1997; Storset *et al.*, 2001; Vázquez *et al.*, 2013). Esto se confirma en nuestro estudio, ya que mediante la inmunización se introducen cargas muy elevadas de Map en el animal a nivel subcutáneo. Recientemente se ha apuntado a que los anticuerpos también podrían jugar un papel frente a Map (Achkar y Casadevall, 2013), lo cual podría estar en relación con los niveles elevados de anticuerpos en el grupo VI; sin embargo, en los cabritos del grupo NVI que no han desarrollado formas avanzadas, no se encontraron niveles elevados de anticuerpos, como se ha observado en otros estudios en casos naturales (Pérez *et al.*, 1997; Vázquez *et al.*, 2013). Por lo tanto, más bien parece que su presencia estaría en relación con la progresión de la infección por Map y la aparición de lesiones más extensas, ya que los niveles se elevan al final del experimento en el grupo NVI, coincidiendo con la aparición de lesiones multifocales. Esto lo apoya la observación de que el

animal del grupo IV con lesiones difusas también mostraba los índices ELISA más elevados encontrados en este estudio, y abundantes BAAR en los tejidos, además de estar vacunado. De todas formas, la variabilidad individual, al analizar la relación entre el tipo de lesión y la respuesta inmunitaria humoral, también ha sido alta.

Finalmente, se ha valorado también la influencia que la vacunación pudiera tener sobre los niveles de subpoblaciones linfocitarias en sangre circulante, valoradas mediante citometría de flujo. En estudios previos (Mateo *et al.*, 1997; Corpa, 1999; Hasvold *et al.*, 2002; Gillan *et al.*, 2010a; de Silva *et al.*, 2015) se habían encontrado variaciones en los niveles de linfocitos sanguíneos asociadas a la vacunación, pero con resultados contradictorios. Por ejemplo, mientras que en unos se incrementaban los niveles de linfocitos T CD4⁺ (de Silva *et al.*, 2015) (De Silva *et al.*, 2015), en otros disminuían (Gillan *et al.*, 2010a). En nuestro estudio, el resultado más destacable ha sido la gran variabilidad individual encontrada, que no ha permitido definir diferencias significativas en los niveles de las distintas subpoblaciones linfocitarias analizadas, dado el tamaño de los grupos. Por lo tanto, la posible acción de la vacunación sobre estos parámetros no se ha podido confirmar ni descartar. A la vista de las diferencias tan marcadas que aparecen entre animales, sería necesario realizar un estudio más amplio, con un número más elevado de individuos por grupo para poder extraer conclusiones.

Aunque no es un resultado relacionado con los tratamientos llevados a cabo en los animales, se ha observado que la subpoblación de linfocitos mayoritaria en sangre periférica es la de linfocitos T $\delta\gamma$. Esta subpoblación juega un papel muy importante en las primeras fases de la respuesta innata frente a infecciones intracelulares (Pollock y Welsh, 2002), en concreto en la organización de los granulomas (Tanaka *et al.*, 2000), pudiendo estar aumentadas por ello, en los animales con lesiones focales o multifocales. Además, esta subpoblación es la población mayoritaria de los linfocitos de la sangre periférica en los terneros jóvenes (Hein y Mackay, 1991) y según nuestros resultados, también en cabritos. Son muy abundantes en los epitelios, por lo que serían la primera línea de defensa frente a la entrada de microorganismos (Hein y Mackay, 1991; Hayday, 2000), aunque este último aspecto o su papel en la formación de los granulomas no se

ha podido confirmar en nuestro estudio, y debería investigarse en la paratuberculosis.

Además de la respuesta inmunitaria periférica, se han estudiado las variaciones en la respuesta inmunitaria local, mediante el análisis de los niveles de poblaciones linfocitarias presentes en el tejido linfoide intestinal y nódulos linfáticos, medidos por citometría de flujo, y de la producción de IFN- γ con el test IGRA tras la estimulación *in vitro* de linfocitos de esas localizaciones con PPD. Al igual que en sangre periférica, la gran variabilidad individual observada en el presente estudio no permitió obtener resultados concluyentes, por lo que, futuros estudios, deberían emplear, quizás, un mayor número de animales por grupo para compensar la variabilidad individual. Un resultado llamativo ha sido que, a diferencia que, en sangre circulante, el tipo linfocitario predominante en todas las muestras, independientemente del grupo, han sido los linfocitos B. En los folículos linfoides de las placas de Peyer de los rumiantes y nódulos linfáticos, los linfocitos B son la población mayoritaria (Larsen y Landsverk, 1986; Reynolds *et al.*, 1991; Corpa *et al.*, 2001) y aunque también hay linfocitos T en las regiones interfoliculares (Reynolds *et al.*, 1991), los primeros serían más numerosos. En contraste con lo que sucede en sangre periférica, en el tejido linfoide los linfocitos T $\delta\gamma$ serían una población poco numerosa. Respecto a los linfocitos CD4⁺ y CD8⁺, aumentan en todas las localizaciones entre el primer y segundo sacrificio, lo que podría estar relacionado con el desarrollo de una respuesta inmunitaria específica, de tipo adaptativo, que se estaría desarrollando cada vez con mayor intensidad, como consecuencia del contacto con antígenos presentes en el intestino. La caracterización de poblaciones celulares a partir de muestras de tejido de intestino o nódulos linfáticos mediante citometría de flujo ha demostrado proporcionar información relevante en estudios previos sobre patogenia en paratuberculosis (Weiss *et al.*, 2006; Albarrak *et al.*, 2017). Por ello, este es un campo en el que se debería seguir investigando en futuros estudios que aborden la respuesta local asociada a la vacunación, pero empleando un mayor número de animales por grupo para compensar la variabilidad individual.

La vacunación, independientemente del momento en el que se aplicase, no afectó a la producción de IFN- γ por parte de las células mononucleares extraídas

de las placas de Peyer o nódulos linfáticos. Únicamente se han visto diferencias significativas con el resto de grupos, cuando las células estimuladas procedían del NLP, en el grupo VI y a los 360 dpv (en ese momento, solo se pudo analizar un animal del grupo VNI, lo que explicaría que este grupo no haya ofrecido valores significativamente elevados). Sin embargo, en el grupo IV no se han encontrado, si bien estos animales se valoraron en el día 180 tras la vacunación, momento en el que tampoco había una producción elevada en el grupo VI. Es de destacar que solo se encontraran niveles más elevados en los animales del segundo sacrificio (360 dpv), cuando ya los niveles de IFN- γ tras la estimulación de la sangre periférica empezaban a decrecer. Esto no coincide con lo encontrado en otro estudio en la especie bovina (Sweeney *et al.*, 2009) en el que a los 90 dpv ya encuentran mayores niveles de secreción de esta citoquina en linfocitos del nódulo preescapular y en sangre periférica. También en terneros, Muñoz (2014), observa niveles de IFN- γ más elevados tras la estimulación de linfocitos del NLP en animales vacunados a los 330 dpv, en los que los niveles de producción de esta citoquina en sangre también descendían, en coincidencia con nuestros resultados. Sin embargo, en ese estudio, solo analizan ese momento tras la vacunación, por lo que no sabe lo que sucedía anteriormente. En cualquier caso, se puede concluir que los linfocitos del NLP participarían en la producción de IFN- γ tras la vacunación.

La vacunación no parece tener un efecto sobre los linfocitos presentes en el tejido linfoide intestinal, que no participarían en la producción local de esta citoquina en el punto donde se están produciendo las lesiones, en contraposición con lo encontrado en terneros por Muñoz (2014), que si encuentra niveles más elevados que en los animales no vacunados. Aunque no se puedan descartar diferencias de especie, posiblemente el escaso número de animales estudiado, y la variabilidad individual encontrada, puedan explicar los distintos resultados.

En el grupo NVI, si se ha encontrado una mayor producción de IFN- γ en linfocitos procedentes del NL, en ambos sacrificios, y del tejido linfoide de las placas de Peyer en el segundo, lo que indicaría que la infección si sería capaz de sensibilizar linfocitos de esas localizaciones, que podrían jugar un papel en la interacción a ese nivel entre Map y el hospedador. Hallazgos similares obtuvo

Muñoz (2014) en terneros, a los 300 dpi, si bien en su caso las diferencias existieron con el grupo control no infectado, pero no con los vacunados.

Finalmente, también se ha valorado el efecto de la vacunación sobre la excreción fecal de Map y la colonización de tejidos. Respecto a la excreción, el efecto sería positivo, ya que solo se ha aislado la bacteria a partir de heces en un animal del grupo NVI con lesión multifocal b, y en ningún animal vacunado. En los tejidos, se aisló Map del animal del grupo IV con lesiones difusas. Según estos resultados, la vacunación si tendría un claro efecto en la presencia de bacterias viables en los animales vacunados antes de la infección. Esto no ocurriría en todos los casos al vacunar animales infectados, lo que apoyaría la hipótesis de la exacerbación ya señalada. Sin embargo, debe considerarse que solo ha ocurrido en un animal, no en el resto. Destaca que los dos resultados positivos solamente se han conseguido en el medio HEYM, que si bien es cierto que es el que se ha empleado en el aislamiento de Map en cabras (Salgado *et al.*, 2007), hay algún trabajo que señala que sería menos sensible que el medio Middlebrook 7H9 también empleado en nuestro estudio (Schwalm *et al.*, 2018), pero a partir de muestras bovinas.

Al considerar los resultados de la PCR anidada, se observa que esta técnica fue más sensible que el aislamiento bacteriológico, algo ya previamente señalado (Collins *et al.*, 1993; Gao *et al.*, 2009; Soumya *et al.*, 2009; Delgado *et al.*, 2013; Muñoz, 2014). Todos los animales del grupo VI, excepto uno sacrificado a los 120 dpi fueron positivos, si bien el número de muestras en las que se identificó ADN de Map fue bajo, normalmente una por animal. En el caso del grupo NVI, también se identificó en todos los casos, excepto en 4 animales sacrificados a los 120 dpi, pero a diferencia del caso anterior, el número de muestras positivas fue más alto, aunque destaca que, sobre todo en el primer sacrificio hubo varios animales negativos. En el grupo IV, solo un animal sin lesiones fue negativo, y en el resto mayoritariamente se identificó ADN de Map en al menos dos muestras distintas, e incluso de las 3 examinadas en el animal nº 5, con lesión difusa. En general, estos resultados se correlacionan con las lesiones, e indican que los animales vacunados, especialmente los del grupo VI, se infectan, pero en menos localizaciones que los no vacunados, o los del grupo IV, lo que confirmaría el

efecto de la vacunación sobre una reducción de la colonización de tejidos, como ya se ha señalado (Muñoz, 2014). Por otro lado, conviene señalar que la PCR detecta fragmentos de ácidos nucleicos de Map (Garrido *et al.*, 2000b), no necesariamente el microorganismo entero sino que también incluiría bacilos que hubieran sido destruidos por la acción de macrófagos u otros mecanismos, o incluso que hubieran llegado en tránsito a las localizaciones examinadas. Por ello, a pesar de su menor sensibilidad (Garrido *et al.*, 2000b; Delgado *et al.*, 2013; Sonawane y Tripathi, 2016b), el cultivo sería un indicador único de colonización por bacilos viables. En relación con el examen histopatológico, también la PCR parece ser una técnica más sensible, ya que ha puesto en evidencia la existencia de ADN de Map en animales sin lesiones. El hecho de que se tomen varias secciones de tejido para la PCR frente a una para el estudio histológico, y la posibilidad de que existan ácidos nucleicos de Map en un tejido sin que hayan dado lugar a un granuloma -que precisaría de la existencia de antígenos concretos de la micobacteria- (Martin *et al.*, 2016), podría explicar esta diferente sensibilidad. En cualquier caso, la PCR a partir de muestras de parafina se presenta como un complemento del examen histológico para poder comprobar la especificidad de lesiones granulomatosas, especialmente las de tipo focal, que suelen ser negativas a otras técnicas de detección de Map como ZN o los métodos inmunohistoquímicos (Pérez *et al.*, 1996; Delgado *et al.*, 2013).

En resumen, a partir de los resultados bacteriológicos, parece deducirse que la vacunación sí que provoca una reducción de la colonización de tejidos por Map, especialmente en el grupo VI, donde no se han recuperado bacterias viables, lo que estaría de acuerdo con estudios anteriores que han observado una disminución en la presencia de Map cuando la vacunación se aplicaba previa a un desafío (Reddacliff *et al.*, 2006; Windsor, 2006; Sweeney *et al.*, 2009; Hines II *et al.*, 2014) o incluso en animales que probablemente estuvieran ya infectados (Alonso-Hearn *et al.*, 2012; Dhand *et al.*, 2016), en los que aunque se redujo la excreción de Map al medio, algunos animales aún la mostraban, algo que no se observó en nuestro caso.

En relación con la infección por Map, en el grupo NIV, también se observó una gran variabilidad individual, algo frecuente y ya encontrado en otros estudios

experimentales (Juste *et al.*, 1994; Köhler *et al.*, 2001; Storset *et al.*, 2001; Delgado *et al.*, 2013; Fernández *et al.*, 2014). Sin embargo, aunque se observó un progreso de la infección hacia formas más avanzadas entre el primer y segundo sacrificio, no se produjeron lesiones difusas, en contraste con otros trabajos similares (Verna *et al.*, 2007; Delgado *et al.*, 2013; Krüger *et al.*, 2015b) donde a los 330 dpi o incluso antes se habían observado lesiones graves. Es difícil comparar unos y otros trabajos por tratarse de especies, razas, inóculos y dosis diferentes. En algunos casos, se han usado inóculos directamente extraídos de la mucosa intestinal de animales clínicamente enfermos (Verna *et al.*, 2007; Delgado *et al.*, 2013), que se ha confirmado que son más patógenos que las cepas producidas en laboratorio (Begg *et al.*, 2010; Fernández *et al.*, 2015). La cepa K-10 empleada en nuestro estudio ya se había utilizado antes con éxito (Stabel *et al.*, 2009; Fernández *et al.*, 2014) aunque su patogenicidad se ha demostrado que es menor que otras cepas aisladas de casos clínicos (Fernández *et al.*, 2014). También debe considerarse el número de pases que dicha cepa pudiera haber llevado en el laboratorio, factor que se ha visto es crucial ya que determina su pérdida de patogenicidad (Fernández *et al.*, 2015). En cualquier caso, el hecho de que haya existido un animal con lesiones difusas y abundantes BAAR, aunque no fuera en el grupo NVI, confirma la patogenicidad del inóculo empleado y pone el acento en que es posible que la respuesta individual de los animales sea el factor clave que condiciona la evolución de la infección, reproduciendo más fielmente lo que sucede en condiciones naturales.

Por lo que respecta al desarrollo de la infección, la localización de las lesiones ha sido la esperada, con un preponderante papel de las placas de Peyer yeyunales y la válvula ileocal, y no tanto el íleon, como ya se ha puesto de manifiesto en numerosos estudios (Sigurðardóttir *et al.*, 1999; Storset *et al.*, 2001; Verna *et al.*, 2007; Delgado *et al.*, 2013; Fernández *et al.*, 2014; Muñoz, 2014). También la respuesta inmunitaria o la evolución de las lesiones, con formas de tipo multifocal b, más graves, presentes únicamente entre los animales sacrificados a los 330 dpi, está de acuerdo con lo encontrado en los estudios anteriormente citados y confirma la validez de este modelo.

En conclusión, de este estudio se deduce que la vacunación tiene efectos importantes sobre la patogenia de la paratuberculosis, influyendo sobre el tipo de lesiones y su evolución, favoreciendo su reducción. Esto ha sido evidente en el grupo VI. Sin embargo, la vacunación de animales ya infectados ha mostrado una gran variabilidad en la respuesta de los animales, coexistiendo individuos con lesiones focales o incluso sin lesiones, con otro con formas graves y abundantes BAAR, por lo que no se ha podido demostrar fehacientemente un pretendido efecto terapéutico en todos los casos; incluso estos resultados sugieren que podría contribuir a exacerbar una infección ya instaurada en algunos animales. La vacunación también ha mostrado su efecto sobre la respuesta inmunitaria, en cuanto a la producción de IFN- γ y anticuerpos en sangre periférica, pero no así a nivel local. Tampoco parece incidir sobre los niveles de poblaciones de linfocitos circulantes o presentes en los tejidos. Asimismo, también influye sobre la presencia de bacterias viables en los animales, consiguiendo su reducción, especialmente en los cabritos vacunados antes de la infección por Map.

CAPÍTULO V

**PRODUCCIÓN DE IFN- γ EN SANGRE
PERIFÉRICA EN CABRAS VACUNADAS
FRENTE A PARATUBERCULOSIS EN
RESPUESTA A DIFERENTES ANTÍGENOS
DE *Mycobacterium avium* subespecies
paratuberculosis Y *M. bovis***

1. INTRODUCCIÓN

La aplicación de la vacunación en la especie bovina prohibida en muchos países, incluido España, debido a las interferencias que ocasiona en las pruebas de diagnóstico empleadas en los programas de erradicación de la tuberculosis (Bastida y Juste, 2011). Estos programas, como el PNETB en el caso de España, emplean la IDTB simple como técnica principal de diagnóstico de la tuberculosis, complementada con la prueba IGRA (MAPA, 2018). En ambas pruebas se ha observado la existencia de reacciones cruzadas entre los animales vacunados frente a paratuberculosis y aquellos infectados de tuberculosis (Nedrow *et al.*, 2007; Pérez de Val *et al.*, 2012; Garrido *et al.*, 2013), que estarían ocasionadas por la poca especificidad de la PPD bovina, que se emplea como antígeno en dichas pruebas. La PPD bovina es un derivado proteico purificado del cultivo tratado por calor de *M. bovis* (Good y Duignan, 2011). Esta micobacteria posee similitudes filogenéticas con Map (Rogall *et al.*, 1990) lo que hace que compartan antígenos comunes (Pitulle *et al.*, 1992).

En los últimos años, se han producido y evaluado nuevos antígenos que puedan sustituir a las tuberculinas clásicas de forma que aumenten su especificidad y permitan diferenciar aquellos animales vacunados frente a la paratuberculosis y aquellos animales infectados con tuberculosis, entre los que destacan los cócteles antigénicos PC-EC y PC-HP, los cuales han sido evaluados en algunos estudios experimentales en cabritos o terneros infectados de tuberculosis (Vordermeier *et al.*, 2001, 2011; Pérez de Val *et al.*, 2012; Lyashchenko *et al.*, 2017; Serrano *et al.*, 2017) pero no en experimentos de vacunación en condiciones de campo, o en animales infectados experimentalmente con Map.

En el caso de Map, también se han valorado algunos antígenos (Hughes *et al.*, 2013, 2017) para ser empleados en pruebas de detección de la respuesta inmunitaria celular, con el fin de incrementar la sensibilidad y especificidad de la PPD aviar o johnina, empleadas para el diagnóstico de la paratuberculosis, con

resultados, hasta el momento insatisfactorios y que no han logrado superar a los proporcionados por estas PPDs.

Este estudio tuvo como **objetivo** evaluar diferentes antígenos derivados de Map, de *M. bovis* y de *M. avium* subsp. *avium*, empleados en la prueba IGRA, técnica empleada en las campañas de erradicación de tuberculosis, tanto en cabritos de una explotación comercial vacunados frente a paratuberculosis a distintas edades como en animales de la misma especie, vacunados e infectados experimentalmente con Map.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Selección de animales y diseño experimental

Este estudio se llevó a cabo sobre muestras de sangre obtenidas en algunos muestreos de los grupos de animales empleados en el primer y segundo estudio de esta Tesis Doctoral.

El **lote A** estaba formado por cabritos de 1 a 1,5 meses de edad procedentes del experimento del segundo estudio (Capítulo IV, apartado 2.1 página 142), que habían sido desafiados oralmente con Map 30 días después de su vacunación con la vacuna inactivada Silirum® (CZ Veterinaria, Porriño, Pontevedra), tal y como se indica en el Capítulo IV, apartado 2.2. (página 145). Se establecieron 3 grupos de animales: vacunados (V): formado por 2 cabritos que habían sido vacunados, pero no desafiados; infectados (I): constituido por 2 cabritos que habían sido desafiados con Map, pero no vacunados y el grupo NVNI, de 2 cabritos, que no había sido sometidos a ningún tratamiento.

En estos animales se llevó a cabo la evaluación de la producción periférica de IFN- γ , mediante la técnica IGRA, tras la estimulación de las muestras de sangre con diferentes antígenos micobacterianos, que se detallan posteriormente, a los 4 mpv (120 dpv o 90 dpi) y a los 9 mpv (270 dpv o 210 dpi).

El **lote B** lo componían cabras procedentes de una explotación comercial de producción de leche, que habían sido vacunadas a diferentes edades (1,5 meses,

5 meses o animales adultos mayores de 1,5 años) (Capítulo III, apartado 2.1, página 116). Se establecieron 6 grupos de animales: AdultasV y AdultasNV, formado cada uno de ellos por entre 4-5 cabras adultas vacunadas (V) o no (NV); 5MV y 5MNV, compuestos por entre 4-5 cabras (V) y 3 cabras (NV), que habían sido inmunizadas o no a los 5 meses de edad; 1,5MV y 1,5MNV, formados cada uno de ellos por entre 3-5 animales, vacunados (V) o no (NV) a los 1,5 meses de edad. En todos los casos habían sido inmunizados con la vacuna comercial inactivada Gudair® (Vetia Animal Health, S.A., Madrid). En estos animales, también se llevó a cabo la valoración de la producción de IFN- γ tras la estimulación de las muestras de sangre con los mismos antígenos que van a ser detallados a continuación, a los 9 mpv y a los 15 mpv.

2.2. Antígenos empleados

Los antígenos empleados fueron obtenidos a partir de Map, *M. bovis* o *M. avium* subsp. *avium* (Maa) y fueron los siguientes:

- **PPD aviar y PPD bovina** (CZ Veterinaria, Porriño, Pontevedra): derivados proteicos purificados obtenidos de cultivos de Maa o de *M. bovis* respectivamente, tratados por calor (OIE, 2008).
- **Johnina** (Neiker-Tecnalia, Derio, Vizcaya/Bizkaia): derivado proteico purificado obtenido a partir de un cultivo de Map tratado por calor (OIE, 2008; Capsel *et al.*, 2016).
- **Cócteles peptídicos PC-EC y PC-HP** (Thermo Fischer Scientific, EE.UU.): combinaciones de diferentes proteínas propias de *M. bovis*. El cóctel **PC-EC** tiene en su formulación dos proteínas: ESAT-6 y CFP-10, mientras que el **PC-HP** tiene esas mismas proteínas más la Rv-3615c. Estos cócteles peptídicos han sido empleados previamente en el diagnóstico de la tuberculosis bovina y caprina con resultados satisfactorios (Casal *et al.*, 2012; Pérez de Val *et al.*, 2012; Serrano *et al.*, 2017).
- Antígenos **VK 055** y **VK 067** (Vacunek, Derio, Vizcaya/Bizkaia) purificados a partir de Map. Estos últimos únicamente fueron empleados únicamente en muestras del lote A, a los 4 mpv (120 dpv o 90 dpi).

2.3. Valoración de la producción de IFN- γ en sangre periférica

2.3.1. Toma y procesado de las muestras de sangre

En los animales y muestreos señalados en el apartado 2.1 de este Capítulo, se recogieron muestras de sangre en tubos Vacutainer® (Becton Dickinson, Plymouth, Reino Unido) de 10 ml con heparina, mediante punción de la vena yugular. Dentro de las 4 horas posteriores a la recogida, se tomaron 3 alícuotas de 1,5 ml de sangre que fueron estimuladas respectivamente con los siguientes compuestos y concentraciones:

- 100 μ l de PBS.
- 100 μ l de PPD bovina (20 μ g/ml)
- 100 μ l de PPD aviar (20 μ g/ml)

Además, se realizaron otras 3 alícuotas de 0,5 ml de sangre, que fueron estimuladas con:

- 50 μ l de PBS.
- 50 μ l del coctel peptídico PC-EC (5 μ g/ml).
- 50 μ l del coctel peptídico PC-HP (5 μ g/ml).

Por último, se recogieron 4 alícuotas de 0,5 ml de sangre que fueron estimuladas con:

- 35 μ l de PBS.
- 35 μ l de johnina (55 μ g/ml).
- 35 μ l de VK 055 (22 μ g/ml)
- 35 μ l de VK 067 (33 μ g/ml).

El establecimiento de las cantidades de sangre y antígenos se hizo de acuerdo a la disponibilidad de los reactivos y a las indicaciones de los fabricantes. En todos los casos, tanto los cócteles peptídicos como las PPDs fueron reconstituidos según las instrucciones proporcionadas. Todas las estimulaciones se llevaron a cabo en tubos de microcentrífuga de 2 ml (Eppendorf, Alemania).

Las muestras con los diferentes antígenos fueron incubadas en una estufa a 37 °C en atmósfera humidificada durante 20 horas. Una vez finalizada la incubación, se procedió a su centrifugado a 6000 rpm durante 5 minutos, y el plasma sobrenadante obtenido fue recogido y almacenado a -20 °C hasta su posterior uso.

2.3.2. Valoración de la respuesta inmunitaria periférica

2.3.2.1. Determinación de la cantidad de IFN- γ

Una vez se descongelaron las muestras, se procedió a realizar la técnica IGRA tal como se ha explicado en el Capítulo III, apartado 2.2.2.1. (página 118). Una vez terminadas las incubaciones y tratamientos necesarios, la cantidad de IFN- γ se valoró mediante la lectura de las placas en un espectrofotómetro (ELx800 Universal Microplate Reader®), a 450 nm, dentro de los 20 minutos siguientes a la adición de la solución de frenado. Para cada muestra, se obtuvo un “**índice de IFN- γ** ”, mediante la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{DO media de cada muestra estimualda con antígeno}}{\text{DO media de cada muestra estimulada con PBS}}$$

2.4. Análisis estadístico

Los datos de producción de IFN- γ fueron analizados mediante un procedimiento de análisis de varianza (ANOVA), empleando el software GraphPad Prism 5 (Estados Unidos de América). Para el establecimiento de diferencias, se consideró un nivel de significación de 0.05.

3. RESULTADOS

3.1. Valoración de la producción de IFN- γ

En las Figuras V.1. y V.2. se muestran las producciones de IFN- γ en los animales de los distintos grupos (infectados, vacunados y NVNI) del **lote A**, tras la estimulación de las muestras de sangre con antígenos derivados del género *M. avium* (Map y Maa), en los muestreos llevados a cabo a los 4 y 9 mpv.

En la primera (Figura V.1.), se observa que a los **4 mpv**, los animales vacunados (V) presentaron niveles medios más elevados ($p < 0,05$) del índice IFN- γ en la sangre estimulada con **PPD aviar, johnina y el antígeno VK 055**, que los grupos infectados (I) y control (NVNI), sin que se observaran diferencias entre estos dos últimos. Tampoco hubo diferencias significativas entre los tres grupos cuando la sangre se estimuló con el antígeno **VK 067**. Aunque la producción de IFN- γ alcanza los niveles más elevados cuando la sangre es estimulada con johnina, las diferencias en la producción de esta citoquina no eran significativas tras el estímulo con PPD aviar, pero sí con VK 055 ($p < 0,05$). Sin embargo, esas diferencias no existieron entre la sangre estimulada con PPD aviar y con el VK 055.

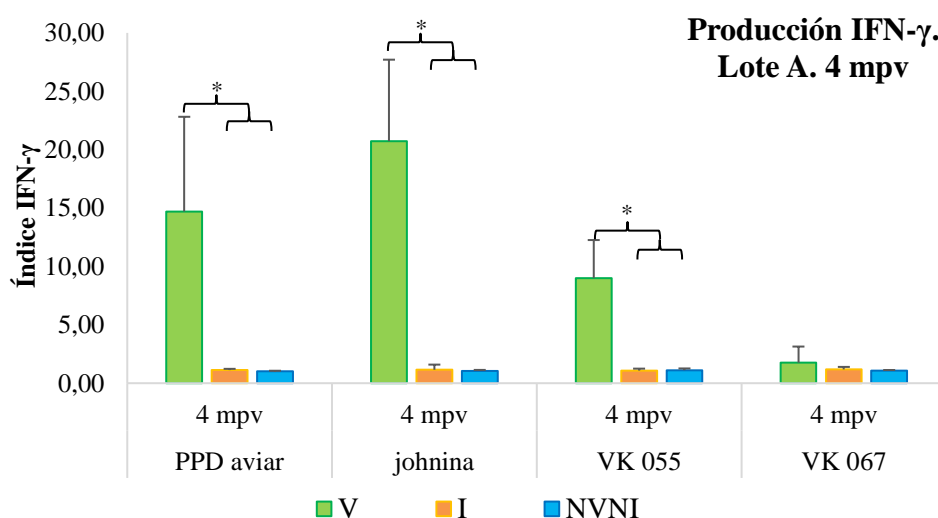


Figura V.1. Valores medios del índice IFN- γ en los animales de los distintos grupos a los 4 mpv, según el antígeno empleado para estimular la sangre (PPD aviar, johnina, VK 055 y VK 067). mpv: meses post vacunación. V: vacunado. I: infectado. NVNI: no vacunado-no infectado.

A los **9 mpv** (Figura V.2.), tampoco existieron diferencias significativas entre ninguno de los grupos y para ninguno de los antígenos empleados (**PPD aviar y johnina**). En el caso del grupo de los animales infectados y no vacunados (I), se observa una mayor producción de IFN- γ cuando la sangre es estimulada con johnina en comparación con PPD aviar, pero esas diferencias no fueron

significativas; la diferencia también era mayor al comparar los grupos infectado (I) y control (NVNI) para la johnina, sin llegar a ser significativa.

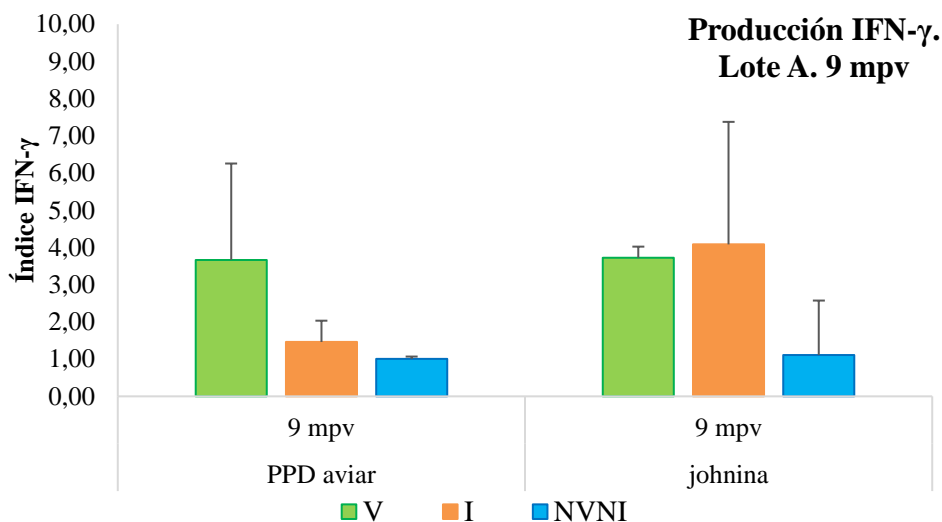


Figura V.2. Valores medios del índice IFN- γ en los animales de los distintos grupos a los 9 mpv, según el antígeno empleado para estimular la sangre (PPD aviar y johnina) a los 9 mpv. mpv: meses post vacunación. V: vacunado. I: infectado. NVNI: no vacunado-no infectado.

En la Figura V.3. se muestra la media del índice IFN- γ de los distintos grupos, tras estimular la sangre con **antígenos derivados de *M. bovis***, a los 4 y 9 mpv. A los **4 mpv** se aprecia que la producción de esta citoquina es significativamente superior al resto de grupos únicamente cuando se estimula la sangre con PPD bovina ($p < 0,05$). Sin embargo, a los **9 mpv**, al igual que sucede con la PPD aviar, tampoco se observan ya diferencias entre grupos. Es de destacar que, a diferencia de la PPD bovina, no se encontró respuesta significativa en los grupos vacunados cuando la sangre se estimuló con los cocteles peptídicos **PC-EC** y **PC-HP** de *M. bovis* en ninguno de los dos muestreos realizados.

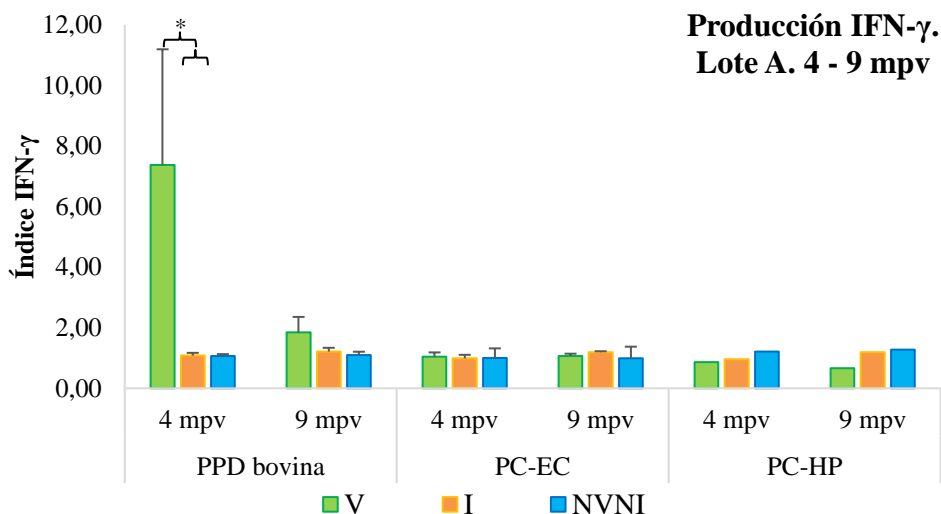


Figura V.3. Valores medios del índice IFN- γ en los animales de los distintos grupos a los 4 y 9 mpv, según el antígeno empleado para estimular la sangre (PPD bovina, PC-EC y PC-HP). mpv: meses post vacunación. V: vacunado. I: infectado. NVNI: no vacunado-no infectado.

Al comparar la producción de IFN- γ tras el estímulo de la sangre con todas las citoquinas en el grupo de cabras vacunadas (V), a los 4 mpv los valores más elevados se alcanzan tras la estimulación con PPD aviar y johnina. Estos valores eran significativamente superiores a los observados tras la incubación con PPD bovina. También, se pudo comprobar una producción significativamente ($p < 0,05$) superior de esta citoquina al comparar los valores obtenidos por la estimulación con johnina con los del antígeno de Map VK 055. Sin embargo, no se observan diferencias entre los niveles de IFN- γ al estimular las sangres con PPD aviar y los del VK 055. A los 9 mpv, ya solo se observan diferencias significativas ($p < 0,05$) entre la johnina y la PPD bovina en el grupo de cabritos vacunados (V).

En las siguientes Figuras, se muestran los valores medios del índice IFN- γ que se obtuvieron en los diferentes grupos experimentales del **lote B** y en los dos muestreos realizados a los 9 y 15 mpv.

En lo que respecta a los valores del índice IFN- γ obtenidos a los **9 mpv** tras la estimulación de las sangres con **PPD aviar** o **johnina** (Figura V.4.), éstos fueron significativamente superiores en todos los grupos ($p < 0,05$), sin que se

observaran diferencias entre los 3 grupos de edad para los valores obtenidos con los dos antígenos.

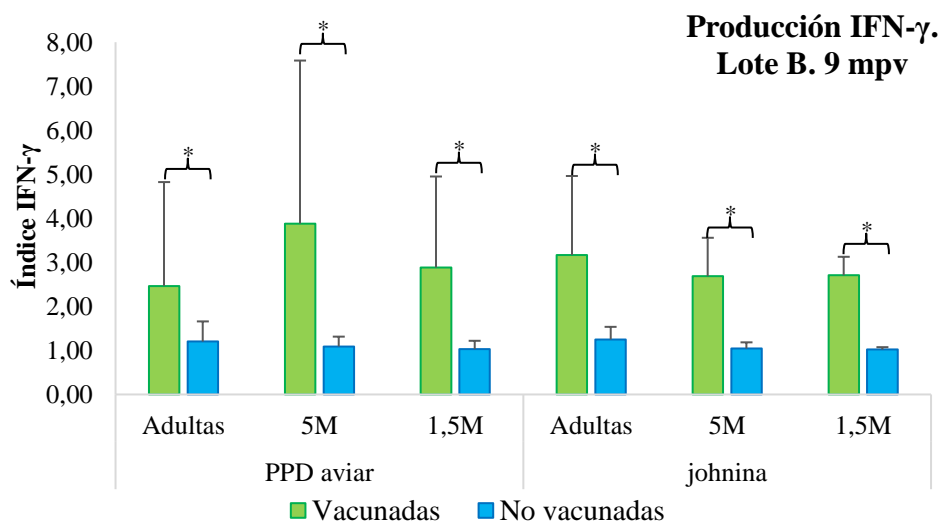


Figura V.4. Valores medios del índice IFN- γ en los animales de los distintos grupos de edad, según el antígeno empleado para estimular la sangre (PPD aviar y johnina), a los 9 mpv. M: meses; mpv: meses post vacunación.

A los **9 mpv**, cuando las sangres se estimularon con **antígenos derivados de *M. bovis*** (Figura V.5.), se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$) en el índice de IFN- γ en todos los grupos únicamente cuando la sangre fue estimulada con PPD bovina. En ningún caso hubo diferencias entre grupos (de edad o de vacunación) al emplear como estímulo los dos cócteles antigénicos de *M. bovis*.

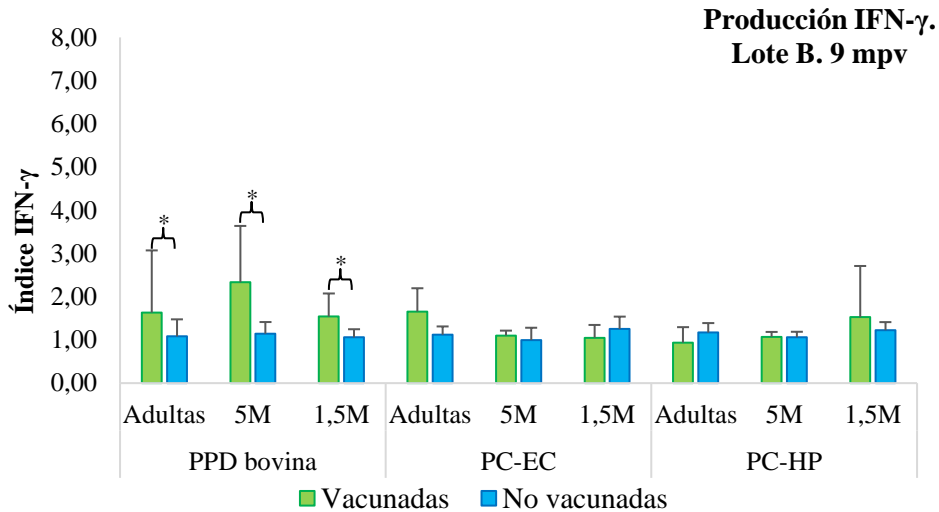


Figura V.5. Valores medios del índice IFN- γ en los animales de los distintos grupos de edad, según el antígeno empleado para estimular la sangre (PPD bovina, PC-EC, PC-HP), a los 9 mpv. M: meses; mpv: meses post vacunación.

En el muestreo realizado a los **15 mpv** (Figura V.6.), en los animales cuya sangre fue estimulada con la **PPD aviar** o con **johnina**, las diferencias en los valores medios del índice IFN- γ siguieron siendo significativas ($p < 0,05$) entre los grupos vacunados y control en los grupos AdultasV y 5MV. Sin embargo, en el grupo 1,5MV, únicamente en los animales vacunados cuya sangre fue estimulada con PPD aviar, existieron diferencias significativas con los controles, no así para la johnina. Tampoco se observaron diferencias significativas entre ellos, excepto para los niveles de IFN- γ alcanzados tras la estimulación con johnina en el grupo 5MV, que fueron superiores ($p < 0,05$) al resto de grupos.

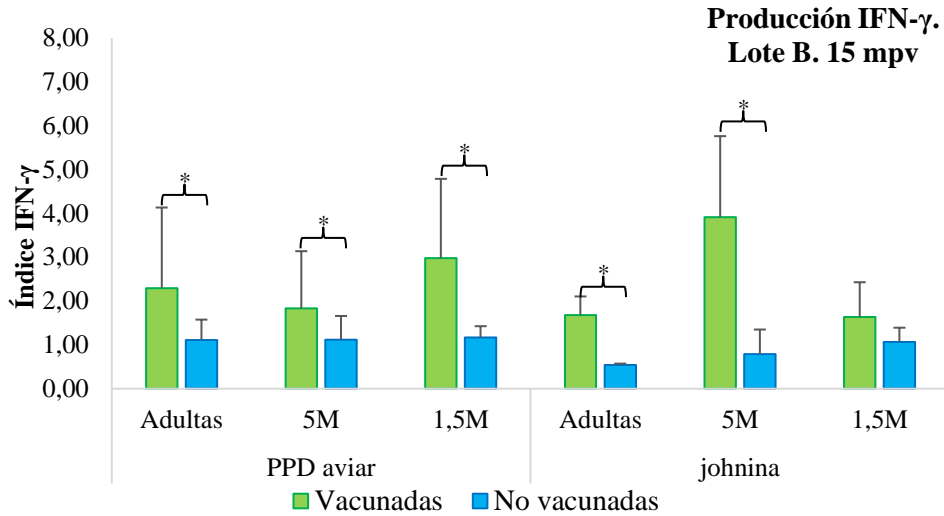


Figura V.6. Valores medios del índice IFN- γ en los animales de los distintos grupos de edad, según el antígeno empleado para estimular la sangre (PPD aviar y johnina), a los 15 mpv. M: meses; mpv: meses post vacunación.

A los **15 mpv** (Figura V.7.), cuando se estimularon las sangres con **antígenos de *M. bovis***, no se encontraron diferencias en la producción de IFN- γ entre los animales vacunados y controles en ninguno de los grupos de edad ni para los tres antígenos evaluados, incluida la PPD bovina.

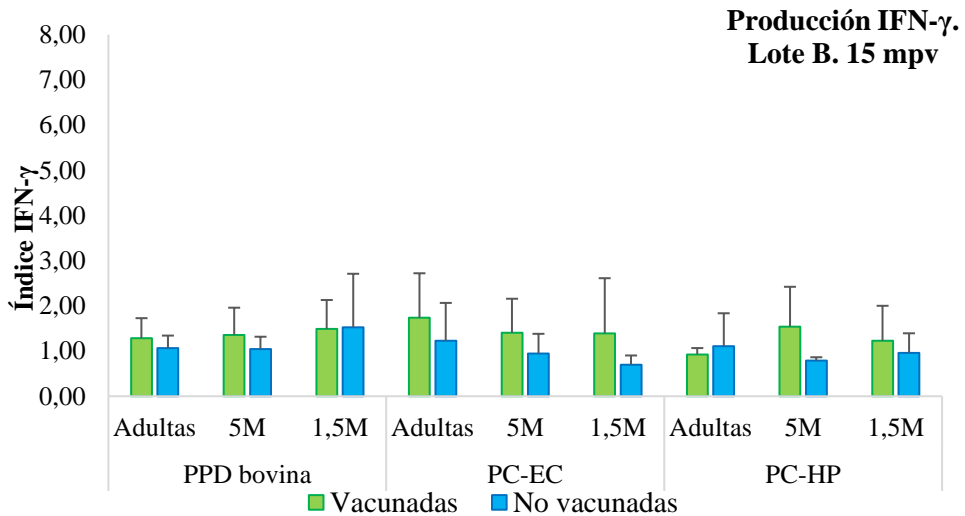


Figura V.7. Valores medios del índice IFN- γ en los animales de los distintos grupos de edad, según el antígeno empleado para estimular la sangre (PPD bovina, PC-EC, PC-HP), a los 15 mpv. M: meses; mpv: meses post vacunación.

4. DISCUSIÓN

Una de las principales limitaciones del uso de la vacunación como procedimiento de control de la paratuberculosis son las reacciones cruzadas que se producen en las pruebas de diagnóstico de tuberculosis empleadas en las campañas de erradicación de la enfermedad (Nedrow *et al.*, 2007; Álvarez *et al.*, 2008; Garrido *et al.*, 2013) y que han motivado que el uso de vacunas frente a paratuberculosis en la especie bovina esté prohibido en numerosos países, incluido España (Bastida y Juste, 2011). En este estudio, con el fin de comprobar si se pueden paliar esas reacciones inespecíficas, se han evaluado diferentes antígenos de *M. bovis* en la prueba IGRA, de detección de los niveles de IFN- γ tras la estimulación de sangre de animales vacunados, con dos vacunas frente a paratuberculosis que emplean la misma cepa de Map, en un ensayo experimental y en una prueba de campo. Asimismo, se han valorado varios antígenos de Map para conocer su eficacia en la identificación de individuos vacunados.

En este trabajo, se ha empleado como modelo experimental el ganado caprino, ya que ofrece similitudes con el bovino, como la alta sensibilidad a la infección tuberculosa que padecen ambas especies (Daniel *et al.*, 2009; Napp *et al.*, 2013) y el haberse demostrado también la existencia de reacciones cruzadas (Pérez de Val *et al.*, 2012) entre las cabras vacunadas frente a la paratuberculosis con la infección experimental por *Mycobacterium caprae*, agente causal de la tuberculosis caprina.

En la paratuberculosis, la respuesta inmunitaria de tipo celular se ha asociado con características de protección frente a la infección por Map (Koets *et al.*, 2015) por lo que, una vacuna efectiva debería ser capaz de inducirla. Para su evaluación, se ha empleado ampliamente la prueba de cuantificación de la producción del IFN- γ (IGRA), que mostraría valores altos en las fases iniciales o latentes de la infección (Stabel, 1996; Gwozdz *et al.*, 2000b; Begg *et al.*, 2009). La vacunación frente a paratuberculosis, mediante la cual se pone en contacto el organismo con gran cantidad de bacilos, se sabe que induce una intensa y rápida respuesta inmunitaria específica tanto de tipo celular como humoral (Juste *et al.*,

1994; Corpa *et al.*, 2000b; Tewari *et al.*, 2014; Ghosh *et al.*, 2015; Arrazuria *et al.*, 2016). La respuesta celular es posible medirla mediante el test IGRA (Gwozdz *et al.*, 2000a; Muñoz, 2014; Arrazuria *et al.*, 2016), en el que se emplean también las PPDs y, al igual que con la IDTB, se pueden encontrar reacciones cruzadas cuando se emplea en el diagnóstico de tuberculosis (Köhler *et al.*, 2001; Muskens *et al.*, 2002; Pérez de Val *et al.*, 2012).

El agente causal de la paratuberculosis se encuentra englobado en el complejo *Mycobacterium avium* (MAC) (Rindi y Garzelli, 2014) que incluye cuatro micobacterias, entre ellas, la propia Map, que poseen una homología filogenética del 99,99 % comprobada mediante el empleo de la amplificación del fragmento 16S rRNA (Rogall *et al.*, 1990). En ese mismo estudio se encontraron similitudes filogenéticas entre Map y *M. bovis* del 98,6 %. Posiblemente, esta es la causa de las reacciones cruzadas cuando se emplea para el diagnóstico de la tuberculosis, la PPD bovina (Monaghan *et al.*, 1994). Las tuberculinas son derivados proteicos purificados a partir del cultivo tratado por calor y lisado de *M. bovis* o *M. avium* (Good y Duignan, 2011). Para el diagnóstico de la tuberculosis, la IDTB es la prueba estándar, que puede ser simple si se emplea la PPD bovina o comparada, si se emplean las PPD aviar y bovina (OIE, 2012). El IGRA es una prueba complementaria a la IDTB, que se emplea en las campañas de erradicación de la tuberculosis (Gormley *et al.*, 2006) y ha sido la elegida en este estudio para valorar distintos antígenos micobacterianos, por la facilidad de acceso a las muestras de sangre, la menor manipulación de los animales y al hecho de que la tuberculinización en cabras, en condiciones de campo, está sujeta a control oficial.

En ambos tipos de pruebas (IDTB e IGRA), se ha referido previamente la existencia de reacciones inespecíficas en animales vacunados de paratuberculosis, en el diagnóstico de la tuberculosis en bovinos y caprinos (Pérez de Val *et al.*, 2012; Garrido *et al.*, 2013). Los resultados del IGRA en este estudio han confirmado dichas reacciones cruzadas al emplear las PPDs, ya que en todos los animales vacunados frente a paratuberculosis, se ha producido una respuesta frente a ellas, incluida la PPD bovina, si bien menos intensa que la

encontrada al emplear PPD aviar o johnina, como observaron previamente otros autores en una vacunación en campo en ganado bovino y caprino (López Cruz *et al.*, 1999; Mercier *et al.*, 2014; Serrano *et al.*, 2017). Sin embargo, hay algún estudio en la especie bovina donde encuentran una respuesta similar para la PPD aviar y la PPD bovina (Köhler *et al.*, 2001). En cualquier caso, en nuestro estudio como en otros, la vacunación indujo una respuesta frente a la PPD bovina, de duración variable. Dicha respuesta ya había desaparecido en los muestreos de los 9 y 15 mpv en los lotes A y B, respectivamente; sin embargo en otros estudios previos llevados a cabo también en cabras dicha respuesta persiste hasta los 23 mpv (Mercier *et al.*, 2014) o incluso hasta los 3,5 años (Chartier *et al.*, 2012) En ganado bovino, las diferencias habrían desaparecido a los 24 mpv (Köhler *et al.*, 2001). Por lo tanto, esas interferencias tendrían una duración limitada en el tiempo, hecho a tener en cuenta cuando se practica la IDTB simple en rebaños vacunados de paratuberculosis. En cualquier caso, este estudio confirma la existencia de una respuesta inespecífica en el test IGRA si solo se empleara la PPD bovina para el diagnóstico de la tuberculosis.

Durante los últimos años, se han realizado trabajos encaminados hacia la búsqueda de nuevos antígenos más específicos que permitan la diferenciación de animales vacunados frente a paratuberculosis de animales infectados con tuberculosis (Vordermeier *et al.*, 2001; Aagaard *et al.*, 2010; Casal *et al.*, 2012; Risalde *et al.*, 2017). Entre ellos, destacan los nuevos antígenos específicos de *M. bovis* ESAT-6, CFP-10 y el Rv3615c que forman parte de los cócteles peptídicos (PC-EC y PC-HP) empleados en este estudio. El ESAT-6 es una proteína secretada por *M. bovis* y *M. tuberculosis* (Pollock y Andersen, 1997a, 1997b; Singh *et al.*, 2005) que se encuentra ausente en la vacuna BCG (Harboe *et al.*, 1996). En animales infectados por *M. bovis*, su empleo induce un incremento en la producción de IFN- γ en sangre periférica (Andersen *et al.*, 1995). La CFP-10 es una proteína obtenida del cultivo filtrado de *M. bovis* (Encinas *et al.*, 2018) y, al igual que ESAT-6, también produce una reacción específica en la técnica IGRA frente a la tuberculosis bovina (Elnaggar *et al.*, 2015). Por último, Rv3616c también ha demostrado la misma eficacia que los

antígenos anteriores al inducir un incremento específico de la producción de IFN- γ en tuberculosis bovina (Sidders *et al.*, 2008).

Los dos cócteles peptídicos de *M. bovis* empleados (PC-EC y PC-HP) han demostrado ser más específicos que la PPD bovina, ya que al contrario que con esta tuberculina, la estimulación con ellos no indujo ninguna respuesta específica celular detectable mediante el IGRA en los animales vacunados, independientemente del tipo de vacuna empleado, frente a paratuberculosis en ninguno de los dos muestreos de ninguno de los dos lotes. Idénticos resultados a los nuestros se obtuvieron en una vacunación en cabras frente a paratuberculosis que fueron posteriormente infectadas con *M. caprae* (Pérez de Val *et al.*, 2012), donde se comprobó que, a los 3,5-4 mpy, la estimulación en sangre periférica con estos antígenos derivados de *M. bovis*, no dio ningún tipo de reacción, mientras que cuando se produjo la infección por *M. caprae* sí que hubo reacción específica frente a ellos. De acuerdo con estos resultados, en una infección con *M. bovis* en terneros que previamente habían sido vacunados frente a paratuberculosis (Serrano *et al.*, 2017), tampoco se obtuvieron respuestas específicas en aquellos animales vacunados cuando las muestras fueron estimuladas con los mismos antígenos empleados en nuestro estudio. Como ya se ha indicado, su especificidad en el diagnóstico de la tuberculosis en animales infectados con *M. bovis* o *M. caprae* ha sido ya comprobada en diferentes estudios empleando tanto la prueba IGRA y la IDTB (Andersen *et al.*, 1995; Sidders *et al.*, 2008; Casal *et al.*, 2012; Pérez de Val *et al.*, 2012; Elnaggar *et al.*, 2015; Serrano *et al.*, 2017).

Los resultados de este estudio sugieren que el empleo de cualquiera de estos cócteles antigénicos en lugar de la PPD bovina, cuando se quiera discriminar entre falsos reaccionantes en las pruebas de diagnóstico de tuberculosis por estar vacunados frente a paratuberculosis, o posiblemente por estar infectados por Map, es una vía nueva de posible utilidad en las campañas de saneamiento. Serían necesarios nuevos estudios, incluyendo la prueba de IDTB, y también más animales, para llegar a validar su uso como sustitutos de la PPD bovina. Por otra

parte, en este momento, su elevado precio comercial haría inviable su uso en campañas a gran escala.

Otro de los objetivos de este trabajo ha sido conocer la respuesta obtenida en la prueba IGRA al estimular la sangre de animales vacunados o infectados experimentalmente de paratuberculosis con dos proteínas purificadas a partir de Map (VK 055 y VK 067) y compararla con la ofrecida al usar dos PPDs, la aviar y la johnina. La VK 067 no indujo ningún tipo de respuesta ni en individuos vacunados ni en infectados, por lo que no sería un candidato para medir la respuesta celular asociada a esta micobacteria mediante la técnica IGRA. Con la VK 055 sí que se obtuvo una respuesta específica en las cabras vacunadas que no se encontró en las no inmunizadas. Sin embargo, al compararlo con las PPDs, solo se obtuvieron diferencias significativas con la johnina, no así con la PPD aviar. Tampoco se ha comprobado que su uso permita una detección más precoz de la infección por Map que con las PPDs, al menos en las condiciones de este estudio donde sólo se ha valorado la producción de IFN- γ a los 3 meses post infección (4 mpv), y no se han encontrado diferencias en las respuestas en el grupo de animales infectados y no vacunados del lote A.

En los últimos años, se han ido evaluando distintas proteínas de Map como son Map_0268c y Map_3651c, que han demostrado ser capaces de inducir una respuesta inmunitaria celular medida con la técnica IGRA en ganado bovino experimentalmente infectado con Map (Hughes *et al.*, 2017) y en explotaciones ganaderas ovinas infectadas subclínicamente con Map, aunque de una menor intensidad que la respuesta lograda frente a la johnina (Hughes *et al.*, 2013). También se han empleado proteínas de latencia (LATP-1, LATP-2 y LATP-3) que han dado resultados óptimos mediante el IGRA pero siempre por debajo de las producciones frente a la johnina (Mikkelsen *et al.*, 2011). Idéntico resultado se ha obtenido con una proteína de la membrana de Map (L5P) en ganado bovino (Holbert *et al.*, 2015) que estimuló la producción de IFN- γ en los animales infectados aunque por debajo de la PPD aviar. De momento, al igual que ocurre con las proteínas ensayadas en este estudio, ninguna parece ser más específica o sensible que ambas PPDs.

Respecto a la PPD aviar y johnina, con ambas se ha detectado una mayor producción de IFN- γ al estimular las sangres en animales vacunados, como ya ha sido previamente señalado (Corpa *et al.*, 2000b; Gwozdz *et al.*, 2000a; Jungersen *et al.*, 2002; Muskens *et al.*, 2002; Begg y Griffin, 2005; Arrazuria *et al.*, 2016), sin que se hayan observado diferencias significativas entre ellas, o incluso mejores resultados al emplear la PPD aviar en comparación con la johnina en terneros infectados por Map (Jungersen *et al.*, 2002), lo que explicaría su uso indistinto. En los animales del lote A, esas diferencias entre animales vacunados y control ya habían desaparecido a los 9 mpv, mientras que en los del lote B aún persistían a los 15 mpv. Si bien es cierto que las edades de los animales variaban entre ambos grupos, y se puede pensar que la vacunación de animales jóvenes (1,5 meses) haría que la respuesta fuera menos duradera, en los cabritos vacunados con 1,5 meses del lote B, esa respuesta aún se detectaba a los 15 mpv, únicamente con la PPD aviar, no así con la johnina. En el estudio de Mercier *et al.* (2014), donde también se vacunaban cabritos jóvenes de 1 mes de edad, la respuesta inmunitaria celular a la vacunación se mantenía hasta los 23 mpv. Por ello, no parece que la edad sea una posible explicación a esta disparidad de resultados. Otros factores, como el estado inmunitario general de los animales, condiciones ambientales u otras que puedan influir en el mismo, se deberían tener en cuenta, así como el hecho de que se hayan empleado dos productos vacunales distintos, que comparten cepa de Map y cantidad de micobacterias, pero no el adyuvante.

Como se acaba de señalar, en el lote B se encontro que, en los animales vacunados a los 1,5 meses, la PPD aviar siguió induciendo una respuesta específica frente a ella, pero no así a la johnina. Este resultado podría estar relacionado con que la respuesta celular en animales vacunados a edades más jóvenes (1,5 meses) sería menos duradera que si se vacunan más tarde tal y como ya señaló Corpa *et al.* (2000), también para ganado caprino, y que la johnina podría tener una menor capacidad de estímulo que la PPD aviar, a pesar de ser más específica cuando se vacunan cabras a diferentes edades. En el resto de muestreos y grupos, no se observaron diferencias significativas entre la respuesta al estímulo con ambas citoquinas. Únicamente, en el lote A, en el grupo de

animales infectados y no vacunados, a los 9 mpv, se observó una producción mayor de IFN- γ cuando su sangre era estimulada con johnina en comparación con PPD aviar, y aunque no fue estadísticamente significativa, sí mostraba esa tendencia. Este hecho, podría sugerir que la johnina sería algo más precoz que la PPD aviar en la identificación de animales infectados mediante la técnica IGRA. Para demostrarlo se deberían llevar a cabo más estudios, ya que, en este, el número de animales analizados fue pequeño y no permitió extraer conclusiones.

La búsqueda de nuevos antígenos tanto de Map como de las micobacterias causantes de la tuberculosis y su uso en pruebas de diagnóstico con el fin de contribuir a su mejora, constituye un nuevo campo en la investigación de estas enfermedades (Aagaard *et al.*, 2010; Pérez de Val *et al.*, 2012; Hughes *et al.*, 2017; Serrano *et al.*, 2017). En nuestro estudio, los antígenos de *M. bovis* sí pueden resultar prometedores en un futuro, si se consigue estandarizar su uso en pruebas de diagnóstico de la tuberculosis, incorporándolos a las técnicas oficiales. En cambio, los antígenos de Map ensayados, no parecen aportar ninguna ventaja sobre las PPDs, en las condiciones de este estudio.

CAPÍTULO VI
DISCUSIÓN GENERAL

La vacunación se ha considerado como el método de control de la paratuberculosis más efectivo, en términos coste-beneficio. Aún son muchos factores que se desconocen en torno a cómo influye la administración de la vacuna sobre distintos aspectos de la enfermedad, especialmente su patogenia. El objetivo principal de esta Tesis Doctoral ha sido evaluar el efecto que ejerce dicha vacunación sobre la respuesta inmunitaria, local y periférica, el desarrollo de lesiones o el control de la enfermedad, y de qué forma lo modifican algunos factores como la edad de inmunización o la infección previa por Map de los animales vacunados.

La evaluación del efecto de la vacunación sobre la respuesta inmunitaria periférica frente a Map se llevó a cabo en dos estudios con animales de la especie caprina, empleando las vacunas inactivadas Gudair® y Silirum® (CZ Veterinaria, Porriño, Pontevedra), ambas formuladas con la misma cepa de Map, aunque con distintos adyuvantes. La primera fue testada en condiciones de campo y la segunda en un ensayo experimental. El empleo de ambas vacunas inactivadas había mostrado su eficacia en estudios previos, donde se señala que su uso consigue una reducción del número de casos clínicos y de la excreción fecal de Map al medio (Corpa *et al.*, 2000c; Fridriksdottir *et al.*, 2000; García-Pariente *et al.*, 2003; Alonso-Hearn *et al.*, 2012; Hines II *et al.*, 2014; Mercier *et al.*, 2014; Dhand *et al.*, 2016).

En este estudio, se ha demostrado que la vacunación tuvo un efecto sobre la respuesta inmunitaria de tipo celular periférica, ya que se observó un aumento de la producción de IFN- γ tras la estimulación de los linfocitos sanguíneos con la PPD aviar en aquellos animales vacunados en ambos estudios, medida mediante la técnica IGRA o la prueba de IDTB (en el estudio experimental). Este incremento se comenzó a observar a partir del mes o dos meses tras la vacunación, variando según el grupo de animales considerado en los estudios de esta tesis. Estos resultados coinciden con lo observado previamente en otros trabajos realizados en cabras (Corpa *et al.*, 2000b; Pérez de Val *et al.*, 2012) o en otras especies de rumiantes como bovinos (Köhler *et al.*, 2001; Sweeney *et al.*, 2009; Stabel *et al.*, 2011; Muñoz, 2014; Tewari *et al.*, 2014) u ovinos (Corpa *et*

al., 2000b; Begg y Griffin, 2005), e incluso en conejos (Arrazuria *et al.*, 2016). Sin embargo, donde sí hubo variaciones fue en la duración de dicha respuesta, es decir, en el periodo en el cual se encontraron diferencias significativas en la producción de IFN- γ entre los animales vacunados y sus controles. En el estudio de campo, se prolongó hasta los 18 mpv, en la línea de lo encontrado en otros trabajos llevados a cabo en cabritas vacunadas al mes de vida en Francia, con la misma vacuna que nosotros (Chartier *et al.*, 2012) o en ganado bovino, en el caso de terneros vacunados a los 28 días con una vacuna viva (Neoparasec®) donde llegó hasta los dos años (Köhler *et al.*, 2001). Similares resultados se obtuvieron en el caso de vacas adultas vacunadas con Silirum®, donde el efecto vacunal se prolongó durante 30 mpv (García-Pariente *et al.*, 2006). En los animales vacunados en el estudio experimental, esta duración fue más corta, de 6 meses en el caso de los cabritos del grupo VI, o de 3 meses en los del grupo IV. Los resultados del primer grupo se asemejan a lo encontrado en otras infecciones experimentales semejantes en terneros (Muñoz, 2014), donde la producción de IFN- γ se mantuvo en valores elevados hasta los 8 mpv, o en cabras y ovejas, donde el efecto se alargó hasta los 6 y 9 mpv, respectivamente (Corpa *et al.*, 2000b). En el caso del grupo IV, no se han realizado experimentos similares, por lo que no se dispone de otros datos diferentes al de este estudio. No se encuentra una explicación evidente para estas diferencias. La edad de vacunación podría ser una de ellas, ya que en el estudio de campo se vacunó a animales de distintas edades, pero en el grupo de cabritos vacunado a los 1,5 meses, edad similar a la que se vacunaron los cabritos del grupo VI, la duración también fue superior. Posiblemente el diferente número de animales que componían los diferentes grupos pueda ser la causa de estas diferencias. Dada la gran variabilidad individual que se observó en la respuesta, al aumentar el tamaño del grupo a comparar, es probable que esos resultados sean más homogéneos. El hecho de que estas diferencias entre ensayos experimentales con menos animales o estudios de campo que incluyen a más individuos, sea un hecho habitual como ya se ha señalado, apoyaría esta hipótesis.

Uno de los factores cuya influencia en la respuesta inmunitaria se ha analizado ha sido la edad de los animales en el momento de la vacunación. En el

estudio de campo, se valoró la respuesta que ofrecían cabritas que, en el momento de vacunar, tenían un mes y medio, 5 meses o eran cabras adultas mayores de 1,5 años. La respuesta inmunitaria de tipo celular más elevada se obtuvo en el grupo de cabras de 5 meses. Estos resultados están de acuerdo con otras investigaciones, donde se detectó que las cabritas vacunadas a los 5 meses tuvieron una mejor respuesta que las cabritas vacunadas a los 15 días (Corpa *et al.*, 2000b). La siguiente mejor respuesta se obtuvo en las cabritas vacunadas al 1,5 mes de vida y la respuesta más baja se obtuvo en el grupo de cabras vacunadas con más de año y medio. Sin embargo, en el estudio experimental, la respuesta más elevada se encontró en el grupo VI, vacunado con 1,5-2 meses, mientras que en el grupo IV, cuyos animales tenían unos 7 meses de edad, la respuesta fue más baja. Aunque el bajo número de animales en cada grupo, en comparación con el estudio de campo, pudiera haber influido en estos resultados, el hecho de que los animales del grupo IV fueran infectados 5 meses antes, posiblemente sea la razón de esa diferencia, como se luego se comentará.

Una de las hipótesis que se barajan para explicar la menor respuesta en el grupo vacunado a la edad de 1,5 meses, es el menor grado de maduración de su sistema inmunitario en comparación con los de 5 meses (Reynolds y Morris, 1983). Este hecho se ha comprobado en otro estudio, donde se ha observado una mayor proporción de linfocitos T CD4⁺ en aquellos animales adultos con respecto a los jóvenes, hecho que podría estar relacionado con la mayor producción de IFN- γ que también encuentran tras estimular la sangre con concanavalina A, ya que son los linfocitos T los encargados de producir esta citoquina mayoritariamente (Watson *et al.*, 1994).

Sin embargo, según la hipótesis que se acaba de exponer, los animales adultos vacunados tendrían que haber desarrollado una respuesta más intensa que los cabritos vacunados con 1,5 meses, lo que no ocurrió. Hay que tener en cuenta que este trabajo se llevó a cabo en una explotación con casos clínicos de paratuberculosis, por lo que muchos de estos animales, en el momento de la vacunación, habrían tenido ya contacto con Map o incluso estarían infectados, a pesar de que en el momento de la vacunación no tuvieran una respuesta

inmunitaria periférica frente a Map, hecho ya señalado en muchos estudios (Begg *et al.*, 2011; Vázquez *et al.*, 2013; Fernández *et al.*, 2014), lo que habría podido influir sobre la respuesta inmunitaria asociada a la vacunación. Esta hipótesis queda reforzada por los hallazgos del segundo experimento, en el cual las cabras del grupo IV, vacunadas a los 150 días post infección, desarrollaron una respuesta celular menos intensa y duradera que las del grupo VI. En el caso de la tuberculosis, y en el caso de la inmunización con la vacuna BCG, se ha postulado que las sensibilizaciones previas con otras micobacterias, podrían provocar un mecanismo de bloqueo o un enmascaramiento de la vacuna (Andersen y Doherty, 2005). Un mecanismo similar puede haber ocurrido en nuestro caso donde la infección previa con Map habría interferido con la respuesta inmune a la vacuna de paratuberculosis.

La respuesta inmunitaria celular periférica, en particular un incremento en la producción de IFN- γ , se ha relacionado con protección en paratuberculosis (Begg y Griffin, 2005; Koets *et al.*, 2015), por lo que se ha considerado que una vacuna efectiva tendría que ser capaz de inducir niveles elevados de esta citoquina tras la estimulación de sangre periférica (Chiodini *et al.*, 1984a; Begg y Griffin, 2005; Koets *et al.*, 2015). Teniendo esto en cuenta, y aunque en este trabajo la vacunación ha provocado un incremento de IFN- γ en todas las edades estudiadas, el hecho de que la mejor respuesta se observara en el grupo vacunado a los 5 meses en condiciones de campo, sugiere que esta sería la mejor edad para vacunar a los animales, ya que iría asociada una mayor protección. Esta propuesta también la hace Corpa *et al.* (2000b), al obtener resultados similares y estaría de acuerdo con las recomendaciones orquestadas por el gobierno australiano para controlar la paratuberculosis, desde cuya administración se recomienda la vacunación del ganado caprino entre los 5 y 8 meses de edad (Windsor, 2006).

Esta hipótesis no se ha podido comprobar en el estudio de campo (a pesar de que se había diseñado precisamente con ese objetivo) ya que no se observaron bajas asociadas a paratuberculosis en ningún grupo, vacunado o no, en el periodo evaluado. Los resultados del estudio experimental sí que apoyarían esta hipótesis

ya que se pudo constatar que en el grupo VI, donde los niveles de IFN- γ fueron más elevados, la vacuna tuvo un claro efecto protector ya que no se encontraron animales con lesiones graves e incluso se produjo una reducción de su intensidad entre el primer y segundo sacrificio, mientras que en el grupo IV, con niveles menos elevados de esta citoquina, es donde se encontraron cabras con lesiones más graves, incluso una forma difusa con abundantes bacterias.

Ahora bien, cuando se llevó a cabo el estudio detallado entre el tipo de lesión y la respuesta inmunitaria de los animales, la relación entre una respuesta celular periférica elevada y la protección frente a la enfermedad, ofrece resultados controvertidos. Si bien es cierto que, en los grupos vacunados o solamente infectados, muchas cabras sin lesiones o con formas leves (focales o multifocales a) muestran niveles elevados de IFN- γ , hecho ya señalado previamente (Pérez *et al.*, 1997; Delgado *et al.*, 2013; Vázquez *et al.*, 2013; Fernández *et al.*, 2014) lo que sí apoyaría esa asociación positiva, otros animales tienen lesiones avanzadas de tipo multifocal b relacionadas con niveles elevados de esta citoquina; incluso, el único animal con lesiones difusas y una carga bacteriana elevada, mostraba niveles muy elevados de IFN- γ (de los más altos encontrados), lo que iría en contra. En un estudio anterior en terneros vacunados (Muñoz, 2014), también se encontró un animal vacunado que presentaba una respuesta inmunitaria celular intensa. En otros estudios en ovino donde se han reportado fallos vacunales, muchos de los animales también mostraban una intensa producción de IFN- γ (de Silva *et al.*, 2015). En otros trabajos, bien en vacas sacrificadas en matadero (Vázquez *et al.*, 2013) o en ovinos procedentes de rebaños con paratuberculosis (Pérez *et al.*, 1999), también se encontraron porcentajes significativos de animales con lesiones graves y niveles elevados de esta citoquina, así como otros con formas focales y niveles bajos. Por lo tanto, la hipótesis tradicionalmente aceptada de que una respuesta celular periférica elevada estaría asociada a protección, no puede ser afirmada en todos los casos. Más bien, todos estos resultados sugieren que, al menos en algunos animales, la aparición de niveles elevados de IFN- γ tras la estimulación de sangre periférica con PPD aviar, sería únicamente un reflejo de que el animal ha estado en contacto con Map, bien de forma natural o inoculado con una vacuna, y que la intensidad de dicha respuesta

podría estar más relacionada con la extensión de las lesiones y no tanto con la protección.

La vacunación además de inducir una respuesta inmunitaria de tipo celular, también indujo una rápida e intensa repuesta humoral medida mediante la valoración de anticuerpos con la prueba ELISA, al igual de lo ya encontrado en otros trabajos (Juste *et al.*, 1994; Corpa *et al.*, 2000b; Köhler *et al.*, 2001; Hines II *et al.*, 2014; Mercier *et al.*, 2014; Muñoz, 2014). En nuestros estudios, tanto de campo como experimentales, aparece ya a los 2-3 mpv, al igual que en trabajos previos (Spangler *et al.*, 1991; Hines II *et al.*, 2014; Muñoz, 2014; de Silva *et al.*, 2015). La duración en condiciones de campo fue hasta los 21 mpv, momento de conclusión del estudio, por lo que podría haber sido más prolongada. Resultados similares los obtuvieron en una vacunación de cabritas al mes de vida, donde la producción de anticuerpos específicos frente a Map se mantuvo hasta los 23 mpv (Mercier *et al.*, 2014) o en otro estudio de campo, el que se observó como la producción de anticuerpos se mantenía durante 7 años, en terneros vacunados con una vacuna inactivada (Mycopar®) a los 35 días de vida (Tewari *et al.*, 2014). Sin embargo, en el estudio experimental, su duración fue menor (7 meses en el grupo VI y 3 en el IV), al igual que ocurrió con la respuesta celular. La explicación sobre el bajo número de animales de los grupos experimentales respecto a los estudios de campo ya indicada, podría ser también válida aquí.

Como en el caso de la respuesta inmunitaria celular, también la edad a la que se vacunó los animales influyó en la producción de anticuerpos, con resultados similares. Todas las hipótesis planteadas en el caso de la respuesta celular, podrían ser también válidas aquí, sugiriendo que bien el grado de maduración del sistema inmunitario o la influencia que contactos previos con Map pudieran tener en la respuesta inmunitaria a la vacunación, afectarían a ambos tipos.

La respuesta inmunitaria de tipo humoral se ha considerado que no ejerce una función protectora en la paratuberculosis, por lo que no sería un factor a tener en cuenta a la hora de elegir la edad de vacunación. Sin embargo, hay algún trabajo reciente que indica que sí podría jugar algún papel (Achkar y Casadevall, 2013).

En los animales del estudio experimental, en el momento de su sacrificio, no se observaron relaciones aparentes entre las formas lesionales y los niveles de anticuerpos, ya que en todos los vacunados son elevados, independientemente del tipo de lesión y en el grupo NVI son bajos en todos los casos. Estos hallazgos no apoyan esa función protectora de los anticuerpos y más bien refuerzan lo ya descrito de que una intensa respuesta inmunitaria humoral se relaciona con niveles elevados de BAAR en el animal. De hecho, el animal con lesiones difusas y carga bacteriana elevada, fue el que mayor índice ELISA mostró. En cualquier caso, el hecho de que en este trabajo ha coincidido que el grupo de cabras vacunadas con 5 meses fue también el que mejor respuesta humoral ofreció, también apoyaría a esta edad como la más adecuada para vacunar.

Además de evaluar el efecto de la vacunación sobre la respuesta inmunitaria periférica, también se ha analizado su papel sobre las posibles modificaciones en los niveles de varias poblaciones linfocitarias en sangre circulante (linfocitos T CD4+, CD8+, $\delta\gamma$ o células B) mediante citometría de flujo, en la infección experimental. El principal resultado encontrado fue la elevada variabilidad individual, lo que no permitió establecer diferencias asociadas a los grupos de tratamiento. Es cierto que hay estudios previos que sí han encontrado variaciones en los niveles de las poblaciones linfocitarias asociados a la vacunación (Corpa, 1999; Hasvold *et al.*, 2002; Gillan *et al.*, 2010a; de Silva *et al.*, 2015), si bien con resultados contradictorios, lo que sugiere que deberían realizarse nuevos estudios, pero empleando un mayor número de animales, para poder confirmar la influencia que la vacunación puede tener sobre los niveles de linfocitos circulantes.

Finalmente, también se ha valorado la influencia de la vacuna sobre la respuesta inmunitaria local en el tejido linfoide intestinal y los nódulos linfáticos. En el estudio de citometría de flujo sobre las poblaciones linfocitarias ocurrió lo mismo que en sangre periférica, que la alta variabilidad individual no permitió extraer conclusiones. La recomendación de llevar a cabo nuevos estudios con más animales, es también válida para el caso de la respuesta local.

En cuanto a la producción de IFN- γ tras la estimulación de linfocitos extraídos del tejido linfoide intestinal o de nódulos linfáticos, no se vio fundamentalmente afectada por el empleo de la vacuna, en oposición a lo hallado por otros autores (Muñoz, 2014). Únicamente se observaron diferencias a los 360 dpv entre grupos vacunados (VI) y no vacunados en el nódulo linfático prescapular como ya había sido previamente descrito en terneros vacunados (Uzonna *et al.*, 2003; Sweeney *et al.*, 2009), si bien en nuestro estudio fue mucho más tardía, lo que resulta extraño ya que además coincidía con que los niveles de IFN- γ en sangre eran bajos. Al igual que en el caso anterior y dada la gran variabilidad encontrada, parece necesario realizar nuevos estudios incluyendo un mayor número de animales.

En esta Tesis Doctoral también se han evaluado los posibles efectos adversos que la vacunación ejerce sobre la respuesta inmunitaria. Los resultados obtenidos confirmarían el hecho de que la vacunación puede interferir en el diagnóstico de la paratuberculosis empleando métodos inmunológicos, tanto empleando pruebas que detectan la respuesta inmunitaria celular, al menos durante 18 mpv, como humoral, por lo menos hasta los 21 mpv. Resultados similares también se observaron en una prueba realizada en cabras (Mercier *et al.*, 2014). Aunque en el estudio experimental esas diferencias no son tan evidentes, posiblemente lo explique el bajo número de animales estudiados y la variabilidad individual encontrada.

El principal inconveniente de la vacunación frente a paratuberculosis y que ocasiona que su uso esté prohibido en muchos países, es la existencia de reacciones cruzadas con el diagnóstico de la tuberculosis (Nedrow *et al.*, 2007; Pérez de Val *et al.*, 2012; Garrido *et al.*, 2013). La causa de las interferencias puede ser probablemente el gran parecido filogenético entre Map y el agente causal de la tuberculosis bovina (Rogall *et al.*, 1990) y que las tuberculinas empleadas (PPD aviar a partir de Maa y PPD bovina de *M. bovis*) son derivados proteicos purificados de cultivos tratados por calor que engloban un número alto de antígenos, muchos de ellos comunes (Monaghan *et al.*, 1994).

En el estudio experimental, se llevó a cabo la IDTB comparada a los 4 mpv y se pudo comprobar que ninguna cabra dio un resultado positivo a la prueba, pero si se hubiera realizado la IDTB simple, el 58,3 % de los cabritos vacunados resultarían positivos con incrementos de grosor cutáneo de entre 4 y 9 mm. En el caso de la vacunación en campo, sin embargo, la IDTB comparada y simple se llevó a cabo a los 6 mpv y a los 18 mpv, y ambas dieron un resultado negativo. Estas diferencias entre ambos estudios, pueden haberse debido al reducido número de animales del ensayo experimental, que permitió hacer una medición más precisa del incremento de grosor cutáneo que en condiciones de campo. En este sentido, varios de los reaccionantes positivos estaban en el límite de 4 mm, que posiblemente en otras circunstancias no se hubieran detectado. También hay que considerar que no fue el mismo personal el que realizó unas pruebas u otras, que tampoco se empleó el mismo sistema de inyección intradérmica y que incluso la vacuna empleada en los dos estudios era diferente, aunque contenía la misma cepa de Map. Aún con estas consideraciones, los resultados obtenidos están en consonancia con los hallados en otro experimento de vacunación en cabras donde a los 8 mpv, la media de los incrementos cutáneos era inferior a 4 mm (Chartier *et al.*, 2012), lo que indica que esta interferencia tiende a disminuir con el tiempo. Con los resultados de nuestro estudio, se podría sugerir que a partir de los 6 mpv ya no existirían, puesto que en el experimento de campo no hubo reaccionantes positivos. Sin embargo, llegar a esta conclusión parece muy atrevido según lo anteriormente explicado, y teniendo en cuenta que en el propio trabajo de Chartier *et al.* (2012), aunque a los 8 mpv muchos animales vacunados no son reaccionantes, aún hay bastantes que sí.

Estas interferencias también se han detectado al emplear el test IGRA en nuestro estudio ya que la vacunación produjo un incremento de la producción de IFN- γ tras estimular la sangre con PPD bovina, confirmando lo señalado en otros trabajos (Köhler *et al.*, 2001; Mercier *et al.*, 2014). En todos los casos, siempre fue inferior a la inducida por la PPD aviar, como ya se ha señalado (Köhler *et al.*, 2001; Muskens *et al.*, 2002; Pérez de Val *et al.*, 2012) y su duración fue variable, llegando a encontrarse hasta los 21 mpv en el caso de la vacunación en campo, por lo que, según nuestros resultados, estas interferencias serían más

evidentes con la técnica IGRA, si bien no han sido evaluadas con criterios diagnósticos. Otros estudios sí que han encontrado animales vacunados, libres de tuberculosis, donde la producción de IFN- γ era similar con ambas PPDs, o incluso en algún animal superior para la PPD bovina (Mercier *et al.*, 2014). De los resultados de nuestro estudio, se concluye que el empleo de los test de IDTB y el IGRA de manera comparada, no han presentado interferencias con falsas reacciones a tuberculosis, que sí han aparecido empleando las pruebas simples. Otros estudios también habían ya corroborado este resultado (Chartier *et al.*, 2012; Coad *et al.*, 2013; Garrido *et al.*, 2013; Muñoz, 2014).

Para intentar paliar este efecto adverso, se han desarrollado nuevos antígenos, más específicos. Un objetivo de esta Tesis Doctoral ha sido evaluar dos cócteles peptídicos derivados de *M. bovis* (PC-EC y PC-HP) cuya eficacia en el diagnóstico de la tuberculosis se había comprobado ya en varios estudios previos (Vordermeier *et al.*, 2001; Aagaard *et al.*, 2010; Casal *et al.*, 2012), incluyendo su capacidad de inducir la producción de IFN- γ tras el estímulo de linfocitos sanguíneos en animales infectados de tuberculosis (Andersen *et al.*, 1995; Sidders *et al.*, 2008; Elnaggar *et al.*, 2015).

Ambos cócteles peptídicos han demostrado su utilidad en el test IGRA ya que ningún animal vacunado ha reaccionado frente a ellos, ni en el estudio de campo ni el experimental, que empleaban distinto tipo de vacuna, al contrario de lo que sucedió con la PPD aviar y también con la PPD bovina. Estos resultados confirman los encontrados en cabritos (Pérez de Val *et al.*, 2012) o terneros (Serrano *et al.*, 2017), vacunados de paratuberculosis e infectados con *M. caprae* o *M. bovis* respectivamente y son prometedores para un futuro uso de estos cócteles en las campañas de erradicación de la tuberculosis, si bien aún deben realizarse más estudios para su validación, y que su producción se abarate para su utilización a gran escala.

También se han valorado antígenos de Map, tanto la PPD derivada de esta micobacteria (johnina) como dos productos antigénicos (VK 055 y VK 067) de la misma bacteria, con el objetivo de comprobar si su sensibilidad mejora a la de la PPD aviar en la prueba IGRA. En el caso de la johnina, en condiciones

experimentales ofreció mejores resultados como se había observado en trabajos previos (Köhler *et al.*, 2001; Nedrow *et al.*, 2007) a la PPD aviar, o similares a la PPD aviar en condiciones de campo, y en ambos estudios siempre por encima de los resultados ofrecidos por la PPD bovina Hay que tener en cuenta que la johnina empleada en todos estos estudios mencionados no ha sido la misma, y también variaban las concentraciones de trabajo empleadas.

En el caso de los antígenos VK 055 y VK 067 de Map, no se obtuvieron mejoras en la sensibilidad. De hecho, con el producto VK 067 ni siquiera se consiguieron reacciones positivas; en el caso del otro antígeno, VK 055, la respuesta, aunque significativamente diferente del grupo sin vacunar, en el test IGRA fue siempre inferior a la de la PPD aviar y a la johnina. Se han ido probando otros antígenos de Map, distintos de los de este trabajo (Mikkelsen *et al.*, 2011; Hughes *et al.*, 2013, 2017) sin que de momento se hayan encontrado resultados consistentes que mejoren los ofrecidos por la PPD aviar.

Otro de los objetivos de este trabajo, para lo cual se diseñó el estudio experimental, ha sido conocer cuál es el efecto de la vacunación, antes o después de la infección, sobre el desarrollo de lesiones, como un reflejo de la evolución de la infección. Se llevó a cabo la vacunación de cabritos bien 30 días antes de que fueran infectados con la cepa K-10 de Map, o 150 días tras dicha infección. Se observó la existencia de una importante variabilidad individual en la respuesta, tanto a la infección como en los efectos de la vacunación, pero en todos los grupos se pudieron identificar lesiones y ADN de Map. Estos hallazgos confirman que la vacunación antes de la infección no previene la colonización de los tejidos por Map (Wentink *et al.*, 1994; Reddacliff *et al.*, 2006; Windsor, 2006; Bastida y Juste, 2011). De acuerdo a los resultados encontrados en los animales del grupo VI, que desarrollaron menos lesiones y su número tendió a reducirse con el tiempo (el recuento de granulomas mostró que su número se redujo entre el primer y segundo sacrificio), se pudo concluir que la vacunación antes de la infección, aunque no la previene, tiene un claro efecto protector, ya que logró que los animales vacunados mostraran únicamente lesiones restringidas al tejido linfoide intestinal, a las que se les ha asignado un carácter

de latencia o resistencia a la enfermedad clínica (Corpa *et al.*, 2000a; Vázquez *et al.*, 2013; de Silva *et al.*, 2018). Además, el hecho de que, especialmente en el primer sacrificio, muchas de esas lesiones presentaran cantidades relevantes de tejido conjuntivo (fibrosis), en contraste con los granulomas encontrados en el grupo NVI, con un carácter infiltrativo, sugiere que el efecto de la vacunación puede estar en inducir la regresión de los granulomas formados tras la infección por Map. Esta posibilidad ya había sido sugerida previamente (Juste *et al.*, 1994), y este estudio lo confirma. Este tipo de granulomas, con un importante componente de fibrosis, se ha encontrado en otras situaciones, asociados a formas de regresión como tras la infección de corderos con cepas de tipo C o bovinas de Map (Verna *et al.*, 2007; Fernández *et al.*, 2014) o, en ovejas adultas infectadas experimentalmente en las que la infección tiene lugar pero no progresa (Delgado *et al.*, 2013). Este efecto protector se ha visto también corroborado por los resultados bacteriológicos, de forma que, aunque se ha detectado presencia de ADN de Map en animales vacunados, lo ha hecho en menos localizaciones tisulares y además, en ninguno de ellos se consiguió el aislamiento de bacterias viables mediante el cultivo, a diferencia del grupo NVI. Estos hallazgos confirman la acción positiva de la vacunación sobre la excreción y presencia de Map en los tejidos o heces, ya señalada en muchas ocasiones, tanto en estudios de campo (Alonso-Hearn *et al.*, 2012; Mercier *et al.*, 2014) como experimentales (Juste *et al.*, 1994; Sweeney *et al.*, 2009; Hines II *et al.*, 2014). El efecto protector sobre la aparición de signos clínicos no se ha podido comprobar, ya que no se han observado en ninguno de los grupos. Esta situación era esperada ya que el estudio se diseñó para estudiar las fases iniciales de la infección porque, teniendo en cuenta su duración (330 dpi), era muy improbable que algún animal enfermase debido a que la paratuberculosis es una enfermedad con un curso prolongado y hasta los 1,5 o 2 años no aparecen los signos clínicos (Chiodini *et al.*, 1984a; Clarke, 1997; Dennis *et al.*, 2011).

Por el contrario, el posible efecto terapéutico de la vacunación de paratuberculosis no ha podido ser demostrado en todos los casos. Es de destacar que entre los animales del grupo IV, vacunado después de la infección, hubo una gran variabilidad individual en su respuesta, desde un animal sin lesiones y otro

con lesiones focales de carácter regresivo (lo que confirmaría ese efecto terapéutico), hasta individuos con una lesión difusa y abundantes BAAR, la más grave encontrada en todo el experimento (incluido el grupo control de la infección). Este último hallazgo incluso sugiere que, en algunos individuos infectados antes de la vacunación, la inmunización podría provocar una exacerbación de la infección. Los resultados de este experimento parece que reflejan lo que sucedería en condiciones de campo. En diversos estudios llevados a cabo en explotaciones comerciales, al vacunar animales adultos presumiblemente infectados se ha demostrado, que la vacunación tiene un efecto terapéutico ya que disminuye el número de casos clínicos (Crowther *et al.*, 1976; Pérez *et al.*, 1995; Corpa *et al.*, 2000c; Alonso-Hearn *et al.*, 2012), aunque en ningún momento las bajas desaparecerían por completo (Corpa *et al.*, 2000c; García-Pariente *et al.*, 2003; Windsor, 2006), lo que se había sugerido que podía deberse a que algunos animales, en el momento de la vacunación, presentaban formas clínicas tan avanzadas en las que la inmunización ya no ejercería ningún efecto (Corpa *et al.*, 2000c; García-Pariente *et al.*, 2003). Según nuestros resultados, esta hipótesis no se confirmaría, puesto que no parece probable que la cabra con lesiones difusas a los 330 dpi, también las tuviera 6 meses antes. Más bien sugiere que la respuesta de cada animal es diferente y que no se puede descartar que en algunos, la existencia de una infección previa, ante un segundo contacto masivo con el antígeno (vacunación), provoque una exacerbación de la misma. En relación con esto, ya se ha señalado que la revacunación de paratuberculosis no se aconseja por provocar un deterioro del estado inmunológico del animal (Gilmour y Angus, 1973). Esta exacerbación también ha sido observada en tuberculosis humana, donde la vacunación con BCG produjo un aumento de la gravedad en individuos vacunados ya infectados (Gröschel *et al.*, 2014).

Por último, dentro de los efectos de la vacunación que se han pretendido estudiar en esta tesis, su acción sobre el control de la enfermedad, en concreto según la edad de los animales a la vacunación, ha sido uno de ellos. Para ello, se diseñó el primer estudio, en un rebaño de cabras con casos clínicos de paratuberculosis. Sin embargo, en el tiempo de estudio no pudo valorarse este

aspecto ya que no se encontraron animales enfermos en ninguno de los grupos, vacunados o no. Únicamente se detectaron lesiones focales o multifocales, en una cabra no vacunada y en otras dos vacunadas, del grupo de adultas, lo que no ha permitido extraer ningún tipo de conclusión. Sin embargo, un resultado interesante de este estudio, ha sido el encontrar indicios de que la vacunación frente a paratuberculosis tendría un efecto positivo general sobre la salud de los animales vacunados. Al analizar el número total de bajas durante los 21 mpv de duración del estudio, se ha encontrado un menor número de animales eliminados por cualquier causa entre los individuos vacunados (6,12 %) que entre los que no lo estaban (14,13 %). Al analizar los distintos grupos, se pudo observar que el principal descenso tuvo lugar durante el primer año post-vacunación entre los cabritos vacunados a los 1,5 meses de edad, donde no causó baja ningún animal entre los vacunados (1,5MV), frente a tres que murieron por procesos neumónicos entre los no inmunizados. Un resultado similar había sido observado en tuberculosis humana en la vacunación con BCG, donde se encontró una significativa reducción general de la mortalidad no asociada a tuberculosis en niños vacunados (Garly *et al.*, 2003; Vaugelade *et al.*, 2004), especialmente la asociada a neumonías en individuos menores de un año (Niobey *et al.*, 1992). Para explicar este fenómeno de protección heteróloga asociada a la vacunación, en la tuberculosis se ha propuesto que la vacunación con BCG induciría lo que se ha denominado una respuesta inmunitaria “aprendida” o “entrenada” (Kleinnijenhuis *et al.*, 2015), que combinaría una inducción de la respuesta inmunitaria innata junto con la mediada por linfocitos T que responderían de forma heteróloga. Es de destacar que, en la especie humana, la existencia de esa inmunidad “entrenada” se ha comprobado en niños vacunados con BCG a los pocos meses (Netea *et al.*, 2011) lo que estaría de acuerdo con nuestros resultados, ya que el único grupo de edad donde las diferencias en las bajas fueron estadísticamente significativas era el inmunizado a los 1,5 meses.

Hay evidencias de que esa respuesta inmunitaria “entrenada” puede darse también en tuberculosis en rumiantes (Juste *et al.*, 2016a) pero no ha sido analizada en profundidad ni en paratuberculosis ni en relación con la vacunación.

Teniendo en cuenta que esta hipótesis puede explicar los resultados de este estudio, debería contemplarse y ser investigada en profundidad en un futuro.

CAPÍTULO VII

CONCLUSIONES / CONCLUSIONS

CONCLUSIONES

1. La vacunación con la vacuna inactivada Gudair® ha mostrado ejercer una protección heteróloga en un rebaño caprino de leche con historial de casos clínicos de paratuberculosis, ya que el número de bajas, por cualquier causa, se redujo significativamente entre los animales vacunados (6,12 %) frente a los no vacunados (14,13 %) durante un periodo de estudio de 21 meses. Este efecto ha sido más manifiesto en animales vacunados con 1,5 meses de edad.
2. Hay un incremento significativo de la respuesta inmunitaria periférica celular y humoral, específicas frente a Map, asociado a la vacunación frente a paratuberculosis, que aparece entre el 1º y 2º mes tras la inmunización, y que persiste al menos entre 18 y 21 meses. Dicha respuesta se ve influida tanto por la edad a la que se vacunan los animales (más intensa y duradera cuando se practica a los 5 meses e inferior en cabras adultas), como por el estado previo de infección con Map, que provoca una reducción en su duración e intensidad respecto a los animales no infectados.
3. La vacunación frente a paratuberculosis provoca reacciones inespecíficas con la prueba de IDTB simple en el diagnóstico de la tuberculosis, como se ha comprobado en el estudio experimental. Dichas reacciones disminuirían con el tiempo, ya que a los 6 mpv no se encontraron reaccionantes positivos en el estudio de campo. El uso de las pruebas de IDTB o IGRA comparadas permite solventar dichas inespecificidades.
4. El empleo de una vacuna frente a paratuberculosis no ha impedido la infección por Map de los animales, incluso cuando se aplicó antes de la infección. Sin embargo, y solamente en aquellos infectados tras la vacunación, sí consiguió una reducción de la presencia de bacterias viables en los tejidos, al no aislarse en ningún animal, a diferencia del resto de grupos.
5. La inoculación de la vacuna antes de la infección por Map tiene un claro efecto protector valorado mediante el estudio de las lesiones, ya que logra su limitación hacia formas focales y una significativa reducción de su intensidad

con el tiempo, de forma que ocasiona la regresión de los granulomas provocados por la infección.

6. No se ha podido demostrar de forma clara un posible efecto terapéutico de la vacuna, ya que se ha observado una gran variabilidad individual. Incluso, hay evidencias que sugieren que pudiera contribuir a exacerbar una infección previamente establecida, como el hecho de que el animal con mayor carga bacteriana y lesiones más graves encontrado, fuera un animal vacunado tras la infección.

7. No existe una asociación directa evidente entre la respuesta inmunitaria celular periférica, medida por la producción de IFN- γ , y la protección asociada a la vacunación, puesto que los animales con lesiones más graves han mostrado niveles de esta citoquina similares, - o incluso más elevados - que aquellos con lesiones focales, tras la estimulación de sangre circulante con PPD aviar.

8. La vacunación no ejerce ningún efecto sobre la proporción de linfocitos T CD4⁺, CD8⁺, $\delta\gamma$ o células B tanto en sangre circulante como en el tejido linfoide intestinal o nódulos linfáticos yeyunales.

9. Solamente en el caso del nódulo linfático preescapular, localizado en la vecindad del punto de inoculación de la vacuna, hay un incremento de linfocitos sensibilizados frente a Map, valorados por la producción de IFN- γ tras su estimulación con PPD aviar, a los 360 días tras la vacunación. Sin embargo, ésta no induce cambios en el tejido linfoide intestinal o nódulos linfáticos yeyunales.

10. Los cócteles peptídicos PC-EC and PC-HP derivados de *M. bovis* pueden ser buenos candidatos para diferenciar animales vacunados de paratuberculosis de animales infectados con tuberculosis mediante la técnica IGRA, ya que no se observó ningún incremento en la producción de IFN- γ tras la estimulación de la sangre periférica con estos antígenos en las cabras vacunadas con Silirum® o con Gudair®, mientras que, si lo hubo al emplear PPD aviar, johnina o PPD bovina.

11. Los antígenos de Map empleados (VK 055 y VK 067) en este estudio no han mejorado la sensibilidad de la técnica IGRA en la detección de animales vacunados o infectados por Map, en comparación con las PPDs (aviar o johnina).

CONCLUSIONS

1. Vaccination against paratuberculosis with Gudair® has shown to exert a heterologous protection in a dairy goat herd with clinical history of the disease, since the number of culled animals, regardless the cause, was significantly lower among vaccinated animals (6.12 %) than in non-vaccinated (14.13 %), during a period of 21 months. This effect was more evident in kids vaccinated at 1.5 months of age.
2. There is a significant increase of the peripheral immune response specific for Map caused by paratuberculosis vaccination that appears between the 1st and 2nd months after immunization and persists for, at least, between 18 and 21 months post vaccination. This response is influenced by both the age at which the animals are vaccinated (it is more intense and enduring when vaccination takes place at 5 months, while lower and shorter in adult goats) and the previous status of Map infection, that reduces the duration and intensity of the response when compared to non-infected animals.
3. Vaccination against paratuberculosis causes non-specific reactions of the single ITT test in the diagnosis of tuberculosis, as shown in the experimental study, that would decrease with time, since at 6 mpv no positive reactors were detected during the field study. The use of comparative ITT or IGRA tests would permit to solve those non-specificities.
4. The use of a paratuberculosis vaccine has not prevented the infection of animals by Map, even when applied before infection. However, and only in those animals infected after vaccination, it did achieved a reduction in the presence of viable bacteria in the tissues, since no positive isolation was found in any vaccinated kid.
5. The administration of a vaccine before Map infection has demonstrated to have a clear protective effect, assessed by histopathological evaluation of the lesions. It limits the progression of the disease towards focal forms and achieves

a significant reduction of lesion severity with time, so that a regression of the granulomas induced by Map infection occurs.

6. The possible therapeutic effect of vaccination could not be clearly demonstrated since a great individual variability has been observed. Even, there were evidences suggesting that it could contribute to exacerbate a previously established infection shown by the fact that the animal with the highest bacterial burden and the more severe lesions was vaccinated after Map infection.

7. There is no obvious direct association between the peripheral cell-mediated immune response, measured by the production of IFN- γ , and the protection related to vaccination, since animals with severe lesions have shown similar or even higher levels of this cytokine than those with focal lesions, after stimulation of circulating blood with avian PPD.

8. Vaccination has no effect on the proportion of T CD4⁺, T CD8⁺, T $\gamma\delta$ or B lymphocytes, in blood, in intestinal lymphoid tissue or jejunal lymph nodes.

9. Only in the prescapular lymph node, located in the vicinity of the vaccine inoculation point, there is an increase in the number of lymphocytes sensitized against Map, assessed by the production of IFN- γ after stimulation with avian PPD, at 360 dpv. However, it does not cause similar changes in the intestinal lymphoid tissue or jejunal lymph nodes.

10. PC-EC and PC-HP peptidic cocktails derived from *M. bovis* can be good candidates for the differentiation between paratuberculosis-vaccinated and tuberculosis-infected animals by IGRA, since no increase in the IFN- γ production was detected after blood stimulation with these antigens in goats vaccinated with Gudair® or Silirum® whereas IFN- γ production was increased when bovine PPD, avian PPD or johnin were used.

11. Map antigens (VK 055 and VK 067) used in this study did not improve the sensitivity of IGRA method for the detection of vaccinated or Map infected goat kids, when compared to johnin or avian PPD.

CAPÍTULO VIII
RESUMEN / SUMMARY

RESUMEN

La paratuberculosis es una enfermedad infecto-contagiosa de carácter crónico que está causada por *Mycobacterium avium* subespecies *paratuberculosis* (Map). Está difundida por todo el mundo y causa importantes pérdidas económicas en la industria ganadera. Para su control, la única medida que se ha demostrado útil en términos coste-beneficio, es la vacunación. Sin embargo, posee una serie de desventajas, como es el hecho de que produce reacciones cruzadas con las pruebas de diagnóstico empleadas en las campañas de erradicación de la tuberculosis, o que la protección no es completa, ya que, aunque reduce la aparición de casos clínicos y la excreción de Map, esto no se consigue en todos los casos. Por otra parte, además de un efecto protector, hay evidencias en estudios de campo que sugieren que la vacunación podría tener un efecto terapéutico, que hasta el momento no se ha logrado demostrar. Existen, por lo tanto, muchas incógnitas sobre cuáles son los efectos de la vacunación, y ciertos aspectos relacionados con ella, sobre la patogenia de la paratuberculosis y la respuesta inmunitaria de los animales. Su esclarecimiento es el objetivo general de esta Tesis Doctoral. Para ello, se han desarrollado tres estudios, que además van a responder a varios objetivos de carácter más específico.

El primer estudio tiene como objetivo evaluar el efecto de la vacunación, en función de la edad de los animales, sobre la respuesta inmunitaria y el control de la enfermedad, en una explotación caprina comercial con casos clínicos de la enfermedad. Para su logro, se planteó un estudio en un rebaño de cabras murciano-granadina, de producción lechera, donde se inmunizaron, con la vacuna inactivada Gudair®, cabras a tres edades diferentes: 39 cabras adultas (mayores de 1,5 años), dejándose 38 animales de la misma edad sin vacunar; 40 cabritas de 5 meses de edad, con otras 39 de edad similar como controles, y 19 animales de 1,5 meses y otras 15 sin vacunar. En todos los animales se tomaron muestras de sangre con periodicidad trimestral, hasta los 21 meses post-vacunación (mpv) para valorar la producción de IFN- γ mediante la técnica IGRA, empleando las PPD aviar y bovina, y los niveles de anticuerpos séricos empleando un ELISA indirecto. A los 6 y a los 18 mpv, se llevó a cabo la prueba

de IDTB simple y comparada. También se controló el número de bajas, por cualquier razón, durante 21 meses, tanto en los grupos vacunados como no vacunados. En todos los grupos vacunados se observó un incremento significativo en la producción de IFN- γ , cuando se estimularon las muestras de sangre con PPD aviar desde los 3 mpv hasta los 18 mpv y con PPD bovina, entre los 3 y 21 mpv. Igualmente, también hubo un incremento significativo de los niveles de anticuerpos séricos entre los 3 y 21 mpv, en todos los grupos vacunados. También, se observaron diferencias según la edad de vacunación de forma que los niveles más elevados se encontraron en los animales vacunados a los 5 meses, y los menores en los individuos adultos. No se encontraron reaccionantes positivos a tuberculosis en las dos IDTB realizadas. Tampoco se detectaron bajas asociadas a paratuberculosis en ninguno de los grupos. Sin embargo, cuando se analizó el número de bajas totales, independientemente de su causa, se observó que era significativamente menor en los grupos vacunados (6,12 %) que en los no vacunados (14,13 %). Esto era especialmente evidente en el grupo de cabritos inmunizados con 1,5 meses, donde no ocurrió ninguna baja, mientras que en el grupo no vacunado murieron 3 animales durante el primer año por procesos neumónicos. Estos resultados sugieren que la vacunación de paratuberculosis, especialmente en animales jóvenes, induce una protección heteróloga frente a otros procesos infecto-contagiosos.

El segundo estudio se planteó con el objetivo de valorar el efecto de la vacunación, previa o posterior a una infección experimental con Map, sobre la patogenia de la paratuberculosis, valorando el desarrollo de lesiones, la respuesta inmunitaria periférica y local o la colonización de Map en tejidos y heces. Se emplearon 35 cabritos de 1,5 meses de edad, que fueron separados en 6 grupos experimentales. Un grupo de 8 cabritos (VI) fue vacunado 30 días antes de que se les produjera el desafío oral con la micobacteria; 4 cabritos (VNI) permanecieron como animales control de esa vacunación; 9 cabritos fueron desafiados, pero no vacunados (NVI); 5 cabritos fueron desafiados y 150 días después fueron vacunados (IV); 2 cabritos permanecieron como controles de esa vacunación a los 150 dpi (NIV) y, por último, 7 cabritos permanecieron como animales sin vacunar ni infectar (NVNI). La inmunización se llevó a cabo con la

vacuna inactivada Silirum® y para el desafío se empleó la cepa de referencia K-10 de Map. Se tomaron muestras de sangre con periodicidad mensual, entre los 0 y 360 días post-vacunación (dpv), para evaluar la respuesta inmunitaria periférica celular y humoral, con las mismas técnicas del primer estudio, y a los 120 dpv (90 dpi) se realizó la prueba de IDTB comparada, empleando PPD aviar y bovina. A los 120 días post-infección (dpi) y a los 330 dpi se llevaron a cabo sacrificios para evaluar el efecto de la vacunación sobre el desarrollo de las lesiones, la respuesta inmunitaria local y la presencia de micobacterias en tejidos. Durante la duración del estudio, se pudo comprobar cómo se producía un incremento significativo en la producción de IFN- γ tras la estimulación de la sangre con PPD aviar al mes de producirse la vacunación en los grupos vacunados a los -30 dpi, mientras que fue más tardía (60 dpv) en el caso de los grupos vacunados a los 150 dpi. Este incremento fue mucho más prolongado en el caso de la vacunación a los -30 dpi (6 mpv) que en el caso de la vacunación a los 150 dpi (3 mpv). Asimismo, se observó un patrón similar en la PPD bovina, donde se vieron incrementos significativos similares a los observados en el caso de la PPD aviar, aunque siempre inferiores. La posible interferencia de la vacunación en el diagnóstico de la tuberculosis, no se observó al hacer la IDTB comparada, pero sí con la IDTB simple, ya que un 58,3 % de los cabritos vacunados fueron positivos. En ambos grupos vacunados, se detectaron niveles de anticuerpos significativamente más elevados, a los 60 dpv, que se mantuvieron durante 7 meses, en el caso del grupo VI y 3 meses en el grupo IV. Sin embargo, la vacunación no modificó los porcentajes de las poblaciones de linfocitos T CD4⁺, T CD8⁺, T $\delta\gamma$ o B en sangre circulante, valorados mediante citometría de flujo.

Se pudo comprobar que la vacunación no evitó la infección por Map de los animales, ya que en todos los grupos se pudieron identificar lesiones, así como ácidos nucleicos de esta micobacteria mediante PCR. Sin embargo, sí se pudo observar como la vacunación consiguió un efecto protector sobre los cabritos del grupo VI, ya que solo mostraron lesiones restringidas al tejido linfoide (de tipo focal o multifocal a) y, mediante el recuento del número de granulomas, se demostró que disminuyeron con el tiempo. Es de destacar que, a diferencia de

los cabritos del grupo NVI, los granulomas del tejido linfoide mostraban un carácter regresivo, con un incremento en la cantidad de tejido conjuntivo.

Sin embargo, no se pudo demostrar con claridad el posible efecto terapéutico de la vacunación, ya que se observó una gran variabilidad individual en las respuestas de los animales del grupo IV, con cabritos sin lesiones o lesiones focales, hasta un animal con una lesión difusa y gran cantidad de bacilos en el intestino, a pesar de mostrar una respuesta inmunitaria celular muy elevada y del que se consiguió aislar Map mediante el cultivo de sus tejidos. La existencia de este animal plantea la posibilidad de que la vacunación tras la infección pudiera exacerbar esta última en algunos animales.

En cuanto a la respuesta inmunitaria local, la vacunación no indujo cambios en las subpoblaciones linfocitarias presentes en el tejido linfoide intestinal, nódulos linfáticos yeyunales o nódulo linfático preescapular. Sólo en esta última localización se detectaron niveles más elevados de IFN- γ tras la estimulación con PPD aviar de los linfocitos purificados a los 360 dpv en animales vacunados. Lo que no se observó en el resto de muestras estudiadas.

El tercer objetivo de este trabajo de investigación fue analizar la respuesta inmunitaria celular mediante la técnica IGRA, desarrollada por animales sensibilizados frente Map cuando eran expuestos a nuevos antígenos específicos de *M. bovis* y Map. Para ello, se desarrolló un tercer ensayo, empleando animales del primer y segundo estudio, en muestreos realizados a diferentes días post-vacunación, empleando como antígenos para estimular la sangre la PPD aviar y bovina, la johnina, dos cócteles peptídicos (PC-EC y PC-HP) de *M. bovis* y los antígenos VK 055 y VK 067 de Map. No se observó producción específica de IFN- γ tras la estimulación de la sangre con los dos cócteles de *M. bovis* en ningún animal vacunado ni en ningún muestreo, mientras que sí se obtuvo cuando se empleó la PPD bovina, lo que apoya su posible uso en las campañas de erradicación de la tuberculosis al mejorar la especificidad de la PPD bovina. En cambio, los dos antígenos de Map probados en este estudio no mejoraron la sensibilidad de la johnina ni la PPD aviar en la detección de cabritos vacunados o infectados por Map.

SUMMARY

Paratuberculosis is a chronic infectious disease caused by *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. It causes significant economic losses in the livestock industry worldwide. The only control measure that has proven useful in terms of cost-benefit is vaccination. However, it has some disadvantages, such as the cross reactions it causes with the tuberculosis diagnostic tests used in the eradication programs, or that the protection is not complete, since the reduction in the number of clinical cases and the excretion of Map is not achieved in all cases. On the other hand, in addition to a protective effect, there are evidences from field studies suggesting that vaccination could have a therapeutic effect, but this has not been experimentally proven so far. There is still, then, a lack of knowledge regarding the effects that vaccination exerts on both the immune response of the host and the pathogenesis of paratuberculosis. The general aim of this PhD Thesis is the clarification of these uncertainties. For this, three studies have been developed, which will also address different objectives that are more specific.

The first study is aimed to evaluate the effect of vaccination, depending on the age of the animals, on the immune response and control of paratuberculosis, in a commercial goat herd with clinical cases of the disease. With this objective, a commercial herd of Murciano-Granadina dairy goats was immunized with the inactivated Gudair® vaccine. Animals from this herd were vaccinated at three different ages: 39 adult goats (older than 1.5 years), leaving 38 animals of the same age unvaccinated; 40 kids of 5 months of age, with another 39 of similar age as controls, and 19 animals of 1.5 months while another 15 from the same age remained unvaccinated. Blood samples were taken quarterly from all studied animals up to 21 months post-vaccination (mpv) to assess the production of IFN- γ by the IGRA technique (using avian and bovine PPD), and serum antibody levels by an indirect ELISA. At 6 and at 18 mpv, the simple ITTs test was carried out. The number of culled animals, regardless the reason, was also monitored for 21 months, both in the vaccinated and unvaccinated groups. A significant

increase in the production of IFN- γ was observed in all the vaccinated groups when the blood samples were stimulated with avian PPD, from 3 mpv to 18 mpv, and with bovine PPD, between 3 and 21 mpv. Likewise, there was also a significant increase in serum antibody levels between 3 and 21 mpv in all vaccinated groups. Differences were observed according to vaccination age so that the highest levels were found in the animals vaccinated at 5 months, and the lowest in the adult individuals. No positive reactants to tuberculosis were found in the two ITTs performed. No animal losses associated with paratuberculosis were detected in any of the groups. However, when the number of total culled animals was analyzed, it was significantly lower in the vaccinated (6.12 %) than in the unvaccinated groups (14.13 %). This was especially evident in the group of kids vaccinated at 1.5 months, where there were not losses, while 3 deaths occurred during the first year among the unvaccinated, caused by pneumonia. These results suggest that vaccination of paratuberculosis, especially in young animals, induces a heterologous protection against other infectious-contagious processes.

The objective of the second study was to evaluate the effect of vaccination, prior or subsequent to an experimental infection with Map, on the pathogenesis of paratuberculosis, assessing the development of lesions, the peripheral and local immune responses or the colonization of Map in tissues and faeces. For this, 35 goat kids of 1.5 months of age were separated into 6 experimental groups. A group of 8 kids (VI) was vaccinated 30 days before the oral challenge with Map; 4 kids (NIV) remained as control animals of that vaccination; 9 kids were challenged, but not vaccinated (NIV); 5 kids were challenged and 150 days later they were vaccinated (IV); 2 kids remained as controls for that vaccination at 150 dpi (NIV) and, finally, 7 kids remained as non-vaccinated non-infected animals (NVNI). The immunization was carried out with the inactivated Silirum® vaccine and the reference strain K-10 of Map was used for the challenge. Blood samples were taken monthly, between 0 and 360 days post-vaccination (dpv), to evaluate the peripheral cellular and humoral immune responses, following the same techniques of the first study, and at 120 dpv (90

dpi) the comparative ITT test, using avian and bovine PPD, was performed. At 120 days post-infection (dpi) and 330 dpi, goat kids were culled in order to evaluate the effect of vaccination on the development of lesions, the local immune response and the presence of mycobacteria in tissues. Animals vaccinated at -30 dpi showed one month later (30 dpv) a significant increase in the production of IFN- γ , after the stimulation of the blood with avian PPD, whereas it appeared later (60 dpv) in the groups vaccinated at 150 dpi. This increase lasted longer in the case of vaccination at -30 dpi (6 mpv) than in the case of vaccination at 150 dpi (3 mpv). A similar pattern was observed in bovine PPD, where there were significant increases similar to those observed in the case of avian PPD, although always lower. The possible interference of vaccination in the diagnosis of tuberculosis was not observed when the comparative ITT was carried out. However, it appeared when the simple ITT was performed, since 58.3 % of the vaccinated kids were positive to this technique. Both vaccinated groups showed significantly higher antibody levels at 60 dpv, which were maintained for 7 months in the case of VI group and 3 months in IV group. However, vaccination did not modify the percentages of T CD4⁺ T, CD8⁺ T, T $\gamma\delta$ or B lymphocytes in circulating blood, as assessed by flow cytometry.

It was possible to verify that vaccination did not prevent the infection of the animals by Map, since in all the groups it was possible to identify lesions in the intestine or lymph nodes as well as nucleic acids from this *Mycobacterium*. However, vaccination had a protective effect on the kids from group VI, since they only showed lesions restricted to the lymphoid tissue (focal or multifocal type a). These lesions, assessed by the count of granulomas, decreased over time. It is noteworthy that, unlike in the kids of the NVI group, the granulomas of the lymphoid tissue showed a regressive character, with an increase for connective tissue.

On the other hand, the possible therapeutic effect of paratuberculosis vaccination could not be clearly demonstrated, as there was a great individual variability in the responses of the animals of group IV, from kids showing no

lesions or only focal lesions, to one animal with diffuse lesions and abundant bacilli in the intestine, despite showing a strong cellular immune response, and from which animal Map was isolated by culture. The existence of this case raises the possibility that vaccination after infection could exacerbate the latter in some animals.

Regarding the local immune response, vaccination did not induce changes in the lymphocyte subpopulations present in the intestinal lymphoid tissue, jejunal lymph nodes or prescapular lymph node. Only in this last location, higher levels of IFN- γ were detected after stimulation with avian PPD of the lymphocytes purified from vaccinated animals at 360 dpv. This effect was not observed in the other samples studied.

The third objective of this PhD Thesis was to analyse the cellular immune response, using the IGRA technique, developed by animals sensitized to Map when they were exposed to new antigens specific to *M. bovis* and Map. For this, a third study was developed, using animals of the first and second studies, analysing blood samples taken at different post-vaccination days, using the avian and bovine PPD, the johnin, two peptide cocktails (PC-EC and PC-HP) of *M. bovis* and the antigens VK 055 and VK 067 of Map as antigens to stimulate the blood. No specific production of IFN- γ was observed after stimulation of the blood with the two cocktails of *M. bovis* in any sample from vaccinated animals, whereas it was detected when bovine PPD was used. These results support the possible use of these new antigens in the eradication campaigns for tuberculosis by improving the specificity of bovine PPD. In contrast, the two Map antigens tested in this study did not improve the sensitivity of the johnin or avian PPD in the detection of vaccinated or Map infected goats.

CAPÍTULO IX

BIBLIOGRAFÍA

- Aagaard C, Govaerts M, Meikle V, Gutiérrez-Pabello J, McNair J, Andersen P, Suárez-Güemes F, Pollock J, Espitia C, Cataldi A** (2010). Detection of bovine tuberculosis in herds with different disease prevalence and influence of paratuberculosis infection on PPDB and ESAT-6/CFP10 specificity. *Prev. Vet. Med.* 96, 161-169.
- Aagaard C, Govaerts M, Meng Okkels L, Andersen P, Pollock J, Okkels L, Andersen P, Pollock J** (2003). Genomic approach to identification of *Mycobacterium bovis* diagnostic antigens in cattle. *Society* 41, 3719-3728.
- Abendaño N, Juste R, Alonso-Hearn M** (2013). Anti-inflammatory and antiapoptotic responses to infection: a common denominator of human and bovine macrophages infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Biomed Res. Int.* 2013, 908348.
- Aboagye G, Rowe M** (2011). Occurrence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in raw water and water treatment operations for the production of potable water. *Water Res.* 45, 3271-8.
- Acharya K, Dhand N, Whittington R, Plain K** (2017). Detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in powdered infant formula using IS 900 quantitative PCR and liquid culture media. *Int. J. Food Microbiol.* 257, 1-9.
- Achkar J, Casadevall A** (2013). Antibody-mediated immunity against tuberculosis: implications for vaccine development. *Cell Host Microbe* 13, 250-62.
- Aduriz G, Juste R, Garrido J, Geijo M** (2000). Epidemiología y control de la paratuberculosis bovina. *BOVIS, Aula Vet.* 93, 63-73.
- Aduriz G, Juste R, Saez de Ocariz C** (1992). Paratuberculosis in sheep flocks: II. Vaccination, en: 3rd International Colloquium on Paratuberculosis.
- Adúriz J** (1993). Epidemiología, diagnóstico y control de la paratuberculosis ovina en la Comunidad Autónoma del País Vasco. Tesis Doctoral. Universidad de Zaragoza. Facultad de Veterinaria.
- Adúriz J, Juste R, Cortabarría N** (1995). Lack of mycobactin dependence of mycobacteria isolated on Middlebrook 7H11 from clinical cases of ovine paratuberculosis. *Vet. Microbiol.* 45, 211-7.
- Al-Shamali M, Khan I, Al-Nakib B, Al-Hassan F, Mustafa A** (1997). A multiplex polymerase chain reaction assay for the detection of *Mycobacterium paratuberculosis* DNA in Crohn's disease tissue. *Scand. J. Gastroenterol.* 32, 819-23.
- Albarrak S, Waters W, Stabel J, Hostetter J** (2017). WC1 + $\gamma\delta$ T cells from cattle naturally infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* respond differentially to stimulation with PPD-J. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 190, 57-64.
- Albuquerque Ppf, Santos A, Souza Neto Ol, Kim P, Cavalcanti E, Oliveira Jmb, Mota R, Júnior J** (2017). Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in bovine milk from the state of Pernambuco, Brazil. *Braz. J. Microbiol.* 48, 113-117.
- Allen S, Sotos J, Sylte M, Czuprynski C** (2001). Use of Hoechst 33342 staining to detect apoptotic changes in bovine mononuclear phagocytes infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 8, 460-464.
- Allen W, Berrett S, Patterson D** (1974). A biochemical study of experimental Johne's disease. *J. Comp. Pathol.* 84, 381-384.
- Aller B, Fernández-Díez M, Escudero-Díez A** (1973). Paratuberculosis ovina. *Sup Cient Bol Inf Cons Gen Col Vet Esp* 196, 11-18.
- Alonso-Hearn M, Molina E, Geijo M, Vazquez P, Sevilla I, Garrido J, Juste R** (2012). Immunization of adult dairy cattle with a new heat-killed vaccine is associated with longer productive life prior to cows being sent to slaughter with suspected paratuberculosis. *J. Dairy Sci.* 95, 618-29.
- Alonso-Hearn M, Molina E, Geijo M, Vazquez P, Sevilla I, Garrido J, Juste R** (2009). Isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from Muscle Tissue of Naturally Infected Cattle. *Foodborne Pathog. Dis.* 6, 513-518.

- Alvarez G, Zwilling B, Lafuse W** (2003). *Mycobacterium avium* inhibition of IFN-gamma signaling in mouse macrophages: Toll-like receptor 2 stimulation increases expression of dominant-negative STAT1 beta by mRNA stabilization. *J. Immunol.* 171, 6766-6773.
- Álvarez J, de Juan L, Bezos J, Romero B, Sáez J, Gordejo F, Briones V, Moreno M, Mateos A, Domínguez L, Aranaz A** (2008). Interference of paratuberculosis with the diagnosis of tuberculosis in a goat flock with a natural mixed infection. *Vet. Microbiol.* 128, 72-80.
- Álvarez J, de Juan L, Bezos J, Romero B, Sáez J, Marqués S, Domínguez C, Mínguez O, Fernández-Mardomingo B, Mateos A, Domínguez L, Aranaz A** (2009). Effect of paratuberculosis on the diagnosis of bovine tuberculosis in a cattle herd with a mixed infection using interferon-gamma detection assay. *Vet. Microbiol.* 135.
- Aly S, Anderson R, Adaska J, Jiang J, Gardner I** (2010). Association between *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection and milk production in two California dairies. *J. Dairy Sci.* 93, 1030-1040.
- Alzuherrri H, Woodall C, Clarke C** (1996). Increased intestinal TNF-alpha, IL-1 beta and IL-6 expression in ovine paratuberculosis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 49, 331-45.
- Andersen A, Roth A, Jensen K, Erikstrup C, Lisse I, Whittle H, Sartono E, Yazdanbakhsh M, Aaby P, Benn C** (2013). The immunological effect of revaccination with Bacille Calmette-Guérin vaccine at 19 months of age. *Vaccine* 31, 2137-44.
- Andersen P, Andersen A, Sørensen A, Nagai S** (1995). Recall of long-lived immunity to *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice. *J. Immunol.* 154, 3359-72.
- Andersen P, Doherty T** (2005). The success and failure of BCG - implications for a novel tuberculosis vaccine. *Nat. Rev. Microbiol.* 3, 656-62.
- Andersen P, Munk M, Pollock J, Doherty T** (2000). Specific immune-based diagnosis of tuberculosis. *Lancet* (London, England) 356, 1099-104.
- Anderson J, Meece J, Koziczkowski J, Clark D, Radcliff R, Nolden C, Samuel M, Ellingson J** (2007). *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in scavenging mammals in Wisconsin. *J. Wildl. Dis.* 43, 302-308.
- Aniwan S, Park S, Loftus Evj** (2017). Epidemiology, Natural History, and Risk Stratification of Crohn's Disease. *Gastroenterol. Clin. North Am.* 46, 463-480.
- Aranaz A, De Juan L, Bezos J, Alvarez J, Romero B, Lozano F, Paramio J, López-Sánchez J, Mateos A, Domínguez L** (2006). Assessment of diagnostic tools for eradication of bovine tuberculosis in cattle co-infected with *Mycobacterium bovis* and *M. avium* subsp. *paratuberculosis*. *Vet. Res.* 37, 593-606.
- Arango-Sabogal J, Paré J, Labrecque O, Côté G, Roy J, Buczinski S, Wellemans V, Fecteau G** (2017). Incidence of fecal excretion of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in dairy cows before and after the enrolment in the Québec voluntary program. *Prev. Vet. Med.* 148, 94-105.
- Armitage E, Drummond H, Wilson D, Ghosh S** (2001). Increasing incidence of both juvenile-onset Crohn's disease and ulcerative colitis in Scotland. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 13, 1439-47.
- Arrazuria R** (2016). *Mycobacteria* in rabbits: Searching for an efficient paratuberculosis infection model. Universidad del País Vasc.
- Arrazuria R, Juste R, Elguezal N** (2017). *Mycobacterial* infections in rabbits: From the wild to the laboratory. *Transbound. Emerg. Dis.* 64, 1045-1058.
- Arrazuria R, Molina E, Garrido J, Pérez V, Juste R, Elguezal N** (2016). Vaccination sequence effects on immunological response and tissue bacterial burden in paratuberculosis infection in a rabbit model. *Vet. Res.* 47, 77.
- Arrazuria R, Molina E, Mateo-Abad M, Arostegui I, Garrido J, Juste R, Elguezal N** (2015A). Effect of various dietary regimens on oral challenge with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in a rabbit model. *Res. Vet. Sci.* 101, 80-83.

- Arrazuria R, Sevilla I, Molina E, Pérez V, Garrido J, Juste R, Elguezal N** (2015B). Detection of *Mycobacterium avium* subspecies in the gut associated lymphoid tissue of slaughtered rabbits. *BMC Vet. Res.* 11, 130.
- Arsenault R, Maattanen P, Daigle J, Potter A, Griebel P, Napper S** (2014). From mouth to macrophage: mechanisms of innate immune subversion by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Vet. Res.* 45, 54.
- Aucouturier J, Dupuis L, Ganne V** (2001). Adjuvants designed for veterinary and human vaccines. *Vaccine* 19, 2666-72.
- Autschbach F, Eisold S, Hinz U, Zinser S, Linnebacher M, Giese T, Löffler T, Büchler M, Schmidt J** (2005). High prevalence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* IS900 DNA in gut tissues from individuals with Crohn's disease. *Gut* 54, 944-949.
- Ayele W, Bartos M, Svastova P, Pavlik I** (2004). Distribution of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in organs of naturally infected bull-calves and breeding bulls. *Vet. Microbiol.* 103, 209—217.
- Azimi T, Nasiri M, Chirani A, Pouriran R, Dabiri H** (2018). The role of bacteria in the inflammatory bowel disease development: a narrative review. *APMIS* 126, 275-283.
- Babu S, Bhat S, Kumar N, Kumaraswami V, Nutman T** (2010). Regulatory T cells modulate Th17 responses in patients with positive tuberculin skin test results. *J. Infect. Dis.* 201, 20-31.
- Baksh F, Finkelstein S, Ariyanayagam-Baksh S, Swalsky P, Klein E, Dunn J** (2004). Absence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in the microdissected granulomas of Crohn's disease. *Mod. Pathol.* 17, 1289-94.
- Baldwin C, Sathiyaseelan T, Rocchi M, McKeever D** (2000). Rapid changes occur in the percentage of circulating bovine WC1+ $\gamma\delta$ Th1 cells. *Res. Vet. Sci.* 69, 175-180.
- Ballagi-Pordány A, Belák S** (1996). The use of mimics as internal standards to avoid false negatives in diagnostic PCR. *Mol. Cell. Probes* 10, 159-164.
- Balseiro A, García-Marín J, Solano P, Garrido J, Prieto J** (2008). Histopathological classification of lesions observed in natural cases of paratuberculosis in free-ranging fallow deer (*Dama dama*). *J. Comp. Pathol.* 138, 180-188.
- Balseiro A, Prieto J, Espí A, Pérez V, García-Marín J** (2003). Presence of focal and multifocal paratuberculosis lesions in mesenteric lymph nodes and the ileocaecal valve of cattle positive to the tuberculin skin test, *The Veterinary Journal*.
- Banaiee N, Kincaid E, Buchwald U, Jacobs Wrj, Ernst J** (2006). Potent inhibition of macrophage responses to IFN-gamma by live virulent *Mycobacterium tuberculosis* is independent of mature mycobacterial lipoproteins but dependent on TLR2. *J. Immunol.* 176, 3019-3027.
- Bannantine J, Bermudez L** (2013). No holes barred: invasion of the intestinal mucosa by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Infect. Immun.* 81, 3960-3965.
- Bannantine J, Hines II M, Bermudez L, Talaat A, Sreevatsan S, Stabel J, Chang Y-F, Coussens P, Barletta R, Davis W, Collins D, Gröhn Y, Kapur V** (2014). A rational framework for evaluating the next generation of vaccines against *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 4, 126.
- Baquero M, Plattner B** (2016). Bovine WC1+ $\gamma\delta$ T lymphocytes modify monocyte-derived macrophage responses during early *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 170, 65-72.
- Barkema H, Green M, Bradley A, Zadoks R** (2009). Invited review: The role of contagious disease in udder health. *J. Dairy Sci.* 92, 4717-4729.
- Bastida F, Juste R** (2011). Paratuberculosis control: a review with a focus on vaccination. *J. Immune Based Ther. Vaccines* 9, 8.

- Bastola R, Noh G, Keum T, Bashyal S, Seo J-E, Choi J, Oh Y, Cho Y, Lee S** (2017). Vaccine adjuvants: smart components to boost the immune system. *Arch. Pharm. Res.*
- Bates A, O'Brien R, Liggett S, Griffin F** (2018). The effect of sub-clinical infection with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* on milk production in a New Zealand dairy herd. *BMC Vet. Res.* 14, 93.
- Bauman C, Jones-Bitton A, Menzies P, Toft N, Jansen J, Kelton D** (2016). Prevalence of paratuberculosis in the dairy goat and dairy sheep industries in Ontario, Canada. *Can. Vet. J. = La Rev. Vet. Can.* 57, 169-75.
- Beard P, Daniels M, Henderson D, Pirie A, Rudge K, Buxton D, Rhind S, Greig A, Hutchings M, McKendrick I, Stevenson K, Sharp J** (2001A). Paratuberculosis infection of nonruminant wildlife in Scotland. *J. Clin. Microbiol.* 39, 1517-1521.
- Beard P, Stevenson K, Pirie A, Rudge K, Buxton D, Rhind S, Sinclair M, Wildblood L, Jones D, Sharp J** (2001B). Experimental paratuberculosis in calves following inoculation with a rabbit isolate of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.* 39.
- Begara-McGorum I, Wildblood L, Clarke C, Connor K, Stevenson K, McInnes C, Sharp J, Jones D** (1998). Early immunopathological events in experimental ovine paratuberculosis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 63, 265-287.
- Begg D, de Silva K, Bosward K, Di Fiore L, Taylor D, Jungersen G, Whittington R** (2009). Enzyme-linked immunospot: an alternative method for the detection of interferon gamma in Johne's disease. *J. Vet. Diagn. Invest.* 21, 187-96.
- Begg D, de 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, 840-6.
- Begg D, de Silva K, Di Fiore L, Taylor D, Bower K, Zhong L, Kawaji S, Emery D, Whittington R** (2010). Experimental infection model for Johne's disease using a lyophilised, pure culture, seedstock of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Vet. Microbiol.* 141, 301-311.
- Begg D, Griffin J** (2005). Vaccination of sheep against *M. paratuberculosis*: immune parameters and protective efficacy. *Vaccine* 23, 4999-5008.
- Begg D, O'Brien R, Mackintosh C, Griffin J** (2005). Experimental infection model for Johne's disease in sheep. *Infect. Immun.* 73, 5603-5611.
- Begg D, Purdie A, de Silva K, Dhand N, Plain K, Whittington R** (2017). Variation in susceptibility of different breeds of sheep to *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* following experimental inoculation. *Vet. Res.* 48, 36.
- Begg D, Whittington R** (2008). Experimental animal infection models for Johne's disease, an infectious enteropathy caused by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Vet. J.* 176, 129-145.
- Beissert S, Schwarz A, Schwarz T** (2006). Regulatory T Cells. *J. Invest. Dermatol.* 126, 15-24.
- Belák S, Ballagi-Pordány A** (1993). Experiences on the application of the polymerase chain reaction in a diagnostic laboratory. *Mol. Cell. Probes* 7, 241-248.
- Ben-Ali M, Barbouche M-R, Bousnina S, Chabbou A, Dellagi K** (2004). Toll-like receptor 2 Arg677Trp polymorphism is associated with susceptibility to tuberculosis in Tunisian patients. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 11, 625-626.
- Bendixen P** (1978). Immunological reactions caused by infection with *Mycobacterium paratuberculosis*. A review. *Nord. Vet. Med.* 30, 163-168.
- Benedictus A, Mitchell R, Linde-Widmann M, Sweeney R, Fyock T, Schukken Y, Whitlock R** (2008). Transmission parameters of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infections in a dairy herd going through a control program. *Prev. Vet. Med.* 83, 215-27.
- Benedictus G, Dijkhuizen A, Stelwagen J** (1987). Economic losses due to paratuberculosis in dairy cattle. *Vet. Rec.* 121, 142-146.

- Benedictus G, Kalis C** (2003). Paratuberculosis: eradication, control and diagnostic methods. *Acta Vet. Scand.* 44, 231-41.
- Benn C, Netea M, Selin L, Aaby P** (2013). A small jab – a big effect: nonspecific immunomodulation by vaccines. *Trends Immunol.* 34, 431-439.
- Bentley R, Keenan J, Gearry R, Kennedy M, Barclay M, Roberts R** (2008). Incidence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in a population-based cohort of patients with Crohn's disease and control subjects. *Am. J. Gastroenterol.* 103, 1168-72.
- Beran V, Havelkova M, Kaustova J, Dvorska L, Pavlik I** (2006). Cell wall deficient forms of mycobacteria: A review. *Vet. Med. (Praha).* 51.
- Bermudez L, Petrofsky M, Sommer S, Barletta R** (2010). Peyer's patch-deficient mice demonstrate that *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* translocates across the mucosal barrier via both M cells and enterocytes but has inefficient dissemination. *Infect. Immun.* 78, 3570-7.
- Bezoz J, Álvarez J, de Juan L, Romero B, Rodríguez S, Fernández-De-Mera I, Hewinson R, Vordermeier M, Mateos A, Domínguez L, Aranaz A** (2011). Assessment of in vivo and in vitro tuberculosis diagnostic tests in *Mycobacterium caprae* naturally infected caprine flocks. *Prev. Vet. Med.* 100, 187-192.
- Bezoz J, Casal C, Puentes E, Díez-Guerrier A, Romero B, Aguiló N, de Juan L, Martín C, Domínguez L** (2015). Evaluation of the immunogenicity and diagnostic interference caused by <M. tuberculosis> SO2 vaccination against tuberculosis in goats. *Res. Vet. Sci.* 103, 73-79.
- Bharathy S, Gunaseelan L, Porteen K** (2017). Exploring the potential hazard of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* as a cause for Crohn's disease. *Vet. World* 10, 457-460.
- Billman-Jacobe H, Carrigan M, Cockram F, Corner L, Gill I, Hill J, Jessep T, Milner A, Wood P** (1992). A comparison of the interferon gamma assay with the absorbed ELISA for the diagnosis of Johne's disease in cattle. *Aust. Vet. J.* 69, 25-8.
- Boadella M, Carta T, Oleaga A, Pajares G, Munoz M, Górtazar C** (2010). Serosurvey for selected pathogens in Iberian roe deer. *BMC Vet. Res.* 6, 51.
- Boelaert F, Walravens K, Biront P, Vermeersch J, Berkvens D, Godfroid J** (2000). Prevalence of paratuberculosis (Johne's disease) in the Belgian cattle population. *Vet. Microbiol.* 77, 269-281.
- Bosshard C, Stephan R, Tasara T** (2006). Application of an F57 sequence-based real-time PCR assay for *Mycobacterium paratuberculosis* detection in bulk tank raw milk and slaughtered healthy dairy cows. *J. Food Prot.* 69, 1662-7.
- Botsaris G, Swift B, Slana I, Liapi M, Christodoulou M, Hatzitofi M, Christodoulou V, Rees C** (2016). Detection of viable *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in powdered infant formula by phage-PCR and confirmed by culture. *Int. J. Food Microbiol.* 216, 91-4.
- Brady C, O'Grady D, O'Meara F, Egan J, Bassett H** (2008). Relationships between clinical signs, pathological changes and tissue distribution of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in 21 cows from herds affected by Johne's disease. *Vet. Rec.* 162, 147-52.
- Brees D, Reimer S, Chevillie N, Florance A, Thoen C** (2000). Immunohistochemical detection of *Mycobacterium paratuberculosis* in formalin-fixed, paraffin-embedded bovine tissue sections. *J. Vet. Diagnostic Investig.* 12, 60-63.
- Brotherston J, Gilmour N, Samuel J** (1961A). Quantitative studies of *Mycobacterium johnei* in the tissues of sheep: I. Routes of infection and assay of viable *M. johnei*. *J. Comp. Pathol. Ther.* 71, 286-299.
- Brotherston J, Gilmour N, Samuel Jm** (1961B). Quantitative studies of *Mycobacterium johnei* in the tissues of sheep: II. protection afforded by dead vaccines. *J. Comp. Pathol. Ther.* 71, 300-310.
- Buddle B, Wards B, Aldwell F, Collins D, de Lisle G** (2002). Influence of sensitisation to environmental mycobacteria on subsequent vaccination against bovine tuberculosis. *Vaccine* 20, 1126-33.
- Buergelt C, Duncan J** (1978). Age and milk production data of cattle culled from a dairy herd with

- paratuberculosis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 173, 478-480.
- Buergelt C, Hall C, McEntee K, Duncan J** (1978). Pathological evaluation of paratuberculosis in naturally infected cattle. *Vet. Pathol.* 15, 196-207.
- Buergelt C, Williams J** (2004). Nested PCR on blood and milk for the detection of *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* DNA in clinical and subclinical bovine paratuberculosis. *Aust. Vet. J.* 82, 497-503.
- Bulaga L, Collins M** (1999). U.S. Voluntary Johne's Disease Herd Status Program for Cattle., en: 6th International Colloquium on Paratuberculosis. Madison, EEUU, pp. 39-47.
- Bull T, Gilbert S, Sridhar S, Linedale R, Dierkes N, Sidi-Boumedine K, Hermon-Taylor J** (2007). A novel multi-antigen virally vectored vaccine against *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *PLoS One* 2, e1229.
- Bull T, McMinn E, Sidi-Boumedine K, Skull A, Durkin D, Neild P, Rhodes G, Pickup R, Hermon-Taylor J** (2003). 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.* 41, 2915-23.
- Burisch J, Pedersen N, Cukovic-Cavka S, Turk N, Kaimakliotis I, Duricova D, Bortlik M, Shonová O, Vind I, Aynstrøm S, Thorsgaard N, Krabbe S, Andersen V, Dahlerup J, Kjeldsen J, Salupere R, Olsen J, Nielsen K, Manninen P, Collin P, Katsanos K, Tsianos E, Ladefoged K, Lakatos L, Ragnarsson G, Björnsson E, Bailey Y, O'Morain C, Schwartz D, Odes S, Giannotta M, Girardin G, Kiudelis G, Kupcinskas L, Turcan S, Barros L, Magro F, Lazar D, Goldis A, Nikulina I, Belousova E, Martinez-Ares D, Hernandez V, Almer S, Zhulina Y, Halfvarson J, Arebi N, Tsai H, Sebastian S, Lakatos P, Langholz E, Munkholm P, EpiCom-group** (2014). Environmental factors in a population-based inception cohort of inflammatory bowel disease patients in Europe—an ECCO-EpiCom study. *J. Crohns. Colitis* 8, 607-16.
- Burnside D, Rowley B** (1994). Evaluation of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for diagnosis of paratuberculosis in goats. *Am. J. Vet. Res.* 55, 465-6.
- Burrells C, Clarke C, Colston A, Kay J, Porter J, Little D, Sharp J** (1999). Interferon-gamma and interleukin-2 release by lymphocytes derived from the blood, mesenteric lymph nodes and intestines of normal sheep and those affected with paratuberculosis (Johne's disease). *Vet. Immunol. Immunopathol.* 68, 139-148.
- Burrells C, Clarke C, Colston A, Kay J, Porter J, Little D, Sharp J** (1998). A study of immunological responses of sheep clinically-affected with paratuberculosis (Johne's disease). The relationship of blood, mesenteric lymph node and intestinal lymphocyte responses to gross and microscopic pathology. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 66, 343-58.
- Camanes G, Joly A, Fourichon C, Ben Romdhane R, Ezanno P** (2018). Control measures to prevent the increase of paratuberculosis prevalence in dairy cattle herds: an individual-based modelling approach. *Vet. Res.* 49, 60.
- Capsel R, Thoen C, Reinhardt T, Lippolis J, Olsen R, Stabel J, Bannantine J** (2016). Composition and potency characterization of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* purified protein derivatives. *PLoS One* 11, e0154685.
- Carpenter T, Gardner I, Collins M, Whitlock R** (2004). Effects of prevalence and testing by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay and fecal culture on the risk of introduction of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* —infected cows into dairy herds. *J. Vet. Diagnostic Investig.* 16, 31-38.
- Carrigan M, Seaman J** (1990). The pathology of Johne's disease in sheep. *Aust. Vet. J.* 67, 47-50.
- Casal C, Alvarez J, Bezos J, Quick H, Díez-Guerrier A, Romero B, Saez J, Liandris E, Navarro A, Perez A, Domínguez L, Juan L** (2015). Effect of the inoculation site of bovine purified protein derivative (PPD) on the skin fold thickness increase in cattle from officially tuberculosis free and tuberculosis-infected herds. *Prev. Vet. Med.* 121, 86-92.
- Casal C, Bezos J, Díez-Guerrier A, Álvarez J, Romero B, de Juan L, Rodríguez-Campos S, Vordermeier M, Whelan A, Hewinson R, Mateos A, Domínguez L, Aranaz A** (2012). Evaluation of two cocktails

- containing ESAT-6, CFP-10 and Rv-3615c in the intradermal test and the interferon- γ assay for diagnosis of bovine tuberculosis. *Prev. Vet. Med.* 105, 149-54.
- Castellanos E, Aranaz A, de Juan L, Alvarez J, Rodríguez S, Romero B, Bezos J, Stevenson K, Mateos A, Domínguez L** (2009). Single nucleotide polymorphisms in the IS900 sequence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* are strain type specific. *J. Clin. Microbiol.* 47, 2260-4.
- Çetinkaya B, Erdogan H, Morgan K** (1998). Prevalence, incidence and geographical distribution of Johne's disease in cattle in England and the Welsh borders. *Vet. Rec.* 143.
- Chartier C, Mercier P, Pellet M, Vialard J** (2012). Effect of an inactivated paratuberculosis vaccine on the intradermal testing of goats for tuberculosis. *Vet. J.* 191, 360-363.
- Chevillat N, Hostetter J, Thomsen B, Simutis F, Vanloubbeek Y, Steadham E** (2001). Intracellular trafficking of *Mycobacterium avium* ss. *paratuberculosis* in macrophages. *Dtsch. Tierärztl. Wochenschr.* 108, 236-243.
- Chiodini R** (1996). Immunology: resistance to paratuberculosis. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 12, 313-43.
- Chiodini R** (1989). Crohn's disease and the mycobacterioses: a review and comparison of two disease entities. *Clin. Microbiol. Rev.* 2, 90-117.
- Chiodini R, Davis W** (1992). The cellular immunology of bovine paratuberculosis: the predominant response is mediated by cytotoxic gamma/delta T lymphocytes which prevent CD4+ activity. *Microb. Pathog.* 13, 447-463.
- Chiodini R, Hermon-Taylor J** (1993). The thermal resistance of *Mycobacterium paratuberculosis* in raw milk under conditions simulating pasteurization. *J. Vet. Diagnostic Investig.* 5.
- Chiodini R, Van Kruiningen H, Merkal R** (1984A). Ruminant paratuberculosis (Johne's disease): the current status and future prospects. *Cornell Vet.* 74, 218-262.
- Chiodini R, Van Kruiningen H, Merkal R, Thayer W, Coutu J** (1984B). Characteristics of an unclassified *Mycobacterium* species isolated from patients with Crohn's disease. *J. Clin. Microbiol.* 20, 966-71.
- Cho J** (2008). Inflammatory bowel disease: genetic and epidemiologic considerations. *World J. Gastroenterol.* 14, 338-47.
- Cho J, Tauer L, Schukken Y, Gómez M, Smith R, Lu Z, Grohn Y** (2012). Economic analysis of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* vaccines in dairy herds. *J. Dairy Sci.* 95, 1855-72.
- Clarke C** (1997). The pathology and pathogenesis of paratuberculosis in ruminants and other species. *J. Comp. Pathol.* 116, 217-261.
- Clarke C, Little D** (1996). The pathology of ovine paratuberculosis: gross and histological changes in the intestine and other tissues. *J. Comp. Pathol.* 114, 419-437.
- Click R** (2011). A 60-day probiotic protocol with *Dietzia* subsp. C79793-74 prevents development of Johne's disease parameters after in utero and/or neonatal MAP infection. *Virulence* 2, 337-47.
- Cline J, Schlafer D, Callihan D, Vanderwall D, Drazek F** (1991). Abortion and granulomatous colitis due to *Mycobacterium avium* Complex infection in a horse. *Vet. Pathol.* 28.
- Coad M, Clifford D, Vordermeier H, Whelan A** (2013). The consequences of vaccination with the Johne's disease vaccine, Gudair, on diagnosis of bovine tuberculosis. *Vet. Rec.* 172, 266 LP-266.
- Cocito C, Gilot P, Coene M, de Kesel M, Poupard P, Vannuffel P** (1994). Paratuberculosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 7, 328-45.
- Cockle P, Gordon S, Hewinson R, Vordermeier H** (2006). Field evaluation of a novel differential diagnostic reagent for detection of *Mycobacterium bovis* in cattle. *Clin. Vaccine Immunol.* 13, 1119-24.
- Coelho A, Pinto M, Silva S, Coelho A, Rodrigues J, Juste R** (2007). Seroprevalence of ovine paratuberculosis infection in the Northeast of Portugal. *Small Rumin. Res.* 71, 298-303.

- Coetsier C, Havaux X, Mattelard F, Sadatte S, Cormont F, Buergelt K, Limbourg B, Latinne D, Bazin H, Deneff J, Cocito C** (1998). Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in infected tissues by new species-specific immunohistological procedures. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 5, 446-51.
- Coffman R, Sher A, Seder R** (2010). Vaccine adjuvants: putting innate immunity to work. *Immunity* 33, 492-503.
- Colgrove G, Thoen C, Blackburn B, Murphy C** (1989). Paratuberculosis in cattle: a comparison of three serologic tests with results of fecal culture. *Vet. Microbiol.* 19, 183-7.
- Collins D, Gabric D, de Lisle G** (1990). Identification of two groups of *Mycobacterium paratuberculosis* strains by restriction endonuclease analysis and DNA hybridization. *J. Clin. Microbiol.* 28, 1591-1596.
- Collins D, Stephens D, de Lisle G** (1993). Comparison of polymerase chain reaction tests and faecal culture for detecting *Mycobacterium paratuberculosis* in bovine faeces. *Vet. Microbiol.* 36, 289-299.
- Collins F** (1974). Vaccines and cell-mediated immunity. *Bacteriol. Rev.* 38, 371-402.
- Collins M** (2011). Diagnosis of paratuberculosis. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 27, 581-591.
- Collins M, Nordlund K** (1992). Milk production levels in cows ELISA positive for serum antibodies to *M. paratuberculosis*, en: Chiodini, R., Kreeger, J. (Eds.), 3rd International Colloquium on Paratuberculosis. Providence. EE.UU., pp. 402-409.
- Consejería de Agricultura y Ganadería de la Junta de Castilla y León** (S. F.). Orden de 29 de abril de 2002. Erradicación de la Tuberculosis Caprina. B.O.C. y L.
- Cook K, Flis S, Ballard C** (2013). Sensitivity of *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis*, *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* serotype Typhimurium to low pH, high organic acids and ensiling. *J. Appl. Microbiol.* 115, 334-345.
- Cooper A, Magram J, Ferrante J, Orme I** (1997). Interleukin 12 (IL-12) is crucial to the development of protective immunity in mice intravenously infected with *mycobacterium tuberculosis*. *J. Exp. Med.* 186, 39-45.
- Cooper A, Roberts A, Rhoades E, Callahan J, Getzy D, Orme I** (1995). The role of interleukin-12 in acquired immunity to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Immunology* 84, 423-32.
- Corpa J** (1999). Aspectos inmunopatológicos de la paratuberculosis de los pequeños rumiantes. Respuesta inmune asociada a la vacunación. Universidad de León. Facultad de Veterinaria.
- Corpa J, Garrido J, García-Marín J, Pérez V** (2000A). Classification of lesions observed in natural cases of paratuberculosis in goats. *J. Comp. Pathol.* 122, 255-265.
- Corpa J, Juste R, García Marín J, Reyes L, González J, Pérez V** (2001). Distribution of lymphocyte subsets in the small intestine lymphoid tissue of 1-month-old lambs. *Anat. Histol. Embriol.* 30, 121-7.
- Corpa J, Pérez V, García-Marín J** (2000B). Differences in the immune responses in lambs and kids vaccinated against paratuberculosis, according to the age of vaccination. *Vet. Microbiol.* 77, 475-85.
- Corpa J, Pérez V, Sánchez M, García-Marín J** (2000C). Control of paratuberculosis (Johne's disease) in goats by vaccination of adult animals. *Vet. Rec.* 146, 195-196.
- Corr S, Gahan C, Hill C** (2008). M-cells: origin, morphology and role in mucosal immunity and microbial pathogenesis. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 52, 2-12.
- Cousins D, Evans R, Francis B** (1995). Use of BACTEC radiometric culture method and polymerase chain reaction for the rapid screening of faeces and tissues for *Mycobacterium paratuberculosis*. *Aust. Vet. J.* 72, 458-62.
- Cousins D, Whittington R, Marsh I, Masters A, Evans R, Kluver P** (1999). *Mycobacteria* distinct from *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolated from the faeces of ruminants possess IS900-like sequences detectable IS900 polymerase chain reaction: implications for diagnosis. *Mol. Cell. Probes* 13, 431-42.

- Coussens P** (2004). Model for immune responses to *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in cattle. *Infect. Immun.* 72, 3089-3096.
- Coussens P** (2001). *Mycobacterium paratuberculosis* and the bovine immune system. *Anim. Heal. Res. Rev.* 2, 141-161.
- Crandall P, Ricke S, O'Bryan C, Parrish N** (2012). In vitro effects of citrus oils against *Mycobacterium tuberculosis* and non-tuberculous Mycobacteria of clinical importance. *J. Environ. Sci. Heal. Part B* 47, 736-741.
- Crohn B, Ginzburg L, Oppenheimer G** (1932). Regional ileitis, a pathological and clinical entity. *Am. J. Med.* 13, 583-90.
- Crowther R, Polydorou K, Nitti S, Phyrilla A** (1976). Johne's disease in sheep in Cyprus. *Vet. Rec.* 98, 463.
- Curtis M, Way S** (2009). Interleukin-17 in host defence against bacterial, mycobacterial and fungal pathogens. *Immunology* 126, 177-85.
- Dalziel T** (1913). Chronic interstitial enteritis. *Br. Med. J.* 1068-1070.
- Daniel R, Evans H, Rolfe S, de la Rua-Domenech R, Crawshaw T, Higgins R, Schock A, Clifton-Hadley R** (2009). Outbreak of tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis* in golden Guernsey goats in Great Britain. *Vet. Rec.* 165, 335-42.
- Daniels M, Ball N, Hutchings M, Greig A** (2001). The grazing response of cattle to pasture contaminated with rabbit faeces and the implications for the transmission of paratuberculosis. *Vet. J.* 161, 306-313.
- Das S, Sinha R, Chauhan H** (1992). Chemotherapy of paratuberculosis in goats: streptomycin, rifampicin and levamisole versus streptomycin, rifampicin and dapsone, *Indian Journal of Animal Sciences*. Indian Council of Agricultural Research.
- de Almeida D, Colvin C, Coussens P** (2008). Antigen-specific regulatory T cells in bovine paratuberculosis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 125, 234-45.
- de Juan L** (2005). Paratuberculosis caprina: aportaciones a su diagnóstico, epidemiología molecular y control. Universidad Complutense de Madrid.
- de Juan L, Alvarez J, Aranaz A, Rodriguez A, Romero B, Bezos J, Mateos A, Domínguez L** (2006A). Molecular epidemiology of Types I/III strains of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* isolated from goats and cattle. *Vet. Microbiol.* 115.
- de Juan L, Alvarez J, Romero B, Bezos J, Castellanos E, Aranaz A, Mateos A, Domínguez L** (2006B). Comparison of four different culture media for isolation and growth of Type II and Type I/III *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* strains isolated from cattle and goats. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 5927-5932.
- de Kruijf M, Govender R, Yearsley D, Coffey A, O'Mahony J** (2017). A comparative study evaluating the efficacy of IS_MAP04 with IS 900 and IS_MAP02 as a new diagnostic target for the detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* from bovine faeces. *Vet. Microbiol.* 204, 104-109.
- de Lisle G, Duncan J** (1981). Bovine paratuberculosis III. An evaluation of a whole blood lymphocyte transformation test. *Can. J. Comp. Med. Rev. Can. Med. Comp.* 45, 304-9.
- de Lisle G, Seguin P, Samagh B, Corner A, Duncan J** (1980). Bovine paratuberculosis I. A herd study using complement fixation and intradermal tests. *Can. J. Comp. Med. Rev. Can. Med. Comp.* 44, 177-82.
- de Silva K, Begg D, Carter N, Taylor D, Di Fiore L, Whittington R** (2010). The early lymphocyte proliferation response in sheep exposed to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* compared to infection status. *Immunobiology* 215, 12-25.
- de Silva K, Plain K, Begg D, Purdie A, Whittington R** (2015). CD4+ T-cells, $\gamma\delta$ T-cells and B-cells are associated with lack of vaccine protection in *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection. *Vaccine* 33, 149-155.
- de Silva K, Plain K, Purdie A, Begg D, Whittington R** (2018). Defining resilience to mycobacterial disease:

- Characteristics of survivors of ovine paratuberculosis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 195, 56-64.
- Delgado F, Etchehoury D, Gioffré A, Paolicchi F, Blanco Viera F, Mundo S, Romano M** (2009). Comparison between two in situ methods for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* detection in tissue samples from infected cattle. *Vet. Microbiol.* 134, 383-7.
- Delgado L** (2010). Estudio de la patogenia de la paratuberculosis: relacion entre la respuesta inmune y el desarrollo de lesiones en ovinos juvenes y adultos León. Tesis Doctoral. Universidad de León. Facultad de Veterinaria.
- Delgado L, García-Marín J, Muñoz M, Benavides J, Juste R, García-Pariente C, Fuertes M, González J, Ferreras M, Pérez V** (2013). Pathological findings in young and adult sheep following experimental infection with 2 different doses of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Vet. Pathol.* 50, 857-66.
- Delgado L, Juste R, Muñoz M, Morales S, Benavides J, Ferreras M, García-Marín J, Pérez V** (2012). Differences in the peripheral immune response between lambs and adult ewes experimentally infected with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 145, 23-31.
- Dennis M, Reddacliff L, Whittington R** (2011). Longitudinal study of clinicopathological features of johnes' disease in sheep naturally exposed to *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Vet. Pathol.* 48, 565-575.
- Dhand N, Eppleston J, Whittington R, Windsor P** (2016). Changes in prevalence of ovine paratuberculosis following vaccination with Gudair®: Results of a longitudinal study conducted over a decade. *Vaccine* 34, 5107-5113.
- Diéguez F, Arnaiz I, Sanjuán M, Vilar M, López M, Yus E** (2007). Prevalence of serum antibodies to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in cattle in Galicia (northwest Spain), Preventive Veterinary Medicine.
- Dierckins M, Sherman D, Gendron-Fitzpatrick A** (1990). Probable paratuberculosis in a Sicilian ass. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 196.
- Dimareli-Malli Z, Mazaraki K, Stevenson K, Tsakos P, Zdragas A, Giantzi V, Petridou E, Heron I, Vafeas G** (2013A). Culture phenotypes and molecular characterization of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolates from small ruminants. *Res. Vet. Sci.* 95, 49-53.
- Dimareli-Malli Z, Papadopoulos G, Betsas P** (2013B). Evaluation of a live paratuberculosis vaccine in endemically infected flocks of sheep and goats in Greece. *J. Immune Based Ther. Vaccines Antimicrob.* 02, 49-58.
- Dimareli-Malli Z, Sarris K, Xenos G, Papadopoulos G** (1992). Comparison of the ELISA, AGID and C.F. tests for diagnosis of caprine and ovine paratuberculosis, en: Chiodini, R., Kreeger, J. (Eds.), *hird International Colloquium on Paratuberculosis*. Providence. EE.UU., pp. 151-155.
- Dinarelo C** (1996). Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood* 87, 2095-147.
- Djønne B, Jensen M, Grant I, Holstad G** (2003). Detection by immunomagnetic PCR of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk from dairy goats in Norway. *Vet. Microbiol.* 92, 135-43.
- Doherty M, Monaghan M, Bassett H, Quinn P** (1995). Effect of a recent injection of purified protein derivative on diagnostic tests for tuberculosis in cattle infected with *Mycobacterium bovis*. *Res. Vet. Sci.* 58, 217-21.
- Donaghy J, Johnston J, Rowe M** (2011). Detection of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* in cheese, milk powder and milk using IS900 and f57-based qPCR assays. *J. Appl. Microbiol.* 110, 479-489.
- Donaghy J, Totton N, Rowe M** (2004). Persistence of *Mycobacterium paratuberculosis* during manufacture and ripening of cheddar cheese. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 4899-4905.
- Donat K, Eulenberger K, Kampfer P** (2005). Blutserologische Untersuchungen zur Verbreitung von *Mycobacterium avium* spp. *paratuberculosis* in sachsichen Rinderbeständen. *Tieraerzliche Umschau.* 60, 497-501.

- Downs S, Clifton-Hadley R, Upton P, Milne I, Ely E, Gopal R, Goodchild A, Sayers A** (2013). Tuberculin manufacturing source and breakdown incidence rate of bovine tuberculosis in British cattle, 2005–2009. *Vet. Rec.* 172, 98-98.
- Doyle T** (1960). Vaccination against Johne's disease. *Br. Vet. J.* 116, 294-301.
- Dressler J, Smith R, Tauer L, Schukken Y, Grohn Y** (2010). Economic analysis of the cross-reactivity of Johne's disease vaccination with tuberculosis in dairy cattle. *Am. J. Agric. Econ.* 92, 1446-1455.
- Dudemaine P, Fecteau G, Lessard M, Labrecque O, Roy J, Bissonnette N** (2014). Increased blood-circulating interferon- γ , interleukin-17, and osteopontin levels in bovine paratuberculosis. *J. Dairy Sci.* 97, 3382-93.
- Dukes T, Glover G, Brooks B, Duncan J, Swendrowski M** (1992). Paratuberculosis in Saiga antelope (*Saiga tatarica*) and experimental transmission to domestic sheep. *J. Wildl. Dis.* 28, 161-170.
- Dundee L, Grant I, Ball H, Rowe M** (2001). Comparative evaluation of four decontamination protocols for the isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from milk. *Lett. Appl. Microbiol.* 33, 173-7.
- Durrant W, Dong X** (2004). Systemic acquired resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* 42, 185-209.
- Eisenberg S, Nielen M, Hoeboer J, Rutten V, Heederik D, Koets A** (2012). Environmental contamination with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* within and around a dairy barn under experimental conditions. *J. Dairy Sci.* 95, 6477-6482.
- Eisenberg T, Wolter W, Lenz M, Schlez K, Zschock M** (2013). Boot swabs to collect environmental samples from common locations in dairy herds for *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP) detection. *J. Dairy Res.* 80, 485-489.
- Elguezal N, Chamorro S, Molina E, Garrido J, Izeta A, Rodrigo L, Juste R** (2012). Lactase persistence, NOD2 status and *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection associations to Inflammatory Bowel Disease. *Gut Pathog.* 4, 6.
- Ellingson J, Stabel J, Bishai W, Frothingham R, Miller J** (2000). Evaluation of the accuracy and reproducibility of a practical PCR panel assay for rapid detection and differentiation of *Mycobacterium avium* subspecies. *Mol. Cell. Probes* 14, 153-161.
- Elmaggar M, Abdellrazeq G, Sester M, Khalil S, Singh M, Torky H, Davis W** (2015). Development of an improved ESAT-6 and CFP-10 peptide-based cytokine flow cytometric assay for bovine tuberculosis. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 42, 1-7.
- Encinas M, Marfil M, Garbaccio S, Barandiaran S, Huertas P, Morsella C, Macías A, Magnano G, Zapata L, Bigi F, Cataldi A, Paolicchi F, Zumárraga M, Eirin M** (2018). *Mycobacterium bovis* ESAT-6, CFP-10 and EspC antigens show high conservation among field isolates. *Tuberculosis* 111, 143-146.
- Englund S, Ballagi-Pordány A, Bölske G, Johansson K** (1999). Single PCR and nested PCR with a mimic molecule for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 33, 163-71.
- Eppleston J, Reddacliff L, Windsor P, Links I, Whittington R** (2005). Preliminary observations on the prevalence of sheep shedding *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* after 3 years of a vaccination program for ovine Johne's disease. *Aust. Vet. J.* 83, 637-638.
- Eppleston J, Whittington R** (2001). Isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from the semen of rams with clinical Johne's disease. *Aust. Vet. J.* 79, 776-777.
- Espescht I, Souza M, Lima M, Moreira M** (2017). First molecular typing of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* identified in animal and human drinking water from dairy goat farms in Brazil. *Brazilian J. Microbiol.*
- Faisal S, Chen J-W, Yan F, Chen T-T, Useh N, Yan W, Guo S, Wang S-J, Glaser A, McDonough S, Singh B, Davis W, Akey B, Chang Y-F** (2013). Evaluation of a *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* leuD mutant as a vaccine candidate against challenge in a caprine model. *Clin.*

- Vaccine Immunol. 20, 572-81.
- Fechner K, Mätz-Rensing K, Lampe K, Kaup F-J, Czerny C-P, Schäfer J** (2017). Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in non-human primates. J. Med. Primatol. 46, 211-217.
- Fecteau M-E, Whitlock R** (2011). Treatment and chemoprophylaxis for paratuberculosis. Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract. 27, 547-557.
- Feizabadi M, Robertson I, Hope A, Cousins D, Hampson D** (1997). Differentiation of Australian isolates of *Mycobacterium paratuberculosis* using pulsed-field gel electrophoresis. Aust. Vet. J. 75, 887-889.
- Fernández-Silva J, Correa-Valencia N, Ramírez N** (2014). Systematic review of the prevalence of paratuberculosis in cattle, sheep, and goats in Latin America and the Caribbean. Trop. Anim. Health Prod. 46, 1321-1340.
- Fernández M** (2017). Influencia del agente etiológico y la respuesta inmunitaria local sobre la patogenia de la paratuberculosis de los rumiantes. Universidad de León. Facultad de Veterinaria.
- Fernández M, Benavides J, Castaño P, Elguezabal N, Fuertes M, Muñoz M, Royo M, Ferreras M, Pérez V** (2016). Macrophage Subsets Within Granulomatous Intestinal Lesions in Bovine Paratuberculosis. Vet. Pathol. 54, 82-93.
- Fernández M, Benavides J, Sevilla I, Fuertes M, Castaño P, Delgado L, García-Marín J, Garrido J, Ferreras M, Pérez V** (2014). Experimental infection of lambs with C and S-type strains of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*: Immunological and pathological findings. Vet. Res. 45, 1-15.
- Fernández M, Delgado L, Sevilla I, Fuertes M, Castaño P, Royo M, Ferreras M, Benavides J, Pérez V** (2015). Virulence attenuation of a *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* S-type strain prepared from intestinal mucosa after bacterial culture. Evaluation in an experimental ovine model. Res. Vet. Sci. 99, 180-187.
- Fernández M, Fuertes M, Elguezabal N, Castaño P, Royo M, Ferreras M, Benavides J, Pérez V** (2017). Immunohistochemical expression of interferon- γ in different types of granulomatous lesions associated with bovine paratuberculosis. Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis. 51, 1-8.
- Fernández M, Grau A, Vallejo R, Arteché N, Royo M, Gutiérrez-Expósito D, Ferreras M, Benavides J, Mínguez O, Pérez V** (2018). Study on the interference of paratuberculosis vaccination on the tuberculosis eradication program in goats in Castilla y León, en: 14th International Colloquium on Paratuberculosis. Riviera Maya, México, p. 64.
- Ferwerda G, Kullberg B, de Jong D, Girardin S, Langenberg D, van Crevel R, Ottenhoff T, Van der Meer J, Netea M** (2007). *Mycobacterium paratuberculosis* is recognized by Toll-like receptors and NOD2. J. Leukoc. Biol. 82, 1011-1018.
- Fiallo P, Williams D, Chan G, Gillis T** (1992). Effects of fixation on polymerase chain reaction detection of *Mycobacterium leprae*. J. Clin. Microbiol. 30, 3095-8.
- Fitzgerald L, Abendaño N, Juste R, Alonso-Hearn M** (2014). Three-dimensional in vitro models of granuloma to study bacteria-host interactions, drug-susceptibility, and resuscitation of dormant mycobacteria. Biomed Res. Int. 2014, 1-8.
- Flores-Villalva S, Suárez-Güemes F, Espitia C, Whelan A, Vordermeier M, Gutiérrez-Pabello J** (2012). Specificity of the tuberculin skin test is modified by use of a protein cocktail containing ESAT-6 and CFP-10 in cattle naturally infected with *Mycobacterium bovis*. Clin. Vaccine Immunol. 19, 797-803.
- Florou M, Leontides L, Kostoulas P, Billinis C, Sofia M** (2009). Strain-specific sensitivity estimates of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* culture in Greek sheep and goats. Zoonoses Public Health 56, 49-52.
- Foley-Thomas E, Whipple D, Bermudez L, Barletta R** (1995). Phage infection, transfection and transformation of *Mycobacterium avium* complex and *Mycobacterium paratuberculosis*. Microbiology 141 (Pt 5, 1173-81.
- Francis J, Madinaveitia J** (1949). Isolation from acid-fast bacteria of a growth-factor for *Mycobacterium*

- johni and of a precursor of phthiocol. *Nature* 163, 365.
- Freeman H** (2014). Natural history and long-term clinical course of Crohn's disease. *World J. Gastroenterol.* 20, 31-6.
- Frehel C, Canonne-Hergaux F, Gros P, De Chastellier C** (2002). Effect of Nramp1 on bacterial replication and on maturation of *Mycobacterium avium*-containing phagosomes in bone marrow-derived mouse macrophages. *Cell. Microbiol.* 4, 541-556.
- Fridriksdottir V, Gunnarsson E, Sigurdarson S, Gudmundsdottir K** (2000). Paratuberculosis in Iceland: epidemiology and control measures, past and present. *Vet. Microbiol.* 77, 263-7.
- Gajendran M, Loganathan P, Catinella A, Hashash J** (2017). A comprehensive review and update on Crohn's disease. *Disease-a-Month.*
- Galiero A, Fratini F, Mataragka A, Turchi B, Nuvoloni R, Ikonomopoulos J, Cerri D** (2016). Detection of *mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in cheeses from small ruminants in Tuscany. *Int. J. Food Microbiol.* 217, 195-199.
- Gao A, Odumeru J, Raymond M, Hendrick S, Duffield T, Mutharia L** (2009). Comparison of milk culture, direct and nested polymerase chain reaction (PCR) with fecal culture based on samples from dairy herds infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Can. J. Vet. Res.* 73, 58-64.
- García-Ispuerto I, López-Gatius F** (2016). Early foetal loss correlates positively with seroconversion against *Mycobacterium avium paratuberculosis* in high-producing dairy cows. *Reprod. Domest. Anim.* 51, 227-231.
- García-Jiménez W, Fernández-Llario P, Gómez L, Benítez-Medina J, García-Sánchez A, Martínez R, Risco D, Gough J, Ortiz-Peláez A, Smith N, de Mendoza J, Salguero F, Mendoza Jh, Salguero F** (2012). Histological and immunohistochemical characterisation of *Mycobacterium bovis* induced granulomas in naturally infected Fallow deer (*Dama dama*). *Vet. Immunol. Immunopathol.* 149, 66-75.
- García-Marín J, Pérez V, Badiola J** (1992). Prevalence and type of paratuberculous lesions in sheep and their relation with the diagnosis by AGID test, en: Chiodini, R.J.; Kreeger, J.M. (Ed.), 3rd International Colloquium on Paratuberculosis. Providence. EE.UU., pp. 172-180.
- García-Marín J, Pérez V, González J** (2000). La interacción bovino-bacteria y los mecanismos de enfermedad. *BOVIS, Aula Vet.* 93, 29-38.
- García-Marín J, Tellechea J, Corpa J, Gutiérrez M, Pérez V** (1999A). Relation between ovine paratuberculosis lesions and cellular and humoral immune responses in diagnostic tests, en: 6th International Colloquium on Paratuberculosis. Manning, E.J.B.; Collins, M.T., Madison, EEUU, pp. 593-598.
- García-Marín J, Tellechea J, Gutiérrez M, Corpa J, Pérez V** (1999B). Evaluation of two vaccines (killed and attenuated) against small ruminant paratuberculosis, en: Manning, EJB; Collins, M. (Ed.), 6th International Colloquium on Paratuberculosis. Melbourne, Australia, p. 40.
- García-Marín J, Tellechea J, Gutiérrez M, Pérez V, Juste R** (1997). Paratuberculosis vaccination in sheep modifies and limits the development of lesions, en: Chiodini, R.J., Hines, M.E., Collins, M.T. (Eds.). (Ed.), 5th International Colloquium on Paratuberculosis. Rehoboth, USA, p. 223.
- García-Pariente C, González J, Ferreras M, Fuertes M, Benavides J, Reyes L, Moreno O, García-Marín J, Pérez V** (2003). Paratuberculosis vaccination of adult animals in two flocks of dairy sheep., en: 7th International Colloquium on Paratuberculosis. Bilbao, Spain.
- García-Pariente C, Pérez V, Geijo M, Moreno O, Muñoz M, Fuertes M, Puentes E, Doce J, Ferreras M, García-Marín J** (2006). The efficacy of a killed vaccine against paratuberculosis (SILIRUM®) in cattle. A field study, en: Manning, E., Nielsen, S., Paratuberculosis, I.A. for (Eds.), 8th International Colloquium on Paratuberculosis. Copenhagen, Denmark, p. 52.
- García A, Shalloo L** (2015). Invited review: The economic impact and control of paratuberculosis in cattle. *J. Dairy Sci.* 98, 5019-5039.
- Garly M-L, Martins C, Balé C, Baldé M, Hedegaard K, Gustafson P, Lisse I, Whittle H, Aaby P** (2003).

- BCG scar and positive tuberculin reaction associated with reduced child mortality in West Africa. A non-specific beneficial effect of BCG? *Vaccine* 21, 2782-90.
- Garrido J, Aduriz G, Juste R, Geijo M** (2000A). Los métodos de diagnóstico de la paratuberculosis en el ganado vacuno. *BOVIS*, *Aula Vet.* 93, 49-61.
- Garrido J, Cortabarria N, Oguiza J, Aduriz G, Juste R** (2000B). Use of a PCR method on fecal samples for diagnosis of sheep paratuberculosis, *Veterinary Microbiology*.
- Garrido J, Molina E, Geijo M, Plazaola J, Sevilla I, Juste R** (2007). Preliminary evaluation of a field trial on the use of vaccination in dairy cattle farms with paratuberculosis, en: Nielsen, S. (Ed.), 9th International Colloquium on Paratuberculosis. Nielsen, SS, Tsukuba, Japan, pp. 120-121.
- Garrido J, Molina E, Plazaola J, Sevilla I, Geijo M, Vázquez P, Rodríguez A, Alonso M, Juste R** (2012). Effect of vaccination against paratuberculosis in the diagnosis of bovine tuberculosis with comparative cervical skin test, en: 11th International Colloquium on Paratuberculosis 2012. Sydney, Australia, pp. 166-167.
- Garrido J, Vazquez P, Molina E, Plazaola J, Sevilla I, Geijo M, Alonso-Hearn M, Juste R** (2013). Paratuberculosis vaccination causes only limited cross-reactivity in the skin test for diagnosis of bovine tuberculosis. *PLoS One* 8, 2-8.
- Geijo M** (2007). Estudio de variables inmunológicas y bacteriológicas en relación con la inmunización frente a paratuberculosis en los rumiantes. Tesis Doctoral. Universidad de León. Facultad de Veterinaria.
- Ghione S, Sarter H, Fumery M, Armengol-Debeir L, Savoye G, Ley D, Spycykerelle C, Pariente B, Peyrin-Biroulet L, Turck D, Gower-Rousseau C** (2017). Dramatic Increase in Incidence of Ulcerative Colitis and Crohn's Disease (1988–2011): A Population-Based Study of French Adolescents. *Am. J. Gastroenterol.*
- Ghosh P, Shippy D, Talaat A** (2015). Superior protection elicited by live-attenuated vaccines in the murine model of paratuberculosis. *Vaccine* 33, 7262-70.
- Gillan S, Hughes A, O'Brien R, Griffin J** (2010A). Ovine immune parameters following immunisation against *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* using a lipid-based live-cell vaccine. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 137, 109-119.
- Gillan S, O'Brien R, Hughes A, Griffin J** (2010B). Identification of immune parameters to differentiate disease states among sheep infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Clin. Vaccine Immunol.* 17, 108-17.
- Gilmour N, Angus K** (1973). Effect of revaccination on *Mycobacterium johnei* infection in sheep. *J. Comp. Pathol.* 83, 437-45.
- Gilmour N, Brotherston J** (1962). Quantitative studies of *mycobacterium johnei* in the tissues of sheep: IV. The distribution of *M. johnei* shortly after oral dosing. *J. Comp. Pathol. Ther.* 72, 165-169.
- Glawischnig W, Awad-Masalmeh M, Khaschabi D, Schonbauer M** (2004). Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from the testicles of a clinically infected breeding animal. *Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr.* 117, 136-139.
- González J, Geijo M, García-Pariente C, Verna A, Corpa J, Reyes L, Ferreras M, Juste R, García-Marín J, Pérez V** (2005). Histopathological classification of lesions associated with natural paratuberculosis infection in cattle. *J. Comp. Pathol.* 133, 184-196.
- Good M, Bakker D, Duignan A, Collins D** (2018). The history of <in vivo> tuberculin testing in bovines: tuberculosis, a “One Health” issue. *Front. Vet. Sci.* 5, 59.
- Good M, Clegg T, Sheridan H, Yearsely D, O'Brien T, Egan J, Mullowney P** (2009). Prevalence and distribution of paratuberculosis (Johne's disease) in cattle herds in Ireland. *Ir. Vet. J.* 62, 597-606.
- Good M, Duignan A** (2011). Perspectives on the history of bovine TB and the role of tuberculin in bovine TB eradication. *Vet. Med. Int.* 2011, 410470.
- Goodchild A, Downs S, Upton P, Wood J, de la Rua-Domenech R** (2015). Specificity of the comparative

- skin test for bovine tuberculosis in Great Britain. *Vet. Rec.* 177, 258-258.
- Goodger W, Collins M, Nordlund K, Eisele C, Pelletier J, Thomas C, Sockett D** (1996). Epidemiologic study of on-farm management practices associated with prevalence of *Mycobacterium paratuberculosis* infections in dairy cattle. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 208, 1877-81.
- Gormley E, Doyle M, Fitzsimons T, McGill K, Collins J** (2006). Diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle by use of the gamma-interferon (Bovigam®) assay. *Vet. Microbiol.* 112, 171-179.
- Gormley E, Doyle M, McGill K, Costello E, Good M, Collins J** (2004). The effect of the tuberculin test and the consequences of a delay in blood culture on the sensitivity of a gamma-interferon assay for the detection of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 102, 413-20.
- Grange J, Yates M, Boughton E** (1990). The avian tubercle bacillus and its relatives. *J. Appl. Bacteriol.* 68, 411-431.
- Grant I** (2005). Zoonotic potential of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*: the current position. *J. Appl. Microbiol.* 98, 1282-1293.
- Grant I, Kirk R, Hitchings E, Rowe M** (2003). Comparative evaluation of the MGIT and BACTEC culture systems for the recovery of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from milk. *J. Appl. Microbiol.* 95, 196-201.
- Grant I, O’Riordan L, Ball H, Rowe M, O’Riordan L, Ball H, Rowe M** (2001). Incidence of *Mycobacterium paratuberculosis* in raw sheep and goats’ milk in England, Wales and Northern Ireland. *Vet. Microbiol.* 79, 123-131.
- Green E, Tizard M, Moss M, Thompson J, Winterbourne D, McFadden J, Hermon-Taylor J** (1989). Sequence and characteristics of IS900, an insertion element identified in a human Crohn’s disease isolate of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Nucleic Acids Res.* 17, 9063-73.
- Greenstein R, Su L, Haroutunian V, Shahidi A, Brown S** (2007). On the action of methotrexate and 6-mercaptopurine on *M. avium* subspecies *paratuberculosis*. *PLoS One* 2, e161.
- Greenstein R, Su L, Juste R, Brown S** (2008). On the action of cyclosporine A, rapamycin and tacrolimus on *M. avium* including subspecies *paratuberculosis*. *PLoS One* 3, e2496.
- Greer C, Peterson S, Kiviat N, Manos M** (1991). PCR amplification from paraffin-embedded tissues. Effects of fixative and fixation time. *Am. J. Clin. Pathol.* 95, 117-24.
- Greig A, Stevenson K, Pérez V, Pirie A, Grant J, Sharp J** (1997). Paratuberculosis in wild rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). *Vet. Rec.* 140, 141-143.
- Griffin J, Hughes A, Liggett S, Farquhar P, Mackintosh C, Bakker D** (2009). Efficacy of novel lipid-formulated whole bacterial cell vaccines against *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in sheep. *Vaccine* 27, 911-8.
- Groenendaal H, Nielen M, Jalvingh A, Horst S, Galligan D, Hesselink J** (2002). A simulation of Johne’s disease control. *Prev. Vet. Med.* 54, 225-45.
- Groenendaal H, Zagmutt F, Patton E, Wells S** (2015). Cost-benefit analysis of vaccination against *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* in dairy cattle, given its cross-reactivity with tuberculosis tests. *J. Dairy Sci.* 98, 6070-6084.
- Gröschel M, Prabowo S, Cardona P-J, Stanford J, Werf Ts** (2014). Therapeutic vaccines for tuberculosis—A systematic review. *Vaccine* 32, 3162-3168.
- Gupta R, Siber G** (1995). Adjuvants for human vaccines--current status, problems and future prospects. *Vaccine* 13, 1263-76.
- Gutiérrez M, Tellechea J, García-Marín J** (1998). Evaluation of cellular and serological diagnostic tests for the detection of *Mycobacterium bovis*-infected goats. *Vet. Microbiol.* 62, 281-90.
- Gwozdz J, Reichel M, Murray A, Manktelow W, West D, Thompson K** (1997). Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in ovine tissues and blood by the polymerase chain

- reaction. *Vet. Microbiol.* 57, 233-44.
- Gwozdz J, Thompson K, Manktelow B, Murray A, West D (2000A).** Vaccination against paratuberculosis of lambs already infected experimentally with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Aust. Vet. J.* 78, 560-566.
- Gwozdz J, Thompson K, Murray A, Reichel M, Manktelow B, West D (2000B).** Comparison of three serological tests and an interferon-gamma assay for the diagnosis of paratuberculosis in experimentally infected sheep. *Aust. Vet. J.* 78, 779-83.
- Gwozdz J, Thompson K, Murray A, West D, Manktelow B (2000C).** Use of the polymerase chain reaction assay for the detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in blood and liver biopsies from experimentally infected sheep. *Aust. Vet. J.* 78, 622-4.
- Harboe M, Oettinger T, Wiker H, Rosenkrands I, Andersen P (1996).** Evidence for occurrence of the ESAT-6 protein in *Mycobacterium tuberculosis* and virulent *Mycobacterium bovis* and for its absence in *Mycobacterium bovis* BCG. *Infect. Immun.* 64, 16-22.
- Hardin L, Thorne J (1996).** Comparison of milk with serum ELISA for the detection of paratuberculosis in dairy cows. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 209, 120-2.
- Harding H (1957).** Experimental infection with *Mycobacterium johnei*. II. The histopathology of infection in experimental goats. *J. Comp. Pathol.* 67, 37-52.
- Harris N, Barletta R (2016).** *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Veterinary Medicine. *Clin. Microbiol. Rev.* 91, 9-15.
- Harris N, Feng Z, Liu X, Cirillo S, Cirillo J, Barletta R (1999).** Development of a transposon mutagenesis system for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 175, 21-6.
- Hasvold H, Valheim M, Berntsen G, Storset A (2002).** In vitro responses to purified protein derivat of caprine T lymphocytes following vaccination with live strains of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 90, 79-89.
- Hayday A (2000).** Gamma delta cells: a right time and a right place for a conserved third way of protection. *Annu. Rev. Immunol.* 18, 975-1026.
- Hein W, Mackay C (1991).** Prominence of gamma delta T cells in the ruminant immune system. *Immunol. Today* 12, 30-4.
- Hilbink F, West D (1990).** The antibody response of sheep to vaccination against Johne's disease. *N. Z. Vet. J.* 38, 168-169.
- Hines II M, Stabel J, Sweeney R, Griffin F, Talaat A, Bakker D, Benedictus G, Davis W, de Lisle G, Gardner I, Juste R, Kapur V, Koets A, McNair J, Pruitt G, Whitlock R, Hines II M, Stabel J, Sweeney R, Griffin F, Talaat A, Bakker D, Benedictus G, Davis W, de Lisle G, Gardner I (2007A).** Experimental challenge models for Johne's disease: A review and proposed international guidelines, *Veterinary Microbiology*. Elsevier B.V.
- Hines II M, Stiver S, Giri D, Whittington L, Watson C, Johnson J, Musgrove J, Pence M, Hurley D, Baldwin C, Gardner I, Aly S (2007B).** Efficacy of spheroplastic and cell-wall competent vaccines for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in experimentally-challenged baby goats. *Vet. Microbiol.* 120, 261-83.
- Hines II M, Styer E (2003).** Preliminary characterization of chemically generated *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* cell wall deficient forms (Spheroplasts). *Vet. Microbiol.* 95, 247-258.
- Hines II M, Turnquist S, Ilha M, Rajeev S, Jones A, Whittington L, Bannantine J, Barletta R, Grohn Y, Katani R, Talaat A, Li L, Kapur V, Gröhn Y, Katani R, Talaat A, Li L, Kapur V (2014).** Evaluation of novel oral vaccine candidates and validation of a caprine model of Johne's disease. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 4, 26.
- Hines S, Buergelt C, Wilson J, Bliss E (1987).** Disseminated *Mycobacterium paratuberculosis* infection in a cow. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 190, 681-683.

- Holbert S, Branger M, Souriau A, Lamoureux B, Ganneau C, Richard G, Cochard T, Tholoniati C, Bay S, Winter N, Moyen J, Biet F** (2015). Interferon gamma response to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* specific lipopeptide antigen L5P in cattle. *Res. Vet. Sci.* 102, 118-121.
- Hope A, Kluver P, Jones S, Condron R** (2000). Sensitivity and specificity of two serological tests for the detection of ovine paratuberculosis. *Aust. Vet. J.* 78, 850-6.
- Hope J, Thom M, Villarreal-Ramos B, Vordermeier H, Hewinson R, Howard C** (2005). Exposure to *Mycobacterium avium* induces low-level protection from *Mycobacterium bovis* infection but compromises diagnosis of disease in cattle. *Clin. Exp. Immunol.* 141, 432-9.
- Hostetter J, Steadham E, Haynes J, Bailey T, Cheville N** (2003). Phagosomal maturation and intracellular survival of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in J774 cells. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 26, 269-283.
- Hostetter J, Steadham E, Haynes J, Bailey T, Cheville N** (2002). Cytokine effects on maturation of the phagosomes containing *Mycobacteria avium* subspecies *paratuberculosis* in J774 cells. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 34, 127-134.
- Howard C, Kwong L, Villarreal-Ramos B, Sopp P, Hope J** (2002). Exposure to *Mycobacterium avium* primes the immune system of calves for vaccination with *Mycobacterium bovis* BCG. *Clin. Exp. Immunol.* 130, 190-5.
- Huang Z, Luo Q, Guo Y, Chen J, Xiong G, Peng Y, Ye J, Li J** (2015). *Mycobacterium tuberculosis*-induced polarization of human macrophage orchestrates the formation and development of tuberculous granulomas in vitro. *PLoS One* 10, e0129744.
- Hughes J, Hellmann J, Ricketts T, Bohannon B** (2001). Counting the uncountable: statistical approaches to estimating microbial diversity. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 4399-406.
- Hughes V, Denham S, Bannantine J, Chianini F, Kerr K, May L, McLuckie J, Nath M, Stevenson K** (2013). Interferon gamma responses to proteome-determined specific recombinant proteins: Potential as diagnostic markers for ovine Johne's disease. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 155, 197-204.
- Hughes V, McNair J, Strain S, Barry C, McLuckie J, Nath M, Caldwell G, Stevenson K** (2017). Gamma interferon responses to proteome-determined specific recombinant proteins in cattle experimentally- and naturally-infected with paratuberculosis. *Res. Vet. Sci.* 114, 244-253.
- Huitema H** (1967). Johne's disease in cattle and vaccination. *Bull. Off. Int. Epizoot.* 68, 743-8.
- Hulten K, Karttunen T, El-Zimaity H, Naser S, Almashhrawi A, Graham D, El-Zaatari F** (2000). In situ hybridization method for studies of cell wall deficient *M. paratuberculosis* in tissue samples. *Vet. Microbiol.* 77, 513-8.
- Huntley J, Stabel J, Bannantine J** (2005). Immunoreactivity of the *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* 19-kDa lipoprotein. *BMC Microbiol.* 5, 3.
- Ito S, Ansari P, Sakatsume M, Dickensheets H, Vazquez N, Donnelly R, Larner A, Finbloom D** (1999). Interleukin-10 inhibits expression of both interferon alpha- and interferon gamma- induced genes by suppressing tyrosine phosphorylation of STAT1. *Blood* 93, 1456-63.
- Johne H, Frothingham L** (1895). Ein eigenthümlicher Fall von Tuberkulose beim Rind. *Dtsch. Ztschr. Tiermed. Path.* 21, 438-454.
- Johnson-Ifearulundu Y, Kaneene J, Lloyd J** (1999). Herd-level economic analysis of the impact of paratuberculosis on dairy herds. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 214, 822-825.
- Johnson L, Gough J, Spencer Y, Hewinson G, Vordermeier M, Wangoo A** (2006). Immunohistochemical markers augment evaluation of vaccine efficacy and disease severity in bacillus Calmette-Guerin (BCG) vaccinated cattle challenged with *Mycobacterium bovis*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 111, 219-29.
- Jones P, Farver T, Beaman B, Cetinkaya B, Morgan K** (2006). Crohn's disease in people exposed to clinical cases of bovine paratuberculosis. *Epidemiol. Infect.* 134, 49-56.

- Jorgensen J** (1977). Survival of *Mycobacterium paratuberculosis* in slurry. Nord. Vet. Med. 29, 267-270.
- Jungersen G, Huda A, Hansen J, Lind P** (2002). Interpretation of the gamma interferon test for diagnosis of subclinical paratuberculosis in cattle. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 9, 453-60.
- Juste R, Adúriz J** (1990). Paratuberculosis Ovina. Diagnóstico. Ovis. Tratado Patol. y Prod. ovina 7, 49-62.
- Juste R, Alonso-Hearn M, Garrido J, Abendaño N, Sevilla I, Górtazar C, de la Fuente J, Domínguez L** (2016A). Increased lytic efficiency of bovine macrophages trained with killed mycobacteria. PLoS One 11, e0165607.
- Juste R, Alonso-Hearn M, Molina E, Geijo M, Vazquez P, Sevilla I, Garrido J** (2009A). Significant reduction in bacterial shedding and improvement in milk production in dairy farms after the use of a new inactivated paratuberculosis vaccine in a field trial. BMC Res. Notes 2.
- Juste R, Badiola J, Arnal M, Balaguer L, García-Marín J, Sáez de Ocáriz C, Marco J** (1991A). A survey of ovine paratuberculosis in Aragon (Spain) by different methods. paratuberculosis Newsl. 3, 3-4.
- Juste R, Elguezal N, Pavón A, Garrido J, Geijo M, Sevilla I, Cabriada J, Tejada A, García-Campos F, Casado R, Ochotorena I, Izeta A** (2009B). Association between *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* DNA in blood and cellular and humoral immune response in inflammatory bowel disease patients and controls. Int. J. Infect. Dis. 13, 247-254.
- Juste R, García-Marín J, Peris B, Sáez de Ocáriz C, Badiola J** (1994). Experimental infection of vaccinated and non-vaccinated lambs with *Mycobacterium paratuberculosis*. J. Comp. Pathol. 110, 185-194.
- Juste R, Garrido J, Geijo M, Elguezal N, Aduriz G, Atxaerandio R, Sevilla I** (2005). Comparison of blood polymerase chain reaction and enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in cattle and sheep. J. Vet. Diagn. Invest. 17, 354-9.
- Juste R, Marco J, Sáez de Ocáriz C, Adúriz J** (1991B). Comparison of different media for the isolation of small ruminant strains of *Mycobacterium paratuberculosis*. Vet. Microbiol. 28, 385-90.
- Juste R, Pérez V** (2011). Control of paratuberculosis in sheep and goats. Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract. 27, 127-38.
- Juste R, Saez de Ocariz C** (1990). Paratuberculosis Ovina. Control. Ovis. Tratado Patol. y Prod. ovina 7, 77-85.
- Juste R, Vazquez P, Ruiz-Larrañaga, O Iriondo M, Manzano C, Agirre M, Estonba A, Geijo M, Molina E, Sevilla I, Alonso-Hearn M, Gomez N, Pérez V, Cortes A, Garrido J** (2016B). Association between genetic polymorphisms and epidemio-pathogenic forms of paratuberculosis, en: 13th International Colloquium on Paratuberculosis. Nantes, Francia, p. 51.
- Kalis C, Barkema H, Hesselink J, van Maanen C, Collins M** (2002). Evaluation of two absorbed enzyme-linked immunosorbent assays and a complement fixation test as replacements for fecal culture in the detection of cows shedding *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. J. Vet. Diagn. Invest. 14, 219-24.
- Kalis C, Benedictus G** (1992). Experiences with the use of an experimental vaccine in the control of paratuberculosis in the province of Friesland, The Netherlands, en: Chiodini, R., Kreeger, J. (Eds.), Third International Colloquium on Paratuberculosis. Madison, EEUU, pp. 484-494.
- Kalis C, Hesselink J, Barkema H, Collins M** (2001). Use of long-term vaccination with a killed vaccine to prevent fecal shedding of *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* in dairy herds. Am. J. Vet. Res. 62, 270-4.
- Kaneko H, Yamada H, Mizuno S, Udagawa T, Kazumi Y, Sekikawa K, Sugawara I** (1999). Role of tumor necrosis factor-alpha in *Mycobacterium*-induced granuloma formation in tumor necrosis factor-alpha-deficient mice. Lab. Invest. 79, 379-86.
- Kaufmann S** (1991). Role of T-cell subsets in bacterial infections. Curr. Opin. Immunol. 3, 465-470.
- Kaur P, Filia G, Singh S, Patil P, Sandhu K** (2010). Molecular detection and typing of *Mycobacterium avium*

- subspecies *paratuberculosis* from milk samples of dairy animals. *Trop. Anim. Health Prod.* 42, 1031-5.
- Kawaji S, Nagata R, Mori Y** (2014). Detection and confirmation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in direct quantitative PCR positive fecal samples by the manual fluorescent MGIT culture system. *J. Vet. Med. Sci.* 76, 65-72.
- Kennedy D, Benedictus G** (2001). Control of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in agricultural species. *Rev. Sci. Tech.* 20, 151-179.
- Khader S, Cooper A** (2008). IL-23 and IL-17 in tuberculosis. *Cytokine* 41, 79-83.
- Khalifeh M, Stabel J** (2004). Upregulation of transforming growth factor-beta and interleukin-10 in cows with clinical Johne's disease. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 99, 39-46.
- Khan F, Chaudhry Z, Ali M, Khan S, Mumtaz N, Ahmad I** (2010). Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in tissue samples of cattle and buffaloes. *Trop. Anim. Health Prod.* 42, 633-638.
- Khare S, Adams L, Osterstock J, Roussel A, David L** (2008). Effects of shipping and storage conditions of fecal samples on viability of *Mycobacterium paratuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.*
- Khol J, Braun A, Slana I, Kralik P, Wittek T** (2017). Testing of milk replacers for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* by PCR and bacterial culture as a possible source for Johne's disease (paratuberculosis) in calves. *Prev. Vet. Med.* 144, 53-56.
- Kidd P** (2003). Th1/Th2 balance: the hypothesis, its limitations, and implications for health and disease. *Altern. Med. Rev.* 8, 223-246.
- Kirkeby C, Græsbøll K, Nielsen S, Christiansen L, Toft N, Rattenborg E, Halasa T** (2016). Simulating the epidemiological and economic impact of paratuberculosis control actions in dairy cattle. *Front. Vet. Sci.* 3, 90.
- Kirkwood C, Wagner J, Boniface K, Vaughan J, Michalski W, Catto-Smith A, Cameron D, Bishop F** (2009). *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in children with early-onset Crohn's disease. *Inflamm. Bowel Dis.* 15, 1643-1655.
- Klausen J, Pérez V, Giese S, García-Marín J, Ahrens P** (1997). Immunological detection of sheep experimentally infected with strains of *Mycobacterium avium* subspecies containing insertion sequence IS901/IS902 and a 40 kDa protein. *Vet. Microbiol.* 57, 181-7.
- Klawonn W, Cussler K, Dräger K, Gyra H, Köhler H, Zimmer K, Hess R** (2002). The importance of allergic skin test with Johnin, antibody ELISA, cultural fecal test as well as vaccination for the sanitation of three chronically paratuberculosis-infected dairy herds in Rhineland-Palatinate. *Dtsch. Tierarztl. Wochenschr.* 109, 510-6.
- Kleinnijenhuis J, Quintin J, Preijers F, Benn C, Joosten L, Jacobs C, van Loenhout J, Xavier R, Aaby P, van der Meer J, van Crevel R, Netea M** (2014). Long-lasting effects of BCG vaccination on both heterologous Th1/Th17 responses and innate trained immunity. *J. Innate Immun.* 6, 152-8.
- Kleinnijenhuis J, Quintin J, Preijers F, Joosten L, Ifrim D, Saeed S, Jacobs C, van Loenhout J, de Jong D, Stunnenberg H, Xavier R, van der Meer J, van Crevel R, Netea M** (2012). Bacille Calmette-Guérin induces NOD2-dependent nonspecific protection from reinfection via epigenetic reprogramming of monocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109, 17537 LP-17542.
- Kleinnijenhuis J, van Crevel R, Netea M** (2015). Trained immunity: consequences for the heterologous effects of BCG vaccination. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 109, 29-35.
- Koenig G, Hoffsis G, Shulaw W, Bech-Nielsen S, Rings D, St-Jean G** (1993). Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from mononuclear cells in tissues, blood, and mammary glands of cows with advanced paratuberculosis. *Am. J. Vet. Res.* 54, 1441-1445.
- Koets A, Eda S, Sreevatsan S** (2015). The within host dynamics of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* infection in cattle: where time and place matter. *Vet. Res.* 46, 61.

- 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, 2550-9.
- Koets A, Rutten V, Hoek A, Bakker D, van Zijderveld F, Müller K, van Eden W** (1999). Heat-shock protein-specific T-cell responses in various stages of bovine paratuberculosis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 70, 105-15.
- Koets A, Rutten V, Hoek A, van Mil F, Muller K, Bakker D, Gruys E, van Eden W** (2002). Progressive bovine paratuberculosis is associated with local loss of CD4(+) T cells, increased frequency of gamma delta T cells, and related changes in T-cell function. *Infect. Immun.*
- Köhler H, Gyra H, Zimmer K, Dräger K, Burkert B, Lemser B, Hausleithner D, Cubler K, Klawonn W, Hess R** (2001). Immune reactions in cattle after immunization with a *Mycobacterium paratuberculosis* vaccine and implications for the diagnosis of *M. paratuberculosis* and *M. bovis* infections. *J. Vet. Med. B. Infect. Dis. Vet. Public Health* 48, 185-95.
- 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 Vet. Res.* 11, 74.
- Kopecna M, Ondrus S, Literak I, Klimes J, Horvathova A, Moravkova M, Bartos M, Trcka I, Pavlik I** (2006). Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in two brown bears in the Central European Carpathians. *J. Wildl. Dis.* 42.
- Körmendy B** (1994). The effect of vaccination on the prevalence of paratuberculosis in large dairy herds. *Vet. Microbiol.* 41, 117-25.
- Kox L, Rhienthong D, Miranda A, Udomsantisuk N, Ellis K, Van Leeuwen J, Van Heusden S, Kuijper S, Kolk A** (1994). A more reliable PCR for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples. *J. Clin. Microbiol.* 32, 672-678.
- Kramsky J, Miller D, Hope A, Collins M** (2000). Modification of a bovine ELISA to detect camelid antibodies to *Mycobacterium paratuberculosis*. *Vet. Microbiol.* 77, 333-337.
- Kreeger J** (1991). Ruminant Paratuberculosis—a Century of Progress and Frustration. *J. Vet. Diagnostic Investig.* 3, 373-383.
- Krüger C, Köhler H, Liebler-Tenorio E** (2015A). Cellular composition of granulomatous lesions in gut-associated lymphoid tissues of goats during the first year after experimental infection with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 163, 33-45.
- Krüger C, Köhler H, Liebler-Tenorio E** (2015B). Sequential development of lesions 3, 6, 9, and 12 months after experimental infection of goat kids with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Vet. Pathol.* 52, 276-290.
- Kruze J, Monti G, Schulze F, Mella A, Leiva S** (2013). Herd-level prevalence of Map infection in dairy herds of southern Chile determined by culture of environmental fecal samples and bulk-tank milk qPCR. *Prev. Vet. Med.* 111, 319-324.
- Kuehnel M, Goethe R, Habermann A, Mueller E, Rohde M, Griffiths G, Valentin-Weigand P** (2001). Characterization of the intracellular survival of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*: phagosomal pH and fusogenicity in J774 macrophages compared with other mycobacteria. *Cell. Microbiol.* 3, 551-566.
- Kurade N, Tripathi B** (2008). Lymphoproliferative response and its relationship with histological lesions in experimental ovine paratuberculosis and its diagnostic implications. *Vet. Res. Commun.* 32, 107-119.
- Kurade N, Tripathi B, Rajukumar K, Parihar N** (2004). Sequential development of histologic lesions and their relationship with bacterial isolation, fecal shedding, and immune responses during progressive stages of experimental infection of lambs with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Vet. Pathol.* 41, 378-387.
- Kurtz J** (2005). Specific memory within innate immune systems. *Trends Immunol.* 26, 186-192.

- Ladero I, Arrazuria R, Molina E, Fernández M, Royo M, Garrido J, Juste R, Pérez V, Elguezabal N** (2018). Effects of vaccination route on the immune response in the rabbit paratuberculosis infection model, en: 14. Riviera Maya, México, p. 38.
- Lambeth C, Reddacliff L, Windsor P, Abbott K, McGregor H, Whittington R** (2004). Intrauterine and transmammary transmission of *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* in sheep. *Aust. Vet. J.* 82, 504-508.
- Larsen A, Hawkins Wwj, Merkal R** (1964). Experimental vaccination of sheep against Johne's disease. *Am. J. Vet. Res.* 25, 974-976.
- Larsen A, Merkal R, Vardaman T** (1956). Survival time of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Am. J. Vet. Res.* 17.
- Larsen A, Stalheim O, Hughes D, Appell L, Richards W, Himes E** (1981). *Mycobacterium paratuberculosis* in the semen and genital organs of a semen-donor bull. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 179, 169-171.
- Larsen H, Landsverk T** (1986). Distribution of T and B lymphocytes in jejunal and ileocaecal Peyer's patches of lambs. *Res. Vet. Sci.* 40, 105-11.
- Lauzi S, Pasotto D, Amadori M, Archetti I, Poli G, Bonizzi L** (2000). Evaluation of the specificity of the γ -interferon test in Italian bovine tuberculosis-free herds. *Vet. J.* 160, 17-24.
- Lee J, Shin S, Collins M, Jung I, Jeong Y-I, Lee C-M, Shin Y, Kim D, Park Y-M** (2009). *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* fibronectin attachment protein activates dendritic cells and induces a Th1 polarization. *Infect. Immun.* 77, 2979-88.
- Lee S, Nguyen M** (2015). Recent advances of vaccine adjuvants for infectious diseases. *Immune Netw.* 15, 51.
- Levy-Frebault V, Portaels F** (1992). Proposed minimal standards for the genus *Mycobacterium* and for description of new slowly growing *Mycobacterium* species. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 42, 315-323.
- Li L, 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*, en: National Academy of Sciences. pp. 12344-12349.
- Lillini E, Bittonti G, Gaberale F, Cersini A** (2006). Prevalence of bovine paratuberculosis in the Latium region (Italy), en: En: Manning, E., Nielsen, S.S. (Eds. . (Eds.), 8th International Colloquium on Paratuberculosis. Madison, EEUU, pp. 638-644.
- Lombard J** (2011). Epidemiology and economics of paratuberculosis. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 27, 525-535.
- Lombard J, Byrem T, Wagner B, McCluskey B** (2006A). Comparison of milk and serum Enzyme-Linked Immunosorbent Assays for diagnosis of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection in dairy cattle. *J. Vet. Diagnostic Investig.* 18, 448-458.
- Lombard J, Wagner B, Smith R, McCluskey B, Harris B, Payeur J, Garry F, Salman M** (2006B). Evaluation of environmental sampling and culture to determine *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* distribution and herd infection status on US dairy operations. *J. Dairy Sci.* 89, 4163-4171.
- López Cruz A, Perales Flores A, Sánchez-Prieto Borja M, Franco Cayón F, Puentes Colorado E** (1999). Vaccination of cattle against paratuberculosis with an inactivated vaccine. A controlled field study in an infected herd, en: Manning EJB, C.M. (Ed.), 6th International Colloquium on Paratuberculosis. Madison, EEUU.
- Lorencova A, Vasickova P, Makovcova J, Slana I** (2014). Presence of *Mycobacterium avium* Subspecies and Hepatitis E Virus in Raw Meat Products. *J. Food Prot.* 77, 335-338.
- Lory S** (2014). The Family Mycobacteriaceae, en: Rosenberg, E., DeLong, E., Lory, S., Stackebrandt, E., Thompson, F. (Eds.), *The Prokaryotes: Actinobacteria*. Boston, MA, USA, pp. 571-575.
- Losinger W** (2005). Economic impact of reduced milk production associated with Johne's disease on dairy

- operations in the USA. *J. Dairy Res.* 72, 425.
- Lovell R, Levi M, Francis J** (1944). Studies on the survival of Johne's bacilli. *J. Comp. Pathol. Ther.* 54, 120-129.
- Lozano de Arcenegui E, Marcos Sainero F, Selas Turrillo F, Palomar Muñoz V** (2012). Estudio sobre la interferencia en el diagnóstico de tuberculosis de la vacunación con gudair frente a la paratuberculosis en cabras de reposición, en: XXXVII Congreso Nacional de la Sociedad Española de Ovinotecnia y Caprinotecnia (SEOC). Ciudad Real, pp. 273-275.
- Lugton I** (2004). Cross-sectional study of risk factors for the clinical expression of ovine Johne's disease on New South Wales farms. *Aust. Vet. J.* 82, 355-65.
- Lyashchenko K, Grandison A, Keskinen K, Sikar-Gang A, Lambotte P, Esfandiari J, Ireton G, Vallur A, Reed S, Jones G, Vordermeier H, Stabel J, Thacker T, Palmer M, Waters W** (2017). Identification of novel antigens recognized by serum antibodies in bovine tuberculosis. *Clin. Vaccine Immunol.* 24.
- Machugh N, Mburu J, Carol M, Wyatt C, Orden J, Davis W** (1997). Identification of two distinct subsets of bovine gamma delta T cells with unique cell surface phenotype and tissue distribution. *Immunology* 92, 340-345.
- Mackintosh C, Clark R, Thompson B, Tolentino B, Griffin J, de Lisle G** (2010). Age susceptibility of red deer (*Cervus elaphus*) to paratuberculosis. *Vet. Microbiol.* 143, 255-261.
- Mackintosh C, Labes R, Clark R, de Lisle G, Griffin J** (2007). Experimental infections in young red deer (*Cervus elaphus*) with a bovine and an ovine strain of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *N. Z. Vet. J.* 55, 23-9.
- Mackintosh C, Labes R, Griffin J** (2005). The effect of Johne's vaccination on tuberculin testing in farmed red deer (*Cervus elaphus*). *N. Z. Vet. J.* 53 (4), 216-222.
- Magombedze G, Eda S, Stabel J** (2015). Predicting the role of IL-10 in the regulation of the adaptive immune responses in *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infections using mathematical models. *PLoS One* 10, e0141539.
- Maio E, Carta T, Balseiro A, Sevilla I, Romano A, Ortiz J, Vieira-Pinto M, Garrido J, Pérez de la Lastra J, Gortázar C** (2011). Paratuberculosis in European wild rabbits from the Iberian Peninsula. *Res. Vet. Sci.* 91, 212-218.
- Majeed S, Goudswaard J** (1971). Aortic lesions in goats infected with *Mycobacterium johnei*. *J. Comp. Pathol.* 81, 571-574.
- Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M** (2004). The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol.* 25, 677-686.
- MAPA (2018). Manual para el procedimiento de realización de la prueba IDTB y del gamma-interferón.
- Marianelli C, Cifani N, Capucchio M, Fiasconaro M, Russo M, La Mancusa F, Pasquali P, Di Marco V** (2010). A case of generalized bovine tuberculosis in a sheep. *J. Vet. Diagn. Invest.* 22, 445-8.
- Markesich D, Graham D, Yoshimura H** (1988). Progress in culture and subculture of spheroplasts and fastidious acid-fast bacilli isolated from intestinal tissues. *J. Clin. Microbiol.* 26, 1600-3.
- Marly J, Thorel M, Perrin G, Pardon P, Guerrault D** (1988). Suivi de vaccination de chevrettes contre le paratuberculose: consequences cliniques, serologiques *et* allergiques et epreuve virulente, en: Thorel, M.F.; Merkal, R.. (Ed.), 2nd International Colloquium on Paratuberculosis. Paris. Francia, pp. 136-140.
- Marsh I, Whittington R, Cousins D** (1998). PCR-restriction endonuclease analysis for identification and strain typing of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and *Mycobacterium avium* subsp. *avium* based on polymorphisms in IS1311. *Mol. Cell. Probes* 13, 115-126.
- Martínez F, Gordon S** (2014). The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Rep.* 6, 13.

- Mataragka A, Leousi E, Liandris E, Ntafis V, Leontides L, Aggelidou E, Bossis I, Triantaphyllopoulos K, Theodoropoulou I, Ikonomopoulos J** (2017). Faecal shedding of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* reduces before parturition in sheep? Small Rumin. Res. 147, 32-36.
- Mateo A, Pinato O, Garrido J, Juste R, Llanes D** (1997). Characterization of lymphocyte subpopulations in paratuberculosis vaccinated and non-vaccinated sheep, en: Chiodini, R., Hines II, M., Collins, M. (Eds.), 5th International Colloquium on Paratuberculosis. p. 223.
- Mathevon Y, Foucras G, Falguières R, Corbiere F** (2017). Estimation of the sensitivity and specificity of two serum ELISAs and one fecal qPCR for diagnosis of paratuberculosis in sub-clinically infected young-adult French sheep using latent class Bayesian modeling. BMC Vet. Res. 13, 230.
- McAloon C, Whyte P, More S, O'Grady L, Doherty M** (2015). Development of a HACCP-based approach to control paratuberculosis in infected Irish dairy herds. Prev. Vet. Med. 120, 152-161.
- McGregor H, Dhand N, Dhungyel O, Whittington R** (2012). Transmission of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: Dose-response and age-based susceptibility in a sheep model. Prev. Vet. Med. 107.
- McKenna S, Keefe G, Tiwari A, VanLeeuwen J, Barkema H** (2006). Johne's disease in Canada part II: disease impacts, risk factors, and control programs for dairy producers. Can. Vet. J. = La Rev. vétérinaire Can. 47, 1089-1099.
- McKinley T, Lipschutz-Powell D, Mitchell A, Wood J, Conlan A** (2018). Risk factors and variations in detection of new bovine tuberculosis breakdowns via slaughterhouse surveillance in Great Britain. PLoS One 13, e0198760.
- Meadus W, Gill C, Duff P, Badoni M, Saucier L** (2008). Prevalence on beef carcasses of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* DNA. Int. J. Food Microbiol. 124, 291-4.
- Medzhitov R, Janeway C** (1997). Innate immunity: impact on the adaptive immune response. Curr. Opin. Immunol. 9, 4-9.
- Mendes S, Boinas F, Albuquerque T, Fernandes L, Alfonso A, Amado A** (2004). Epidemiological studies on paratuberculosis in small ruminants in Portugal. Epidemiol Sante Anim 45, 61-71.
- Mendoza J, San-Pedro A, Culebras E, Cíes R, Taxonera C, Lana R, Urcelay E, de la Torre F, Picazo J, Díaz-Rubio M** (2010). High prevalence of viable *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in Crohn's disease. World J. Gastroenterol. 16, 4558-63.
- Meng C, Wan T, Xu Z, Liu Y, Shan F, Sun L, Yin Y, Chen X, Jiao X** (2015). Screening putative antigens as stimulators in the *Mycobacterium bovis* interferon-gamma release assay for cattle. Vet. Immunol. Immunopathol. 168, 111-7.
- Mercier P, Brémaud I, Gautier M-P** (2014). Vaccination of kids under one month of age with a killed vaccine and reduction in the frequency of faecal shedding of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. Small Rumin. Res. 121, 425-433.
- Merkal R, Curran B** (1974). Growth and metabolic characteristics of *Mycobacterium paratuberculosis*. Appl. Microbiol. 28, 276-279.
- Merkal R, Larsen A, Booth G** (1975). Analysis of the effect of inapparent bovine paratuberculosis. Am. J. Vet. Res. 36, 837-838.
- Merkal R, Larsen A, Kopecky K, Kluge J, Monlux W, Lehmann R, Quinn L** (1968). Experimental paratuberculosis in sheep after oral, intratracheal, or intravenous inoculation: serologic and intradermal tests. Am. J. Vet. Res. 29, 963-9.
- Mikkelsen H, Aagaard C, Nielsen S, Jungersen G** (2011). Novel antigens for detection of cell mediated immune responses to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in cattle. Vet. Immunol. Immunopathol. 143, 46-54.
- Miller D, Collins M, Smith B, Anderson P, Kramsky J, Wilder G, Hope A** (2000). Specificity of four serologic assays for *Mycobacterium avium* ss *paratuberculosis* in llamas and alpacas: a single herd study. J. Vet. Diagnostic Investig. 12, 345-353.

- Miller H, Zhang J, Kuolee R, Patel G, Chen W** (2007). Intestinal M cells: the fallible sentinels? *World J. Gastroenterol.*
- Miller J, Jenny A, Ellingson J** (1999). Polymerase chain reaction identification of *Mycobacterium avium* in formalin-fixed, paraffin-embedded animal tissues. *J. Vet. Diagnostic Investig.* 11, 436-440.
- Milner A, Wilks C, Borland R** (1981). In vitro responses of lymphocytes from cattle with advanced *Mycobacterium paratuberculosis* infection to homologous and heterologous antigens. *Res. Vet. Sci.* 31, 93-9.
- Minas A, Koutsoukou-Hartona E, Papisavvas M, Tsantas H** (1994). Epidimiologiki erevna sta poimnia provatou kai aigon stis Voreies Sporades gia parafymatiosi kai kai proiousa pnevmonia. *Delt. tis Ellinikis Ktiniatrikis Etaireias* 45, 25-30.
- Ministerio de Agricultura. Pesca y Alimentación. MAPA.** (2018). Programa Nacional de Erradicación de Tuberculosis Bovina presentado por España para el año 2017 [WWW Document]. URL https://www.mapama.gob.es/es/ganaderia/temas/sanidad-animal-higiene-ganadera/sanidad-animal/enfermedades/tuberculosis/Tuberculosis_bovina.aspx
- Miranda C, Matos M, Pires I, Ribeiro P, Álvares S, Vieira-Pinto M, Coelho A** (2011). *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in slaughtered domestic pigs for consumption detected by molecular methods. *Food Res. Int.* 44, 3276-3277.
- Molina A, Morera L, Llanes D** (1991). Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies against *Mycobacterium paratuberculosis* in goats. *Am. J. Vet. Res.* 52.
- Molina J, Anguiano A, Ferrer O** (1996). Study on immune response of goats vaccinated with a live strain of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 19, 9-15.
- Molodecky N, Soon I, Rabi D, Ghali W, Ferris M, Chernoff G, Benchimol E, Panaccione R, Ghosh S, Barkema H, Kaplan G** (2012). Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review. *Gastroenterology* 142, 46-54.e42.
- Momotani E, Whipple D, Thiermann A, Cheville N** (1988). Role of M cells and macrophages in the entrance of *Mycobacterium paratuberculosis* into domes of ileal Peyer's patches in calves. *Vet. Pathol.* 25, 131-137.
- Monaghan M, Doherty M, Collins J, Kazda J, Quinn P** (1994). The tuberculin test. *Vet. Microbiol.* 40, 111-24.
- Mork T, Heier B, Alvseike K, Lund A** (2003). Overvakings- og kontrollprogrammer for landdyr, fisk og skjell I Norge med vekt på BSE-, salmonella- og paratuberkuloseprogrammene. *Nor. Veterinaertidsskrift* 115, 707-717.
- Mosser D, Edwards J** (2008). Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 958-969.
- Mucha R, Bhide M, Chakurkar E, Novak M, Mikula I** (2009). Toll-like receptors TLR1, TLR2 and TLR4 gene mutations and natural resistance to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in cattle. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 128, 381-388.
- Muehlherr J, Zweifel C, Corti S, Blanco J, Stephan R** (2003). Microbiological quality of raw goat's and ewe's bulk-tank milk in Switzerland. *J. Dairy Sci.* 86, 3849-3856.
- 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.
- Muñoz-Mendoza M, Romero B, Del Cerro A, Gortázar C, García-Marín J, Menéndez S, Mourelo J, de Juan L, Sáez J, Delahay R, Balseiro A** (2016). Sheep as a potential source of bovine TB: epidemiology, pathology and evaluation of diagnostic techniques. *Transbound. Emerg. Dis.* 63, 635-646.
- Muñoz M** (2014). Eficacia de una vacuna inactivada frente a la paratuberculosis bovina en un modelo experimental en terneros y su influencia en la patogenia de la enfermedad. Tesis Doctoral. Universidad

de León. Facultad de Veterinaria.

- Muñoz M, Delgado L, Verna A, Benavides J, García-Pariente C, Fuertes M, Ferreras M, García-Marín J, Pérez V** (2009). Expression of transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta1) in different types of granulomatous lesions in bovine and ovine paratuberculosis. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 32, 239-52.
- Muñoz M, García-Marín J, García-Pariente C, Reyes L, Verna A, Moreno O, Fuertes M, Doce J, Puentes E, Garrido J, Pérez V** (2005). Efficacy of a killed vaccine (SILIRUM®) in calves challenged with MAP, en: Manning, E., Nielsen, S., Paratuberculosis; I.A. for (Eds.), 8th International Colloquium on Paratuberculosis. Copenhagen, Denmark, pp. 208-217.
- Muskens J, Barkema H, Russchen E, van Maanen K, Schukken Y, Bakker D** (2000). Prevalence and regional distribution of paratuberculosis in dairy herds in The Netherlands. *Vet. Microbiol.* 77, 253-61.
- Muskens J, Van Zijderveld F, Eger A, Bakker D** (2002). Evaluation of the long-term immune response in cattle after vaccination against paratuberculosis in two Dutch dairy herds. *Vet. Microbiol.* 86, 269-278.
- Nagata R, Muneta Y, Yoshihara K, Yokomizo Y, Mori Y** (2005). Expression cloning of gamma interferon-inducing antigens of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Infect. Immun.* 73, 3778-82.
- Nalubamba K, Smeed J, Gossner A, Watkins C, Dalziel R, Hopkins J** (2008). Differential expression of pattern recognition receptors in the three pathological forms of sheep paratuberculosis. *Microbes Infect.* 10, 598-604.
- Napp S, Allepuz A, Mercader I, Nofrarías M, López-Soria S, Domingo M, Romero B, Bezos J, Pérez de Val B** (2013). Evidence of goats acting as domestic reservoirs of bovine tuberculosis. *Vet. Rec.* 172, 663.
- Naser S, Ghobrial G, Romero C, Valentine J** (2004). Culture of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* from the blood of patients with Crohn's disease. *Lancet* 364, 1039-1044.
- Naser S, Sagramsingh S, Naser A, Thanigachalam S** (2014). *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* causes Crohn's disease in some inflammatory bowel disease patients. *World J. Gastroenterol.* 20, 7403-15.
- Naser S, Schwartz D, Shafran I** (2000). Isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from breast milk of Crohn's disease patients. *Am. J. Gastroenterol.* 95, 1094-1095.
- National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods** (2010). Assessment of food as a source of exposure to *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (MAP). *J. Food Prot.* 73, 1357-97.
- Navarro J, Ramis G, Seva J, Pallarés F, Sánchez J** (1998). Changes in lymphocyte subsets in the intestine and mesenteric lymph nodes in caprine paratuberculosis., *Journal of Comparative Pathology*. Published for the Editorial Board by Academic Press.
- Nedrow A, Gavalchin J, Smith M, Stehman S, Maul J, McDonough S, Thonney M** (2007). Antibody and skin-test responses of sheep vaccinated against Johne's Disease. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 116, 109-12.
- Netea M, Quintin J, van der Meer J** (2011). Trained immunity: A memory for innate host defense. *Cell Host Microbe* 9, 355-361.
- Netea M, van der Meer J** (2017). Trained immunity: An ancient way of remembering. *Cell Host Microbe* 21, 297-300.
- Nielsen S, Hansen K, Kvist L, Kostoulas P** (2016). Dam's infection progress and within-herd prevalence as predictors of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* ELISA response in Danish Holstein cattle. *Prev. Vet. Med.* 125, 54-58.
- Nielsen S, Thamsborg S, Houe H, Bitsch V** (2000). Bulk-tank milk ELISA antibodies for estimating the prevalence of paratuberculosis in Danish dairy herds. *Prev. Vet. Med.* 44.
- Nielsen S, Toft N** (2009). A review of prevalences of paratuberculosis in farmed animals in Europe. *Prev. Vet.*

- Med. 88, 1-14.
- Nielsen S, Toft N** (2008). Ante mortem diagnosis of paratuberculosis: A review of accuracies of ELISA, interferon- γ assay and faecal culture techniques. *Vet. Microbiol.* 129, 217-235.
- Niobey F, Duchiae M, Vasconcelos A, de Carvalho M, Leal M, Valente J** (1992). Risk factors for death caused by pneumonia in children younger than 1 year old in a metropolitan region of southeastern Brazil. A case- control study. *Rev. Saude Publica* 26, 229-38.
- Nisbet D, Gilmour N, Brotherston J** (1962). Quantitative studies of *Mycobacterium johnei* in tissues of sheep: III Intestinal histopathology. *J. Comp. Pathol. Ther.* 72, 80-IN19.
- Noss E, Pai R, Sellati T, Radolf J, Belisle J, Golenbock D, Boom W, Harding C** (2001). Toll-like receptor 2-dependent inhibition of macrophage class II MHC expression and antigen processing by 19-kDa lipoprotein of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Immunol.* 167, 910-918.
- O'Brien R, Mackintosh C, Bakker D, Kopečna M, Pavlik I, Griffin J** (2006). Immunological and molecular characterization of susceptibility in relationship to bacterial strain differences in *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in the red deer (*Cervus elaphus*). *Infect. Immun.* 74, 3530-7.
- O'Reilly C, O'Connor L, Anderson W, Harvey P, Grant I, Donaghy J, Rowe M, O'Mahony P** (2004). Surveillance of bulk raw and commercially pasteurized cows' milk from approved Irish liquid-milk pasteurization plants to determine the incidence of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 5138-5144.
- Ocepek M, Krt B, Pogacnik M** (2002). Seroprevalence of paratuberculosis in Slovenia between 1999 and 2001. *Slov. Vet. Res.* 39, 179-185.
- OIE** (2017). Código Sanitario para los Animales Terrestres.
- OIE** (2012). Manual de la OIE sobre animales terrestres. Tuberculosis bovina (Chap. 2.4.7) [WWW Document]. URL http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.04.06_BOVINE_TB.pdf
- OIE** (2008). Manual de la OIE sobre animales terrestres. Paratuberculosis (Chap. 2.1.11).
- Oken H, Saleeb P, Redfield R, Schimpff S** (2017). Is *Mycobacterium avium paratuberculosis* the trigger in the Crohn's disease spectrum? *Open Forum Infect. Dis.* 4, ofx104.
- Okura H, Toft N, Pozzato N, Tondo A, Nielsen S** (2011). Apparent prevalence of beef carcasses contaminated with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* sampled from Danish slaughter cattle. *Vet. Med. Int.* 2011, 1-7.
- Olsen I, Reitan L, Holstad G, Wiker H** (2000). Alkyl hydroperoxide reductases C and D are major antigens constitutively expressed by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Infect. Immun.* 68, 801-8.
- Olsen I, Sigurðardóttir Ó, Djonne B** (2002). Paratuberculosis with special reference to cattle. A review. *Vet. Q.* 24, 12-28.
- Olsen I, Tollefsen S, Aagaard C, Reitan L, Bannantine J, Andersen P, Sollid L, Lundin K** (2009). Isolation of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* reactive CD4 T cells from intestinal biopsies of Crohn's disease patients. *PLoS One* 4, e5641.
- Orme I** (2004). Adaptive immunity to mycobacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* 7, 58-61.
- Orme I, Roberts A, Griffin J, Abrams J** (1993). Cytokine secretion by CD4 T lymphocytes acquired in response to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J. Immunol.* 151, 518-25.
- Ostrowski M, Mundo S, Harris N, Barletta R, Lopez O** (2003). B-cell epitopes in the immunodominant p34 antigen of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* recognized by antibodies from infected cattle. *Scand. J. Immunol.* 58, 511-21.
- Ott S, Wells S, Wagner B** (1999). Herd-level economic losses associated with Johne's disease on US dairy operations. *Prev. Vet. Med.* 40, 179-192.

- Paliwal O, Rajya B** (1982). Evaluation of paratuberculosis in goats: pathomorphological studies. *Indian J. Vet. Pathol.* 6, 29-34.
- Park H-T, Yoo H** (2016). Development of vaccines to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection. *Clin. Exp. Vaccine Res.* 5, 108-116.
- Parrish N, Radcliff R, Brey B, Anderson J, Clark D, Koziczkowski J, Ko C, Goldberg N, Brinker D, Carlson R, Dick J, Ellingson J** (2009). Absence of *mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Crohn's patients. *Inflamm. Bowel Dis.* 15, 558-65.
- Patterson C, LaVenture M, Hurley S, Davis J** (1988). Accidental self-inoculation with *Mycobacterium paratuberculosis* bacterin (Johne's bacterin) by veterinarians in Wisconsin. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 192, 1197-9.
- Pavlik I, Bartl J, Dvorska L, Svastova P, du Maine R, Machackova M, Yayo Ayele W, Horvathova A** (2000). Epidemiology of paratuberculosis in wild ruminants studied by restriction fragment length polymorphism in the Czech Republic during the period 1995–1998. *Vet. Microbiol.* 77, 231-251.
- Peleman R, Wu J, Fargeas C, Delespesse G** (1989). Recombinant interleukin 4 suppresses the production of interferon gamma by human mononuclear cells. *J. Exp. Med.* 170, 1751-6.
- Pérez de Val B, Nofrarias M, López-Soria S, Garrido J, Vordermeier H, Villarreal-Ramos B, Martín M, Puentes E, Juste R, Domingo M** (2012). Effects of vaccination against paratuberculosis on tuberculosis in goats: diagnostic interferences and cross-protection. *BMC Vet. Res.* 8, 191.
- Pérez V** (1992). Estudio de la paratuberculosis en la especie ovina. Tesis Doctoral. Universidad de Zaragoza. Facultad de Veterinaria.
- Pérez V, Corpa J, García-Marín J** (2000). El cuadro clínico y lesional de la paratuberculosis bovina. *BOVIS, Aula Vet.* 93, 39-47.
- Pérez V, García-Marín 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.
- Pérez V, García-Marín J, Bru R, Moreno B, Badiola J** (1995). Resultados obtenidos en la vacunación de ovinos adultos frente a paratuberculosis. *Med. Vet.* 12, 196-201.
- Pérez V, Tellechea J, Badiola J, Gutiérrez M, García-Marín J** (1997). Relation between serologic response and pathologic findings in sheep with naturally acquired paratuberculosis. *Am. J. Vet. Res.* 58, 799-803.
- Pérez V, Tellechea J, Corpa J, Gutiérrez M, García-Marín J** (1999). Relation between pathologic findings and cellular immune responses in sheep with naturally acquired paratuberculosis. *Am. J. Vet. Res.* 60, 123-127.
- Pesciaroli M, Alvarez J, Boniotti M, Cagiola M, Di Marco V, Marianelli C, Pacciarini M, Pasquali P** (2014). Tuberculosis in domestic animal species. *Res. Vet. Sci.* 97, S78-S85.
- Petit E** (2001). Enquete serologique sur la paratuberculose bovine menée dans l'Yonne lors de la campagne 98- 99. *Epidemiol Sante Anim* 40, 23-39.
- Pierre C, Lecossier D, Boussougant Y, Bocart D, Joly V, Yeni P, Hance A** (1991). Use of a reamplification protocol improves sensitivity of detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples by amplification of DNA. *J. Clin. Microbiol.* 29, 712-717.
- Pillars R, Grooms D, Woltanski J, Blair E** (2009). Prevalence of Michigan dairy herds infected with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* as determined by environmental sampling. *Prev. Vet. Med.* 89, 191-196.
- Pinedo P, Buergelt C, Donovan G, Melendez P, Morel L, Wu R, Langae T, Rae D** (2009). Association between CARD15/NOD2 gene polymorphisms and paratuberculosis infection in cattle. *Vet. Microbiol.* 134, 346-352.
- Pistone D, Marone P, Pajoro M, Fabbi M, Vicari N, Daffara S, Dalla Valle C, Gabba S, Sassera D, Verri A, Montagna M, Epis S, Monti C, Strada E, Grazioli V, Arrigoni N, Giacosa A, Bandi C** (2012).

- Mycobacterium avium paratuberculosis* in Italy: Commensal or emerging human pathogen? Dig. Liver Dis. 44, 461-465.
- Pitulle C, Dorsch M, Kazda J, Wolters J, Stackebrandt E** (1992). Phylogeny of rapidly growing members of the Genus *Mycobacterium*. Int. J. Syst. Bacteriol. 42, 337-343.
- Plain K, Marsh I, Waldron A, Galea F, Whittington A, Saunders V, Begg D, de Silva K, Purdie A, Whittington R** (2014). High-throughput direct fecal PCR assay for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in sheep and cattle. J. Clin. Microbiol. 52, 745-757.
- Plante Y, Remenda B, Chelack B, Haines D** (1996). Detection of *Mycobacterium paratuberculosis* in formalin-fixed paraffin-embedded tissues by the polymerase chain reaction. Can. J. Vet. Res. 60, 115-20.
- Playfair L** (2001). La vacunación, en: S.A., E.H. (Ed.), Roitt, I. Inmunología. pp. 263-272.
- Pollock J, Andersen P** (1997A). The potential of the ESAT-6 antigen secreted by virulent mycobacteria for specific diagnosis of tuberculosis. J. Infect. Dis. 175, 1251-4.
- Pollock J, Andersen P** (1997B). Predominant recognition of the ESAT-6 protein in the first phase of interferon with *Mycobacterium bovis* in cattle. Infect. Immun. 65, 2587-92.
- Pollock J, Welsh M** (2002). The WC1+ $\gamma\delta$ T-cell population in cattle: a possible role in resistance to intracellular infection. Vet. Immunol. Immunopathol. 89, 105-114.
- 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. Cell. Microbiol. 11, 1802-1815.
- Prabowo S, Gröschel M, Schmidt E, Skrahina A, Mihaescu T, Hastürk S, Mitrofanov R, Pimkina E, Visontai I, de Jong B, Stanford J, Cardona P-J, Kaufmann S, van der Werf T** (2013). Targeting multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB) by therapeutic vaccines. Med. Microbiol. Immunol. 202, 95-104.
- Pruvot M, Kutz S, van der Meer F, Musiani M, Barkema H, Orsel K** (2014). Pathogens at the livestock-wildlife interface in Western Alberta: does transmission route matter? Vet. Res. 45, 18.
- Quirke P** (2001). Antagonist. *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* is a cause of Crohn's disease. Gut 49, 757-60.
- Radosevich T, Reinhardt T, Lippolis J, Bannantine J, Stabel J** (2007). Proteome and differential expression analysis of membrane and cytosolic proteins from *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* strains K-10 and 187. J. Bacteriol. 189, 1109-17.
- Rajya B, Singh C** (1961). Studies on the pathology of Johne's disease in sheep: III. Pathologic changes in sheep with naturally occurring. Am. J. Vet. Res. 22, 189-203.
- Reddacliff L, Eppleston J, Windsor P, Whittington R, Jones S** (2006). Efficacy of a killed vaccine for the control of paratuberculosis in Australian sheep flocks. Vet. Microbiol. 115, 77-90.
- Reddacliff L, Whittington R** (2003). Experimental infection of weaner sheep with S strain *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. Vet. Microbiol. 96, 247-58.
- Reviriego F, Moreno M, Domínguez L** (2000). Soil type as a putative risk factor of ovine and caprine paratuberculosis seropositivity in Spain. Prev. Vet. Med. 43, 43-51.
- Reyes L** (2007). Evaluación de nuevos adyuvantes en la vacunación frente a la paratuberculosis ovina. Tesis Doctoral. Universidad de León. Facultad de Veterinaria.
- Reynolds J, Kennedy L, Peppard J, Pabst R** (1991). Ileal Peyer's patch emigrants are predominantly B cells and travel to all lymphoid tissues in sheep. Eur. J. Immunol. 21, 283-9.
- Reynolds J, Morris B** (1983). The evolution and involution of Peyer's patches in fetal and postnatal sheep. Eur. J. Immunol. 13, 627-635.

- Ricanek P, Lothe S, Szpinda I, Jorde A, Brackmann S, Perminow G, Jørgensen K, Rydning A, Vatn M, Tønjum T, IBSEN II study group** (2010). Paucity of mycobacteria in mucosal bowel biopsies from adults and children with early inflammatory bowel disease. *J. Crohns. Colitis* 4, 561-6.
- Richards W, Thoen C** (1977). Effect of freezing on the viability of *Mycobacterium paratuberculosis* in bovine feces. *J. Clin. Microbiol.* 6, 392-395.
- Rindi L, Garzelli C** (2014). Genetic diversity and phylogeny of *Mycobacterium avium*. *Infect. Genet. Evol.* 21, 375-383.
- Risalde M, Thomas J, Sevilla I, Serrano M, Ortíz J, Garrido J, Domínguez M, Domínguez L, Gortázar C, Ruiz-Fons J** (2017). Development and evaluation of an interferon gamma assay for the diagnosis of tuberculosis in red deer experimentally infected with *Mycobacterium bovis*. *BMC Vet. Res.* 13, 341.
- Robbe-Austerman S, Gardner I, Thomsen B, Morrical D, Martín B, Palmer M, Thoen C, Ewing C** (2006). Sensitivity and specificity of the agar-gel-immunodiffusion test, ELISA and the skin test for detection of paratuberculosis in United States Midwest sheep populations. *Vet. Res.* 37, 553-564.
- Robbi C, Rossi I, Nardelli S, Rossi E, Toson M, Marangon S, Vincenzi G, Vicenzoni G** (2002). Prevalenza di Paratuberculosis (Johne's disease) nella popolazione di bovine da latte della Regione Veneto. *Atti della Soc. Ital. di Buiat.* 34, 283-288.
- Rodriguez-Lazaro D, D'Agostino M, Pla M, Cook N** (2004). Construction strategy for an internal amplification control for real-time diagnostic assays using nucleic acid sequence-based amplification: development and clinical application. *J. Clin. Microbiol.* 42, 5832-5836.
- Rodríguez S** (2000). Desarrollo y evaluación de una prueba ELISA indirecta para el serodiagnóstico de paratuberculosis ovina. Tesina de Licenciatura. Universidad de Córdoba.
- Rogall T, Wolters J, Flohr T, Bottger E** (1990). Towards a phylogeny and definition of species at the molecular level within the Genus *Mycobacterium*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 40, 323-330.
- Roitt I, Delves P, Martin S, Burton D** (2017). *Roitt's Essential Immunology*, 13th editi. ed. New York.
- Rosseels V, Huygen K** (2008). Vaccination against paratuberculosis. *Expert Rev. Vaccines* 7, 817-32.
- Rothel J, Jones S, Corner L, Cox J, Wood P** (1992). The gamma-interferon assay for diagnosis of bovine tuberculosis in cattle: conditions affecting the production of gamma-interferon in whole blood culture. *Aust. Vet. J.* 69, 1-4.
- Rothel J, Jones S, Corner L, Cox J, Wood P** (1990). A sandwich enzyme immunoassay for bovine interferon-gamma and its use for the detection of tuberculosis in cattle. *Aust. Vet. J.* 67, 134-7.
- Roussey J, Steibel J, Coussens P** (2014). Regulatory T cell activity and signs of T cell unresponsiveness in bovine paratuberculosis. *Front. Vet. Sci.* 1, 20.
- Rowan N, MacGregor S, Anderson J, Cameron D, Farish O** (2001). Inactivation of *Mycobacterium paratuberculosis* by Pulsed Electric Fields. *Appl. Environ. Microbiol.* 67.
- Roy G, De Buck J, Wolf R, Mortier R, Orsel K, Barkema H** (2017). Experimental infection with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* resulting in decreased body weight in Holstein-Friesian calves. *Can. Vet. J. = La Rev. Vet. Can.* 58, 296-298.
- Ruiz-Larranaga O, Garrido J, Iriondo M, Manzano C, Molina E, Koets A, Rutten V, Juste R, Estonba A** (2010). Genetic association between bovine NOD2 polymorphisms and infection by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Holstein-Friesian cattle. *Anim. Genet.* 41, 652-655.
- Ryan T, Buddle B, De Lisle G** (2000). An evaluation of the gamma interferon test for detecting bovine tuberculosis in cattle 8 to 28 days after tuberculin skin testing. *Res. Vet. Sci.* 69, 57-61.
- Salgado M, Kruze J, Collins M** (2007). Diagnosis of paratuberculosis by fecal culture and ELISA on milk and serum samples in two types of Chilean dairy goat herds. *J. Vet. Diagnostic Investig.* 19, 99-102.
- Salgado M, Manning E, Monti G, Bölske G, Soderlund R, Ruiz M, Paredes E, Leiva S, Van Kruningen H, Kruze J** (2011). European hares in Chile: a different lagomorph reservoir for *Mycobacterium avium*

- subsp. *paratuberculosis*? J. Wildl. Dis. 47, 734-738.
- Salgame P, Abrams J, Clayberger C, Goldstein H, Convit J, Modlin R, Bloom B** (1991). Differing lymphokine profiles of functional subsets of human CD4 and CD8 T cell clones. *Science* (80-.). 254, 279-282.
- Sanderson J, Moss M, Tizard M, Hermon-Taylor J** (1992). *Mycobacterium paratuberculosis* DNA in Crohn's disease tissue. *Gut* 33, 890-6.
- Sangari F, Goodman J, Petrofsky M, Kolonoski P, Bermudez L** (2001). *Mycobacterium avium* invades the intestinal mucosa primarily by interacting with enterocytes. *Infect. Immun.* 69, 1515-1520.
- Santema W, Hensen S, Rutten V, Koets A** (2009). Heat shock protein 70 subunit vaccination against bovine paratuberculosis does not interfere with current immunodiagnostic assays for bovine tuberculosis. *Vaccine* 27, 2312-2319.
- Santema W, Rutten V, Segers R, Poot J, Hensen S, Heesterbeek H, Koets A** (2013). Postexposure subunit vaccination against chronic enteric mycobacterial infection in a natural host. *Infect. Immun.* 81, 1990-5.
- Sasikala M, Reddy D, Pratap N, Sharma S, Balkumar P, Sekaran A, Banerjee R, Reddy D** (2009). Absence of *Mycobacterium avium* ss *paratuberculosis*-specific IS900 sequence in intestinal biopsy tissues of Indian patients with Crohn's disease. *Indian J. Gastroenterol.* 28, 169-174.
- Saunders B, Cooper A** (2000). Restraining mycobacteria: role of granulomas in mycobacterial infections. *Immunol. Cell Biol.* 78, 334-341.
- Saxegaard F, Fodstad F** (1985). Control of paratuberculosis (Johne's disease) in goats by vaccination. *Vet. Rec.* 116, 439-441.
- Schijns V, Lavelle E** (2011). Trends in vaccine adjuvants. *Expert Rev. Vaccines* 10, 539-550.
- Schleig P, Buergelt C, Davis J, Williams E, Monif G, Davidson M** (2005). Attachment of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* to bovine intestinal organ cultures: Method development and strain differences. *Vet. Microbiol.* 108, 271-279.
- Schwartz D, Shafran I, Romero C, Piromalli C, Biggerstaff J, Naser N, Chamberlin W, Naser S** (2000). Use of short-term culture for identification of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in tissue from Crohn's disease patients. *Clin. Microbiol. Infect.* 6, 303-7.
- Secott T, Lin T, Wu C** (2002). Fibronectin attachment protein is necessary for efficient attachment and invasion of epithelial cells by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Infect. Immun.* 70, 2670-2675.
- Seitz S, Heider L, Heuston W, Bech-Nielsen S, Rings D, Spangler L** (1989). Bovine fetal infection with *Mycobacterium paratuberculosis*. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 194, 1423-1426.
- Semret M, Turenne C, Behr M** (2006). Insertion sequence IS900 revisited. *J. Clin. Microbiol.* 44, 1081-1083.
- Serrano M, Elguezabal N, Sevilla I, Geijo M, Molina E, Arrazuria R, Urkitza A, Jones G, Vordermeier M, Garrido J, Juste R** (2017). Tuberculosis detection in paratuberculosis vaccinated calves: new alternatives against interference. *PLoS One* 12, e0169735.
- Seva J, Sanes J, Ramis G, Mas A, Quereda J, Villarreal-Ramos B, Villar D, Pallares F** (2014). Evaluation of the single cervical skin test and interferon gamma responses to detect *Mycobacterium bovis* infected cattle in a herd co-infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Vet. Microbiol.* 171, 139-46.
- Sevilla I, Aduriz G, Garrido J, Geijo M, Juste R** (1999). A preliminary survey on the prevalence of paratuberculosis in dairy cattle in Spain by bulk milk PCR, en: Manning, E.J.B., Collins, M.T. (Eds.), 6th International Colloquium on Paratuberculosis. Madison, EEUU, pp. 332-336.
- Sevilla I, Garrido J, Geijo M, Juste R** (2007). Pulsed-field gel electrophoresis profile homogeneity of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolates from cattle and heterogeneity of those from sheep and goats. *BMC Microbiol.* 7, 18.

- Sevilla I, Garrido J, Molina E, Geijo M, Elguezal N, Vázquez P, Juste R, Vazquez P, Juste R** (2014). Development and evaluation of a novel multicopy-element-targeting triplex PCR for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in feces. *Appl. Environ. Microbiol.* 80, 3757-3768.
- Sevilla I, Singh S, Garrido J, Aduriz G, Rodríguez S, Geijo M, Whittington R, Saunders V, Whitlock R, Juste R** (2005). Molecular typing of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* strains from different hosts and regions. *Rev. Sci. Tech.* 24, 1061-1066.
- Shams H, Klucar P, Weis S, Lalvani A, Moonan P, Safi H, Wizel B, Ewer K, Nepom G, Lewinsohn D, Andersen P, Barnes P** (2004). Characterization of a *Mycobacterium tuberculosis* peptide that is recognized by human CD4+ and CD8+ T cells in the context of multiple HLA alleles. *J. Immunol.* 173, 1966 LP-1977.
- Sharma B, Abo-Ismael M, Schenkel F, You Q, Verschoor C, Pant S, Karrow N** (2015). Association of TLR4 polymorphisms with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection status in Canadian Holsteins. *Anim. Genet.* 46, 560-565.
- Shephard R, Williams S, Beckett S** (2016). Farm economic impacts of bovine Johne's disease in endemically infected Australian dairy herds. *Aust. Vet. J.* 94, 232-239.
- Shin M-K, Park H, Shin S, Jung M, Lee S, Kim D-Y, Yoo H** (2015). Host transcriptional profiles and immunopathologic response following *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in mice. *PLoS One* 10, e0138770.
- Shin S, Chang C-F, Chang C-D, McDonough S, Thompson B, Yoo H, Chang Y-F** (2005). In vitro cellular immune responses to recombinant antigens of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Infect. Immun.* 73, 5074-85.
- Shin S, Lee B, Koh W, Manning E, Anklam K, Sreevatsan S, Lambrecht R, Collins M** (2010). Efficient differentiation of *Mycobacterium avium* Complex species and subspecies by use of five-target multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol.* 48, 4057-4062.
- Shu D, Subharat S, Wedlock D, Luo D, de Lisle G, Buddle B** (2011). Diverse cytokine profile from mesenteric lymph node cells of cull cows severely affected with Johne's disease. *Clin. Vaccine Immunol.* 18, 1467-76.
- Shulaw W, Bech-Nielsen S, Rings D, Getzy D, Woodruff T** (1993). Serodiagnosis of paratuberculosis in sheep by use of agar gel immunodiffusion. *Am. J. Vet. Res.* 54, 13-9.
- Sibley J, Woodbury M, Appleyard G, Elkin B** (2007). *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in bison (*Bison bison*) from Northern Canada. *J. Wildl. Dis.* 43, 775-779.
- Sidders B, Pirson C, Hogarth P, Hewinson R, Stoker N, Vordermeier H, Ewer K** (2008). Screening of highly expressed mycobacterial genes identifies Rv3615c as a useful differential diagnostic antigen for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Infect. Immun.* 76, 3932-9.
- Sigurðardóttir Ó, Bakke-McKellep A, Djonne B, Evensen Ø** (2005). *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* enters the small intestinal mucosa of goat kids in areas with and without Peyer's patches as demonstrated with the everted sleeve method. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 28, 223-230.
- Sigurðardóttir Ó, Press Cm, Evensen Ø** (2001). Uptake of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* through the distal small intestinal mucosa in goats: an ultrastructural study. *Vet. Pathol.* 38, 184-189.
- Sigurðardóttir Ó, Press Cm, Saxegaard F, Evensen Ø** (1999). Bacterial isolation, immunological response, and histopathological lesions during the early subclinical phase of experimental infection of goat kids with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Vet. Pathol.* 36, 542-550.
- Sigurdsson B** (1960). A killed vaccine against paratuberculosis (Johne's disease) in sheep. *Am. J. Vet. Res.* 21, 54-67.
- Sigurdsson B** (1945). A specific antigen recovered from tissue infected with *M. paratuberculosis* (Johne's bacillus). *J. Immunol.* 51, 279-90.
- Sigurdsson B, Tryggvadóttir A** (1950). Immunization with heat-killed *Mycobacterium paratuberculosis* in

- mineral oil II. J. Bacteriol. 59, 541-3.
- Sigurdsson B, Tryggvadóttir A** (1949). Immunization with heat-killed *Mycobacterium paratuberculosis* in mineral oil. J. Bacteriol. 58, 271-8.
- Simutis F, Chevillat N, Jones D** (2005). Investigation of antigen-specific T-cell responses and subcutaneous granuloma development during experimental sensitization of calves with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. Am. J. Vet. Res. 66, 474-82.
- Singh A, Singh S, Singh P, Sohal J, Singh M** (2011). High prevalence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* ('Indian bison type') in animal attendants suffering from gastrointestinal complaints who work with goat herds endemic for Johne's disease in India. Int. J. Infect. Dis. 15, e677-83.
- Singh G, Singh B, Trajkovic V, Sharma P** (2005). *Mycobacterium tuberculosis* 6kDa early secreted antigenic target stimulates activation of J774 macrophages. Immunol. Lett. 98, 180-188.
- Singh K, Chandel B, Chauhan H, Dadawala A, Singh S, Singh P** (2013). Efficacy of 'indigenous vaccine' using native 'Indian bison type' genotype of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* for the control of clinical Johne's disease in an organized goat herd. Vet. Res. Commun. 37, 109-114.
- Singh S, Singh P, Kumar N, Gupta S, Chaubey K, Singh B, Srivastava A, Yadav S, Dhama K** (2015). Evaluation of goat based «indigenous vaccine» against bovine Johne's disease in endemically infected native cattle herds. Indian J. Exp. Biol. 53, 16-24.
- Singh S, Singh P, Singh A, Sohal J, Gupta V, Vihan V** (2007). Comparative efficacy of an indigenous 'inactivated vaccine' using highly pathogenic field strain of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* 'Bison type' with a commercial vaccine for the control of Capri-paratuberculosis in India. Vaccine 25.
- Singh S, Singh P, Singh A, Sohal J, Sharma M** (2010). Therapeutic effects of a new «indigenous vaccine» developed using novel native «Indian bison Type» genotype of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* for the control of clinical Johne's disease in naturally infected goat herds in India. Vet. Med. Int. 2010, 351846.
- Slocum R** (1982). Combined streptomycin-isoniazid-rifampin therapy in the treatment of Johne's disease in a goat. Can. Vet. J. = La Rev. Vet. Can. 23, 160-3.
- Smith S, Kleinnijenhuis J, Netea M, Dockrell H** (2017). Whole blood profiling of Bacillus Calmette-Guérin-induced trained innate immunity in infants identifies Epidermal Growth Factor, IL-6, Platelet-Derived Growth Factor-AB/BB, and Natural Killer cell activation. Front. Immunol. 8.
- Sockett D, Carr D, Collins M** (1992). Evaluation of conventional and radiometric fecal culture and a commercial DNA probe for diagnosis of *Mycobacterium paratuberculosis* infections in cattle. Can. J. Vet. Res. 56, 148-53.
- Sohal J, Singh S, Tyagi P, Subhodh S, Singh P, Singh A, Narayanasamy K, Sheoran N, Singhsandhu K** (2008). Immunology of mycobacterial infections: with special reference to *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. Immunobiology 213, 585-598.
- Sonawane G, Tripathi B** (2016A). Expression of inflammatory cytokine and inducible nitric oxide synthase genes in the small intestine and mesenteric lymph node tissues of pauci- and multibacillary sheep naturally infected with *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*. Int. J. mycobacteriology 5 Suppl 1, S77-S78.
- Sonawane G, Tripathi B** (2016B). Comparative evaluation of diagnostic tests for the detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in the tissues of sheep affected with distinct pathology of paratuberculosis. Int. J. Mycobacteriology 5, S88-S89.
- Sosa-Martínez L, Lara-García L, Vega-Manriquez X, Morón-Cedillo F, Castrellón-Ahumada V, Maldonado-Castro E, Herrera-Corredor A, Ballesteros-Rodea G, Santos-Días R, Chávez-Gris G** (2018). Seroprevalence of paratuberculosis in goat and bovine cattle of the state of San Luis Potosí, Mexico, en: 14th International Colloquium on Paratuberculosis. Riviera Maya, México, p. 61.
- Soumya M, Pillai R, Antony P, Mukhopadhyay H, Rao V** (2009). Comparison of faecal culture and IS900 PCR assay for the detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in bovine faecal samples.

- Vet. Res. Commun. 33, 781-791.
- Spangler E, Heider L, Bech-Nielsen S, Dorn C** (1991). Serologic enzyme-linked immunosorbent assay responses of calves vaccinated with a killed *Mycobacterium paratuberculosis* vaccine. Am. J. Vet. Res. 52, 1197-200.
- Sreenivasulu D, Krishnaswamy S, Janakiramisharma B** (1986). Study of in vitro techniques to assess the cell-mediated immune responses to vaccination against Johne's disease in sheep. Indian Vet. J. 63, 519-522.
- St Jean G** (1996). Treatment of clinical paratuberculosis in cattle. Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract. 12, 417-30.
- Stabel J** (2006). Host responses to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: a complex arsenal. Anim. Heal. Res. Rev. 7, 61-70.
- Stabel J** (2000A). Cytokine secretion by peripheral blood mononuclear cells from cows infected with *Mycobacterium paratuberculosis*. Am. J. Vet. Res. 61, 754-760.
- Stabel J** (2000B). Transitions in immune responses to *Mycobacterium paratuberculosis*. Vet. Microbiol. 77, 465-473.
- Stabel J** (1998). Johne's disease: a hidden threat. J. Dairy Sci. 81, 283-288.
- Stabel J** (1996). Production of gamma-interferon by peripheral blood mononuclear cells: an important diagnostic tool for detection of subclinical paratuberculosis. J. Vet. Diagn. Invest. 8, 345-50.
- Stabel J, Bannantine J** (2005). Development of a nested PCR method targeting a unique multicopy element, ISMap02, for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in fecal samples. J. Clin. Microbiol. 43, 4744-50.
- Stabel J, Bradner L, Robbe-Austerman S, Beitz D** (2014). Clinical disease and stage of lactation influence shedding of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* into milk and colostrum of naturally infected dairy cows. J. Dairy Sci. 97, 6296-304.
- Stabel J, Khalifeh M** (2008). Differential expression of CD5 on B lymphocytes in cattle infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. Vet. Immunol. Immunopathol. 126, 211-219.
- Stabel J, Palmer M, Harris B, Plattner B, Hostetter J, Robbe-Austerman S** (2009). Pathogenesis of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in neonatal calves after oral or intraperitoneal experimental infection. Vet. Microbiol. 136, 306-313.
- Stabel J, Waters W, Bannantine J, Lyashchenko K** (2011). Mediation of host immune responses after immunization of neonatal calves with a heat-killed *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* vaccine. Clin. Vaccine Immunol. 18, 2079-2089.
- Stabel J, Whitlock R** (2001). An evaluation of a modified interferon-gamma assay for the detection of paratuberculosis in dairy herds. Vet. Immunol. Immunopathol. 79, 69-81.
- Stackebrandt E, Rainey F, Ward-Rainey N** (1997). Proposal for a new hierarchic classification system. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 47, 479-491.
- Stamp J, Watt J** (1954). Johne's disease in sheep. J. Comp. Pathol. 64, 26-40.
- Stenger S, Modlin R** (2002). Control of *Mycobacterium tuberculosis* through mammalian Toll-like receptors. Curr. Opin. Immunol. 14, 452-457.
- Sternberg S, Viske D** (2003). Control strategies for paratuberculosis in Sweden. Acta Vet. Scand. 44, 247-249.
- Stevenson K** (2015). Genetic diversity of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* and the influence of strain type on infection and pathogenesis: a review. Vet. Res. 46, 64.
- Stevenson K, Alvarez J, Bakker D, Biet F, de Juan L, Denham S, Dimareli Z, Dohmann K, Gerlach G, Heron I, Kopečna M, May L, Pavlik I, Sharp J, Thibault V, Willemsen P, Zadoks R, Greig A**

- (2009). Occurrence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* across host species and European countries with evidence for transmission between wildlife and domestic ruminants. *BMC Microbiol.* 9.
- Stevenson K, Hughes V, de Juan L, Inglis N, Wright F, Sharp J** (2002). Molecular characterization of pigmented and nonpigmented isolates of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.* 40, 1798-1804.
- Stewart D, Vaughan J, Stiles P, Noske J, Tizard M, Prowse S, Michalski W, Butler K, Jones S** (2007). A long-term bacteriological and immunological study in Holstein-Friesian cattle experimentally infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and necropsy culture results for Holstein-Friesian cattle, Merino sheep and Angora goats. *Vet. Microbiol.* 122, 83-96.
- Stewart D, Vaughan J, Stiles P, Noske P, Tizard M, Prowse S, Michalski W, Butler K, Jones S** (2006). A long-term study in Angora goats experimentally infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: Clinical disease, faecal culture and immunological studies. *Vet. Microbiol.* 104, 13-24.
- Stewart D, Vaughan J, Stiles P, Noske P, Tizard M, Prowse S, Michalski W, Butler K, Jones S** (2004). A long-term study in Merino sheep experimentally infected with subsp. : clinical disease, faecal culture and immunological studies. *Vet. Microbiol.* 104, 165-178.
- Storset A, Hasvold H, Valheim M, Brun-Hansen H, Berntsen G, Whist S, Djonne B, Press Cm, Holstad G, Larsen H** (2001). Subclinical paratuberculosis in goats following experimental infection: an immunological and microbiological study. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 80, 271-287.
- Stringer L, Wilson P, Heuer C, Hunnam J, Mackintosh C** (2011). Effect of vaccination and natural infection with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* on specificity of diagnostic tests for bovine tuberculosis in farmed red deer (*Cervus elaphus*). *N. Z. Vet. J.* 59.
- Stringer L, Wilson P, Heuer C, Mackintosh C** (2013). A randomised controlled trial of Silirum vaccine for control of paratuberculosis in farmed red deer. *Vet. Rec.* 173, 551-551.
- Sugawara I, Yamada H, Kaneko H, Mizuno S, Takeda K, Akira S** (1999). Role of interleukin-18 (IL-18) in mycobacterial infection in IL-18-gene-disrupted mice. *Infect. Immun.* 67, 2585-9.
- Sweeney R** (1996). Transmission of paratuberculosis. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 12, 305-312.
- Sweeney R, Jones D, Habecker P, Scott P** (1998). Interferon-gamma and interleukin 4 gene expression in cows infected with *Mycobacterium paratuberculosis*. *Am. J. Vet. Res.* 59, 842-7.
- Sweeney R, Uzonna J, 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. *Res. Vet. Sci.* 80, 253-9.
- Sweeney R, Whitlock R, Bowersock T, Cleary D, Meinert T, Habecker P, Pruitt G** (2009). Effect of subcutaneous administration of a killed *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* vaccine on colonization of tissues following oral exposure to the organism in calves. *Am. J. Vet. Res.* 70, 493-7.
- Sweeney R, Whitlock R, Buckley C, Spencer P** (1995). Evaluation of a commercial Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the diagnosis of paratuberculosis in dairy cattle. *J. Vet. Diagnostic Investig.* 7, 488-493.
- Sweeney R, Whitlock R, Hamir A, Rosenberger A, Herr S** (1992). Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* after oral inoculation in uninfected cattle. *Am. J. Vet. Res.* 53, 1312-4.
- Tafti AK, Rashidi K** (2000). The pathology of goat paratuberculosis: gross and histopathological lesions in the intestines and mesenteric lymph nodes. *J. Vet. Med. B. Infect. Dis. Vet. Public Health* 47, 487-95.
- Tanaka S, Itohara S, Sato M, Taniguchi T, Yokomizo Y** (2000). Reduced formation of granulomata in gamma(delta) T cell knockout BALB/c mice inoculated with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Vet. Pathol.* 37, 415-421.
- Tanaka S, Sato M, Onitsuka T, Kamata H, Yokomizo Y** (2005). Inflammatory cytokine gene expression in different types of granulomatous lesions during asymptomatic stages of bovine paratuberculosis. *Vet.*

- Pathol. 42, 579-588.
- Tasara T, Hoelzle L, Stephan R** (2005). Development and evaluation of a *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (MAP) specific multiplex PCR assay. *Int. J. Food Microbiol.* 104, 279-287.
- Taylor A** (1951). Varieties of *Mycobacterium johnei* isolated from sheep. *J. Pathol. Bacteriol.* 63, 333-6.
- Taylor K, Taylor J, White S, Womack J** (2006). Identification of genetic variation and putative regulatory regions in bovine CARD15. *Mamm. Genome* 17, 892-901.
- Tewari D, Hovingh E, Linscott R, Martel E, Lawrence J, Wolfgang D, Griswold D** (2014). *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* antibody response, fecal shedding, and antibody cross-reactivity to *Mycobacterium bovis* in *M. avium* subsp. *paratuberculosis*-infected cattle herds vaccinated against Johne's disease. *Clin. Vaccine Immunol.* 21, 698-703.
- Thoma-Uszynski S, Kiertscher S, Ochoa M, Bouis D, Norgard M, Miyake K, Godowski P, Roth M, Modlin R** (2000). Activation of toll-like receptor 2 on human dendritic cells triggers induction of IL-12, but not IL-10. *J. Immunol.* 165, 3804-3810.
- Thompson K, West D, Anderson P, Burnham D** (2002). Subclinical Johne's Disease in Sheep, en: *New Zealand Society of Animal Production*.
- Thomsen B, Steadham E, Gallup J, Ackermann M, Brees D, Cheville N** (2001). T cell-dependent inducible nitric oxide synthase production and ultrastructural morphology in BALB/c mice infected with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *J. Comp. Pathol.* 125, 137-44.
- 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. s. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 40, 254-260.
- Tiwari A, VanLeeuwen J, McKenna S, Keefe G, Barkema H** (2006). Johne's disease in Canada Part I: clinical symptoms, pathophysiology, diagnosis, and prevalence in dairy herds. *Can. Vet. J. = La Rev. Vet. Can.* 47, 874-82.
- Turenne C, Wallace R, Behr M** (2007). *Mycobacterium avium* in the postgenomic era. *Clin. Microbiol. Rev.* 20, 205-29.
- Uematsu S, Akira S** (2006). Toll-like receptors and innate immunity. *J. Mol. Med.* 84, 712-725.
- USDA** (2008). Johne's Disease on U.S. Dairies, 1991–2007. USDA-APHIS-VS, CEAH, Natl. Anim. Heal. Monit. Syst.
- Uzonna J, Chilton P, Whitlock R, Habecker P, Scott P, Sweeney R** (2003). Efficacy of commercial and field-strain *Mycobacterium paratuberculosis* vaccinations with recombinant IL-12 in a bovine experimental infection model. *Vaccine* 21, 3101-9.
- Valentin-Weigand P, Goethe R** (1999). Pathogenesis of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infections in ruminants: still more questions than answers. *Microbes Infect.* 1, 1121-1127.
- Valheim M, Hasvold H, Storset A, Larsen H, Press Cm** (2002A). Localisation of CD25+ cells and MHCII+ cells in lymph nodes draining *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* vaccination granuloma and the presence of a systemic immune response. *Res. Vet. Sci.* 73, 77-85.
- Valheim M, Storset A, Aleksersen M, Brun-Hansen H, Press Cm** (2002B). Lesions in subclinical paratuberculosis of goats are associated with persistent gut-associated lymphoid tissue. *J. Comp. Pathol.* 127, 194-202.
- Vallée H, Rinjard P** (1926). Etude sur l'entérite paratuberculeuse des bovidés. *Revue. Générale de Médecine Vétérinaire* 409, 1-9.
- van der Burgt G, Drummond F, Crawshaw T, Morris S** (2013). An outbreak of tuberculosis in Lleyn sheep in the UK associated with clinical signs. *Vet. Rec.* 172, 69-69.
- van der Giessen J, Haring R, Vauclare E, Eger A, Haagsma J, van der Zeijst B** (1992). Evaluation of the

- abilities of three diagnostic tests based on the polymerase chain reaction to detect *Mycobacterium paratuberculosis* in cattle: application in a control program. *J. Clin. Microbiol.* 30, 1216-9.
- van der Giessen J, van Dijk L, Bleumink-Plyum N, Eger T, Haagsma J, van der Zeijst B** (1994). The spatial distribution of *Mycobacterium paratuberculosis* in infected cattle. Implications for pathogenesis and diagnosis, en: Chiodini, R., Collins, M. (Eds.), Fourth International Colloquium on Paratuberculosis. Cambridge, Reino Unido.
- Van Kruiningen H, Chiodini R, Thayer W, Coutu J, Merkal R, Runnels P** (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, 1351-60.
- van Schaik G, Kalis C, Benedictus G, Dijkhuizen A, Huirne R** (1996). Cost-benefit analysis of vaccination against paratuberculosis in dairy cattle. *Vet. Rec.* 139, 624-7.
- Vansnick E, Rijk P, Vercammen F, Geysen D, Rigouts L, Portaels F** (2004). Newly developed primers for the detection of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis. *Vet. Microbiol.* 100, 197-204.
- Varges R, Marassi C, Oelemann W, Lilienbaum W** (2009). Interference of intradermal tuberculin tests on the serodiagnosis of paratuberculosis in cattle. *Res. Vet. Sci.* 86, 371-2.
- Vary P, Andersen P, Green E, Hermon-Taylor J, McFadden J** (1990). Use of highly specific DNA probes and the polymerase chain reaction to detect *Mycobacterium paratuberculosis* in Johne's disease. *J. Clin. Microbiol.* 28, 933-7.
- Vaugelade J, Pinchinat S, Guiella G, Elguero E, Simondon F** (2004). Non-specific effects of vaccination on child survival: prospective cohort study in Burkina Faso. *BMJ* 329, 1309.
- Vaughan J, Lenghaus C, Stewart D, Tizard M, Michalski W** (2005). Development of a Johne's disease infection model in laboratory rabbits following oral administration of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Vet. Microbiol.* 105, 207-13.
- Vázquez P, Garrido J, Juste R** (2013). Specific antibody and interferon-gamma responses associated with immunopathological forms of bovine paratuberculosis in slaughtered Friesian cattle. *PLoS One* 8, e64568.
- Vázquez P, Molina E, Alonso-Hearn M, Geijo M, Sevilla I, Estonba A, Ruiz O, Garrido J, Juste R** (2009). Age structure of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in culled Friesian cattle, en: 10th International Colloquium on Paratuberculosis. Minneapolis. Minnesota. EEUU., pp. 185-188.
- Velasova M, Damaso A, Prakashbabu B, Gibbons J, Wheelhouse N, Longbottom D, Van Winden S, Green M, Guitian J** (2017). Herd-level prevalence of selected endemic infectious diseases of dairy cows in Great Britain. *J. Dairy Sci.* 100, 9215-9233.
- Verdugo C, Pleydell E, Price-Carter M, Prattley D, Collins D, de Lisle G, Vogue H, Wilson P, Heuer C** (2014). Molecular epidemiology of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolated from sheep, cattle and deer on New Zealand pastoral farms. *Prev. Vet. Med.* 117, 436-46.
- Verna A, García-Pariente C, Muñoz M, Moreno O, García-Marín J, Romano M, Paolicchi F, Pérez V, Muñoz M, Moreno O, García-Marín J, Romano M, Paolicchi F, Pérez V** (2007). Variation in the immuno-pathological responses of lambs after experimental infection with different strains of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Zoonoses Public Health* 54, 243-52.
- Viale M, Echeverria-Valencia G, Romasanta P, Mon M, Fernandez M, Malchiodi E, Romano M, Gioffré A, Santangelo M** (2014). Description of a novel adhesin of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Biomed Res. Int.* 2014, 729618.
- Villarreal J, Schwartz T, Obst U** (2010). Culture-independent techniques applied to food industry water surveillance--a case study. *Int. J. Food Microbiol.* 141 Suppl, S147-55.
- Vordermeier H, Chambers M, Cockle P, Whelan A, Simmons J, Hewinson R** (2002). Correlation of ESAT-6-specific gamma interferon production with pathology in cattle following *Mycobacterium bovis* BCG vaccination against experimental bovine tuberculosis. *Infect. Immun.* 70.
- Vordermeier H, Whelan A, Cockle P, Farrant L, Palmer N, Hewinson R** (2001). Use of synthetic peptides

- derived from the antigens ESAT-6 and CFP-10 for differential diagnosis of bovine tuberculosis in Cattle. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 8, 571-578.
- Vordermeier M, Gordon S, Hewinson R** (2011). *Mycobacterium bovis* antigens for the differential diagnosis of vaccinated and infected cattle. *Vet. Microbiol.* 151, 8-13.
- Vrieling M, Santema W, Vordermeier M, Rutten V, Koets A** (2013). Hsp70 vaccination-induced primary immune responses in efferent lymph of the draining lymph node. *Vaccine* 31, 4720-4727.
- Waddell L, Rajić A, Stärk 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. *Prev. Vet. Med.* 132, 32-48.
- Wangoo A, Johnson L, Gough J, Ackbar R, Inglut S, Hicks D, Spencer Y, Hewinson R, Vordermeier M, Hewinson G, Vordermeier M** (2005). Advanced Granulomatous Lesions in *Mycobacterium bovis*-infected Cattle are Associated with Increased Expression of Type I Procollagen, $\gamma\delta$ (WC1+) T Cells and CD 68+ Cells. *J. Comp. Pathol.* 133, 223-34.
- Waters W, Miller J, Palmer M, Stabel J, Jones D, Koistinen K, Steadham E, Hamilton M, Davis W, Bannantine J, Begg D, de Silva K, Carter N, Plain K, Purdie A, Whittington R** (2003). Early induction of humoral and cellular immune responses during experimental *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection of calves. *Infect. Immun.* 71, 840-846.
- Waters W, Stabel J, Sacco R, Harp J, Pesch B, Wannemuehler M** (1999). Antigen-specific B-cell unresponsiveness induced by chronic *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection of cattle. *Infect. Immun.* 67, 1593-8.
- Watkins C, Schock A, May L, Denham S, Sales J, Welch L, Sharp J, Stevenson K** (2010). Assessing virulence of vaccine strains of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in a calf model. *Vet. Microbiol.* 146, 63-9.
- Watson D, Colditz I, Andrew M, Gill H, Altmann K** (1994). Age-dependent immune response in Merino sheep. *Res. Vet. Sci.* 57, 152-8.
- Weber M, 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.
- Weiss D, Evanson O, Deng M, Abrahamsen M** (2004). Sequential patterns of gene expression by bovine monocyte-derived macrophages associated with ingestion of mycobacterial organisms. *Microb. Pathog.* 37, 215-224.
- Weiss D, Evanson O, Souza C** (2006). Mucosal immune response in cattle with subclinical Johne's disease. *Vet. Pathol.* 43, 127-35.
- Weiss D, Souza C** (2008). Review paper: modulation of mononuclear phagocyte function by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Vet. Pathol.* 45, 829-41.
- Wentink G, Bongers J, Vos J, Zeeuwen A** (1993). Relationship between negative skin test with Johnin after vaccination and post mortem findings. *Vet. Rec.* 132, 38-9.
- Wentink G, Bongers J, Zeeuwen A, Jaartsveld F** (1994). Incidence of paratuberculosis after vaccination against *M. paratuberculosis* in two infected dairy herds. *Zentralbl. Veterinarmed. B* 41, 517-22.
- Whan L, Grant I, Ball H, Scott R, Rowe M** (2001). Bactericidal effect of chlorine on *Mycobacterium paratuberculosis* in drinking water. *Lett. Appl. Microbiol.* 33.
- Whang J, Lee B, Choi G-E, Cho S-N, Kil P, Collins M, Shin S** (2011). Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism of the *rpoB* gene for identification of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and differentiation of *Mycobacterium avium* subspecies. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 70, 65-71.
- Whipple D, Callihan D, Jarnagin J** (1991). Cultivation of *Mycobacterium Paratuberculosis* from Bovine Fecal Specimens and a Suggested Standardized Procedure. *J. Vet. Diagnostic Investig.* 3, 368-373.

- Whipple D, Kapke P, Vary C** (1990). Identification of restriction fragment length polymorphisms in DNA from *Mycobacterium paratuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.* 28, 2561-2564.
- Whipple D, Palmer M, Slaughter R, Jones S** (2001). Comparison of purified protein derivatives and effect of skin testing on results of a commercial gamma interferon assay for diagnosis of tuberculosis in cattle. *J. Vet. Diagnostic Investig.* 13, 117-122.
- Whist S, Storset A, Larsen H** (2000). The use of interleukin-2 receptor expression as a marker of cell-mediated immunity in goats experimentally infected with *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 73, 207-18.
- Whitlock R** (2000). ELISA and fecal culture for paratuberculosis (Johne's disease): sensitivity and specificity of each method. *Vet. Microbiol.* 77, 387-398.
- Whitlock RH, Buergelt C** (1996). Preclinical and clinical manifestations of paratuberculosis (including pathology). *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 12, 345-356.
- Whittington R, Eamens G, Cousins D** (2003). Specificity of absorbed ELISA and agar gel immuno-diffusion tests for paratuberculosis in goats with observations about use of these tests in infected goats. *Aust. Vet. J.* 81, 71-5.
- Whittington R, Fell S, Walker D, McAllister S, Marsh I, Sergeant E, Taragel C, Marshall D, Links I** (2000A). Use of pooled fecal culture for sensitive and economic detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in flocks of sheep. *J. Clin. Microbiol.* 38, 2550-6.
- Whittington R, Hope A, Marshall D, Taragel C, Marsh I** (2000B). Molecular Epidemiology of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: IS900 Restriction Fragment Length Polymorphism and IS1311 Polymorphism Analyses of Isolates from Animals and a Human in Australia. *J. Clin. Microbiol.* 38, 3240-3248.
- Whittington R, Marsh I, McAllister S, Turner M, Marshall D, Fraser C** (1999). Evaluation of modified BACTEC 12B radiometric medium and solid media for culture of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from sheep. *J. Clin. Microbiol.* 37, 1077-83.
- Whittington R, Marsh I, Reddacliff L** (2005). Survival of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in dam water and sediment. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 5304-5308.
- Whittington R, Marsh I, Saunders V, Grant I, Juste R, Sevilla I, Manning E, Whitlock R** (2011). Culture phenotypes of genomically and geographically diverse *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolates from different hosts. *J. Clin. Microbiol.* 49, 1822-1830.
- Whittington R, Marsh I, Whitlock R** (2001). Typing of IS 1311 polymorphisms confirms that bison (Bison bison) with paratuberculosis in Montana are infected with a strain of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* distinct from that occurring in cattle and other domesticated livestock. *Mol. Cell. Probes* 15, 139-145.
- Whittington R, Marshall D, Nicholls P, Marsh I, Reddacliff L** (2004). Survival and dormancy of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in the environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 2989-3004.
- Whittington R, Whittington A-M, Waldron A, Begg D, de Silva K, Purdie A, Plain K** (2013). Development and validation of a liquid medium (M7H9C) for routine culture of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* to replace modified Bactec 12B medium. *J. Clin. Microbiol.* 51, 3993-4000.
- Whittington R, Windsor P** (2009). In utero infection of cattle with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: A critical review and meta-analysis. *Vet. J.* 179, 60-69.
- Windsor P** (2015). Paratuberculosis in sheep and goats. *Vet. Microbiol.* 181, 161-169.
- Windsor P** (2014). Managing control programs for ovine caseous lymphadenitis and paratuberculosis in Australia, and the need for persistent vaccination. *Vet. Med. Res. Reports Volume 5*, 11.
- Windsor P** (2013). Understanding the efficacy of vaccination in controlling ovine paratuberculosis. *Small Rumin. Res.* 110, 161-164.

- Windsor P** (2006). Research into vaccination against ovine Johne's disease in Australia. *Small Rumin. Res.* 62, 139-142.
- Windsor P, Bush R, Links I, Eppleston J** (2005). Injury caused by self-inoculation with a vaccine of a Freund's complete adjuvant nature (Gudair) used for control of ovine paratuberculosis. *Aust. Vet. J.* 83, 216-20.
- Windsor P, Eppleston J, Dhand N, Whittington R** (2014). Effectiveness of Gudair™ vaccine for the control of ovine Johne's disease in flocks vaccinating for at least 5 years. *Aust. Vet. J.* 92, 263-8.
- Windsor P, Whittington R** (2010). Evidence for age susceptibility of cattle to Johne's disease. *Vet. J.* 184, 37-44.
- Wong S, Grant I, Friedman M, Elliott C, Situ C** (2008). Antibacterial activities of naturally occurring compounds against *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 5986-5990.
- Yamamura M, Uyemura K, Deans R, Weinberg K, Rea T, Bloom B, Modlin R** (1991). Defining protective responses to pathogens: cytokine profiles in leprosy lesions. *Science* (80-.). 254.
- Yokomizo Y, Hiramune T, Isayama Y** (1970). Antibodies produced in a cow naturally infected with Johne's disease. *Natl. Inst. Anim. Health Q. (Tokyo)*. 10, 137-142.
- Yoshimura H, Graham D, Estes M, Merkal R** (1987). Investigation of association of mycobacteria with inflammatory bowel disease by nucleic acid hybridization. *J. Clin. Microbiol.* 25, 45-51.
- Zanetti S, Bua A, Molicotti P, Delogu G, Mura A, Ortu S, Sechi L** (2008). Identification of mycobacterial infections in wild boars in Northern Sardinia, Italy. *Acta Vet. Hung.* 56, 145-152.
- Zimmer K, Dräger K, Klawonn W, Hess R** (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. *Zentralbl. Veterinarmed. B* 46, 137-40.
- Zwick L, Walsh T, Barbiers R, Collins M, Kinsel M, Murnane R** (2002). Paratuberculosis in a mandrill (*Papio sphinx*). *J. Vet. Diagnostic Investig.* 14, 326-328.

