

eman ta zabal zazu



Universidad del País Vasco Euskal Herriko Unibertsitatea

Análisis del potencial epizoótico de cepas de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* aisladas de diversos hospedadores empleando modelos de infección *in vitro*

UNIVERSIDAD DEL PAÍS VASCO

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Farmacia y Ciencias de los Alimentos

Naiara Abendaño Carbajo

2015

eman ta zabal zazu



Universidad
del País Vasco

Euskal Herriko
Unibertsitatea

TESIS DOCTORAL

**Análisis del potencial epizoótico de cepas
de *Mycobacterium avium* subsp.
paratuberculosis aisladas de diversos
hospedadores empleando modelos de
infección *in vitro***

Autor: Naiara Abendaño Carbajo

Directora: Dra. Marta Alonso Fernández-Pacheco

UNIVERSIDAD DEL PAÍS VASCO

Departamento de Farmacia y Ciencias de los Alimentos

Vitoria-Gasteiz, 2015

eman ta zabal zazu



Universidad
del País Vasco

Euskal Herriko
Unibertsitatea

FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE FARMACIA Y CIENCIAS DE LOS ALIMENTOS

Análisis del potencial epizoótico de cepas de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* aisladas de diversos hospedadores empleando modelos de infección *in vitro*

Memoria para optar al grado de Doctor en Biología

por la Universidad del País Vasco

Presentada por: **Naiara Abendaño Carbajo**

Dirigida por: **Dra. Marta Alonso Fernández-Pacheco**

NEIKER-Tecnalia, Instituto Vasco de Investigación y Desarrollo
Agrario



VITORIA-GASTEIZ, 2015

El presente trabajo de Tesis Doctoral ha sido realizado en el Departamento de Sanidad Animal del Instituto Vasco de Investigación y Desarrollo Agrario (NEIKER-Tecnalia). Su desarrollo ha sido posible gracias a una beca de Formación de Tecnólogos e Investigadores del Departamento de Medio Ambiente, Planificación Territorial, Agricultura y Pesca del Gobierno Vasco.

El desarrollo de este trabajo ha sido posible gracias a los proyectos de investigación: "Potencial epizootico y zoonosico de cepas de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* aisladas de ganado y de fauna silvestre" (FAU2008-00018-C02-01) e "Interacciones Bacteria-Hospedador en Infecciones con *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (*Map*): Susceptibilidad de los rumiantes domesticos a la infeccion con distintos genotipos de *Map*" (RTA 2011-00049-00-00), ambos financiados por el Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA) y Fondos Europeos para el Desarrollo Regional (FEDER).

Para el desarrollo de esta tesis doctoral, se ha contado con la colaboración del Departamento de Sanidad Animal del Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario del Principado de Asturias (SERIDA), de la empresa Miltenyi Biotec S.L., el matadero de San Sebastián y con los Servicios Generales de Investigación (SGIker) de la Universidad del País Vasco-Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV-EHU).



La presente Tesis Doctoral ha sido redactada en la modalidad de compendio de publicaciones. A continuación, se presentan las referencias bibliográficas de los seis artículos, publicados o en proceso de publicación, que mantienen una misma unidad temática y se integran en esta Tesis Doctoral:

- **PUBLICACIÓN I: Abendaño N**, Sevilla IA, Prieto JM, Garrido JM, Juste RA, Alonso-Hearn M. 2012. Quantification of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* strains representing distinct genotypes and isolated from domestic and wildlife animal species by use of an automatic liquid culture system. *Journal of Clinical Microbiology*, 50(8):2609-2617.
- **PUBLICACIÓN II: Abendaño N**, Sevilla IA, Prieto JM, Garrido JM, Juste RA, Alonso-Hearn M. 2013a. *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* isolates from sheep and goats show reduced persistence in bovine macrophages than cattle, bison, deer and wild boar strains regardless of genotype. *Veterinary Microbiology*, 163:325-334.
- **PUBLICACIÓN III: Abendaño N**, Juste RA, Alonso-Hearn M. 2013b. Anti-inflammatory and antiapoptotic responses to infection: a common denominator of human and bovine macrophages infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Biomed Research International*, 908348. Review.
- **PUBLICACIÓN IV: Fitzgerald LE**, **Abendaño N**, Juste RA, Alonso-Hearn M. 2014. Three-dimensional *in vitro* models of granuloma to study bacteria-host interactions, drug-susceptibility, and resuscitation of dormant *Mycobacteria*. *Biomed Research International*, 623856. Review.
- **PUBLICACIÓN V: Abendaño N**, Tyukalova L, Barandika JF, Balseiro A, Sevilla IA, Garrido JM, Juste RA, Alonso-Hearn M. 2014. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolates induce *in vitro* granuloma formation and show successful survival phenotype, common anti-inflammatory and antiapoptotic responses within ovine macrophages regardless of genotype or host of origin. *PLoS One*, 9(8):e104238.
- **PUBLICACIÓN VI: Abendaño N**, Tyukalova L, Barandika JF, Balseiro A, Sevilla IA, Garrido JM, Juste RA, Alonso-Hearn M. Improved ruminants's monocyte-derived macrophages infection models to study *Mycobacteria*-host interactions and for vaccine candidates evaluation. *BMC Microbiology*, en revisión.

AGRADECIMIENTOS

*Hay momentos en la vida que
son especiales por sí solos.
Compartirlos con las personas
que quieres los hacen
inolvidables*

Gracias por acompañarme

Al finalizar un trabajo tan arduo y lleno de dificultades como el desarrollo de una tesis doctoral es inevitable pensar que este trabajo hubiese sido imposible sin la participación de personas e instituciones que han facilitado que esta tesis llegue a buen puerto. Por ello, es para mí un verdadero placer utilizar este espacio para ser justo y consecuente con ellas, expresándoles mis agradecimientos.

Es difícil entender la importancia de los agradecimientos de una tesis doctoral hasta que no se ha terminado. En ese momento te das cuenta de cuánto tienes que agradecer a tanta gente. En primer lugar, debo agradecer de manera especial y sincera a mi directora de tesis, la Dra. Marta Alonso, por aceptarme para realizar esta tesis doctoral bajo su dirección. Su apoyo y confianza en mi trabajo y su capacidad para guiar mis ideas ha sido un aporte invaluable, no solamente en el desarrollo de esta tesis, sino también en mi formación como investigadora. También me gustaría agradecer a los doctores Ramón Juste, Joseba Garrido, Iker Sevilla y Jesse Barandika su importante aporte en el desarrollo de este trabajo, sobre todo por su colaboración, asesoramiento, dedicación y esfuerzo, sin los cuales esta tesis no habría sido posible.

Por otro lado, me gustaría expresar mi gratitud a todas las personas de otras instituciones que a lo largo de estos años han contribuido en este trabajo, como son, Dra. Ana Balseiro (SERIDA), Beatriz Ledo y Eduardo Bóveda (Miltenyi Biotec), Alejandro Díez y Ricardo Andrade (SGIker, UPV/EHU) y no me quiero olvidar de los estudiantes de prácticas que nos han ayudado a sacar esta tesis adelante, Lyudmila y Liam.

Quiero expresar también mi más sincero agradecimiento a todo el personal de Neiker, becarios, técnicos, investigadores, personal de mantenimiento, informáticos, personal de administración etc. por lo querida y bien tratada que me he sentido estos años, por los buenos momentos que hemos pasado, por vuestros consejos profesionales y personales, por escucharme y por vuestra disponibilidad, que han hecho posible que este trabajo hoy vea la luz.

Por último, me gustaría agradecer especialmente esta tesis a mi padres, a mi hermana, a David, a mis compañeras de mesa (Elena, Rakel, Belén, Patri y Felix), a mis compis de piso (Sandra y Miri) y por supuesto a la "cuadrilla" por vuestro apoyo incondicional, por haber confiado en mí, por vuestra paciencia, por enseñarme a valorar lo que realmente es importante

en esta vida, por sacarme siempre una sonrisa y por hacerme saber que siempre estaréis ahí.
Todo esto no hubiera sido posible sin vosotr@s!!!!!!

ESKERRIK ASKO DANORI!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!

ÍNDICES

ÍNDICE GENERAL

I. JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO	1
II. INTRODUCCIÓN GENERAL	9
II.1. Impacto económico y social de la paratuberculosis	11
II.2. Etiología	13
II.2.1. Historia y Taxonomía	13
II.2.2. Características morfológicas, bacteriológicas y metabólicas de <i>Map</i>	17
II.2.3. Resistencia ambiental y físico-química de <i>Map</i>	20
II.3. Epidemiología	24
II.3.1. Rango de hospedadores	24
II.3.2. Transmisión.	29
II.3.3. Resistencia a la infección	30
II.3.4. Distribución y prevalencia	33
II.4. Patogenia	37
II.4.1. Entrada de <i>Map</i> en el hospedador	38
II.4.2. Mecanismos de supervivencia de <i>Map</i> en los macrófagos de hospedador	40
II.4.3. Establecimiento y progresión de la infección	44
II.5. Respuesta inmune del hospedador	46
II.5.1. Respuesta inmune anti-inflamatoria inducida tras la interacción de <i>Map</i> con los macrófagos del hospedador	46
II.5.2. Respuesta inmune pro-inflamatoria (Th1) inducida durante la fase subclínica de la infección	48
II.5.3. Respuesta inmune humoral (Th2) inducida en la fase clínica de la infección	49
II.6. Cuadro lesional y signos clínicos	54
II.6.1. Lesiones macroscópicas	54
II.6.2. Lesiones microscópicas	55
II.6.3. Clasificación de las lesiones	56
II.6.4. Signos clínicos	59
II.7. Inmunopatogenia	61
II.8. Diagnóstico	63
II.9. Tratamiento y medidas de control	64

II.9.1. Tratamiento	64
II.9.2. Medidas de control	67
II.10. Modelos de infección paratuberculosa	75
II.10.1. Modelos de infección animal	75
II.10.2. Modelos de infección <i>in vitro</i>	78
II.11. Diferencias entre distintos aislados de <i>Map</i>	80
II.11.1. Diferencias genómicas entre diversos aislados de <i>Map</i>	80
II.11.2. Diferencias en la capacidad de crecimiento de diversos aislados de <i>Map</i> en medios de cultivo	89
II.11.3. Comparación de las características epidemiológicas de diversos aislados de <i>Map</i>	91
II.11.4. Comparación de la virulencia de diversos aislados de <i>Map</i> en infecciones experimentales realizadas en hospedadores naturales	92
II.11.5. Comparación de la patogénesis de diversos aislados de <i>Map in vitro</i>	95
III. OBJETIVOS	99
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	103
V. RESUMEN	125
VI. PUBLICACIONES.	129
VI.1. Quantification of <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> strains representing distinct genotypes and isolated from domestic and wildlife animal species by use of an automatic liquid culture system	135
VI.2. Anti-inflammatory and antiapoptotic responses to infection: a common denominator of human and bovine macrophages infected with <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i>	147
VI.3. <i>Mycobacterium avium</i> subspecies <i>paratuberculosis</i> isolates from sheep and goats show reduced persistence in bovine macrophages than cattle, bison, deer and wild boar strains regardless of genotype	155
VI.4. Three-dimensional <i>in vitro</i> models of granuloma to study bacteria-host interactions, drug-susceptibility, and resuscitation of dormant mycobacteria	167
VI.5. <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> isolates induce <i>in vitro</i> granuloma formation and show successful survival phenotype, common anti-inflammatory and antiapoptotic responses within ovine macrophages regardless of genotype or host of origin	177
VI.6. Improved ruminants' monocyte-derived macrophages infection models to study Mycobacteria-host interactions and for vaccine candidates evaluation	191

VII. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS Y DISCUSIÓN GENERAL	227
VIII. CONCLUSIONES	247
IX. BIBLIOGRAFÍA	251
X. ANEXOS	289
X.1. Abreviaturas	291
X.2. Trabajos pendientes de publicación	295
X.3. Factor de impacto y área temática	295
X.4. Otras contribuciones del doctorando	297

ÍNDICE TABLAS

Tabla I.	Causas directas e indirectas de las pérdidas económicas producidas por la paratuberculosis	11
Tabla II.	Especies y subespecies integrantes del complejo <i>Mycobacterium avium</i>	16
Tabla III.	Características morfológicas, bacteriológicas y metabólicas de <i>Map</i>	20
Tabla IV.	Resumen de alimentos en los que se ha detectado contaminación por <i>Map</i>	23
Tabla V.	Estimaciones de viabilidad de <i>Map</i> en función de las condiciones medioambientales	24
Tabla VI.	Especies de rumiantes silvestres en las que se ha aislado <i>Map</i> por cultivo bacteriológico	26
Tabla VII.	Especies de mamíferos no rumiantes y aves silvestres en las que se ha aislado <i>Map</i> por cultivo bacteriológico	27
Tabla VIII.	Factores ambientales y genéticos que influyen a la susceptibilidad de la infección por <i>Map</i>	30
Tabla IX.	Genes candidatos que pudieran intervenir en la susceptibilidad a la infección por <i>Map</i> en rumiantes	32
Tabla X.	Ejemplos de prevalencia de la paratuberculosis bovina a nivel de rebaño	34
Tabla XI.	Resumen adaptado de las prevalencias individuales de paratuberculosis en Europa en ganado vacuno	35
Tabla XII.	Resumen adaptado de las prevalencias individuales de paratuberculosis en Europa en ovejas y cabras	35
Tabla XIII.	Prevalencias de <i>Map</i> en animales domésticos y silvestres en España	37
Tabla XIV.	Mecanismos de supervivencia intracelular de <i>Map</i>	40
Tabla XV.	Citoquinas más importantes en la respuesta inmune inducida tras una infección con <i>Map</i>	52
Tabla XVI.	Clasificación de las lesiones en bovinos y ovinos según los estudios histopatológicos realizados por González y col. (2005) y Pérez y col. (1996)	57
Tabla XVII.	Capacidad de detección de <i>Map</i> de los ensayos diagnósticos en función de la fase clínica de la enfermedad	63
Tabla XVIII.	Test disponibles para el diagnóstico de la paratuberculosis y su propósito	64
Tabla XIX.	MIC ₅₀ y MIC ₉₀ de 18 cepas de <i>Map</i> y el porcentaje de cepas clasificadas como susceptibles, intermedias y resistentes a 10 medicamentos antimicrobianos de uso común	65

Tabla XX.	Medidas higiénico-sanitarias para el control de la paratuberculosis en las explotaciones	69
Tabla XXI.	Resumen de los ensayos realizados en animales con candidatos vacunales basados en vacunas de proteínas y DNA de <i>Map</i>	73
Tabla XXII.	El ratón y el conejo como modelos de infección paratuberculosa	76
Tabla XXIII.	Algunos métodos de experimentación basados en cultivos celulares. Ventajas e inconvenientes	79
Tabla XXIV.	Nomenclatura de las cepas de <i>Map</i> determinado por diferentes técnicas de tipado	81
Tabla XXV.	Polimorfismos presentes en las cepas Tipo S y ausentes en las cepas Tipo C	82
Tabla XXVI.	Resumen de las deleciones en las cepas Tipo S con respecto a las cepas Tipo C	83
Tabla XXVII.	Genes presentes en la cepa K-10 (Tipo C) y ausentes en la cepa MAP S397 (Tipo-S)	85
Tabla XXVIII.	Comparación de las características genómicas de las cepas K-10,S397, JQ5 y MAP4 de <i>Map</i>	87
Tabla XXIX.	Características de cultivo descritas para las cepas Tipo S y Tipo C de <i>Map</i>	89
Tabla XXX.	Infecciones experimentales realizadas en rumiantes para estudiar la virulencia de distintos aislados de <i>Map</i>	93
Tabla XXXI.	Aislados de <i>Map</i> incluidos en el estudio	106
Tabla XXXII.	Primers específicos utilizados para la detección de MAP1485, MAP1487c, MAP1738, MAP2325 y MAP16S por PCR	107
Tabla XXXIII.	Crecimiento en medio líquido (7H9) y sólidos (HEYM, LJ, 7H11) de los aislados de <i>Map</i> seleccionados	110
Tabla XXXIV.	Genes bovinos seleccionados, primers correspondientes utilizados en las reacciones de qRT-PCR y concentración óptima para cada gen	115
Tabla XXXV.	Genes ovinos seleccionados, primers correspondientes utilizados en las reacciones de qRT-PCR y concentración óptima para cada gen	116
Tabla XXXVI.	Resumen de los test estadísticos utilizados	123
Tabla XXXVII.	Modelo GLM de comparación estadística de los valores de UFCs globales estimados en los modelos celulares bovinos y ovinos cuando el tiempo p.i., modelo y tipo celular se consideraron como variables principales.	240

ÍNDICE FIGURAS

Figura 1.	Árbol filogenético de las diversas especies y subespecies de micobacterias basado en la secuencia parcial 16S rRNA	14
Figura 2.	Fotografía de <i>Map</i> obtenida con microscopio electrónico de barrido	17
Figura 3.	Esquema de la pared celular de <i>Map</i>	18
Figura 4.	Principales vías de transmisión de <i>Map</i> a los humanos	21
Figura 5.	Entrada de <i>Map</i> por vía oral	38
Figura 6.	Tácticas utilizadas por <i>Map</i> para atravesar la barrera intestinal e invadir los macrófagos	40
Figura 7.	Inhibición de la maduración del fagosoma que contiene a <i>Map</i> y su fusión con lisosomas	42
Figura 8.	Estructura de un granuloma	45
Figura 9.	Representación esquemática de las etapas del proceso de infección micobacteriana	48
Figura 10.	Representación esquemática de la formación de los granulomas, diseminación de la infección y el paso de una respuesta inmune Th1 a Th2	50
Figura 11.	Resumen esquematizado de la respuesta inmune inducida en el hospedador en respuesta a la infección por <i>Map</i>	53
Figura 12.	Lesiones macroscópicas en el íleon típicas de la paratuberculosis bovina	55
Figura 13.	Lesiones microscópicas asociadas a la paratuberculosis bovina	58
Figura 14.	Signos clínicos de la paratuberculosis bovina	60
Figura 15.	Formas inmunopatológicas de la paratuberculosis	62
Figura 16.	Representación esquemática de las 3 etapas del modelo de programa de control básico de la paratuberculosis bovina	68
Figura 17.	Análisis comparativo del genoma de la cepa K-10 y la cepa ovina S397	84
Figura 18.	Filogenia de distintos aislados de <i>Map</i> basada en la presencia de SNPs en todo el genoma	88
Figura 19.	Modelos de infección temprana: (A) MDMs bovinos, (B) MDMs ovinos y (C) BoMac	108
Figura 20.	Esquema de la obtención de PBMCs mediante un gradiente con Ficoll	109
Figura 21.	Sistema de cultivo BACTEC MGIT 960	111
Figura 22.	Curvas de amplificación y curvas de disociación de los genes bovinos seleccionados	115

Figura 23.	Curvas de amplificación y curvas de disociación de los genes ovinos seleccionados	116
Figura 24.	Fotografía al microscopio invertido de contraste de fases de microgranulomas generados tras la infección de PBMCs ovinos con <i>Map</i> (20X)	118
Figura 25.	Esquema de la separación celular inmunomagnética utilizando la tecnología MACS	120
Figura 26.	Entrada, crecimiento y supervivencia de los aislados de <i>Map</i> seleccionados en BoMac	234
Figura 27.	Entrada, crecimiento y supervivencia de los aislados de <i>Map</i> seleccionados en MDMs bovinos	235
Figura 28.	Dendrograma mostrando el agrupamiento de los dos aislados de <i>Map</i> de acuerdo a su contenido en ácidos grasos en diferentes condiciones medioambientales	243
Figura 29.	Ácidos grasos con contenido significativamente distinto entre la cepa K-10 de <i>Map</i> y el aislado ovino S397 expuestos durante 4 h al ambiente extracelular de células BoMac y MOCL-4	244

I. JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO

I. JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO

Mycobacterium avium subsp. *paratuberculosis* (*Map*) es el agente causal de la paratuberculosis o enfermedad de Johne, una enteritis crónica contagiosa que afecta fundamentalmente a rumiantes domésticos y silvestres. El principal mecanismo de transmisión de la infección es la vía fecal-oral. Los animales se infectan bien por vía directa al ingerir las heces de animales infectados o bien indirectamente al ingerir agua, leche, calostro o pienso contaminado con *Map* (Sweeney, 1996). Una vez ingerida, *Map* atraviesa las células M que tapizan los folículos linfoides de las placas de Peyer del epitelio intestinal. Una vez en la submucosa, la bacteria es fagocitada por los macrófagos subepiteliales del hospedador, donde reside en unas vacuolas denominadas fagosomas (Bermudez y col., 2010). A pesar de que el interior de los macrófagos constituye un ambiente hostil para la mayoría de las bacterias patógenas, las cepas virulentas de *Map* han desarrollado estrategias que le permiten sobrevivir y multiplicarse en el interior de los macrófagos del hospedador. Entre estas estrategias caben destacar: la inhibición de la maduración del fagosoma y su fusión con el lisosoma, la reducción de los niveles de reactivos oxigenados, la alteración de la capacidad de los macrófagos infectados para presentar antígenos bacterianos a las células T y la inhibición de la apoptosis de los macrófagos infectados (Arsenault y col., 2014). Durante el transcurso de la infección, algunos de los macrófagos infectados pueden activarse y secretar citoquinas y quimioquinas que desencadenan una respuesta inflamatoria cuyo resultado es el reclutamiento de macrófagos y linfocitos T de la sangre y tejidos al sitio de la infección. Esta acumulación de células alrededor de los macrófagos infectados se denomina granuloma. *Map* es capaz de persistir en el interior de los granulomas en un estado latente, que puede extenderse durante varios años. En condiciones estresantes para el animal; por ejemplo después del parto, *Map* puede llegar a reactivarse, escapar de los granulomas y originar nuevas lesiones en otras zonas del tejido intestinal infectado y en otros órganos del animal infectado.

La patogenia de la paratuberculosis engloba los mecanismos utilizados por *Map* para infectar y persistir en el animal. Las moléculas implicadas en las interacciones *Map*-hospedador en los distintos estadios de la infección no se conocen en profundidad, ni tampoco se ha determinado con exactitud su mecanismo de actuación. A pesar de que se ha trabajado en la generación de mutantes de algunos genes potencialmente implicados en la virulencia de *Map* no se ha podido determinar el papel de éstos debido fundamentalmente a la falta de

métodos fiables y rápidos de cuantificación de células viables de *Map*. Debido a su lenta velocidad de replicación y a su tendencia a agruparse, *Map* ha sido difícil de cuantificar por los métodos bacteriológicos de rutina (Elguezabal y col., 2011). La cuantificación de la carga bacteriana suele realizarse mediante el conteo del número de bacterias en el microscopio óptico, mediante reacción en cadena de la polimerasa (polymerase chain reaction; PCR) o espectrofotometría, pero estos métodos sobre-estiman la carga bacteriana al cuantificar bacteria viva y muerta. Como alternativa, el cultivo bacteriológico de *Map* en medio sólido sí que proporciona una estimación real del número de células viables. Sin embargo, no todas las cepas de *Map* crecen en los mismos medios sólidos y a veces son necesarios varios meses en cultivo y la realización de varias réplicas de diluciones seriadas para poder cuantificar el número de colonias presentes en un inóculo. Además, los métodos estándar de recuento en placa son costosos y con frecuencia fallan por contaminación o por deshidratación del medio durante el largo período de incubación. En contrapartida, los sistemas automáticos de detección micobacteriana que utilizan un medio líquido para el cultivo bacteriológico, tales como el sistema BACTEC MGIT 960, tienen mejor sensibilidad analítica y requieren menos tiempo para el crecimiento de las micobacterias (Cruciani, 2004). El sistema BACTEC MGIT 960 se utiliza habitualmente para la detección de *Map* y hasta la realización de esta tesis sólo se había utilizado para la cuantificación de cepas de *Map* aisladas de bovino y de humanos (Shin y col., 2007). Este sistema no se había utilizado previamente para la cuantificación de cepas de *Map* aisladas de animales silvestres o de especies domésticas distintas del ganado vacuno, ni tampoco se había aplicado para determinar la carga bacteriana en el interior de los macrófagos infectados del hospedador. Este método, por lo tanto, no se había utilizado con anterioridad en el estudio de las interacciones que tienen lugar en los estadios iniciales de la infección entre la bacteria y los macrófagos del hospedador. El estudio de los estadios iniciales de la interacción bacteria-hospedador es fundamental para poder determinar si un aislado determinado de *Map* es capaz de inducir una respuesta inmune de tipo anti-inflamatorio y anti-apoptótico que le permita sobrevivir en el interior de los macrófagos del hospedador. La generación de este tipo de respuesta puede utilizarse como un marcador de infección y de virulencia de *Map*.

Las cepas de *Map* se han clasificado atendiendo a un polimorfismo genético en la secuencia de inserción IS1311 en cepas Tipo S, Tipo C y Tipo B (Whittington y col., 2001a, Marsh y col., 2006). En cuanto a su aislamiento, las cepas Tipo S se han aislado predominantemente pero no exclusivamente de ovino y caprino lo que sugería cierta

preferencia y adaptación de este tipo de cepas por los pequeños rumiantes. Las cepas Tipo C presentan un amplio rango de hospedadores y son las cepas más comúnmente aisladas de animales silvestres y de ganado bovino. Las cepas Tipo B se han aislado principalmente del bisonte americano y de ovejas de la India. Tras la secuenciación del genoma completo de varios aislados de *Map* se ha confirmado la división de los aislados de *Map* en dos grandes grupos; Tipo I (o S) y Tipo II (o C) (Stevenson, 2015). Un análisis más detallado de las cepas Tipo B mediante secuenciación completa de su genoma ha revelado que las cepas de este tipo aisladas de animales de la India eran diferentes de los aislados de bisonte de Estados Unidos y ambas se consideran en la actualidad subtipos del Tipo C (Stevenson, 2015). A pesar de que las distintas cepas de *Map* emplearían un único protocolo de infección, su capacidad para sobrevivir en los macrófagos del hospedador parecía ser variable. Por ello, al inicio de esta tesis doctoral nos planteamos las siguientes cuestiones:

1. ¿Son todas los aislados/genotipos de *Map* igualmente virulentas?
2. ¿Son todos los rumiantes igualmente susceptibles a la infección con diversos aislados de *Map*?
3. ¿Es posible correlacionar las respuestas inmunes inducidas en el hospedador con la virulencia de cada aislado/genotipo de *Map*?

Un conocimiento preciso de la capacidad infectiva de distintos aislados de *Map* permitiría determinar que aislados/genotipos de *Map* representan un riesgo potencial para la salud y producción animal de las principales especies ganaderas. Este análisis de riesgo, permitiría determinar si es necesario incluir el tipado de las cepas de *Map* en los programas de control y certificación de la paratuberculosis y podría influir en la toma de decisiones a la hora de introducir medidas de control que eviten el contacto y la transmisión de *Map* entre ciertas especies ganaderas y/o especies silvestres.

En infecciones experimentales en rumiantes se ha evidenciado variación en el grado de patogenicidad o virulencia entre cepas de *Map* de distinto origen en un mismo hospedador, así como la diferente virulencia que puede tener una cepa concreta de *Map* en una especie animal u otra. Así, Stewart y col. (2004, 2006 y 2007) demostraron que bovinos, ovinos y caprinos podían infectarse con cepas de *Map* de origen bovino y ovino, si bien el efecto de dichas cepas era diferente según el hospedador. Mientras que en bovino y caprino se observó una mayor patogenicidad de las cepas bovinas frente a las ovinas, en las ovejas infectadas con

cepas bovinas u ovinas, los patrones de respuesta y la enfermedad clínica fueron similares. Sin embargo, hay que tener en cuenta que en estas infecciones experimentales no se especifica el genotipo de la cepa empleada en el experimento, únicamente su origen. Por otro lado, hay que considerar que generalmente las infecciones experimentales se realizan empleando altas concentraciones de *Map* por lo que no reflejan exactamente lo que ocurre en condiciones de campo en donde la exposición a pequeñas cantidades de *Map* por un tiempo prolongado es suficiente para desencadenar la infección (Hines y col., 2007). Finalmente, es importante considerar el elevado coste económico que supone la realización de las infecciones experimentales puesto que requieren de largos periodos de incubación, hasta que las lesiones típicas y los signos clínicos asociados a la enfermedad son apreciables en los animales infectados. Debido a la variabilidad genética que existe entre animales, en las infecciones experimentales es preciso utilizar un número elevado de éstos durante un tiempo prolongado para obtener resultados fiables, lo que resulta muy costoso. Una alternativa a las infecciones experimentales en rumiantes es la utilización de animales de experimentación por su facilidad de manejo y bajo coste de mantenimiento. Sin embargo, existen diferencias anatómicas, fisiológicas e inmunológicas entre los animales de laboratorio y los rumiantes.

Los modelos de infección *in vitro*, además de presentar ciertas ventajas sobre las infecciones experimentales como son la reproducibilidad del ensayo, reducción de costo y tiempo en la realización de los ensayos, permiten comparar simultáneamente la virulencia de un gran número de aislados de *Map*, sobre todo si se combina con un método rápido y fiable que permita cuantificar y comparar la carga bacteriana presente, como es el caso del sistema BACTEC MGIT 960. Hasta la realización de esta tesis doctoral, los estudios *in vitro* de comparación de la virulencia de diversas cepas de *Map* se habían realizado únicamente en macrófagos bovinos, utilizando pocas cepas y sin genotipo determinado y nunca se habían incluido cepas silvestres de *Map* en los análisis. Janagama y col. (2006) demostraron que las cepas bovinas y humanas eran capaces de sobrevivir mejor que las cepas ovinas en el interior de macrófagos bovinos infectados a las 24, 48 y 96 horas post-infección (p.i.). Sin embargo, para evaluar el número de bacterias en el interior de los macrófagos infectados utilizaron la técnica de PCR que al cuantificar ácido desoxirribonucleico (deoxyribonucleic acid; DNA) tanto de bacteria viva como muerta sobre-estima la carga bacteriana. Previamente, solo algunos estudios habían evaluado *in vitro* los perfiles de expresión de genes del sistema inmune inducidos por cepas bovinas de *Map* en macrófagos bovinos obtenidos de animales sanos y en líneas celulares de macrófagos bovinos (Weiss y col., 2004; Janagama y col., 2006;

Murphy y col., 2006). En conjunto, los resultados de estos estudios transcriptómicos sugerían que tras una infección con *Map* se produce un bloqueo de los mecanismos de defensa pro-inflamatorios, lo que explicaría la persistencia y la inhibición de la apoptosis de las cepas virulentas de *Map* en el interior de los macrófagos infectados. Además, se demostró que las respuestas inmunes inducidas en macrófagos bovinos frente a una infección con *Map* parecían depender del aislado bacteriano (Motiwala y col., 2006; Gollnick y col., 2007). En concreto, las cepas bovinas y humanas se comportarían de manera similar y serían más virulentas que las cepas ovinas atendiendo al perfil de expresión de ciertos marcadores de respuesta inmune del hospedador. Mientras las cepas bovinas y humanas inducirían una respuesta celular de tipo anti-inflamatorio que les permitiría sobrevivir en el interior del macrófago infectado, las cepas de origen ovino provocarían una respuesta pro-inflamatoria en los macrófagos infectados dirigida a eliminar a la bacteria del macrófago infectado. A pesar de que al comienzo de esta tesis doctoral se habían realizado estudios transcriptómicos evaluando las respuestas inmunes inducidas por cepas de origen bovino y ovino de *Map* en macrófagos bovinos, ninguno de estos estudios había establecido posibles correlaciones entre la carga bacteriana presente en el interior de los macrófagos infectados con la respuesta inmune inducida. Por otro lado, previamente no se había realizado un análisis transcripcional de las respuestas inmunes inducidas en macrófagos ovinos infectados con distintas cepas de *Map*. Para la realización de estos estudios era necesario definir previamente los marcadores inmunológicos de infección que permitirían diferenciar claramente las respuestas inmunes inducidas por cepas de *Map* con distinta virulencia en estadios iniciales de la infección.

Aunque los modelos de infección *in vitro* empleando macrófagos pueden proporcionar información acerca de la interacción *Map*-hospedador en las primeras etapas de la infección, este modelo celular no es capaz de reproducir etapas posteriores de la infección, tales como las primeras etapas de la formación de granulomas. Para abordar esta cuestión se han desarrollado recientemente modelos *in vitro* de granulomas humanos tras una infección con *M. tuberculosis*, *M. bovis* y *M. leprae* (Puissegur y col., 2004; Birkness y col., 2007; Kapoor y col., 2013; Wang y col., 2013). Estos modelos han permitido demostrar que la capacidad para desarrollar granulomas bien definidos se correlaciona con la severidad de las infecciones micobacterianas, por lo que podrían servir para evaluar la virulencia de diversas cepas de *Map*. Los modelos *in vitro* de granuloma presentan ciertas ventajas sobre las infecciones experimentales o los modelos animales como son su bajo coste, mayor control experimental y el hecho de que pueden ayudar a comprender las interacciones *Map*-hospedador en las etapas

iniciales de formación de los granulomas que son difícilmente abordables con modelos animales, pues cuando las lesiones se pueden visualizar *in vivo* generalmente ya están bien constituidas. Hasta la realización de esta tesis doctoral, no se había desarrollado un modelo *in vitro* de granuloma bovino y ovino tras una infección con *Map*.

La mayoría de los estudios *in vitro* en los que se ha comparado la virulencia y perfil transcriptómico de cepas de *Map* se han realizado con monocitos purificados a partir de sangre periférica con métodos tradicionales y posteriormente cultivados *in vitro* para su diferenciación a macrófagos. Sin embargo, el aislamiento de monocitos de sangre periférica con alta pureza es crucial para la generación *in vitro* de un número suficiente de macrófagos y para aumentar la sensibilidad de los ensayos posteriores. Entre los ensayos que pueden requerir la utilización de macrófagos con alto grado de pureza se pueden incluir los ensayos de capacidad fagocítica dirigidos a evaluar la eficacia de ciertos prototipos vacunales, sobre todo cuando se trata de determinar la dosis vacunal más eficaz. En investigación biomédica, la selección positiva de monocitos CD14 + se realiza empleando la tecnología de selección celular magnética (magnetic activated cell sorter; MACS). Esta tecnología se basa en la utilización de nanopartículas magnéticas funcionalizadas con un anticuerpo que permite la separación inmunomagnética de un tipo celular concreto; en este caso de monocitos CD14 + (Grützkau y Radbruch, 2010). Hasta la realización de esta tesis doctoral, no se había diseñado un protocolo para la purificación selectiva de monocitos CD14 + a partir de sangre periférica de rumiantes vacunados y control que permitiera evaluar de manera rápida y en condiciones *ex vivo* la eficacia vacunal.

II. INTRODUCCIÓN GENERAL

II. INTRODUCCIÓN GENERAL

II.1. IMPACTO ECONÓMICO Y SOCIAL DE LA PARATUBERCULOSIS

La paratuberculosis es una enteritis granulomatosa crónica causada por *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (*Map*) que afecta a un amplio rango de hospedadores, fundamentalmente rumiantes domésticos y salvajes. Aunque la paratuberculosis se conoce desde hace más de cien años, en la actualidad esta infección sigue representando un gran desafío científico y es objeto de vigilancia epidemiológica por parte de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) quien establece la obligatoriedad de su notificación. En 2007, la paratuberculosis fue incluida por la OIE en la lista B de enfermedades transmisibles por considerarse una enfermedad importante desde el punto de vista socioeconómico y/o sanitario.

La paratuberculosis se considera una enfermedad de distribución mundial, y en la actualidad constituye uno de los principales procesos patológicos que afecta a los rumiantes domésticos. Los datos actuales estiman que sobre el 50 % de los rebaños bovinos de leche de Europa y Norte América podrían estar infectados con paratuberculosis, por lo que la enfermedad podría considerarse de endémica en estas regiones (Nielsen y Toft, 2009). La paratuberculosis ocasiona graves pérdidas económicas en las explotaciones productoras de ganado ovino (*Ovis aries*), caprino (*Capra hircus*) y bovino (*Bos taurus*) (Barkema y col., 2010). Las principales pérdidas económicas causadas por la paratuberculosis son debidas a la muerte prematura, descenso de fertilidad y producción láctea de los animales infectados, así como, por el aumento de su predisposición a padecer otras enfermedades (Hasanova y Pavlik, 2006). En la Tabla I se muestran las causas directas e indirectas de las pérdidas económicas producidas por la paratuberculosis.

Tabla I. Causas directas e indirectas de las pérdidas económicas producidas por la paratuberculosis.

Pérdidas Económicas Directas	Pérdidas Económicas Indirectas
<ul style="list-style-type: none"> • Mortalidad de animales clínicamente enfermos • Disminución de la producción de leche • Cambios en parámetros de calidad de la leche: aumento de los recuentos de células somáticas y aumento de la incidencia de la mastitis • Disminución de la fertilidad • Disminución de la edad de producción de los animales • Predisposición a otras enfermedades: artritis, dermatitis, mastitis 	<ul style="list-style-type: none"> • Sacrificio prematuro de los animales • Gastos por reemplazo de animales • Gastos de asistencia veterinaria • Gastos de los programas de control • Pérdida del valor genético de los animales • Gastos asociados a las restricciones impuestas por el mercado o por la legislación • Gastos por la pérdida de reputación de una granja con animales infectados con <i>Map</i>

Basado en Hasanova y Pavlik, 2006.

En Estados Unidos, las pérdidas económicas anuales debidas a la paratuberculosis en las granjas lecheras se estimaron en unos 1.5 billones de dólares, con un coste aproximado de unos 200 dólares por animal infectado (Ott y col., 1999; Losinger, 2006). En España, disponemos de estimaciones de pérdidas anuales por mortalidad, disminución de la lactación y descenso de la fertilidad que supondrían sólo en la Comunidad Autónoma del País Vasco unos 1.1 millones de euros en ganado ovino (Aduriz y col., 1993).

Además del interés veterinario de la paratuberculosis en relación con la producción de las especies tradicionales, la paratuberculosis tiene también el carácter de enfermedad emergente al haber sido identificada en rumiantes silvestres y en especies no rumiantes domésticas y salvajes. La cada vez mayor proximidad entre los animales domésticos y las especies silvestres hace que se facilite la transmisión de la enfermedad, pudiendo actuar la fauna silvestre como reservorio o vehículo de transmisión de *Map* de unas explotaciones a otras. En España, *Map* es endémico en ciervos (*Cervus elaphus*) (Reyes-García y col., 2008) y gamos (*Dama dama*) de la costa norte (Marco y col., 2002) y ha sido identificado esporádicamente en jabalíes (*Sus scrofa*) (Alvarez y col., 2005), conejos (*Oryctolagus cuniculus*) (Maio y col., 2011) y tejones (*Meles meles*) (Matos y col., 2014).

Por otro lado, la enfermedad es importante por su potencial zoonótico ya que se ha asociado la presencia de *Map* con la enfermedad de Crohn, una enfermedad intestinal de humanos que presenta similitudes con la paratuberculosis. Así, se han observado similitudes clínicas y lesionales entre la enfermedad de Crohn en humanos y la paratuberculosis en rumiantes y se ha demostrado que pacientes de Crohn responden favorablemente a drogas con actividad anti-*Map* (Behr y Kapoor, 2008; Juste y col., 2008). Por otro lado, *Map* ha sido identificada en leche, sangre y tejidos de pacientes de Crohn mediante técnicas moleculares e histopatológicas (Naser y col., 2000; Bull y col., 2003; Juste y col., 2009). Además de con la enfermedad de Crohn, *Map* se ha asociado a otras patologías inflamatorias autoinmunes, como por ejemplo, la sarcoidosis (El-Zaatari y col., 1996), la tiroiditis de Hashimoto (Sisto y col., 2010), el síndrome Blau (Dow y Ellingson, 2010), la diabetes tipo 1 (Naser y col., 2013) o la esclerosis múltiple (Frau y col., 2015).

II.2. ETIOLOGÍA

II.2.1. Historia y Taxonomía

Mycobacterium avium subsp. *paratuberculosis* (Map) es el agente causal de la paratuberculosis o enfermedad de Johne. Este bacilo ácido-alcohol resistente fue identificado por primera vez por Johne y Frothingam en 1895 mediante tinción de Ziehl-Neelsen (ZN) de muestras de tejido intestinal de una vaca de raza Frisona que presentaba lesiones que recordaban a las descritas para la tuberculosis intestinal. Por ello, y dadas las dimensiones de los bacilos, atribuyeron la etiología de este proceso “tuberculoso atípico” al agente causante de la tuberculosis en las aves, que actualmente se designa como *Mycobacterium avium* subsp. *avium* (Mijls y col., 2002). En 1912, la enfermedad se consideró como una enfermedad distinta de la tuberculosis y la bacteria pasó a denominarse “*Mycobacterium enteritidis chronicae pseudotuberculosis bovis*” (Twort e Ingram, 1912). Más tarde pasó a denominarse *Bacterium paratuberculosis* (Bergey y col., 1923), *Bacillus paratuberculosis* (Krasilnikov, 1941) y más tardíamente *Mycobacterium johnei* por Francis en 1943. A finales del siglo XX, primero Saxegaard y Baess (1988) y posteriormente Thorel y col. (1990) demostraron la existencia de una alta homología genética entre el agente causal de la paratuberculosis y *M. avium* subsp. *avium*, lo que hizo que se reconsiderase como una subespecie de *M. avium* y se aceptara la denominación que actualmente sigue vigente: *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*.

Map pertenece al género *Mycobacterium* (Lehmann y Neumann, 1896). Actualmente, este género comprende 147 especies de micobacterias. Desde el punto de vista taxonómico, las micobacterias están incluidas en la división *Firmicutes*, clase *Actinomycetes*, subclase *Actinobacteridae*, orden *Actinomycetales*, suborden *Corynebacterineae*, familia *Mycobacteriaceae*, género *Mycobacterium* (Shinnick y Good, 1994). Esta clasificación estaba basada en dos características presentes en todos los miembros del género: la morfología (bacilos inmóviles) y la ácido-alcohol resistencia (Lehmann y Neumann, 1896). En la actualidad, los requisitos mínimos para la inclusión de una especie bacteriana dentro del género *Mycobacterium* son la ácido-alcohol resistencia, la presencia de ácidos micólicos de 60-90 átomos de carbono de longitud y un 61-71 % de GC (guanina, citosina) en su genoma (Levy-Frebault y Portaels, 1992).

II. INTRODUCCIÓN GENERAL

La presencia de ciertos polimorfismos en las secuencias de algunos genes diana ha permitido realizar una clasificación taxonómica de las micobacterias. Uno de los genes diana más comúnmente empleado es el gen del RNA ribosómico 16S (ribosomic RNA 16S; rRNA 16S) que se caracteriza por tener una longitud aproximada de 1500 nucleótidos y presentar regiones altamente conservadas y dos regiones hipervariables (A y B) en todas y cada una de las especies micobacterianas (Boddinghaus y col., 1990). Para la identificación y clasificación de las diferentes especies micobacterianas, la secuenciación de la región hipervariable A suele ser suficiente, aunque cuando se requiere confirmación se suele secuenciar también la región B. El árbol filogenético de algunas especies de micobacterias basado en la secuencia parcial del rRNA 16S se muestra en la Figura 1.

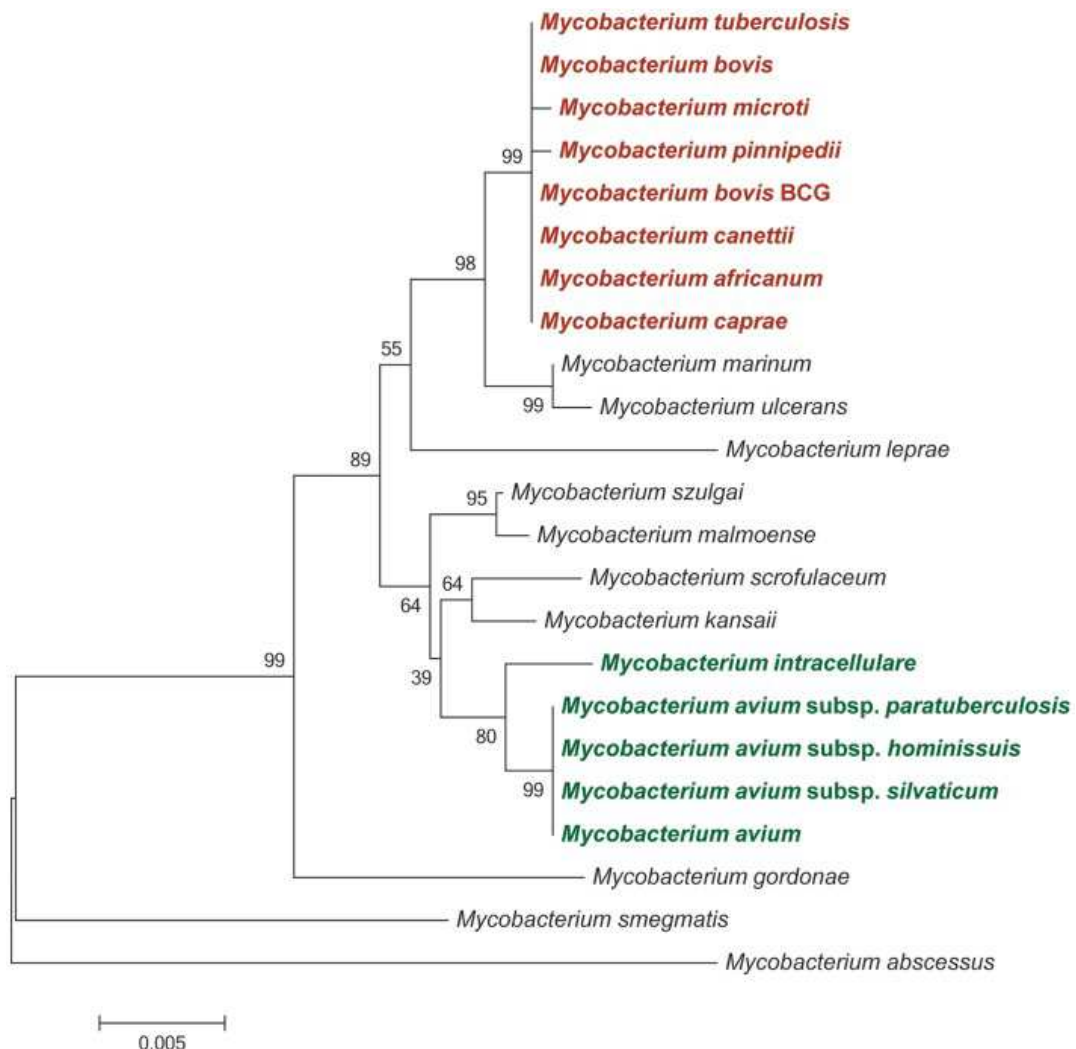


Figura 1. Árbol filogenético de diversas especies y subespecies de micobacterias basado en la secuencia parcial 16S rRNA. Las especies y cepas pertenecientes al complejo *Mycobacterium tuberculosis* se muestran en rojo y los miembros del complejo *Mycobacterium avium* se muestran en verde. Rue-Albrecht y col., 2014.

Otra clasificación es la que distingue entre el grupo de micobacterias del complejo *Mycobacterium tuberculosis* (*Mycobacterium tuberculosis* complex; MTC) y las micobacterias no tuberculosas, atípicas o distintas de la tuberculosis (non tuberculous mycobacteria; NTM). El complejo MTC incluye a siete micobacterias que causan tuberculosis en mamíferos, de las que la mejor estudiada es *M. tuberculosis*, el agente causal de la tuberculosis en humanos. A nivel genético, los miembros del MTC presentan más de un 99,95 % de identidad en su secuencia de nucleótidos (Brosch y col., 2002). A pesar de su alta similitud genética, los miembros del MTC pueden diferenciarse de acuerdo a su rango de hospedadores y a su capacidad patogénica: *M. tuberculosis* y *M. africanum* son patógenos exclusivamente de humanos, *M. microti* infecta a roedores, *M. pinnipedii* causa la tuberculosis en mamíferos marinos incluyendo a leones de mar y focas, y *M. caprae* al igual que *M. bovis* infecta cabras y ciervos. La especie micobacteriana con el mayor rango de hospedadores es *M. bovis*, que aunque se aísla fundamentalmente de ganado vacuno, es responsable de epizootias en pequeños rumiantes y en animales salvajes y también puede infectar a humanos. *M. canetti* también infecta a humanos, pero se diferencia de otros miembros del complejo MTC en la morfología de las colonias, que no son de aspecto rugoso como las del resto de los miembros del MTC (van Soolongen y col., 1997).

Un segundo gran grupo de micobacterias es el constituido por el complejo *M. avium* (*Mycobacterium avium* complex; MAC) (Inderlied y col., 1993), donde se incluye *Map* (Nº Identificación Taxonómica: 1770; National Center for Biotechnology Information; NCBI). Las micobacterias de este complejo comparten un 40 % de similitud en su secuencia de nucleótidos con las del complejo MTC. Todos los componentes del complejo MAC están muy relacionados desde el punto de vista genético, son de crecimiento lento, crecen en un amplio rango de temperaturas (20 °C hasta 37 °C) y de pH (desde 4 a 7.5) y pertenecen al grupo NTM. El complejo MAC incluye micobacterias ambientales, agentes micobacterianos intrínsecamente patógenos del ganado y de las aves, y patógenos oportunistas del hombre por lo que adquiere gran relevancia en medicina veterinaria (Thorel y col., 2001) y humana (Weiss y Glassroth, 2012). En la Tabla II se muestran las especies y subespecies pertenecientes al complejo MAC, la enfermedad que causan y sus hospedadores preferentes.

II. INTRODUCCIÓN GENERAL

Tabla II. Especies y subespecies integrantes del complejo *Mycobacterium avium*.

Especie	Subespecie	Patogenicidad	Hospedador	Referencia
<i>M. avium</i>	<i>avium</i>	Tuberculosis aviar	Aves	Mijs y col., 2002
	<i>silvaticum</i>	Enfermedad similar a la Tuberculosis	Palomas	Thorel y col., 1990
	<i>hominissuis</i>	Infecciones pulmonares	Humanos	Mijs y col., 2002
		Linfadenitis cervical Infecciones de tejidos blandos difundidos Infecciones diseminadas	Porcinos	
	<i>paratuberculosis</i>	Enfermedad de Johne	Rumiantes	Thorel y col., 1990
<i>M. intracellulare</i>		Infecciones pulmonares	Humanos	Pfyffer y col., 2007
<i>M. colombiense</i>		Infecciones diseminadas Linfadenopatía	Humanos	Murcia y col., 2006
<i>M. chimaera</i>		Infecciones pulmonares	Humanos	Tortoli y col., 2004
<i>M. marseillense</i>		Infecciones pulmonares	Humanos	Ben Salah y col. 2009
<i>M. timonense</i>		Infecciones pulmonares	Humanos	Ben Salah y col., 2009
<i>M. boucherdurhonense</i>		Infecciones pulmonares	Humanos	Ben Salah y col., 2009
<i>M. vulneris</i>		Linfadenopatía Heridas	Humanos	Van Ingen y col., 2009
<i>M. arosiense</i>		Osteomielitis	Humanos	Bang y col., 2008
MAC-otras		Infecciones pulmonares Infecciones diseminadas	Humanos	Smole y col., 2002

Rindi y Garzelli, 2014.

A pesar de su similitud genética, los miembros del complejo MAC muestran diferente rango de hospedadores y tropismo celular. Por ejemplo, *M. avium* subsp. *avium* es el principal agente causal de la tuberculosis en aves (Mijs y col., 2002), mientras que *M. avium* subsp. *silvaticum* causa lesiones tuberculosas en palomas (Thorel y col., 1990). Además de aves, *M. avium* subsp. *avium* también puede infectar un amplio rango de especies animales, principalmente a cerdos y a vacas (Rindi y Garzelli, 2014). Esta micobacteria se ha detectado en ocasiones en niños con linfadenopatías (Bruijnesteijn van Coppenraet y col., 2008; Thegerström y col., 2005). *M. avium* subsp. *hominissuis* y *M. intracellulare* son patógenos oportunistas ampliamente distribuidos en el medio ambiente y pueden causar infección pulmonar y tuberculosis diseminada en un amplio rango de mamíferos; incluyendo cerdos, vacas y también en humanos (Rindi y Garzelli, 2014). Desde el punto de vista de salud pública, *M. avium* subsp. *hominissuis* es la micobacteria del complejo MAC más importante al causar frecuentemente enfermedades oportunistas diseminadas en pacientes inmunodeprimidos (Falkinham, 2010). En el caso de pacientes con el síndrome de la inmunodeficiencia adquirida (SIDA), se ha descrito que la frecuencia de infecciones

concomitantes por miembros del complejo MAC oscila entre el 25 y el 50 % (Horsburgh y col., 1991; Nightingale y col., 1992). El agente causal de entre el 87 y el 98 % de estas infecciones era *M. avium hominissuis* (Biet y col., 2005). En la última década se han descrito nuevos miembros del complejo MAC como *M. chimaera* (Tortoli y col., 2004), *M. colombiense* (Murcia y col., 2006), *M. arosiense* (Bang y col., 2008), *M. bouchedurhonense*, *M. marseillense* y *M. timonense* (Ben Salah y col., 2009).

II.2.2. Características morfológicas, bacteriológicas y metabólicas de *Map*

Map se diferencia de las otras subespecies de *M. avium* por su lenta tasa de crecimiento *in vitro*, entre 8 y 24 semanas de crecimiento son requeridas para la formación de colonias visibles en los medios de cultivo.

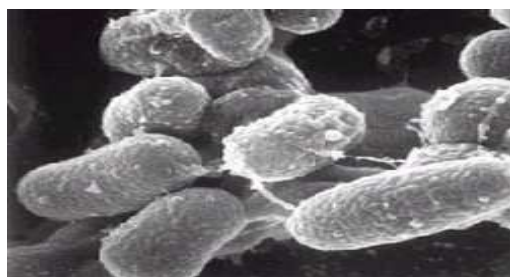


Figura 2. Fotografía de *Map* obtenida con un microscopio electrónico de barrido (MT Collins).

Map es una bacteria aerobia facultativa, no móvil, Gram-positiva y ácido-alcohol resistente que presenta una tinción homogénea de color rojizo con los métodos de tinción y decoloración con alcohol ácido (como el de ZN o Kinyoun). *Map* es un bacilo de 1-2 μm de longitud por 0.5 μm de anchura que tiende a agruparse en grumos cuando crece en cultivo. Su temperatura óptima de crecimiento es de 37 °C.

Fenotípicamente *Map* se caracteriza por la formación de colonias rugosas y por su crecimiento lento en medios de cultivo, por lo que requiere de un aporte externo del sideróforo micobactina para la captación del hierro. La comparación de los genomas de *Map* y *M. tuberculosis* reveló que uno de los genes responsable de la producción de micobactina (*mbtA*) es más corto en *Map* (400 aa) que en *M. tuberculosis* (565 aa) (Li y col., 2005). El efecto del truncamiento del gen *mbtA* de *Map* podría afectar no solo a la producción de la micobactina sino también a la capacidad de ésta para captar hierro, por lo que se necesita añadir no solo micobactina sino también citrato férrico en el medio de cultivo de *Map* (Merkal y Curran, 1974).

Map, junto con los otros miembros del género *Mycobacterium*, presenta una pared celular hidrofóbica y con un alto porcentaje en lípidos (40 %), porcentaje muy elevado en comparación con el de otras bacterias Gram + (5 %) y Gram - (10 %) (Goren y Brennan, 1979; Crellin y col., 2013). Esta propiedad podría explicar la tendencia de las micobacterias a crecer formando agregados bacterianos y también su propiedad de ácido-alcohol resistencia. En la Figura 3 se muestra un esquema de la pared celular de *Map*.

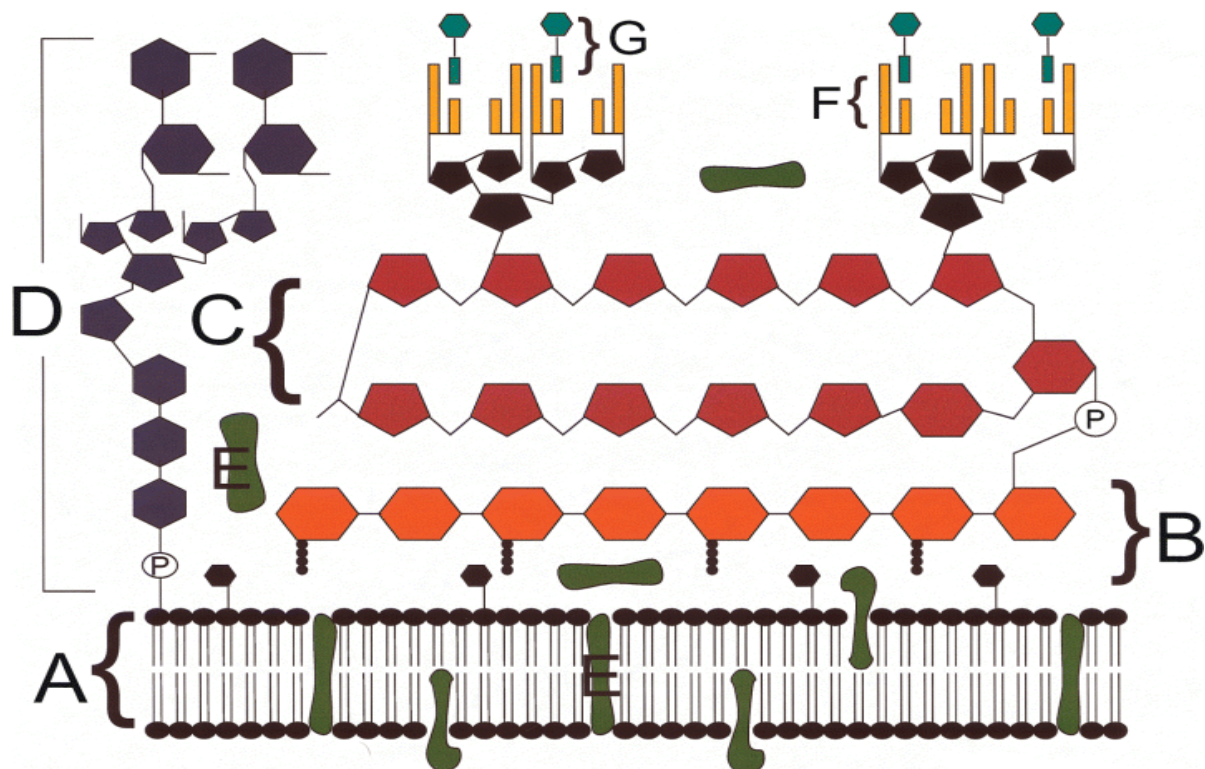


Figura 3. Esquema general de la pared celular micobacteriana. (A) Membrana plasmática, (B) Peptidoglicano (PG), (C) Arabinogalactano (AG), (D) Lipoarabinomano (LAM), (E) Proteínas, (F) ácidos micólicos (AM), (G) Glicolípidos.

En la membrana celular de *Map* se anclan las proteínas y el lipoarabinomano (LAM). El LAM es un lipoglicano que presenta una estructura compleja de 17 kDa y que se compone de tres dominios: un núcleo polisacárido compuesto por unidades de D-manana y D-arabianana, un dominio formado por fosfatidilinositol anclado a la membrana y un polisacárido terminal que contienen el disacárido β -D-Araf(1-1)- α -D-Araf. Las especies de micobacterias patógenas y de crecimiento lento (como es el caso de *M. tuberculosis*, *M. leprae* y *Map*) presentan en el extremo terminal β -Ara, un residuo de manosa, por lo que al LAM se le denomina (Man-LAM). En contraste, las especies micobacterianas avirulentas y de crecimiento rápido (como *M. fortuitum* y *M. smegmatis*) presentan en el extremo terminal β -

Ara, un fosfoinositol, por lo que al LAM se le denomina PILAM (Chatterjee y col., 1992; Prinzi y col., 1993; Nigou y col., 2003). La capa de peptidoglicano (PG) forma el esqueleto interno básico al que se une el arabinogalactano (AG), un polisacárido ramificado formado por D-arabinosa y D-galactosa. El residuo terminal de la D-arabinosa se esterifica para dar lugar a ácidos micólicos (AM) hidrofóbicos de alto peso molecular a los que se anclan glicolípidos de superficie. El complejo PG-AG-AM es insoluble y se caracteriza por conformar la estructura esencial de la pared celular y por ser la diana a la que van dirigidos la mayoría de agentes antimicrobianos (Hett y Rubin, 2008).

El PG es un material rígido que facilita el mantenimiento de la forma y estructura de la bacteria y la protege de la presión osmótica, aunque también permite la expansión y crecimiento bacteriano. El PG está formado por cadenas de péptidos y glicanos, éstos últimos representados por cadenas largas formadas por repeticiones seriadas de N-acetilglucosamida y N-acetilmurámico (Hett y Rubin, 2008).

El AG es el principal polisacárido de la pared celular cuya función es el mantenimiento de la arquitectura celular y el anclaje de la capa de AM a la capa de PG. El AG está compuesto por arabino y galactano y está unido a su vez a la capa de PG mediante una unión fosforil-N-acetilglucosaminosil-ramnosil (McNeil y col., 1990; Crick y col., 2001).

Finalmente los AM están constituidos por una variedad de ácidos grasos de cadena corta (60-90 carbonos/cadena), α -alkil y β -hidroxil y son los encargados de mantener la impermeabilidad de la pared celular. A lo largo de las capas de la pared se intercalan proteínas transportadoras y porinas, que representan el 15 % del peso de la pared. Aunque las micobacterias presentan una capa gruesa de PG y carecen de membrana externa al igual que las bacterias Gram +, presentan también algunas propiedades comunes con las bacterias Gram -. Al igual que las bacterias Gram -, las micobacterias no retienen la tinción de Gram (sin embargo si retienen la carbolfucsina en presencia de ácido y alcohol) debido a la presencia de porinas en la membrana lipídica (Hett y Rubin, 2008). En la Tabla III se resumen las principales características morfológicas, bacteriológicas y metabólicas de *Map*.

II. INTRODUCCIÓN GENERAL

Tabla III. Características morfológicas, bacteriológicas y metabólicas de *Map*

Característica morfológicas, bacteriológicas y metabólicas de <i>Map</i>	Referencias
Características Morfológicas	
<ul style="list-style-type: none">• Bacilo inmóvil.• Tamaño: 0.5 μm x 1-2 μm• Tendencia a formar grumos	Twort e Ingram, 1912 Bergey y col., 1923 Thorel y col., 1990
Características Bacteriológicas	
<ul style="list-style-type: none">• Gram +• Tinciones: Acido-alcohol resistente (BAAR). ZN +• Pared celular de alto contenido lipídico<ul style="list-style-type: none">○ 4 capas: Membrana citoplasmática, PG, AG y AM○ Presencia de AM de 60-90 átomos de carbono.	Twort e Ingram, 1912 Wayne y Kubica, 1986 Brennan y Nikaido, 1995
Características Metabólicas	
<ul style="list-style-type: none">• Aerobio Facultativo• Baja actividad metabólica• Test Bioquímicos:<ul style="list-style-type: none">○ Positivo a: catalasa, hidrólisis del Tween y test de la trehalosa.○ Negativo a: producción de niacina y fosfatasa alcalina, actividad: ureasa, pirazinamidasa y arilsulfatasa, reducción de nitrato y telurito y tolerancia al cloruro sódico.• Requerimientos nutricionales<ul style="list-style-type: none">○ Fuente de Carbono: glicerol, piruvato e hidrocarburos.○ Fuente de Nitrógeno: asparagina, glutamina, glutamato, ácido aspártico, sales de amonio.○ Macroelementos: Potasio, magnesio, azufre, fósforo.○ Microelementos: Hierro, zinc, manganeso, molibdeno.○ Componentes que facilitan el crecimiento: ácidos palmítico y OADC, yema de huevo o dióxido de carbono• Crecimiento lento: 8-6 semanas (hasta 6-12 meses) según la cepa y el medio<ul style="list-style-type: none">○ a 37°C○ La mayoría de las cepas requieren micobactina para su crecimiento	Snow, 1970 Merkal y Curran, 1974 Thorel y col., 1990 Cocito y col., 1994 Whittington, 2010

BAAR: Bacteria Ácido-Alcohol Resistente. OADC: Oleico, Albúmina, Dextrosa, Catalasa.

II.2.3. Resistencia ambiental y físico-química de *Map*.

Map es altamente resistente a condiciones ambientales adversas y a algunos tratamientos físico-químicos empleados para higienizar el agua y los alimentos destinados al consumo humano. El elevado grado de resistencia que presenta este bacilo se explica en parte por la compleja estructura de la pared celular rica en lípidos, lo que le permite soportar condiciones físico-químicas que no suelen aguantar otras especies bacterianas y por otro lado, por la posibilidad de ralentizar su metabolismo en determinadas condiciones y por su lento crecimiento (Grant, 2010).

Debido al creciente interés y preocupación suscitado en torno al posible potencial zoonótico de *Map*, se ha tratado de determinar que productos alimentarios de origen animal podrían estar implicados en una posible transmisión de *Map* a la especie humana (Eltholth y

col., 2009). En la Figura 4 se muestra cuales son las principales vías de transmisión de *Map* a los humanos.

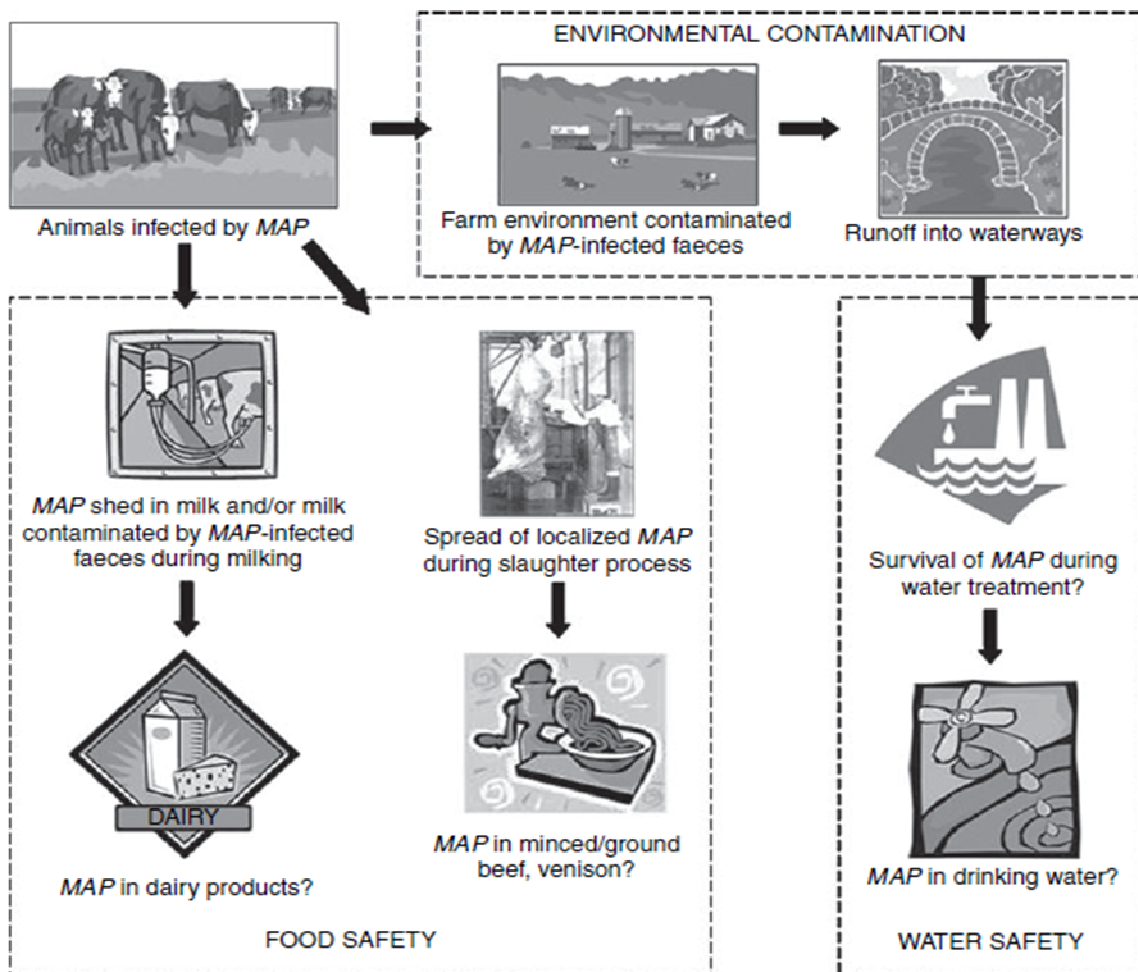


Figura 4. Principales vías de transmisión de *Map* a los humanos. Grant, 2010.

El producto más veces estudiado hasta el momento es la leche. La contaminación de ésta en las explotaciones puede producirse por eliminación directa en la leche de vacas infectadas, o por contacto con heces infectadas. El hecho de que la leche pueda constituir un vehículo de transmisión de *Map* de los animales al ser humano ha hecho que se hayan llevado a cabo numerosos estudios para determinar la termorresistencia y la efectividad del tratamiento térmico de pasteurización en la destrucción de *Map*. Chiodini y Hermon-Taylor (1993) demostraron que los tratamientos de calor utilizados en la pasteurización (63 °C 30 minutos o 72 °C 15 segundos) destruyen gran parte de las células viables de *Map* pero no consiguen eliminar la bacteria totalmente. Mientras que con el tratamiento térmico de 63 °C durante 30 minutos se destruyeron el 90 % de las células viables de *Map*, con el tratamiento de 72 °C 15 segundos se eliminaron el 95 % de las células de *Map*. Rademaker y col. (2007)

demonstraron que el tratamiento de la leche a temperatura de 72 °C durante 15 segundos era suficiente para la eliminación prácticamente total de *Map*. Sin embargo, un estudio reciente ha demostrado la viabilidad de *Map* en más del 40 % de 65 muestras de leche en polvo analizadas que procedían de 18 países diferentes (Grant y col., 2014). Otros tratamientos como la electroporación (Rowan y col., 2001) y las radiaciones gamma (Stabel y col., 2001) ofrecen mejores resultados de inactivación que la pasteurización a nivel experimental.

Otra posibilidad que se ha contemplado es la de que *Map* entrara en la cadena alimentaria a partir de carne contaminada. Así, todo el tratamiento de la carne destinada al consumo humano, desde el momento en que el ganado entra en el matadero hasta el procesado de dicha carne para la venta en las plantas especializadas, debe ser llevado con precaución para evitar los riesgos de contaminaciones con *Map* a partir de un foco primario de infección. Alonso-Hearn y col. (2009) aislaron y detectaron bacilos viables de *Map* a partir del músculo del diafragma de 6 terneras sacrificadas en matadero mediante cultivo bacteriológico y PCR convencional y a tiempo real. De estos 6 animales 4 presentaban signos clínicos, lo que sugiere que el posible riesgo de transmisión de *Map* podría darse a partir del consumo de carne contaminada tanto de animales sintomáticos como de subclínicos. Sin embargo, recientemente se ha demostrado una reducción de 5 ordenes en la carga bacteriana presente en hamburguesas de carne de vaca al cocinar estas durante 6 minutos (Hammer y col., 2013).

También se ha investigado el papel del agua potable como posible vehículo de transmisión de *Map* de los animales al ser humano, demostrándose la capacidad de cepas bovinas y humanas de *Map* de sobrevivir al tratamiento con cloro (Whan y col., 2001). Vaerewijck y col. (2005) estimaron que en el agua potable podrían acumularse hasta 7×10^5 células de *Map* por litro de agua debido a que la bacteria es capaz de resistir a los tratamientos de cloración y filtración del agua. Según algunos autores, los procesos normales de sedimentación, filtrado y desinfección del agua no serían lo suficientemente eficientes para eliminar el bacilo, lo que explicaría su detección posterior en agua del grifo (Whittington y col., 2005). En la Tabla IV se muestra un resumen de los alimentos en los que se ha detectado contaminación por *Map*.

Tabla IV. Resumen de alimentos en los que se ha detectado contaminación por *Map*.

Alimento	Número muestras	% PCR +	% PCR -	Número de UFC de <i>Map</i>	Referencia
Leche y productos lácteos					
Leche cruda de vaca (Animales Individuales)	26	a	35	a	Taylor y col., 1981
	77	a	11.6	2-8 UFC ^b /50ml	Sweeney y col., 1992
	126	a	8.3	a	Streeter y col., 1995
	11	18.0	45.0	<100 UFC ^b /ml	Giese y Ahrens, 2000
	211	33.0	4.0	a	Pillai y Jayarao, 2002
	1493	13.5	2.8	a	Jayarao y col., 2004
	483	a	18.4	4-20UFC ^b /50ml	Ayele y col., 2005
	84	3.6	a	a	Bosshard y col., 2006
	342	32.5	0	10-560 cél/ml ^c	Slana y col., 2008
Leche cruda de vaca (Tanque, nivel de explotación)	200	9.0	a	a	Sevilla y col., 2002
	52	68.0	0	a	Stabel y col., 2002
	501	22.4	a	a	Stephan y col., 2002
	20	50.0	5.0	a	Pillai y Jayarao, 2002
	29	27.5	20.6	a	Jayarao y col., 2004
	100	3.0	a	a	Bosshard y col., 2006
	110	11.0	a	a	Haghkhal y col., 2008
	5	80.0	0	1-<10 cél/ml ^c	Slana y col., 2008
Leche cruda de vaca (nivel de procesamiento)	244	7.8	1.6	4-20UFC ^b /50ml	Grant y col., 2002
	310	a	0	a	O'Doherty y col., 2002
	389	12.9	0.3	a	O'Reilly y col., 2004
	175	a	0.6	a	Pearce y col., 2005
Leche de vaca pasteurizada	312	7.0	0	a	Millar y col., 1996
	567	11.8	1.8	a	Grant y col., 2002
	710	15	0	a	Gao y col., 2002
	77	A	0	a	O'Doherty y col., 2002
	357	9.8	0	a	O'Reilly y col., 2004
	702	64.0	2.8	a	Ellingson y col., 2005
	244	a	1.6	a	Ayele y col., 2005
	70	a	2.9	a	Paolicchi y col., 2005
	22	4.5	0	a	Lillini y col., 2007
	10	a	10	a	Singh y Vihan, 2004
Leche cruda de cabra (Animales individuales)	90	1.1	0	a	Grant y col., 2001
	340	7.1	0	a	Djonne y col., 2003
Leche cruda de oveja (Tanque, nivel de explotación)	344	23.0	a	a	Muehlherr y col., 2003
	14	0	0	a	Grant y col., 2001
	63	23.8	a	a	Muehlherr y col., 2003
Queso					
Queso feta griego	42	50.0	4.7	a	Ikonomopolous y col., 2005
Queso duro y semiduro	42	12.0	2.4	a	Ikonomopolous y col., 2005
Queso curado	98	5.0	0	a	Clark y col., 2006
Queso suave, semiduro y duro curado suizo	143	4.2	0	a	Stephan y col., 2007
Queso crudo artesanal	19	6.8	20	a	Williams y Withers, 2008
Leche en polvo para lactantes	51	49.0	2.0	a	Hruska y col., 2005
Leche entera en polvo por aspersión en seco	190	9.5	0	a	Rowe y col., 2007
Carne de vaca					
Carne picada/molida	113	a	0	a	Maher y col., 2004
	200	0	a	a	Jaravata y col., 2007
Canales de carne de vacuno	200	4.0-	a	a	Meadus y col., 2008
	450	54.0			

a) No testado o no reportado. b) UFC. Unidades formadoras de colonias. c) Recuento determinado por qPCR a tiempo real. Grant, 2010.

II. INTRODUCCIÓN GENERAL

En cuanto a la resistencia ambiental de *Map*, diversos autores han estimado la viabilidad de *Map* en agua, suelo, heces, purines y orina bajo diversas condiciones medioambientales.

Tabla V. Estimaciones de la viabilidad de *Map* en función de las condiciones medioambientales.

Condiciones Ambientales		Viabilidad	Técnica	Referencias
Agua	De estanque	9 meses	Cultivo	Lovell y col., 1944
	De río	163 días	Cultivo	Lovell y col., 1944
	De presa, sin incidir luz solar	48 semanas	Cultivo/PCR	Whittington y col., 2004
	Lagos	841 días	Cultivo/PCR	Pickup y col., 2005
Suelo	Pastos	117 semanas	Cultivo/PCR	Whittington y col., 2004
	Ambiente seco y sombrío	55 semanas	Cultivo/PCR	Whittington y col., 2004
Heces	Origen ovino	385 días	Cultivo/PCR	Whittington y col., 2004
	Origen bovino	246 días	Cultivo	Lovell y col., 1944
	Origen caprino	67 días	Cultivo	Lovell y col., 1944
Purines	Origen bovino	252-287 días	Cultivo	Jorgensen, 1977
	Digestión anaeróbica (Biogás)	21-28 días	Cultivo	Olsen y col., 1985
Orina	Origen bovino	7 días	Cultivo	Vishnevskii y col., 1940

Recientemente, también se ha señalado la presencia de *Map* viable en los suelos, cubículos e incluso en el polvo depositado en varios establos, tras la introducción de vacas excretoras de esta micobacteria (Eisenberg y col., 2010). Así mismo, *Map* puede ser ingerido por amebas de vida libre (*Acanthamoeba* spp.) que le proveen de un nicho protegido donde no sólo sobrevive sino que puede llegar a replicarse (Mura y col., 2006). Salgado y col. (2015) sugieren que las amebas infectadas por *Map* puede actuar como un "Caballo de Troya" proporcionando un medio para la persistencia de *Map* en los suelos y potencialmente una fuente de infección para los animales de pastoreo.

II.3. EPIDEMIOLOGÍA

II.3.1. Rango de hospedadores

La paratuberculosis afecta principalmente a rumiantes tanto domésticos como silvestres y adquiere mayor importancia en las especies bovina (*Bos taurus*), ovina (*Ovis aries*) y caprina (*Capra hircus*) debido a los intereses adquiridos por el ser humano sobre ellas. Aunque hasta la fecha no se han descrito casos de paratuberculosis en todas las especies de rumiantes, se considera que todos los rumiantes son susceptibles a ser infectados por *Map*,

al igual que los camélidos (Manning, 2011). La paratuberculosis se ha reportado ampliamente en muchas poblaciones de camellos en Asia, Oriente Medio, África y la antigua Unión Soviética (Ivanov y Skalinskii, 1957; Gameel y col., 1994; Wernery y Kinne, 2007). La enfermedad en camellos puede tener una evolución más rápida que en ganado, pudiéndose producir la muerte después de 4-6 semanas de enfermedad (Wernery y col., 2007).

A pesar de que ciertos rumiantes como la cabra salvaje y los antílopes no manifiestan signos clínicos de la enfermedad (Griffin, 1988), los ciervos sí manifiestan diarrea asociada a la infección por *Map* (Mackintosh y Griffin, 2010). El ciervo es particularmente susceptible a la enfermedad, sobre todo cuando se cría en granjas en cautividad mostrando evidencias clínicas de la enfermedad y patología severa a una edad más joven que en otros rumiantes. Desde mediados de los años 90, se han identificado lesiones asociadas a la paratuberculosis en unos 600 ciervos criados en cautividad en unas 300 granjas de Nueva Zelanda, con una prevalencia a nivel de rebaño del 6 % (de Lisle y col., 2003). Con el tiempo, es muy posible que la mayoría de las granjas de ciervos de Nueva Zelanda estén infectadas con paratuberculosis, debido al movimiento de ciervos entre las granjas y a que los ciervos comparten pastos con vacas y ovejas presumiblemente infectadas con *Map*.

Como puede observarse en la Tabla VI y VII, *Map* se ha sido aislada por cultivo bacteriológico de una gran variedad de especies animales silvestres, rumiantes (Tabla VI) pero también especies monogástricas (Tabla VII). De las 41 especies de animales no rumiantes en las que se ha aislado *Map* hasta la fecha, en 39 de ellas el aislamiento se realizó a partir de tejidos de los animales infectados, en 16 de ellas a partir de heces y en 15 de las 41 especies se observaron lesiones histopatológicas asociadas a la paratuberculosis (Elliot y col., 2014). La histopatología de las infecciones por *Map* en especies no rumiantes se ha estudiado preferentemente en conejos infectados en condiciones naturales, en los que se ha podido observar lesiones severas en el intestino (Greig y col., 1997; Beard y col., 2001a). En otras especies de animales no rumiantes, la patología de la infección es menos notoria observándose generalmente pequeños granulomas y baja carga bacteriana en los nódulos linfáticos mesentéricos y en la mucosa intestinal (Beard y col., 2001a).

II. INTRODUCCIÓN GENERAL

Tabla VI. Especies de rumiantes silvestres en las que se ha aislado *Map* por cultivo bacteriológico.

Rumiantes	Familia	Especie	Referencia
Arruí	Bovidae	<i>Ammotragus lervia</i>	Boever y Peters, 1974
Bisonte	Bovidae	<i>Bison bison</i>	Buergelt y col., 2000
Yak	Bovidae	<i>Bos grunniens</i>	Almejan, 1958
Cebú	Bovidae	<i>Bos indicus</i>	Katic, 1961
Búfalo de agua	Bovidae	<i>Bubalus bubalis</i>	Katic, 1961
Íbice	Bovidae	<i>Capra ibex</i>	Ferroglio y col., 2000
Gnu	Bovidae	<i>Connochaetes albojubatus</i>	Rankin, 1958
Cabra blanca	Bovidae	<i>Oreamnos americanus</i>	Williams y col., 1979
Musmón	Bovidae	<i>Ovis canadensis</i>	Williams y col., 1979
Muflón	Bovidae	<i>Ovis mousimon</i>	Machackova y col., 2004
Saiga	Bovidae	<i>Saiga tatarica</i>	Dukes y col., 1992
Camello bactriano	Camelidae	<i>Camelus bactrianus</i>	Katic, 1961
Dromedario	Camelidae	<i>Camelus dromedarius</i>	Amand, 1974
Llama	Camelidae	<i>Llama glama</i>	Appleby y Head, 1954
Guanaco	Camelidae	<i>Llama guanicoe</i>	Salgado y col., 2009
Alpaca	Camelidae	<i>Lama pacos</i>	Ridge y col., 1995
Alce	Cervidae	<i>Alces alces</i>	Soltys y col., 1967
Axis	Cervidae	<i>Axis axis</i>	Riemann y col., 1979
Corzo	Cervidae	<i>Capreolus capreolus</i>	Machackova y col., 2004
Ciervo Común	Cervidae	<i>Cervus elaphus</i>	Pavlik y col., 2000a
Ciervo canadiense	Cervidae	<i>Cervus elaphus nannodes</i>	Jessup y col., 1981
Ciervo sica	Cervidae	<i>Cervus nippon</i>	Thoen y col., 1977
Gamo	Cervidae	<i>Dama dama</i>	Riemann y col., 1979
Venado de cola blanca	Cervidae	<i>Odocoileus virginianus</i>	Chiodini y Vankrunigen, 1983
Ciervo de los cayos	Cervidae	<i>Odocoileus virginianus clavium</i>	Quist y col., 2002
Reno	Cervidae	<i>Rangifer tarandus</i>	Katic, 1961

Elliott y col. 2014

II. INTRODUCCIÓN GENERAL

Tabla VII. Especies de mamíferos no rumiantes y aves en las que se ha aislado *Map* por cultivo bacteriológico.

Mamíferos no rumiantes	Orden	Especie	Presencia de <i>Map</i>		Lesiones	Referencia
			Tejidos	Heces		
Jabalí	Artiodactyla	<i>Sus scrofa</i>	Si	Nt	Nt	Notario y col., 2010
Cerdo doméstico	Artiodactyla	<i>Sus scrofa domesticus</i>	Si	Nt	Si	Miranda y col., 2011
Coyote	Carnivora	<i>Canis latrans</i>	Si	Nt	Nt	Anderson y col., 2007
Gato	Carnivora	<i>Felis familiaris</i>	Si	Si	Nt	Corn y col., 2005
Tejón	Carnivora	<i>Meles meles</i>	Si	Nt	No	Beard y col., 2001a
Mofeta	Carnivora	<i>Mephitis mephitis</i>	Si	No	Nt	Corn y col., 2005
Armiño	Carnivora	<i>Mustela erminea</i>	Si	Si	Si	Beard y col., 2001a
Comadreja	Carnivora	<i>Mustela nivalis</i>	Si	Nt	Si	Beard y col., 2001a
Hurón	Carnivora	<i>Mustela putorius furo</i>	Si	Nt	Si	De Lisle y col., 2003
Mapache	Carnivora	<i>Procyon lotor</i>	Si	Si	Nt	Corn y col., 2005
Oso pardo	Carnivora	<i>Ursus arctus</i>	Si	No	Nt	Kopečna y col., 2006
Zorro	Carnivora	<i>Vulpes vulpes</i>	Si	Si	Si	Beard y col., 2001a
Armadillo de nueve bandas	Cingulata	<i>Dasybus novemcinctus</i>	Si	Si	Nt	Corn y col., 2005
Zarigüeya	Didelphimorphia	<i>Didelphys virginiana</i>	Si	Si	Nt	Corn y col., 2005
Ualabí	Diprodontia	<i>Macropus eugenii</i>	Si	No	Si	Cleland y col., 2010
Canguro gris	Diprodontia	<i>Macropus fuliginosus</i>	Si	No	Si	Cleland y col., 2010
Possum de cola de cepillo	Diprodontia	<i>Trichosurus sp.</i>	Si	Si	Si	Nugent y col., 2011
Erizo	Erinaceomorpha	<i>Erinaceus europaeus</i>	Si	Si	Si	Nugent y col., 2011
Liebre parda europea	Lagomorpha	<i>Lepus europeus</i>	Si	Si	Si	Nugent y col., 2011
Conejo	Lagomorpha	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	Si	Si	Si	Beard y col., 2001b
Conejo de Florida	Lagomorpha	<i>Sylvilagus floridanus</i>	Nt	Si	Nt	Raizman y col., 2005
Rinoceronte negro	Perissodactyla	<i>Diceros bicornis</i>	Nt	Si	Nt	Bryant y col., 2012
Asno	Perissodactyla	<i>Equus asinus</i>	Si	Nt	Si	Van Ulsen, 1970
Macaco rabón	Primates	<i>Macaca arctoides</i>	Si (Tracto GI)	Nt		McClure y col., 1987
Mandrill	Primates	<i>Papio sphinx</i>	Si	Si	Si	Zwick y col., 2002
Ratón de campo	Rodentia	<i>Apodemus sylvaticus</i>	Si	Si	Si	Beard y col., 2001a
Topo	Rodentia	<i>Microtus arvalis</i>	Si	Nt	Nt	Pavlik y col., 2010
Ratón casero	Rodentia	<i>Mus musculus</i>	Si	Nt	Nt	Florou y col., 2008
Rata parda	Rodentia	<i>Rattus norvegicus</i>	Si	No	No	Beard y col., 2001a
Rata negra	Rodentia	<i>Rattus rattus</i>	Si	Nt	Si	Florou y col., 2008
Rata café	Rodentia	<i>Sigmodon hispidus</i>	Si (Tracto GI)	Nt		Corn y col., 2005
Rata de abazones	Rodentia	<i>Thomomys talpoides</i>	Si (Tracto GI)	Nt		Corn y col., 2005
Blarina	Soricomorpha	<i>Blarina brevicauda</i>	Si	No	Nt	Corn y col., 2005
Musaraña blanca	Soricomorpha	<i>Crociodura suaveolens</i>	Si	Nt	Nt	Pavlik y col., 2010

II. INTRODUCCIÓN GENERAL

Aves	Orden	Especie	Presencia de <i>Map</i>		Lesiones	Referencia
			Tejidos	Heces		
Tarro maorí	Anseriformes	<i>Tadorna variegata</i>	Si	No	No	Nugent y col., 2011
Agachadiza común	Charadriiformes	<i>Gallinago gallinago</i>	Si (Tracto GI)	Nt		Corn y col., 2005
Cuervo	Passeriformes	<i>Corvus corone</i>	Si	Si	Leve	Beard y col., 2001a
Graja	Passeriformes	<i>Corvus frugilegus</i>	Si	Si	No	Beard y col., 2001a
Grajilla occidental	Passeriformes	<i>Corvus monedula</i>	Si	Nt	No	Beard y col., 2001a
Gorrión común	Passeriformes	<i>Passer domesticus</i>	Si (Tracto GI)	Nt		Corn y col., 2005
Estornino europeo	Passeriformes	<i>Sturnus vulgaris</i>	Si (Tracto GI)	Nt		Corn y col., 2005

Nt: No testado. GI: Gastro-intestinal. Elliot y col., 2014

Los aislamientos en especies silvestres son importantes desde el punto de vista epidemiológico, ya que estos animales podrían actuar como reservorios de *Map* y contribuir a la difusión de la paratuberculosis, pudiendo participar como fuentes de infección para el ganado doméstico. Sin embargo, un metanálisis realizado recientemente ha demostrado que la prevalencia de *Map* en animales silvestres es de sólo un 2.41 % aproximadamente (Carta y col., 2013). A pesar de esta baja prevalencia, numerosos estudios han demostrado que la transmisión de *Map* entre especies es posible. Entre estas evidencias caben destacar las siguientes: i) el aislamiento de cepas de *Map* de genotipos bovinos y ovinos de tejido intestinal de ciervos y gamos que comparten zonas de pasto con rebaños de vacuno lechero (de Lisle y col., 1993), ii) el aislamiento de *Map* en heces de conejo de campo muertos en prácticas de caza menor en una zona en la que había constancia de diagnóstico de paratuberculosis en pequeños rumiantes (Fuentes y Cebrain, 1988), iii) la reproducción experimental de la infección en conejos utilizando como inóculo una cepa de *Map* aislada de ganado vacuno (Mokresh y Butler, 1990) y viceversa (Beard y col., 2001c), iv) el aislamiento de cepas de genotipo ovino en roedores, zorros y liebres que estaban en contacto con rebaños de pequeños rumiantes, además de la identificación de una cepa de genotipo ovino en un roedor (Florou y col., 2008). Como las liebres son capaces de eliminar una gran cantidad de *Map* en sus heces, 10^6 UFCs de *Map* por hectárea y día (Daniels y col., 2003), el consumo de heces de conejo de campo infectadas con *Map* por vacas y ovejas podría constituir una posible vía de transmisión a pesar de que no se ha confirmado hasta el momento. Con el desarrollo de técnicas de genotipado molecular, numerosos estudios han detectado idénticos genotipos de *Map* en diversas especies de animales silvestres y domésticas sugiriendo que la posibilidad de transmisión de *Map* entre especies es factible (Stevenson y col., 2009; Fritsch y col., 2012).

II.3.2. Transmisión

El principal mecanismo de transmisión de la infección en rumiantes domésticos es la vía horizontal o fecal-oral, es decir, los animales se infectan al ingerir calostro, agua, o alimentos contaminados con restos fecales que contienen *Map* excretado por animales infectados, o al mamar de las ubres contaminadas con restos fecales de las madres (Sweeney, 1996; Manning y Collins, 2010). El riesgo de infección es muy grande en explotaciones intensivas donde existe un contacto frecuente entre recién nacidos y animales eliminadores. A pesar de que las terneras son más susceptibles a la infección por esta vía, los animales adultos también pueden infectarse por el consumo de alimentos o agua contaminados (Larsen y col.,

1975). La vía fecal-oral adquiere especial importancia en aquellas explotaciones con mala higiene o con una alta prevalencia de paratuberculosis.

Una vía menor de transmisión en los rumiantes domésticos es la intrauterina o vertical, que quedó confirmada al aislarse *Map* en tejidos del tracto reproductor, así como, en fetos de vacas gestantes con sintomatología clínica de paratuberculosis (Whittington y Windsor, 2009). En el ganado vacuno, las infecciones intrauterinas se estiman entre un 10 y un 50 % de los fetos en función del curso subclínico o clínico de las madres, respectivamente (Sweeney, 1996; Kennedy y Benedictus, 2001). El semen de toros o carneros infectados puede contener la bacteria, provocando infección intrauterina en hembras receptoras, que al mismo tiempo puede ser trasladada al cigoto, lo que hace que la utilización de estos animales con fines reproductivos sea desaconsejada (Glawisching y col., 2004; Khol y col., 2010; Munster y col., 2013).

Otras vías de transmisión que han sido sugeridas son: i) vía aerógena (Corner y col., 2004; Biet y col., 2005), ii) por ingestión de presas o cadáveres contaminados en animales carnívoros o carroñeros como el zorro y el jabalí (Beard y col., 2001a; Machackova y col., 2004) o iii) a través de vectores-insectos, nematodos, lombrices y amebas de vida libre (Lloyd y col., 2001; Fischer y col., 2003b; Mura y col., 2006). Recientemente, Sorge y col. (2013a) han demostrado la presencia de DNA de *Map* en la saliva de vacas con paratuberculosis, por lo que estos autores plantean la hipótesis de que la saliva pueda constituir un nuevo vehículo de transmisión de *Map*.

II.3.3. Resistencia a la infección

La resistencia a desarrollar paratuberculosis se ha asociado con diversos factores ambientales y genéticos, tal y como se indica en la Tabla VIII.

Tabla VIII. Factores ambientales y genéticos que influyen a la susceptibilidad de la infección por *Map*.

Factores Ambientales	Factores Genéticos
<ul style="list-style-type: none">• Edad en el momento de exposición	<ul style="list-style-type: none">• Efecto especie
<ul style="list-style-type: none">• Dosis infectante	<ul style="list-style-type: none">• Efecto racial
<ul style="list-style-type: none">• Manejo higiénico-sanitario	<ul style="list-style-type: none">• Genes candidatos: inmunidad innata

II.3.3.1. Factores ambientales

La edad de los animales cuando entran en contacto con el agente etiológico es un factor decisivo en la paratuberculosis. Los animales jóvenes (menores de seis meses de edad) son los más susceptibles a la infección debido principalmente a los siguientes hechos:

- a) El desarrollo incompleto de su sistema inmune hace a este grupo de edad más vulnerable a la infección por *Map*.
- b) El máximo desarrollo en animales jóvenes de las placas de Peyer ileales que son la puerta de entrada de *Map* al intestino.
- c) Gracias a la presencia de la gotera esofágica en animales jóvenes, la leche infectada con *Map* pasa directamente del esófago al abomaso evadiendo los mecanismos defensivos del tracto alimentario del hospedador como son compuestos biliares, pH ácido, enzimas digestivas, mucus, peristaltismo y competición con la flora comensal.

Otro parámetro importante para el establecimiento de la enfermedad es la dosis ingerida. Se ha establecido que la dosis infectiva es aproximadamente de 10^3 bacilos (Brotherston y col., 1961). Teniendo en cuenta que el número de bacilos viables eliminados en heces de animales supereliminadores es de 10^6 - 10^8 UFC/g (Whittington y col., 2000c), una mínima contaminación fecal del ambiente es suficiente para producir la infección de los animales susceptibles. A pesar de que se ha demostrado que los animales adultos (mayores de dos años de edad) son más resistentes a la infección con *Map* que los animales jóvenes, se ha descrito la infección por *Map* en animales adultos sometidos a una dosis elevada de micobacterias, bien por una elevada tasa de animales excretores en el rebaño o por un nivel de contaminación ambiental alto (Larsen y col., 1975; Windsor y Whittington, 2010). Por ello, el adecuado manejo higiénico-sanitario del rebaño y más concretamente la instauración de pautas de manejo orientadas a minimizar la exposición de la cría a *Map* (protocolos de limpieza y desinfección, separación física de madre y cría postparto, pasteurización de los calostros, etc.) resulta fundamental para evitar nuevas infecciones.

II.3.3.2. Factores genéticos

En lo relativo a los factores genéticos y la susceptibilidad a *Map*, se ha descrito cierta variabilidad racial para los rumiantes domésticos. De acuerdo a algunos estudios epidemiológicos la incidencia de la paratuberculosis es mayor en las razas de aptitud láctea que en las razas cárnicas (Pence y col., 2003). Además, la heredabilidad de la susceptibilidad a la infección por *Map* ha sido estimada para las raza Holstein-Frisona (Shook y col., 2012; van Hulzen y col., 2012a) y Jersey (Zare y col., 2014a). Estos estudios, así como otros realizados en pequeños rumiantes (Hickey y col., 2003; van Hulzen y col., 2012b) concluyen valores de heredabilidad bajos, en torno a 0.1-0.3.

Por otro lado, se ha planteado la hipótesis de que ciertos genes implicados en los mecanismos que regulan la respuesta inmune innata frente a patógenos intracelulares-parasitarios, bacterianos o incluso micobacterianos de los humanos y los animales, pudieran intervenir también en la susceptibilidad a la infección por *Map* en los rumiantes. En la Tabla IX se muestran algunos de los genes candidatos evaluados en relación a la infección paratuberculosa en bovino y ovino.

Tabla IX. Genes candidatos que pudieran intervenir en la susceptibilidad a la infección por *Map* en rumiantes.

Gen	Especie	Micro-satélite	SNP	Mutación ^a	Localización	Significación ^b	Referencia	Año
CARD15	Bovino	-	2197T>C	Cys733Arg	LRR ^c	2.32 (1.41–3.83) ^{de}	Pinedo y col.	2009
	Bovino	-	1908C>T	-	3'-UTR ^c	2.043 (1.22–3.42) ^f	Ruiz-Larranaga y col.	2010
IFN-γ	Bovino	-	2781G/T	Gly134Val	Exón 1	1.98 (1.11–3.51) ^{dg}	Pinedo y col.	2009
IL10RA	Bovino	-	984G>A	Syn ^c	Codificación	2.27 (1.4–3.67) ^h	Verschoor y col.	2010
	Bovino	-	1098C>T	Syn	Codificación	2.27 (1.4–3.67) ^h	Verschoor y col.	2010
	Bovino	-	1269T>C	Syn	Codificación	2.27 (1.4–3.67) ^h	Verschoor y col.	2010
	Bovino	-	1302A>G	Syn	Codificación	2.27 (1.4–3.67) ^h	Verschoor y col.	2010
MHC	Ovino	163/*	-	-	-	p < 0.05 ⁱ	Reddacliff y col..	2005
SLC11A1	Ovino	162/*	-	-	Intrón 1	p < 0.05 ⁱ	Reddacliff y col..	2005
	Bovino	275/*	-	-	3'-UTR	2.01 (1.08–3.76) ^e	Pinedo y col.	2009
	Bovino	279/*	-	-	3'-UTR	5.31 (1.56–17.9) ^e	Pinedo y col.	2009
	Bovino	-	1067C>G	Pro356Ala	Transmembrana dominio 8	1.484 (1.049–2.099)	Ruiz-Larranaga y col.	2010
	Bovino	-	1157-91A>T	-	Intrón 11–12	1.592 (1.095–2.314)	Ruiz-Larranaga y col.	2010

Gen	Especie	Micro-satélite	SNP	Mutación ^a	Localización	Significación ^b	Referencia	Año
TLR1	Bovino	-	G658A	Val220Met	Ectodominio	3.459	Mucha y col.	2009
	Ovino	-	448A>G	Ser150Gly	Ectodominio	9.08 ⁱ	Bhide y col.	2009
	Ovino	-	517G>Y	Glu173 [Lys,Glu]	Codificación	9.08 ^k	Bhide y col.	2009
	Ovino	-	658A>G	Val220Met	Ectodominio	9.08 ^j	Bhide y col.	2009
TLR2	Bovino	-	2038A>G	Ile680Val	Dominio Toll/IL-1R	NA	Mucha y col.	2009
	Bovino	-	1903T>C	Syn	LRR Putativa	1.7 (1.2–2.8) ^h	Koets y col.	2010
	Ovino	-	2008A>Y	Phe670Leu	Dominio Toll/IL-1R	4.5 ^k	Bhide y col.	2009
	Ovino	-	2037T>C	Leu679Phe	Dominio Toll/IL-1R	2.01 ^k	Bhide y col.	2009
TLR4	Bovino	-	892G>Y	Gly298 [Arg,Trp]	Ectodominio	NA ^l	Mucha y col.	2009
	Bovino	-	895G>A	Asp299Asn	Ectodominio	NA ^l	Mucha y col.	2009
	Bovino	-	1165G>A	Gly389Ser	Ectodominio	NA ^l	Mucha y col.	2009
	Bovino	-	1167T>C	Gly389Ser	Ectodominio	NA ^l	Mucha y col.	2009
	Ovino	-	1066T>C	Phe356Leu	Ectodominio	1.64 ^j	Bhide y col.	2009

a) Cambios en los aa de la secuencia de la proteína, si el polimorfismo está dentro de la región traducida. **b)** Significancia presentada como odd ratio o valor de p obtenido con los test de Chi-square/Fisher. **c)** Abreviaturas: LRR: Leucine-Rich Repeat. 3'-UTR: Untranslated Region. Syn: Synonymous. SNP: Single Nucleotide Polymorphism. TLR: Toll-like Receptor. SLC: Solute Carrier Family. MHC: Major Histocompatibility Complex. IL: Interleuquina. IFN: Interferon. CARD: caspase recruitment domain. **d)** Odd ratio determinado por análisis univariante (0 = homocigoto, 1 = mutante heterocigoto, 2 = mutante homocigoto). **e)** El efecto es incluso significativo usando análisis multivariante, considerando factores como la raza y la edad. **f)** Significativo sólo para los rebaños Holstein-Frisona de España. **g)** La significancia se pierde en los análisis multivariantes, considerando factores como la raza y la edad. **h)** Odd ratio para el factor dominante **i)** Asociación significativa con enfermedad grave. **j)** Odd ratio para mutantes homocigotos. **k)** Odd ratio para mutantes heterocigotos. **l)** No aplicable al 100 % (14/14) de las vacas con estas mutaciones. Todos tienen fenotipo de enfermedad. Purdie y col., 2011.

II.3.4. Distribución y Prevalencia

La paratuberculosis es una enfermedad de creciente prevalencia en especies ganaderas que está ampliamente distribuida por todo el mundo (Manning y Collins, 2010). Sin embargo, la dificultad en su diagnóstico hace que en ocasiones la estimación de la prevalencia real sea difícil. Las técnicas utilizadas en la detección de animales infectados, sobre todo de los animales subclínicos, en general no son especialmente sensibles, a lo que hay que añadir el largo período de latencia desde la infección hasta la aparición de síntomas, y la variabilidad del curso de la enfermedad entre animales. Además, a pesar de que la paratuberculosis está incluida dentro de la lista B de enfermedades de la OIE, la notificación de casos en los distintos países es variable, lo que dificulta conocer su distribución mundial. En EEUU se estima que la infección afecta aparentemente al 68 % de los rebaños bovinos de leche (Nielsen y Toft, 2009). Sin embargo, de acuerdo a los análisis bayesianos realizados por Lombard y col. (2013) la prevalencia real para estos rebaños estadounidenses muestreados en 2007 alcanzaría el 91 %. La prevalencia de la paratuberculosis bovina en rebaños en Europa es de aproximadamente un 50 %. En la Tabla X se muestra la prevalencia de la paratuberculosis bovina en rebaños de varios países (García y Shallo, 2015).

II. INTRODUCCIÓN GENERAL

Tabla X. Prevalencia de la paratuberculosis bovina a nivel de rebaño en diversos países.

País (estado)	Tipo de rebaño bovino	Nº rebaños; Nº vacas	Prevalencia de rebaño aparente (%)	Prevalencia reportada (%)	Método de diagnóstico	Referencia
Holanda	Leche	378; 15.822	54.7 ^b	NR	Suero, Elisa	Muskens y col., 2000
Bélgica	Leche	98; 4.497	32	10 ^c	Suero, Elisa	Boelaert y col., 2000
Bélgica	Carne	259; 4.010	7	3 ^c	Suero, Elisa	Boelaert y col., 2000
Estados Unidos	Carne	380; 10.371	7.9 ^d	NR	Suero, Elisa	Dargatz y col., 2001
Canadá	Carne	NR; 1.799	15, ^d 3 ^c	NR	Suero, Elisa	Waldner y col., 2002
Suiza	Leche	1.384	19.7	NR	Leche de tanque, PCR	Corti y Stephan, 2002
Reino Unido	Leche	1.384	19.7	NR	Leche de tanque, PCR	Grant y col., 2002
Estados Unidos (CA)	Leche	65; 1.950	68, ^d 35 ^c	NR	Suero, Elisa	Adaska y Anderson, 2003
Canadá	Leche	50; 1.500	40.0 ^c	26.8	Suero, Elisa	Sorensen y col., 2003
Austria	Mixto	NR; 756	19	NR	Varios métodos	Dreier y col., 2006
Estados Unidos	Leche	524; NR	68.1	NR	Cultivo fecal	APHIS, 2007
España	Leche	1.210; 38.077	35.95, ^d 14.96 ^c	27.77, ^d 18.79 ^c	Suero, Elisa	Dieguez y col., 2007
España	Carne	1.497; 22.964	10.68, ^d 2.47 ^c	2.78, ^d 2.40 ^c	Suero, Elisa	Dieguez y col., 2007
España	Mixto	28; 84	7.14, ^d 3.57 ^c	5.70, ^d 12.24 ^c	Suero, Elisa	Dieguez y col., 2007
Irlanda	Leche	34; 949	50, ^d 25 ^c	NR	Suero, Elisa	Mee y Richardson, 2008
Irlanda	Leche	165; NR	31.5	20.6	Suero, Elisa	Good y col., 2009
Irlanda	Carne	458; NR	17.9	7.6	Suero, Elisa	Good y col., 2009
Estados Unidos	Leche	524	70.4	91.1	Cultivo fecal	Lombard y col., 2013
Estados Unidos	Leche	13 granjas	76.92	NR	Cultivo fecal	Toth y col., 2013
Caribe y Latino América	Mixto	21 estudios	75.8	NR	Varios métodos	Fernández-Silva y col., 2014
Nueva Zelanda	Carne	116; NR	29	42	Pool de cultivo fecal + Elisa de sueros individuales	Verdugo y col., 2014
Suiza	Leche	12; 855	83.3	NR	Pool de cultivo fecal + PCR	Keller y col., 2014
Suiza	Carne	11; 484	72.7	NR	Pool de cultivo fecal + PCR	Keller y col., 2014
Canadá	Carne	28; 840	21	20	Suero, Elisa	Pruvot y col., 2014

a) NR: No reportado. ELISA: Enzyme-linked Immunosorbent Assay. **b)** Nivel de corte ajustado al alza para aumentar la especificidad. **c)** Basado en 2 o más animales con resultado positivo. **d)** Basado en 1 o más animales con resultado positivo. Garcia y Shalloo, 2015.

La prevalencia individual de la paratuberculosis en Europa tanto en bovino como en pequeños rumiantes es muy variable y oscila entre el 0-52 % como se puede observar en las Tablas XI y XII.

Tabla XI. Resumen adaptado de las prevalencias individuales de paratuberculosis en Europa en ganado vacuno.

País/región	Período de estudio	Prevalencia aparente (%)	Referencia
Alemania/Arnsberg	1993	1.5	Bottcher y Gangl, 2004
Alemania/Arnsberg	1993	1.4	Bottcher y Gangl, 2004
Alemania/Bavaria	2005	1.5	Bottcher y Gangl, 2004
Alemania/Bavaria	2005	0.9	Bottcher y Gangl, 2004
Alemania/Bavaria	2005	24	Bottcher y Gangl, 2004
Alemania/Sajonia	2002-2004	4.4	Donat y col., 2005
Austria/todas	Desconocido	19.0	Dreier y col., 2006
Austria/4 regiones	1995-1997	6.0	Gasteiner y col., 1999
Bélgica/todas	1997-1998	0.9	Boelaert y col., 2000
Eslovenia/todas	1997	0.4	Ocepek y col., 1999
Eslovenia/todas	1998	1.2	Ocepek y col., 1999
Eslovenia/todas	2000-2001	0.4	Ocepek y col., 1999
Eslovenia/todas	1999	3.4	Ocepek y col., 1999
Francia/Yonne	1998-1999	3.3	Petit, 2001
Holanda/todas	1998	2.5	Muskens y col., 2000
Italia/Latium	Desconocido	2.4	Lillini y col., 2005
Italia/Véneto	2000-2001	3.5	Robbi y col. 2002
Italia/Verona	1997-1998	6.8	Vicenzoni y col., 1999
Noruega/desconocido	1996-1997	7.7	Tharaldsen y col., 2003
Noruega/todas	2002	0.1	Mork y col., 2003
República de Irlanda/animales importados	1997	3.6	O'Doherty y col., 2002
Reino Unido/sur-oeste	2004	3.5	Cetinkaya y col., 1996
Suecia/todas	2000-2001	0	Sternberg y Viske, 2003
Turquía/desconocida	Desconocido	4.6	Atala y Akcay, 2001
Turquía/Tracia	Desconocido	0	Ikiz y col., 2005
Turquía/Elazig	1997-1998	5	Cetinkaya y col., 2000

Nielsen y Toft, 2009

Tabla XII. Resumen adaptado de las prevalencias individuales de paratuberculosis en Europa en ovejas y cabras.

Especie animal	País/región	Período de estudio	Prevalencia aparente (%)	Referencia
Cabra	Grecia/ Islas Espóradadas	Desconocido	0	Minas y col., 1994
Cabra	España/Ávila	1996	52	Reviriego y col., 2000
Cabra	Suiza/todas	2002	23	Muehlherr y col., 2003
Cabra	Reino Unido/Inglaterra, Gales, Irlanda del Norte	1998	1	Grant y col., 2001
Rebaño mixto de ovejas y cabras	Eslovenia/todas	2000-2001	12	Ocepek y col., 2002
Rebaño mixto de ovejas y cabras	Portugal/Lisboa	Desconocido	27	Mendes y col., 2004
Ovejas	Grecia/Norte Islas Espóradadas	Desconocido	0	Minas y col., 1994
Ovejas	España/Ávila	1996	29	Reviriego y col., 2000
Ovejas	Reino Unido/Inglaterra, Gales, Irlanda del Norte	1998	0	Grant y col., 2001
Ovejas	Suiza/todas	2002	24	Muehlherr y col., 2003

Nielsen y Toft, 2008

Un estudio sobre la prevalencia de *Map* en explotaciones bovinas lecheras realizado mediante PCR específico de *Map* en muestras de leche de tanque indicó que alrededor de un 18 % de las instalaciones españolas podrían estar infectadas (Sevilla y col., 2002). En otro estudio realizado en 201 vacas de desvieje procedentes del matadero de Bilbao se detectaron porcentajes de positivos individuales de 0.5, 0.5, 4.7, 15.4 y 19.4 % mediante cultivo de tejidos y de heces, inmunodifusión en gel de agarosa (agarose gel immunodiffusion; AGID), histopatología, PCR y ELISA respectivamente (Garrido, 2001). Al combinar los resultados de las distintas técnicas, la prevalencia individual fue de un 31.3 %. En Asturias, Balseiro y col. (2003) analizaron 134 vacas mediante histopatología encontrando una prevalencia individual del 28 % y a nivel de rebaño de alrededor del 32 %. Más recientemente se ha observado que el 2.8 % de los terneros de 137 rebaños analizados de Castilla y León presentaban lesiones asociadas con la paratuberculosis y que cerca del 50 % de estos rebaños presentan al menos un animal infectado con paratuberculosis (Pérez y col., 2009).

En cuanto a la prevalencia de la enfermedad en ganado ovino, en el País Vasco se analizaron 4.504 ovejas procedentes de 226 rebaños encontrándose prevalencias individuales del 2 % con la técnica AGID y del 5.8 % con la técnica ELISA (Aduriz, 1993). Las seroprevalencias a nivel de rebaño encontradas en este estudio fueron del 23.5 % con la técnica AGID y del 31.4 % con ELISA. En Aragón, Pérez y col. (1996) encontraron prevalencias individuales en ovino de hasta un 49.4 % empleando métodos histopatológicos. Otro estudio realizado en rebaños de ovejas y cabras en Madrid reveló mediante la técnica AGID una prevalencia individual de hasta el 44 % en pequeños rumiantes (Mainar-Jaime y col., 1998). En rebaños caprinos procedentes de Huelva, Córdoba e Islas Canarias, los resultados de ELISA indicaron porcentajes de animales positivos del 41, 13 y 0.5 % respectivamente (Molina y col., 1991). Estos estudios confirman una amplia distribución de la paratuberculosis en España en bovino, ovino y caprino.

En España, *Map* es endémico en ciervos (*Cervus elaphus*) y gamos (*Dama dama*) de la costa norte y también ha sido identificado esporádicamente en jabalíes (*Sus scrofa*), conejos (*Oryctolagus cuniculus*) y tejones (*Meles meles*). La prevalencia de la enfermedad en ciervo se estimó inicialmente en un 30.1 % (Reyes-García y col., 2008). Sin embargo, estudios más recientes situaron la prevalencia en ciervo en un 1.1 % (Carta y col., 2012). Estas diferencias se deben principalmente a que en el primer estudio se emplearon ciervos en cautividad y se utilizó la técnica ELISA, mientras que el segundo estudio se realizó únicamente con ciervos

silvestres y se utilizó análisis histopatológico para determinar la prevalencia. Los porcentajes de prevalencia de la enfermedad en jabalí, gamo y conejo se han estimado en un 1.5, 29.4 y 2.5 % mediante cultivo, histopatología y ELISA, respectivamente (Alvarez y col., 2005; Balseiro y col., 2008; Maio y col., 2011). Carta y col. (2013) concluyeron que la prevalencia media de *Map* en animales silvestres se situaría en torno a un 2.4 %. Para llegar a esta conclusión realizaron una revisión bibliográfica de 66 estudios, la mayoría de ellos realizados en Europa y Norte América, en los que se determinaba la prevalencia de un total de 178 especies silvestres empleando histopatología, PCR, cultivo y serología. En la Tabla XIII se resumen las prevalencias de *Map* encontradas en animales domésticos y silvestres en España.

Tabla XIII. Prevalencias de *Map* en animales domésticos y silvestres en España.

Especie	Región	Tipo Prevalencia	Prevalencia (%)	Técnica	Referencias
Bovino	Norte/Centro/Sur España	Rebaño	18.0	PCR	Sevilla y col., 2002
	País Vasco	Individual	31.3	Cultivo, AGID, PCR, histopatología,	Garrido, 2001
	Asturias	Individual	28.0	ELISA	Balseiro y col., 2003
	Asturias	Rebaño	32.0	Histopatología	Balseiro y col., 2003
	Castilla y León	Individual	2.8	Histopatología	Pérez y col., 2009
	Castilla y León	Rebaño	50.0	Histopatología	Pérez y col., 2009
Ovino	País Vasco	Individual	2.0	AGID	Aduriz, 1993
	País Vasco	Individual	5.8	ELISA	Aduriz, 1993
	País Vasco	Rebaño	23.5	AGID	Aduriz, 1993
	País Vasco	Rebaño	31.4	ELISA	Aduriz, 1993
	Aragón	Individual	49.4	Histopatología	Pérez y col., 1996
	Madrid	Individual	44.0	AGID	Mainar-Jaime y col., 1998
Caprino	Huelva	Rebaño	41.0	ELISA	Molina y col., 1991
	Córdoba	Rebaño	13.0	ELISA	Molina y col., 1991
	Canarias	Rebaño	0.5	ELISA	Molina y col., 1991
	Madrid	Individual	44.0	AGID	Mainar-Jaime y col., 1998
Ciervo	Centro/Sur España	Individual	30.1	ELISA	Reyes-García y col., 2008
	Centro/Sur España	Individual	1.1	Histopatología	Carta y col., 2012
Jabalí	Sur/Oeste España	Individual	1.5	Cultivo	Alvarez y col., 2005
Gamo	Asturias	Individual	29.4	Histopatología	Balseiro y col., 2008
Conejo	Sur España	Individual	2.5	ELISA	Maio y col., 2011

II.4. PATOGENIA

La patogénesis de la paratuberculosis engloba los diferentes mecanismos empleados por *Map* para penetrar y persistir en el animal que van dirigidos a prevenir la activación de los macrófagos, la maduración de los fagosomas y la atenuación de la respuesta inmune Th1 o proinflamatoria. Es imprescindible comprender con claridad la patogénesis de la enfermedad

para poder llegar a desarrollar estrategias que prevengan o controlen la infección o para el tratamiento de los animales infectados.

II.4.1. Entrada de *Map* en el hospedador

II.4.1.1. Entrada de *Map* a través del epitelio intestinal

Una vez ingerida, *Map* viaja a través del tracto gastrointestinal hasta el íleon. En los modelos de infección *in vivo* en los que generalmente se emplean concentraciones más altas de *Map* se ha demostrado que una vez ingerida *Map* invade la mucosa oral a nivel de las criptas de las amígdalas, desde donde llega a los nódulos linfáticos mesentéricos y al íleon por vía sanguínea (Sweeney y col., 2008). En la Figura 4 se muestra la vía oral de infección con *Map*.

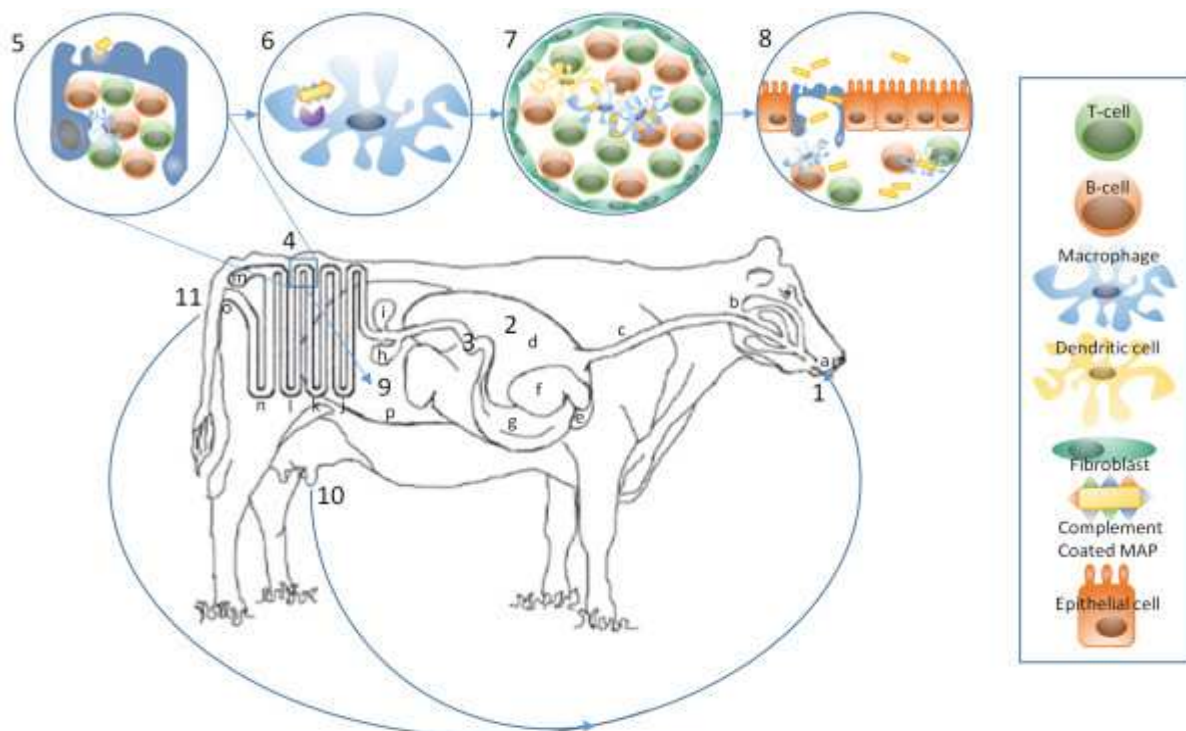


Figura 5. Entrada de *Map* por vía oral. *Map* es ingerida (1) y a través del tracto gastrointestinal llega hasta el rumen (2) donde las proteínas FAP de la bacteria se activan y se unen a la fibronectina. A continuación, *Map* llega hasta el tracto digestivo inferior (3). Al alcanzar el íleon (4) *Map* se une a los receptores de fibronectina de las células M localizadas en las placas de Peyer (5). Una vez que la bacteria cruza el epitelio intestinal, es fagocitada por los macrófagos sub-epiteliales a través de receptores de complemento C3 o TLR-2 que unen el Man-LAM de la envuelta de *Map* (6). Los macrófagos infectados se agregan a otros macrófagos y linfocitos para dar lugar a los granulomas (7) en donde *Map* persiste durante la larga fase crónica de la enfermedad. Cuando la enfermedad se reactiva (8) *Map* escapa de los granulomas y puede ser transmitida a los terneros y a los recién nacidos a través de la leche (10) o a través de las heces (11). (a) boca (b) glándulas salivares (c) esófago (d) rumen (e) retículo (f) omaso (g) abomaso (h) vesícula biliar (i) páncreas (j) duodeno (k) yeyuno (l) íleon (m) ciego (n) intestino grueso (o) ano (p) útero. Arsenault y col., 2014.

Una vez alcanzado el íleon, *Map* se une preferentemente a los receptores de fibronectina $\beta 1$ de las células M que tapizan los folículos linfoides de las placas de Peyer del epitelio intestinal (Momotani y col., 1988; Sweeney, 2011; Bermudez y col., 2010). Se ha demostrado que la entrada de *Map* a través de las células M depende de la expresión de la proteína de membrana de 35 kDa de la bacteria (Bannantine y col., 2003a) y del puente de unión de las proteínas de unión a la fibronectina (fibronectin-attachment protein; FAP) de *Map* y las integrinas $\beta 1$ de las células M (Secott y col., 2001; Secott y col., 2004). No obstante, el paso de *Map* vía células M no es exclusivo puesto que también se ha demostrado el paso de la micobacteria a través de las células epiteliales o enterocitos (Bermudez y col., 2010; Ponnusamy y col., 2013). Sin embargo, las células M al poseer en su superficie una alta densidad de integrinas $\beta 1$, actuarían como receptores preferentes (Coussens y col., 2010).

Las células M son capaces de traslocar la micobacteria intacta en el interior de vacuolas desde el lumen intestinal hasta la submucosa donde será fagocitada por los macrófagos subepiteliales (Miller y col., 2007). Debido a la falta de lisosomas y enzimas hidrolíticas presentes en las células M, muchas de las propiedades antigénicas de *Map* permanecerían inalteradas después de pasar a través de ellas. La captación y transporte de *Map* por estas células transcurre de manera muy rápida. Sigurdardóttir y col. (2001) demostraron que tras la inoculación directa de *Map* en el intestino delgado de cabras, la mayor parte de las bacterias atravesaron las células M en menos de una hora.

II.4.1.2. Entrada de *Map* en los macrófagos subepiteliales

La entrada en el macrófago se produce mediante la unión del Man-LAM a los receptores de manosa del macrófago (mannose receptor; MR), por unión al receptor de complemento 3 (complement receptor 3; CR3) de la bacteria previamente opsonizada con complemento-3 (C3) y a través del CD14 del TLR-2. Además de con los macrófagos del hospedador, *Map* también puede interactuar con las células dendríticas mediante unión del Man-LAM de la envuelta de *Map* al receptor DC-SIGN (Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin) (Jozefowski y col., 2008).

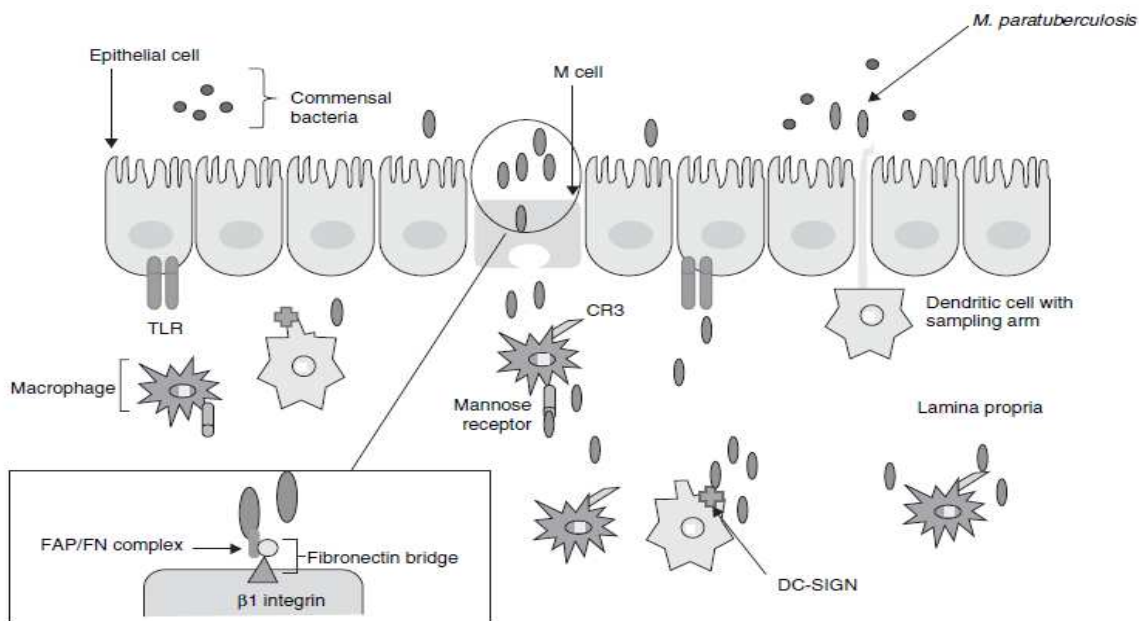


Figura 6. Tácticas utilizadas por *Map* para atravesar la barrera intestinal e invadir los macrófagos. *Map* invade preferentemente las células M mediante la creación de un puente de fibronectina y posteriormente invade los macrófagos subepiteliales. *Map* también puede atravesar las células epiteliales intestinales. La entrada en el macrófago se produce mediante la unión del Man-LAM de *Map* al receptor de complemento CR3, a los MR y/o a los TLR-2. Coussens y col., 2010.

II.4.2. Mecanismos de supervivencia de *Map* en los macrófagos del hospedador

Los diferentes mecanismos de los que dispone *Map* para asegurar su supervivencia intracelular en el interior de los macrófagos del hospedador vienen resumidos en la Tabla XIV.

Tabla XIV. Mecanismos de supervivencia intracelular de *Map*.

Mecanismo	Vía celular	Factor	Resultados
Sobre-expresión de IL-10	TLR2-MAPK-p38	Man-LAM	↓ TNF- α ↓ IL-12 ↓ IL-8 ↓ MHC-II ↓ Apoptosis ↓ Acidificación del fagosoma ↓ Muerte del <i>Map</i>
Disminución de la expresión de TNF- α , IL-12 e IL-8	Mediado por IL-10	Man-LAM	Atenuación de la respuesta inflamatoria Atenuación de la respuesta inmune Th1
Disminución de la expresión de MHC-II.	Mediado por IL-10	Man-LAM	↓ Presentación de antígenos
Disminución de la apoptosis	Mediado por IL-10 ↓ TNF- α	?	↑ Supervivencia celular
↓ Acidificación del fagosoma	Mediado por IL-10	Man-LAM	↑ Supervivencia de <i>Map</i>
↓ Fusión fagosoma-lisosoma	TLR2/MAPK-p38		

TNF: Tumor necrosis factor. Weiss y Souza, 2008.

Map tiene la capacidad de inhibir la maduración del fagosoma, su acidificación y su consecuente fusión con los lisosomas. El papel activo que tiene *Map* en la prevención de la fusión fagosoma-lisosoma está apoyado por la observación de que las células viables de *Map* son capaces de persistir en el fagosoma durante 15 días, mientras que la formación del fagolisosoma no se ve interrumpido después de la captación de células no viables de *Map* (Kuehnel y col., 2001). Souza y col. (2013) demostraron que la incubación de macrófagos bovinos con el Man-LAM de la envuelta de *Map* previo a la infección con *Map* inhibe la acidificación del fagosoma, la fusión fagosoma-lisosoma, la apoptosis y aumenta la supervivencia de *Map* en el interior del macrófago infectado. Consecuentemente con estos resultados, se demostró que la unión del Man-LAM de dos aislados virulentos de *Map* al TLR-2 de los macrófagos resulta en activación de la proteína quinasa activada por mitógeno P38 (mitogen-activated protein kinase; MAPK-38). La activación de esta quinasa serina/treonina celular conduce a la activación de una cascada de activación de factores de transcripción que a su vez resultan en una sobre-expresión de la IL-10 (Weiss y Souza, 2008). La sobre-expresión de la IL-10 resulta en una inhibición de quimioquinas, IL-12, TNF- α , IFN- γ y el MHC-II. Estos resultados apoyan la hipótesis de que el Man-LAM es uno de los factores de virulencia de *Map* que facilita su supervivencia en el interior del macrófago infectado. Además, el Man-LAM de *Mycobacterium tuberculosis* (*MTb*) parece estar implicado directamente en la supresión de radicales de oxígeno y generación de óxido nítrico (Majumdar y col., 2008).

Map es capaz de inhibir la maduración de los fagosomas. La maduración de los fagosomas es un proceso regulado por dos GRabGTPasas; Rab5 estimula la fusión de los fagosomas con endosomas tempranos y Rab7 la fusión de los fagosomas con endosomas tardíos y con los lisosomas (Chua y col., 2011). Al retener a Rab5 en el fagosoma y al inhibir el reclutamiento del autoantígeno endosomal primario (early endosome antigen 1; EEA1) al fagosoma, la bacteria es capaz de bloquear la actividad de Rab5 y Rab7 y consecuentemente inhibir la maduración del fagosoma infectado (Fratti y col., 2001).

La inhibición de la fusión fagosoma-lisosoma se puede producir directamente gracias a los sulfolípidos de *Map* como se puede observar en la Figura 7. *Map* también puede inhibir la fusión del fagosoma con el lisosoma mediante la secreción de la fosfatasa SapM. Durante la maduración de fagosoma, el fosfatidilinositol 3-fosfato (PI3P) es un lípido que regula el tráfico a través de la membrana que permite que el fagosoma pueda adquirir constituyentes

lisosomales (Vergne y col., 2005). En células infectadas con micobacterias muertas, el PI3P funciona de forma normal, pero en células infectadas con micobacterias vivas, el PI3P se elimina de forma continua por la actividad hidrolítica de la fosfatasa SapM (Brumell y Scidmore, 2007). Este mecanismo es muy probable que sea utilizado por *Map* ya que su genoma contiene una fosfoesterasa muy similar en secuencia de aminoácidos a la que presenta la SapM en *Mtb*. Otro mecanismo utilizado por *Map* para inhibir la fusión fagosoma-lisosoma es bloqueando la liberación de la proteína envuelta de triptófano aspartato (tryptophan aspartate nontaining coat protein; TACO). Normalmente, TACO es liberado por el fagosoma permitiendo así su fusión con el lisosoma. (Ferrari y col., 1993).

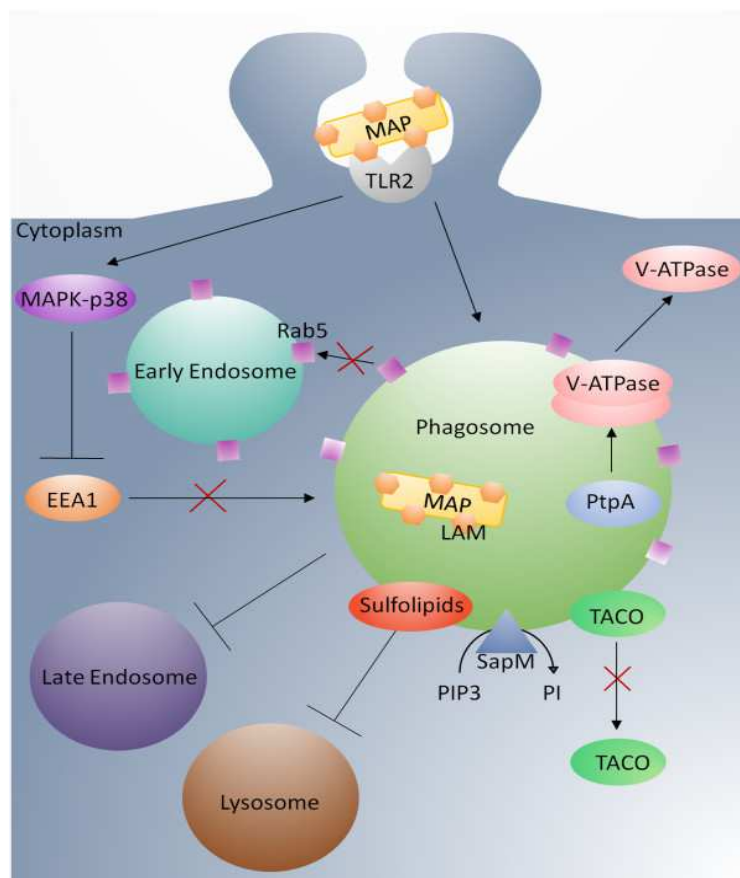


Figura 7. Inhibición de la maduración del fagosoma que contiene a *Map* y su fusión con lisosomas. El Man-LAM de las cepas virulentas de *Map* se une a los TLR-2 del macrófago lo que resulta en una inhibición de la MAPK-p38 y consecuentemente en un bloqueo de la liberación de EEA1 al fagosoma que contiene a *Map*. El bloqueo en la liberación de EEA1 impide la correcta maduración del fagosoma. Otro mecanismo utilizado por *Map* para impedir la maduración correcta del fagosoma es impidiendo la fusión de éste con endosomas tempranos mediante el bloqueo de la liberación de RAb5. Por otro lado, los sulfolípidos de *Map* bloquean directamente la fusión del fagosoma con el lisosoma. Otros mecanismos utilizados por *Map* para bloquear la fusión fagosoma-lisosoma están mediados por las fosfatasas SapM y PtpA (Protein tyrosine phosphatase A) que son secretadas por *Map*. SapM desfosforila PIP3 y altera el tráfico de membrana impidiendo al fagosoma la adquisición de constituyentes lisosomales. *Map* puede también bloquear la liberación de TACO del fagosoma lo que impide la fusión fagosoma-lisosoma. La V-ATPasa está involucrada en la acidificación del fagosoma. La PtpA de *Map* se une a la V-ATPasa y esto resulta en la eliminación de ésta última del fagosoma lo que impide la acidificación del fagosoma. Arsenault y col., 2014.

Para que las enzimas hidrolíticas que contienen los lisosomas puedan actuar se requiere que el pH del fagosoma sea lo suficientemente ácido. Para ello, el fagosoma aumenta el pH de sus vacuolas mediante la acción de la H⁺-ATPasa (V-ATPasa), una proteína transportadora que utiliza la energía de trifosfato de adenosina (ATP; Adenosine triphosphate) para bombear protones en la vacuola fagocítica (Sturgill-Koszycki y col., 1994). La inhibición de la acidificación de las vacuolas fagosomales es un mecanismo de evasión utilizado por muchos patógenos intracelulares. De hecho se ha demostrado que los fagosomas que contienen micobacterias patógenas tienen un pH substancialmente más alto que los fagosomas que contienen organismos no patógenos o muertos (Tsukano y col., 1999). A través de la neutralización de esta bomba de protones *Map* es capaz de prevenir la acidificación de las vacuolas fagosomales y consecuentemente del fagosoma (Sturgill-Koszycki y col., 1994). Para ello, *Map* secreta la fosfatasa PtpA a la vacuola fagosomal que se une a la V-ATPasa bloqueando su acción y la consecuente acidificación del fagosoma.

La actividad bactericida del fagolisosoma maduro depende de la producción de moléculas químicas reactivas, incluyendo las especies reactivas de intermediarios de oxígeno (reactive oxygen intermediates; ROI) tales como el anión superóxido, peróxido de hidrógeno y los radicales libres hidroxilo (Karakousis y col., 2004). *Map* tiene la capacidad de secretar superóxido dismutasa que neutraliza los radicales de superóxido. En el ambiente del fagolisosoma también se producen otras moléculas antimicobacterianas, los reactivos intermediarios de nitrógeno (Reactive nitrogen intermediates; RNI) como el óxido nítrico (Chan y col., 1992). En macrófagos de ratón, la producción de óxido nítrico inducida por IFN- γ está directamente relacionada con la capacidad de eliminar a *Mtb*, *Map* y *M. leprae* (Adams y col., 1993; Denis y col., 1990; Chan y col., 1992). La relevancia de los RNIs en la paratuberculosis está apoyado por la capacidad de los monocitos bovinos infectados por *Map* para aumentar la producción de óxido nítrico en respuesta a una estimulación con IFN- γ (Zhao y col., 1997). *Map*, así como otras micobacterias inhiben el reclutamiento de óxido nítrico sintetasa a los fagosomas infectados.

La inhibición de la apoptosis de los macrófagos es otra de las estrategias utilizadas por *Map* para evadir el sistema inmune del hospedador y aumentar su supervivencia. Se ha observado como macrófagos infectados con *Map* son más resistentes a la apoptosis inducida por H₂O₂, un inductor de la apoptosis de los macrófagos (Kabara y col., 2012). Uno de los mecanismos por los que *Map* inhibe la apoptosis es mediante la reducción de la expresión de

caspasa 3/7 y 8 (Borutaite y Brown, 2003). *Map* también inhibe la apoptosis a través de la secreción de la IL-10 y posterior inhibición de TNF- α (Koul y col., 2004). Man-LAM también parece estar implicado en la regulación de la apoptosis mediante la prevención de un aumento en la concentración del calcio citosólico. El calcio citosólico facilita la apoptosis al aumentar la permeabilidad de la membrana mitocondrial, lo que resulta en la liberación de productos pro-apoptóticos (Koul y col., 2004). El Man-LAM de *Map* también estimula la fosforilación de la proteína proapoptótica Bad (Bcl-2-associated death). La proteína Bad fosforilada es incapaz de unirse a proteínas anti-apoptóticas como el BCL-2 (B-cell lymphoma 2). Moléculas de BCL-2 libres evitan la liberación de citocromo c de la mitocondria e inhiben la apoptosis (Pott y col., 2009).

En las fases iniciales de la infección, las cepas virulentas de *Map* son capaces de alterar la capacidad de los macrófagos infectados para presentar antígenos bacterianos a las células T a través del sistema CD154-CD40 (Sommer y col., 2009). Esto conduce a la secreción de la citoquina anti-inflamatoria IL-10 que permite la supervivencia de las cepas virulentas de *Map* en los macrófagos del hospedador durante la fase subclínica de la enfermedad al inhibir la producción de IL-1- α , IFN- γ e IL-1- β (Weiss y col., 2004; Kabara y Coussens, 2012; Abendaño y col., 2013a). El factor de virulencia de *Map* implicado en la inhibición de la interacción de los macrófagos infectados con las células T es desconocido.

II.4.3. Establecimiento y progresión de la infección

Map replica en el interior del macrófago infectado hasta que los recursos celulares y el espacio son limitantes. Es entonces cuando *Map* induce la apoptosis e infecta a otros macrófagos subepiteliales vecinos. Los macrófagos infectados migran a los nódulos linfáticos locales y regionales, incluyendo los nódulos linfáticos mesentéricos (Ayele y col., 2004; Sivakumar y col., 2005; Tiwari y col., 2006; Zhu y col., 2008). Los macrófagos infectados secretan IL-8 que resulta en el reclutamiento de células epiteliales y células gigantes de Langhans, macrófagos y linfocitos T y B al sitio de la infección. Esta acumulación de células alrededor de los macrófagos infectados se denomina granuloma y se rodea de una capa densa de fibroblastos y colágeno que cierran la estructura (Saunders y Cooper, 2000). En la Figura 8 se muestra la estructura de un granuloma.

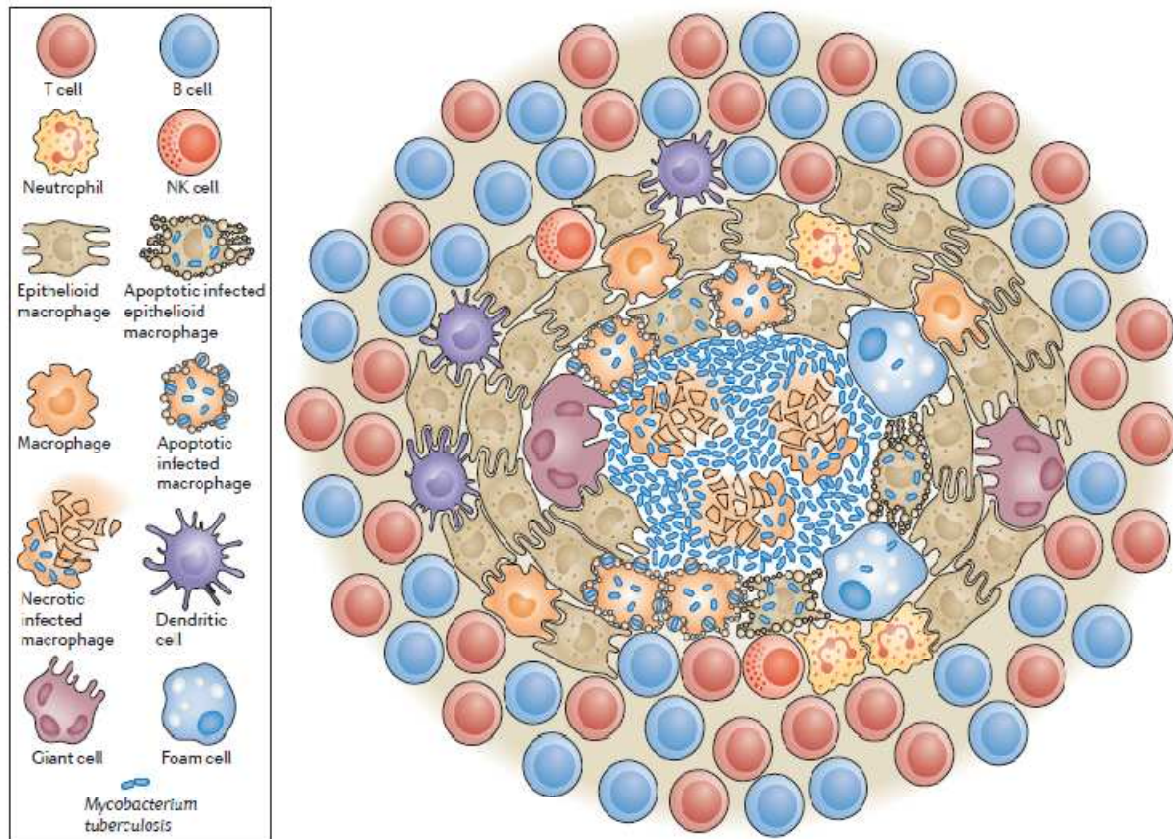


Figura 8. Estructura de un granuloma. Los macrófagos del granuloma pueden fusionarse a células gigantes multinucleadas o diferenciarse en células espumosas, que se caracterizan por la acumulación de lípidos. Las células espumosas se han observado con más frecuencia en el borde del centro necrótico de los granulomas maduros. Se han observado pocas bacterias en las células espumosas y en las células gigantes multinucleadas. Las bacterias están presentes por lo general en las áreas necróticas centrales donde se observan los macrófagos muertos y moribundos. Muchos otros tipos de células también forman el granuloma, tales como neutrófilos, células dendríticas, células B y T, células NK (Natural killer), fibroblastos y células que secretan componentes de la matriz extracelular. Basado en Ramakrishnan y col., 2012.

Dentro del granuloma, los linfocitos T secretan $\text{IFN-}\gamma$, que se encarga de activar a otros macrófagos. El $\text{TNF-}\alpha$ producido por los macrófagos es una de las citoquinas críticas para la correcta formación y persistencia de los granulomas, manteniendo el reclutamiento celular (Roach y col., 2002, Marino y col., 2007, Chakravarty y col., 2008). Los macrófagos infectados también producen grandes cantidades de IL-6 que juega un papel fundamental en la diferenciación de macrófagos activados a células gigantes multinucleadas.

Aunque se ha pensado durante mucho tiempo que la formación de granulomas es un proceso impulsado por el hospedador para contener la infección, estudios recientes indican que los granulomas contribuyen al crecimiento bacteriano temprano y que las micobacterias patógenas aprovechan el granuloma para su expansión local y diseminación sistémica (Davis

y col., 2009). *Map* puede persistir por tanto en el interior de los granulomas en un estado de dormancia durante décadas (Sandor y col., 2003). Si la inmunidad del hospedador se ve debilitada o suprimida, la micobacteria en estado de dormancia puede reactivarse, escapar del granuloma y causar lesiones en otras partes del tejido intestinal causando el engrosamiento de la pared intestinal (Sivakumar y col., 2005). La infección también puede diseminarse a los nódulos linfáticos supramamarios y a la glándula mamaria contaminando la leche y el calostro (Sweeney y col., 1992).

II.5. RESPUESTA INMUNE DEL HOSPEDADOR

II.5.1. Respuesta inmune anti-inflamatoria inducida tras la interacción de *Map* con los macrófagos del hospedador

En los estadios más iniciales de la infección, *Map* es capaz de evadir la respuesta inmune pro-inflamatoria del hospedador que es la que en condiciones normales se activa en el hospedador en respuesta a un agente patógeno. Contrariamente a lo que sería esperable, *Map* induce una respuesta inmune de tipo anti-inflamatorio en el macrófago infectado para lo que emplea diversos mecanismos: inhibición de la activación de los macrófagos infectados, inhibición de la apoptosis e inhibición de la presentación de antígenos a las células T. Esta respuesta de tipo anti-inflamatorio facilita la supervivencia de *Map* en el interior de los macrófagos infectados.

II.5.1.1. Inhibición de la activación de los macrófagos infectados.

El mecanismo que *Map* utiliza para entrar en los macrófagos del hospedador determina directamente la naturaleza de la respuesta de éste antes incluso de que *Map* entre en la célula hospedadora. La unión de Man-LAM de *Map* al TLR-2 inicia una cadena de activación celular a través de la cual se activa la proteína kinasa MAPK-p38. La activación de esta kinasa media en la producción de las citoquinas anti-inflamatorias IL-10 y TGF- β (transforming growth factor β) (Weiss y Souza, 2008). La producción temprana de IL-10 inhibe la producción de las citoquinas pro-inflamatorias IL-12, IL-1, IL-2, IFN- γ , TNF- α e IL-8 con lo que se favorece la supervivencia de *Map* en el interior del macrófago infectado. Por otro lado, la IL-10 inhibe la activación de los macrófagos infectados al inhibir la producción del factor estimulante de colonias de granulocitos en macrófagos (Granulocyte-macrophage

colony-stimulating factor; GM-CSF). La estimulación de IL-10 en los macrófagos infectados resulta también en un bloqueo de la acidificación del fagosoma que contienen los bacilos infectivos y de su fusión con el lisosoma. Es interesante destacar el hecho de que en monocitos bovinos tratados únicamente con Man-LAM se ha conseguido reproducir los efectos supresores de inmunidad que tienen lugar tras una infección con una cepa virulenta de *Map*.

II.5.1.2. Inhibición de la apoptosis.

Se ha demostrado que el Man-LAM de *Map* es capaz de inhibir la apoptosis del macrófago infectado al incrementar la concentración de calcio intracelular (Koul y col., 2004). El aumento de calcio intracelular conlleva un aumento de la permeabilidad de la membrana mitocondrial con la consiguiente liberación de moléculas pro-apoptóticas como por ejemplo el citocromo C. La liberación de moléculas pro-apoptóticas al exterior de la célula resulta en una disminución de las posibilidades de que la célula infectada entre en apoptosis. El Man-LAM de la envuelta de *Map* inhibe la apoptosis de la célula infectada por otra vía que consiste en la estimulación de la fosforilación de la proteína Bad. La fosforilación de Bad previene su unión a las proteínas anti-apoptóticas BCL-2 y BCL-XL. Como consecuencia, moléculas libres de BCL-2 pueden prevenir la liberación de citocromo C de la mitocondria y por lo tanto prevenir la apoptosis en los macrófagos infectados con *Map*. Otro mecanismo utilizado por las cepas virulentas de *Map* para inhibir la apoptosis de los macrófagos infectados es a través de la inhibición de la producción de TNF- α .

II.5.1.3. Inhibición de la presentación de antígenos a los linfocitos T.

En un periodo de tiempo de solo 12-24 horas tras la fagocitosis, los macrófagos infectados con cepas virulentas de *Map* presentan un número menor de moléculas del MHC clase II en superficie que los infectados con cepas avirulentas o con *Mycobacterium avium*. El procesamiento de los antígenos de *Map* y su presentación a las células T también está inhibido al neutralizarse las proteínas fagosomales implicadas en la degradación de antígenos a péptidos como la catepsina D. De hecho, se ha demostrado que en los fagosomas que contienen cepas virulentas de *Map*, la catepsina D y otras enzimas proteolíticas, se encuentran inactivadas (Gomes y col., 1999). Por el contrario, en fagosomas que contienen cepas de *Map* atenuadas, la catepsina D se presenta en su forma activa. Se ha demostrado que la IL-10

también actúa bloqueando la presentación de antígenos de *Map* a las células T al inhibir la producción del MHC clase II, CD (Cluster of differentiation) 80, CD86 y ICAM-1 (Intercellular adhesion molecule 1) presentes en la membrana celular del macrófago infectado.

II.5.2. Respuesta inmune pro-inflamatoria (Th1) inducida durante la fase subclínica de la infección

Durante el transcurso de la infección, algunos de los macrófagos infectados pueden reactivarse e inducir la expresión de quimioquinas y citoquinas pro-inflamatorias que favorecen el reclutamiento continuo de otros macrófagos infectados y de linfocitos T y B al sitio de infección para dar lugar a las lesiones granulomatosas características que aparecen en los tejidos de los animales infectados. Es por tanto, esta respuesta pro-inflamatoria exacerbada y continuada a lo largo del tiempo la causante de la destrucción progresiva del epitelio intestinal. En la Figura 9 se muestra una representación esquemática de las primeras etapas de la respuesta inmune a la infección micobacteriana.

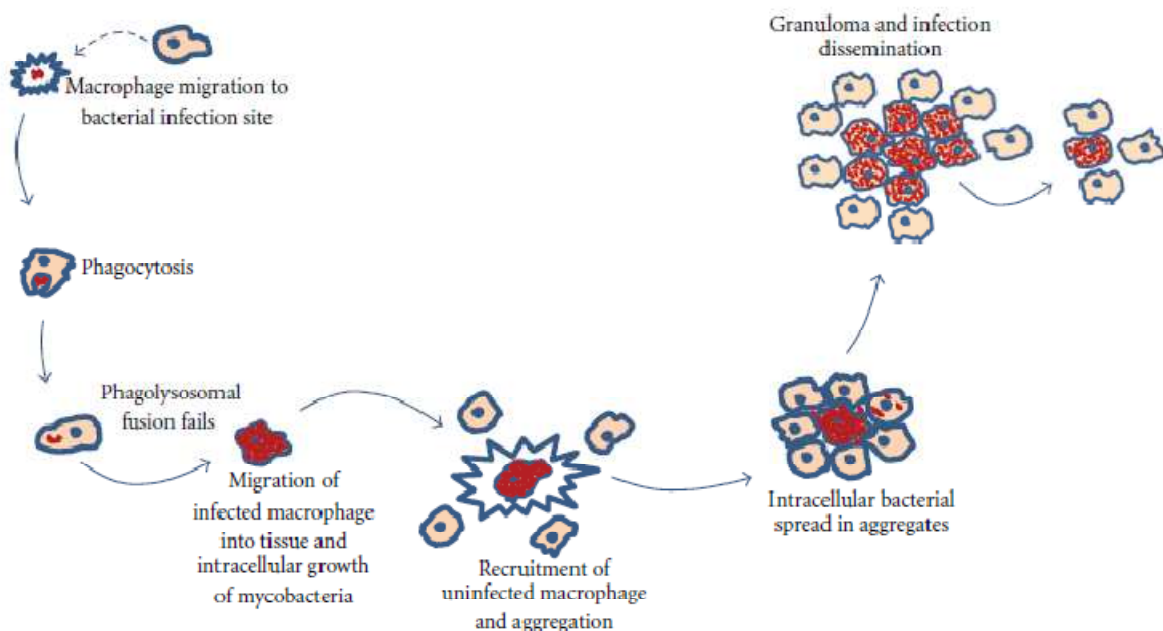


Figura 9. Representación esquemática de las primeras etapas del proceso de infección micobacteriana. Carvalho y col., 2012.

Cuando los macrófagos infectados con *Map* se reactivan lo primero que se produce es la presentación de antígenos de *Map* por parte del MHC en la superficie de los macrófagos junto con la producción de IL-1. Ambos eventos resultan en una activación de las células T

(Stabel y col., 2010). Las células T activadas producen IL-12 que está implicada en la expansión clonal de los linfocitos CD4 + T helper y CD8 + T citolíticos. En esta etapa crónica de la infección, son los linfocitos CD4 + los encargados de expresar las citoquinas pro-inflamatorias IFN- γ , IL-12 y TNF- α (Burrells y col., 1999; Stabel y col., 2000). El IFN- γ es la principal citoquina efectora de tipo Th1 y desempeña un papel muy importante en la diferenciación de las células que intervienen en este tipo de respuesta, así como en la activación y reclutamiento de los macrófagos al sitio de infección (Stabel, 2000a, 2006). Aunque los linfocitos T CD4 + son los principales productores de IFN- γ en las fases subclínicas de la infección; se ha demostrado que otras poblaciones de linfocitos como los linfocitos T CD8 + también lo producen pero en estadios más avanzados de la infección. Otra de las poblaciones de linfocitos, los $\gamma\delta$, están implicados en la formación de granulomas indirectamente al aumentar la producción de IFN- γ o directamente mediante la atracción de los macrófagos al sitio de la infección. El TNF- α se considera también una de las citoquinas básicas en las fases subclínicas de la paratuberculosis, estando estrechamente implicado en la formación de granulomas (Alzuherri y col., 1996).

II.5.3. Respuesta inmune humoral (Th2) inducida en la fase clínica de la infección

Aunque la secreción de citoquinas pro-inflamatorias es necesaria para controlar la infección inicial, su producción excesiva o demasiado prolongada también puede llegar a ser perjudicial a nivel local debido al riesgo de causar excesivo daño tisular. Por tanto, a medida que la infección progresa, y como consecuencia de una respuesta pro-inflamatoria (Th1) exacerbada que implica graves lesiones tisulares granulomatosas, se produce un cambio en el perfil de citoquinas (Stabel, 2010). De este modo, algunas citoquinas anti-inflamatorias (Th2) principalmente la IL-10 pero también las IL-4, IL-5 y la IL-6, se sobre-expresan contribuyendo a disminuir los niveles de IL-12 y de IFN- γ producidos por los linfocitos CD4 + Th1 (Ito y col., 1999; Khalifeh y Stabel, 2004a). De esta manera, al estar inhibido el IFN- γ por estas citoquinas Th2, no se reclutan nuevos macrófagos al sitio de la infección que puedan fagocitar la bacteria e ir aumentando y favoreciendo el desarrollo del granuloma. Sin embargo, el cambio de una respuesta inmune Th1 a una Th2 sería perjudicial para el hospedador, porque al activarse la Th2 lo que se consigue es la propagación de las micobacterias a otras zonas del tejido infectado en las fases avanzadas de la infección.

II. INTRODUCCIÓN GENERAL

Esta inhibición de una inmunidad Th1 y el cambio a una inmunidad Th2 se relaciona con la etapa clínica de la paratuberculosis y con una estimulación de los linfocitos B para producir anticuerpos, mayoritariamente de tipo IgG1, y por tanto, con una inmunidad de tipo humoral (Figura 10). En efecto, Ito y col. (1999), evidenciaron la función inmunosupresora que la IL-10 es capaz de ejercer indirectamente sobre el IFN- γ , al inhibir el gen IP-10, esencial para su secreción. También se ha descrito el papel supresor de la IL-4 sobre el IFN- γ (Peleman y col., 1989). Confirmando estos resultados, Khalifeh y Stabel (2004a) demostraron que la expresión de IL-10 y TGF- β era mayor en íleon y nódulos linfáticos asociados de vacas que manifestaban un estado más avanzado de la enfermedad, con lesiones multifocales y elevado número de micobacterias, comparado con vacas sanas o en fases iniciales de la enfermedad. De la misma forma, Tanaka y col. (2005), constataron una mayor expresión de IL-4 e IL-10 en lesiones multibacilares frente a las paucibacilares en nódulos linfáticos ileales de vacas infectadas por *Map*.

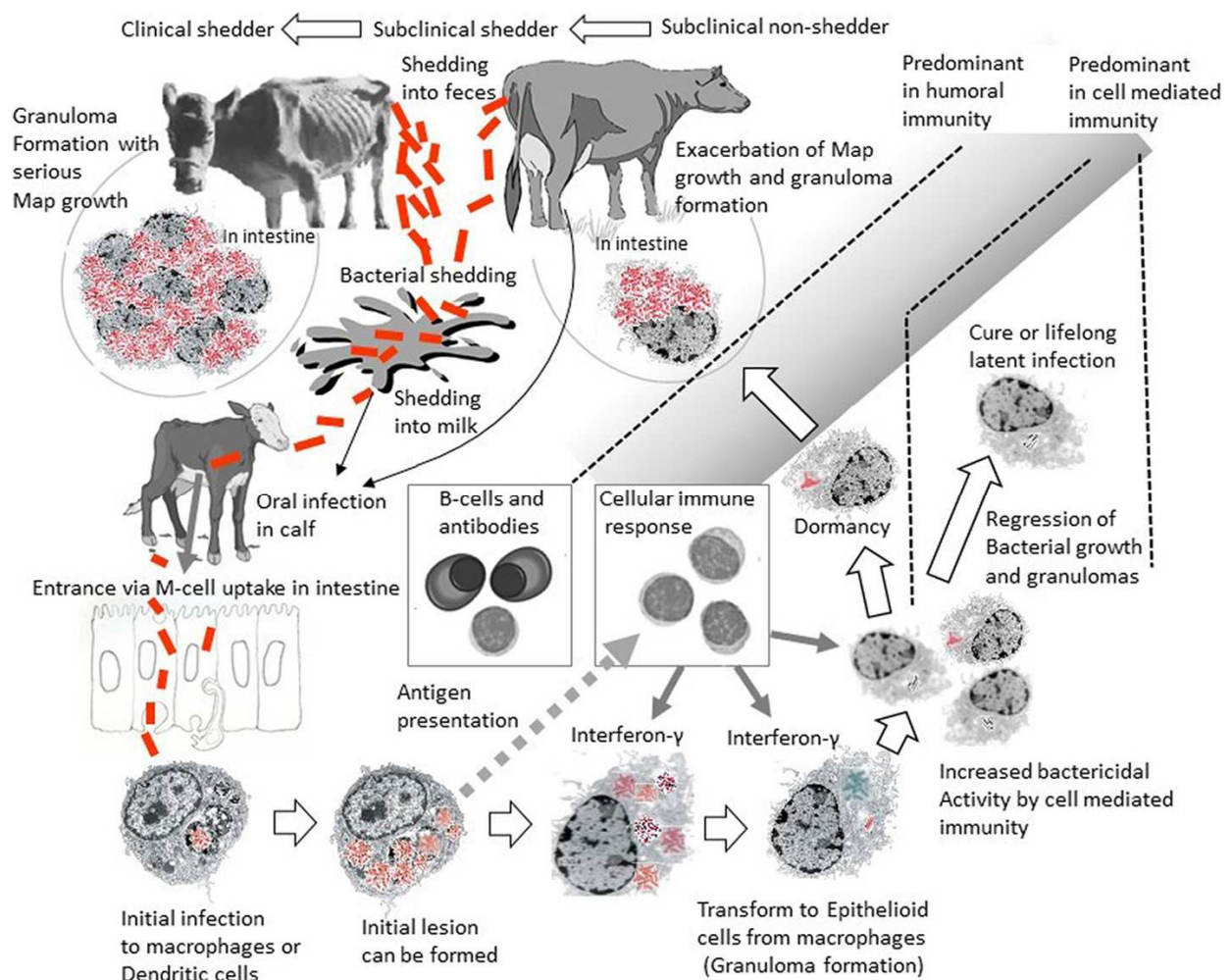


Figura 10. Representación esquemática de la formación de los granulomas, diseminación de la infección y el paso de una respuesta inmune Th1 a Th2. Koets y Gröhn, 2015.

El TGF- β es otra de las citoquinas conocidas por sus efectos inmunomoduladores en la paratuberculosis. Tiene la capacidad de suprimir la secreción de IL-2, pero también se ha comprobado la inhibición que ejerce sobre la producción de IFN- γ , del MHC-II y el bloqueo que ejerce sobre la activación macrofágica, además de favorecer la secreción de la IL-10 (Maeda y col., 1995). Muñoz y col. (2008) comprobaron *in situ* en íleon y nódulos linfáticos asociados de bovinos y ovinos infectados natural y experimentalmente, que el TGF- β se expresaba abundantemente en los macrófagos y células gigantes repletos de *Map* en los animales con lesiones difusas multibacilares y negativos al test del IFN- γ , mientras que su presencia era escasa o nula en aquellos con lesiones focales, multifocales o difusas paucibacilares, con escasos bacilos y positivos al IFN- γ . Estos resultados confirmaron que la secreción de TGF- β se asociaría con la incapacidad de los macrófagos de contener la diseminación y propagación de *Map*, probablemente a través de la inhibición del IFN- γ . En la Tabla XV se muestran las principales citoquinas que participan en la respuesta inmune del hospedador frente a una infección con *Map* y en la Figura 11 se muestra un resumen esquematizado de los acontecimientos inmunológicos que suceden en el hospedador en respuesta a la infección por *Map*.

II. INTRODUCCIÓN GENERAL

Tabla XV. Citoquinas más importantes en la respuesta inmune inducida tras una infección con *Map*.

Citoquina	Efectos biológicos principales	Célula productora
IFN- γ	<ul style="list-style-type: none"> - Activador de células T y macrófagos. - Favorece la maduración de células dendríticas - Implicado en la sobre-expresión de MHC I y II - Induce producción de reactivos de O₂ y N₂ - Induce la secreción de IL-12 - Reclutamiento de monocitos al sitio de infección. 	linfocitos T CD4+, CD8+, $\gamma\delta$
TNF- α	<ul style="list-style-type: none"> - Función pro-inflamatoria (Th1) directamente relacionada con la destrucción de <i>Map</i> del macrófago infectado a través de la generación de intermediarios de NO₂. - Implicado en la apoptosis de los macrófagos infectados. 	macrófagos, células dendríticas, linfocitos T
IL-4, IL5	<ul style="list-style-type: none"> - Citoquinas anti-inflamatorias (Th2). - Estimula el crecimiento y diferenciación de linfocitos B. - Inhibe citokinas y mediadores pro-inflamatorios. - Induce IgE e IgG4. 	linfocitos Th2
IL-10	<ul style="list-style-type: none"> - Inhibe la respuesta inmune pro-inflamatoria al inhibir la producción de IL12. - Inhibe la presentación de antígenos de los macrófagos infectados a las células T al inhibir la expresión del complejo mayor de histocompatibilidad MHC-II, CD80, CD86 y ICAM-I en la membrana del macrófago infectado. - Inhibe la proliferación de células T y $\gamma\delta$ productoras de IFN-γ. 	monocitos, macrófagos, linfocitos T y B
TGF- β	<ul style="list-style-type: none"> - Función inmunosupresora de la respuesta inmune proinflamatoria y producción de IFN-γ. - Suprime la maduración y diferenciación de células dendríticas. - Inhibe la presentación de antígenos de los macrófagos infectados a las células T al inhibir la expresión del complejo mayor de histocompatibilidad MHC-II. - Inhibe los mecanismos de destrucción de microorganismos en el interior del macrófago. - Inhibe la apoptosis celular. 	monocitos, macrófagos
IL-1	<ul style="list-style-type: none"> - Función Proinflamatoria. Activación de las células Th1. 	monocitos, macrófagos, células dendríticas
IL-12	<ul style="list-style-type: none"> - Su producción es esencial para la estimulación de una respuesta pro-inflamatoria. - Activa las células T colaboradoras de tipo 1 (Th1) y estimula la producción y citotoxicidad de las células T citotóxicas y de las células NK. - Induce la producción de IFN-γ 	monocitos, macrófagos, células dendríticas

No obstante, esta teoría de dualismo inmunológico que tradicionalmente se ha asumido en la paratuberculosis de los rumiantes podría no ser del todo cierta, tal y como han indicado recientemente Begg y col. (2011) tras detectar respuestas inmunes concomitantes en ovejas infectadas experimentalmente.

II.6. CUADRO LESIONAL Y SIGNOS CLÍNICOS

II.6.1. Lesiones macroscópicas

Macroscópicamente, las lesiones características de la paratuberculosis afectan preferentemente a los tramos distales del intestino delgado (íleon y válvula ileocecal) y a los linfonodos mesentéricos asociados. A veces, también es posible observar lesiones en los tramos distales del yeyuno, en el ciego o en los segmentos más craneales del colon. Macroscópicamente, el engrosamiento de la pared intestinal es el rasgo característico de la enfermedad en la especie bovina, principalmente en el íleon. Tras seccionar longitudinalmente estos tramos, en la mucosa tumefacta y edematosa se suele apreciar el relieve de unos pliegues de aspecto circunvolvoide que persiste incluso tras traccionar el intestino. En los nódulos linfáticos mesentéricos, principalmente yeyunales e ileocecales, se observa aumento de tamaño, tumefacción y edema.

En fases subclínicas, el grado de engrosamiento intestinal es menor y los nódulos linfáticos pueden estar ligeramente tumefactos. Por el contrario, en fases avanzadas de la infección, el engrosamiento puede llegar a los segmentos más distales del intestino, duodeno y recto. En estas fases es posible observar pérdida de grasa mesentérica y subcutánea, atrofia muscular y serosa, edemas en el tejido subcutáneo, submandibular o ventral, ascitis y presencia de líquido en las cavidades torácica y pericárdica (Fecteau y Whitlock, 2010). A consecuencia de la diseminación bacterina que ocurre en fases avanzadas de la enfermedad, se han descrito lesiones extraintestinales, tales como atrofia de la grasa de los surcos coronarios, calcificaciones y fibrosis en la aorta (torácica y mesentérica) y endocardio, y la depleción linfática del timo (Chiodini y col., 1984; Perez y col., 2000; González y col., 2005). En bovino es posible incluso observar microgranulomas en el intersticio hepático en las fases avanzadas de la enfermedad. En animales que llegan a presentar un estado de caquexia y debilidad extrema, es posible llegar a observar lesiones compatibles con enfisema pulmonar intersticial agudo (Chiodini y col., 1984; Perez y col., 2000; Delgado y col., 2012). En la Figura 12 se

muestra una imagen de algunas de las lesiones macroscópicas producidas por la paratuberculosis bovina.

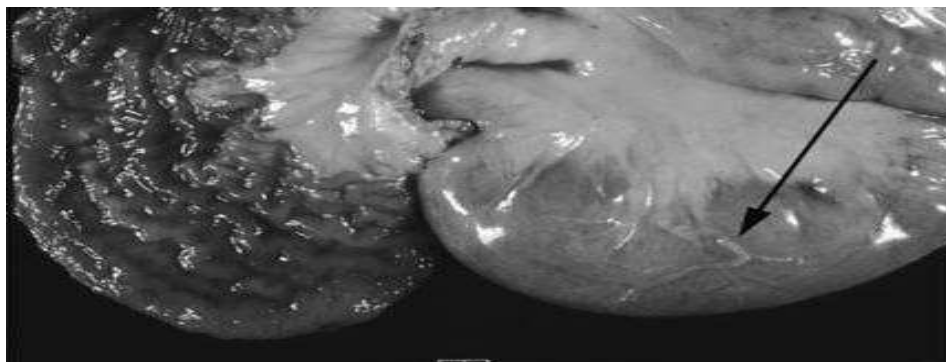


Figura 12. Lesiones macroscópicas en el íleon típicas de la paratuberculosis bovina. Fotografía de lesiones en el íleon típicas de la paratuberculosis. A la izquierda, la pared intestinal se observa engrosada debido a la infiltración de leucocitos y células epitelioides. A la derecha, se observa un edema mesentérico, con un canal linfático mesentérico dilatado, que se muestra con una flecha. Fecteau y Whitlock, 2010.

La tumefacción de la mucosa intestinal, linfangitis y linfangiectasia en los segmentos intestinales engrosados es más frecuente y numerosa en pequeños rumiantes, especialmente en cabras, pero también ocurre en bovino (Djonne, 2010). Así, los vasos linfáticos inflamados y dilatados presentan un aspecto de cordones de coloración blanquecina y forman trayectos tortuosos en la serosa intestinal, llegando incluso a alcanzar los nódulos linfáticos mesentéricos. La formación de focos necróticos caseosos y calcificaciones es un hallazgo característico de la paratuberculosis caprina, que también se describe en corzos y en ovinos pero es inusual en ganado vacuno (Badiola y col., 1980; Juste y col., 1983; Garcia-Marin y col., 1994; Perez y col., 2000; Gonzalez y col., 2005; Delgado y col., 2012).

II.6.2. Lesiones microscópicas

Histológicamente, las lesiones se caracterizan por enteritis y/o linfadenitis granulomatosa de la lamina propia de la mucosa intestinal y de los nódulos linfáticos mesentéricos asociados. El infiltrado inflamatorio es de naturaleza mayoritariamente histiocítica y está compuesto por macrófagos, linfocitos, células epitelioides, células gigantes multinucleadas de Langhans y eosinófilos (Stamp y Watt, 1954). Tanto en el intestino como en los nódulos linfáticos mesentéricos asociados, la distribución del infiltrado inflamatorio varía en función del tiempo de infección. Así, en animales que no manifiestan sintomatología clínica las lesiones microscópicas se limitan fundamentalmente a pequeños granulomas localizados en el espacio interfolicular de las placas de Peyer intestinales, o al área cortical y

paracortical de los nódulos linfáticos mesentéricos asociados, frecuentemente en la zona interfolicular o próximas a los senos peritrabeculares. Sin embargo, al progresar la infección en animales con signos clínicos, la inflamación tiende a extenderse de forma multifocal a difusa por la mucosa, siendo frecuente observar la afectación de otras capas más internas de la pared intestinal, como la submucosa o la muscular. En cualquier caso, no siempre el grado de diseminación de la infección se correlaciona con los signos clínicos característicos de la infección (Antognoli y col., 2008; Alonso-Hearn y col., 2008). A consecuencia de la infiltración inflamatoria se produce la dilatación de las vellosidades llegando incluso a fusionarse y a atrofiarse si el infiltrado es abundante. A su vez, el desplazamiento de las criptas de Lieberkhun debido al acúmulo de detritus celulares que contienen en su interior, conlleva la alteración de la arquitectura del intestino. De la misma forma, el aumento en el número de granulomas en los nódulos linfáticos mesentéricos y su extensión hacia la zona medular causa también alteración de la pared intestinal. Durante la progresión de la infección, además de un aumento de la inflamación, se evidencia un incremento de la presencia de BAAR en el interior de los macrófagos y células gigantes cuando se emplea la tinción de ZN u otras técnicas inmunohistoquímicas (Buergelt y col., 1978b).

Gonzalez y col. (2005) describieron algunas características diferenciales de la microscopía de las lesiones paratuberculosas en el ganado vauno con respecto a los pequeños rumiantes: i) localización preferente de los granulomas primarios o focales en el linfonodo yeyunal caudal y en menor medida en las placas de Peyer de la válvula ileocecal (VIC), ii) mayor frecuencia de presentación de células gigantes aisladas o formando parte de los granulomas en los tejidos afectados y iii) ausencia de focos de necrosis caseosa y calcificación en los nódulos linfáticos mesentéricos.

II.6.3. Clasificación de las lesiones

En el ganado bovino, Gonzalez y col. (2005) clasificaron a las lesiones según su extensión y severidad en focales, multifocales y difusas. Las lesiones difusas se subdividieron a su vez atendiendo a la composición celular del infiltrado inflamatorio y a la cantidad de BAAR en linfocíticas (o paucibacilares), intermedias y multibacilares. En el ganado ovino, Perez y col. (1996) emplean como criterios de clasificación: i) presencia de lesiones granulomatosas, ii) localización de las lesiones, iii) intensidad de las lesiones, iv) composición celular predominante en el infiltrado y v) presencia y cantidad de BAAR.

Tabla XVI. Clasificación de las lesiones en bovinos y ovinos según los estudios histopatológicos realizados por González y col. (2005) y Pérez y col. (1996).

Bovino González y col., 2005	Ovino Pérez y col., 1996
<ul style="list-style-type: none"> • Focales: Pequeños granulomas, bien delimitados, localizados en el área interfolicular de la placa de Peyer o más frecuentemente en el cortex de los LN mesentéricos asociados, fundamentalmente LN ileal y LN yeyunal. <p>Los granulomas están formados por 5-30 macrófagos, junto a algunos linfocitos. Frecuentemente, se observan células gigantes de Langhans aisladas o formando parte del granuloma.</p> <p>Escaso o nulo número de BAAR</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Tipo 1: No se observan lesiones macroscópicas en la mucosa intestinal ni en las placas de Peyer yeyunal. Granulomas formados por 6-50 macrófagos junto a algunos linfocitos. Estos granulomas se encuentran exclusivamente en el tejido linfoide. No hay detección de la bacteria por cultivo.
<ul style="list-style-type: none"> • Multifocales: Generalmente, las lesiones afectan al ápice de algunas vellosidades intestinales, ocasionando un moderado engrosamiento de las mismas. Sin embargo, la mayor parte de los segmentos intestinales no presentan variaciones morfológicas. <p>Granulomas formados por 15-40 macrófagos o células gigantes de Langhans, rodeados de un ligero infiltrado de naturaleza linfocitaria o plasmocitaria, localizados en el tejido linfoide.</p> <p>Moderada presencia de BAAR.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Tipo 2: No se observan lesiones macroscópicas. Los granulomas se encuentran colocados en fila desde la zona basal de la zona interfolicular hasta el ápice de algunas vellosidades, penetrando en la lámina propia. Los granulomas están bien delimitados, son de forma redonda y variable en número, pero nunca lo suficientemente numerosos como para causar una enteritis difusa. En los ganglios linfáticos, los granulomas parecen ser similares a los descritos en las lesiones de tipo 1 pero se observan con menor frecuencia en este sitio que en las placas de Peyer, y siempre de menor tamaño. Escaso o moderado número de BAAR. <p>Tipo 3: Las lesiones granulomatosas afectan tanto a las placas de Peyer y a la mucosa adyacente, así como a las mucosas no asociadas con el tejido linfoide. Moderada presencia de BAAR. Se reconocen 3 subtipos:</p>
<ul style="list-style-type: none"> • Difusas: Marcado engrosamiento de grandes segmentos de la pared intestinal, íleon y en menor medida yeyuno, que afectan tanto a áreas de mucosa asociadas con tejido linfoide organizado como a tramos no relacionados con la placa de Peyer. Tanto en los LNs mesentéricos como en el intestino se pierde la arquitectura histológica normal. Se reconocen 3 subtipos: 	<ul style="list-style-type: none"> • 3a: La única lesión macroscópica es un ligero engrosamiento de los vasos linfáticos del íleon. Las lesiones observadas en las placas de Peyer y la mucosa adyacente se parecen mucho a las lesiones de tipo 2, pero los granulomas situados en la lámina propia son más grandes en tamaño y afectan a más vellosidades. Los granulomas tienen una distribución multifocal y se observan en mayor número en el íleon que en el yeyuno.
<ul style="list-style-type: none"> • Difusas linfocíticas (paucibacilares): infiltrado inflamatorio con predominio de linfocitos, algunas células plasmáticas y células gigantes de Langhans Escasos o nulos BAAR. 	<ul style="list-style-type: none"> • 3b: Hay un marcado engrosamiento de la pared intestinal, íleon y en menor medida del yeyuno. Este subtipo se caracteriza por una enteritis granulomatosa difusa formada por grupos de células epitelioides. En las placas de Peyer, los granulomas se observan en las zonas interfoliculares así como en los folículos y cúpulas, lo que resulta en una modificación notable de su estructura normal. La inflamación causa un cambio en la morfología de las vellosidades intestinales y del área basal de la lamina propia. Se observan unas pocas células gigantes mal definidas. La presencia de <i>Map</i> se puede demostrar, tanto por tinción ZN y métodos IHQ.
<ul style="list-style-type: none"> • Difusas intermedias: infiltrado celular formado por linfocitos, células plasmáticas, células gigantes y macrófagos, aislados o formando granulomas. Número variable de BAAR, menor que en las lesiones multibacilares. 	<ul style="list-style-type: none"> • 3c: Se observa una enteritis granulomatosa difusa. Un mayor número de macrófagos y células gigantes de Langhans. Las células inflamatorias predominantes son los linfocitos. El edema de la submucosa se presenta con frecuencia. En los granulomas, se observan pequeños focos necróticos, con o sin calcificación.
<ul style="list-style-type: none"> • Difusas multibacilares: predominio de macrófagos cargados de BAAR y células epitelioides que infiltran de forma difusa la lamina propia. 	

LN: nódulo linfático. IHQ: inmunohistoquímica.

II. INTRODUCCIÓN GENERAL

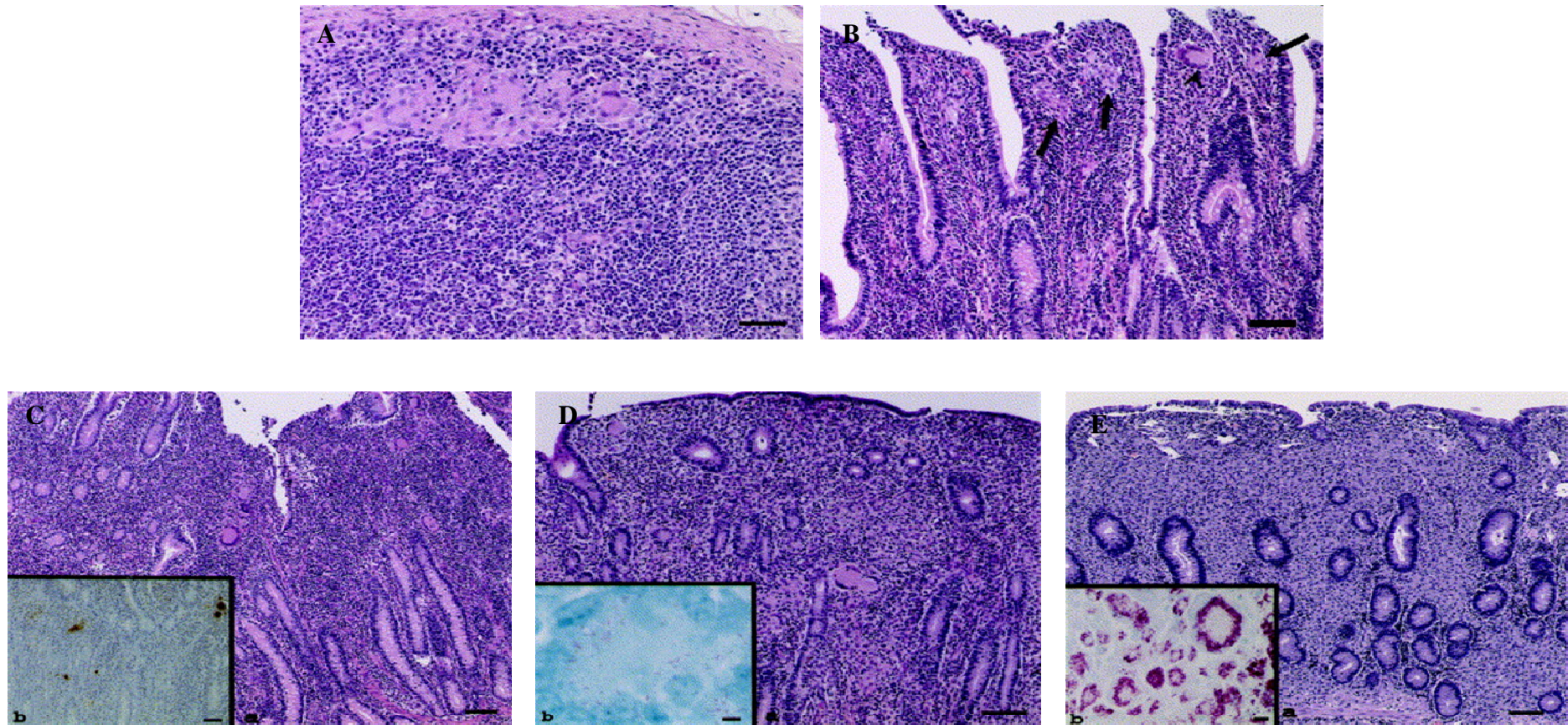


Figura 13. Lesiones microscópicas asociadas a la paratuberculosis bovina. (A) **Focal.** Granulomas pequeños formados por macrófagos y algunas células gigantes, localizados en el área cortical del ganglio linfático ileal. Hematoxilina-Eosina (HE). Bar, 50 μ m. (B) **Multifocal.** Íleon. Grupo de macrófagos (flechas) o células gigantes (punta flecha), rodeados de linfocitos y localizados en el ápice de las vellosidades intestinales. (C) **Difusa Linfocítica.** Íleon. Marcado engrosamiento de la mucosa intestinal debido a la presencia de un infiltrado granulomatoso formado principalmente por linfocitos. Entre ellos se pueden observar algunos macrófagos y células gigantes de Langhans dispersas. HE. Bar, 100 μ m. En el recuadro, se detectan inmunohistoquímicamente los macrófagos y células gigantes. Anti-lisozima. Bar, 60 μ m. (D) **Difusa Intermedia.** Íleon. Vellosidades intestinales atrofiadas y separación de las glándulas debido a la presencia de un infiltrado granulomatoso rico en linfocitos y macrófagos. Se pueden observar varias células gigantes de Langhans. HE. Bar, 100 μ m. En el recuadro, se pueden observar los bacilos situados en el citoplasma de una célula gigante. ZN. Bar, 6 μ m. (E) **Difusa Multibacilar.** Yeyuno. Infiltrado inflamatorio formado principalmente por macrófagos, que muestra una apariencia de mosaico y provocando el engrosamiento de la mucosa, la fusión de las vellosidades y la separación de las glándulas intestinales. HE. Bar, 100 μ m. En el recuadro, detalle del infiltrado con una célula gigante, que muestra un gran número de bacterias ácido-alcohol resistentes. ZN. Bar, 10 μ m. González y col., 2005.

II.6.4. Signos clínicos

Los signos clínicos de la enfermedad son poco evidentes, a veces variables y están asociados principalmente a los diferentes estadios de la enfermedad (Whitlock y Buergelt, 1996). Así, la progresión de la enfermedad se divide en cuatro estadios o fases:

Fase I. Infección silente. Esta fase se caracteriza por la ausencia de signos clínicos de la enfermedad y se encuentra presente fundamentalmente en terneros y novillas, aunque en ocasiones también se ha descrito en ganado adulto.

Fase II. Fase subclínica. En este estadio se encuentran los animales portadores de *Map* que no presentan sintomatología alguna de la enfermedad. En estas formas subclínicas de infección, los signos que pueden llevar a su sospecha en el vacuno de leche son principalmente reducción de la producción láctea, problemas reproductivos y mayor predisposición al desarrollo de mastitis. Además, la gran mayoría de los animales son negativos al cultivo en heces, pues excretan en heces una carga microbiana baja de manera intermitente.

Fase III. Fase clínica. Esta fase se desarrolla tras varios años de infección por *Map* en animales adultos. Concretamente, en el vacuno lechero frecuentemente se observan signos clínicos entre los 2 y los 6 años, generalmente tras el parto y coincidiendo con la primera o segunda lactación de las hembras (Nielsen y Salem, 2013). Otros factores estresantes que pueden desencadenar la aparición de la clínica son cambios en el manejo, elevada densidad animal, carencias nutricionales o procesos parasitarios (Blood y Rasdotits, 1999). Los signos clínicos iniciales y característicos de esta fase son la caída de la producción láctea, pelo hirsuto, pérdida de peso y diarrea.

Fase IV. Fase clínica avanzada. El paso de la fase anterior a esta fase tiene lugar en tan solo unas pocas semanas, durante las cuales los animales entran en un estado de letargo, debilitación y emaciación. Esta fase se caracteriza a su vez por la aparición de un edema mandibular debido a la presencia de hipoproteinemia, además de la presencia de caquexia y diarrea profusa. Es en este estadio en el que los animales son sacrificados debido a la reducción en la producción lechera y a la pérdida de peso, aunque en ocasiones algunos animales mueren por la deshidratación severa y la caquexia que tiene lugar. En los rebaños bovinos infectados, por ejemplo, se suele observar una baja proporción de animales con

clínica, en torno al 1-10 % (Merkal y col., 1975; Sherman, 1985). De hecho, la aparición de un animal con clínica de paratuberculosis puede suponer hasta 25 infecciones subclínicas en el rebaño (Whitlock y Buergelt, 1996).

El signo clínico más característico de la paratuberculosis, y común a todas las especies de rumiantes, es el adelgazamiento progresivo, consunción o tisis, sin pérdida de apetito como consecuencia de la mala absorción y pérdida proteica que experimentan los animales infectados (Sweeney, 2011). Aunque la administración de dietas nutricionalmente mejoradas puede provocar una recuperación del peso y de los niveles óptimos de digestibilidad, en fases de infección muy avanzadas la condición corporal no se recupera y el animal finalmente muere o es prematuramente eliminado del rebaño.

En la especie bovina, la hipoproteinemia favorece la aparición de edemas que tienden a localizarse en el área intermandibular o en el pecho (Dunkin, 1934). En la especie bovina también es característica la presentación de una diarrea acuosa y persistente que puede aparecer de forma crónica o intermitente y que no responde al tratamiento (Saseendranath y col., 2011; Sweeney, 2011). Los episodios diarreicos pueden remitir durante varias semanas y aparecer de nuevo asociados con factores estresantes o con el parto. En la Figura 14 se muestran algunos de los signos clínicos de la paratuberculosis bovina.



Figura 14. Signos clínicos de la paratuberculosis bovina. Marcado estado caquéctico (arriba) y diarrea y detalle del edema de papada (abajo). Fecteau y Whitlock, 2010. Vázquez, 2014.

En los rebaños ovinos y caprinos, la diarrea se observa más esporádicamente, sin exceder el 20 % de los casos y ligada a formas finales de la infección (Stehmann, 1996). Otros signos más inespecíficos que suelen acompañar a la caquexia son: debilitamiento general, empaldecimiento de las mucosas, anemia u otras alteraciones en los valores séricos de proteínas y microelementos, fiebre intermitente, sangre en heces, deterioro y/o caída del pelo o lana, atrofia muscular, postración y en último término la muerte (Kopecky y col., 1971; Badiola y col., 1980).

II.7. INMUNOPATOGENIA

En otras enfermedades provocadas por micobacterias como la tuberculosis y lepra ha sido descrita la estrecha relación existente entre la respuesta inmune y las lesiones presentadas por el hospedador (Ridley, 1983; Yamamura y col., 1991; Orme y col., 1993). Tomando estas descripciones como modelo, diversos autores han establecido el espectro inmunopatológico de la paratuberculosis (Bendixen, 1978; Chiodini y col., 1984; Clarke, 1997; Bastida y Juste, 2011; Vázquez y col., 2013). En la Figura 15 se muestra una representación esquemática de las formas inmunopatológicas de la paratuberculosis de acuerdo al modelo propuesto por Bastida y Juste en 2011. Así, las respuestas inmunes celulares o de tipo Th1, con predominio de células CD4 + y secreción de IFN- γ , tienen lugar en las fases subclínicas de la infección tras la exposición a *Map* y se asocian con lesiones focales y multifocales, denominadas *formas delimitadas*. Cuando la infección progresa hacia fases clínicas algo más avanzadas, las lesiones que se observan avanzan simultáneamente dando lugar a las *formas difusas*. En el caso de que la respuesta inmune no fuera capaz de detener la infección, las micobacterias pueden proliferar y la respuesta de tipo Th1 decaer, siendo sustituida por la respuesta humoral o de tipo Th2. Esta respuesta se acompaña de una progresión lesional hacia formas difusas, llegando a provocar una enteritis crónica granulomatosa típica de las formas multibacilares, acompañadas de una elevada carga micobacteriana en el intestino. Sin embargo, en el caso en que se mantenga una fuerte respuesta celular Th1 de manera prolongada e incontrolada, suficiente para contener la diseminación de *Map* pero demasiado excesiva, ésta resulta perjudicial para el hospedador y acaba causando las enteritis difusas linfocíticas o paucibacilares.

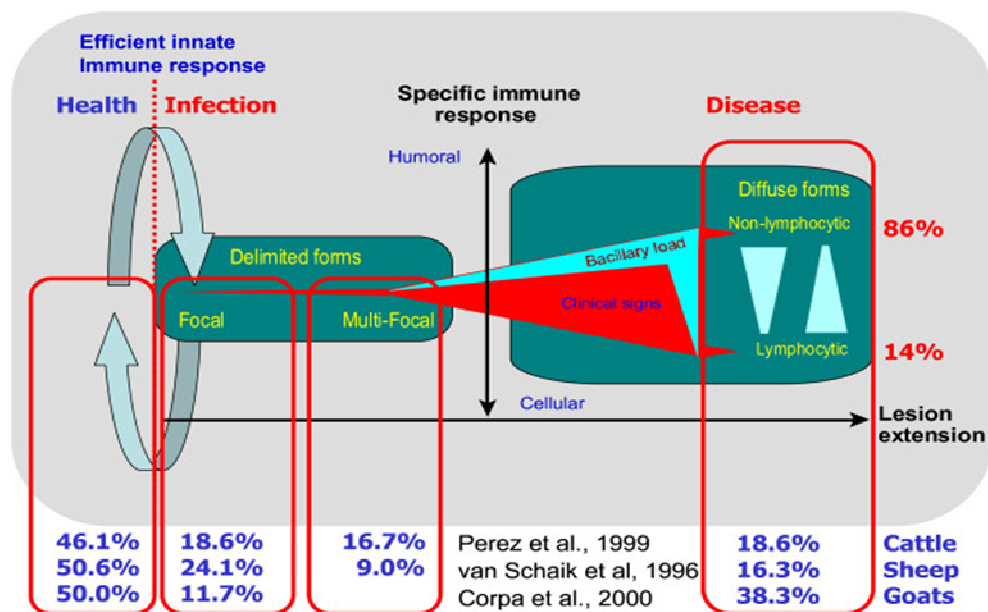


Figura 15. Formas inmunopatológicas de la paratuberculosis. Representación esquemática de acuerdo al modelo propuesto por Bastida y Juste en 2011.

Según el modelo propuesto por Bastida y Juste (2011) alrededor de un 46 % del ganado bovino, 51 % de las ovejas, y 50 % de las cabras en una granja infectada no presentarían ningún signo de infección. Por otro lado, el 19 % del ganado bovino, el 24 % de las ovejas y el 12 % de las cabras presentarían una infección focal y delimitada. Alrededor del 17 % y el 9 % del ganado bovino y ovino infectado respectivamente presentan formas multifocales. Aproximadamente el 19 % del ganado vacuno, el 16 % de las ovejas y el 38 % de las cabras desarrollarían formas difusas que conducen a que los animales presenten signos clínicos y posteriormente a su muerte.

Recientemente, las cinco formas inmunopatológicas previamente descritas (focales, multifocales, difusas linfocíticas, difusas intermedias y difusas paucibacilares) se han reagrupado en dos grupos; las formas latentes y las formas patentes (Vázquez y col., 2013). Esta clasificación aúna los hallazgos histopatológicos y variables microbiológicas e inmunológicas específicas, tanto de base celular como humoral. Para esta clasificación se utilizaron cuatro pruebas diagnósticas: ELISA, cultivo, PCR e histopatología en 1031 bovinos sacrificados en matadero. Así, las formas latentes se definen como aquellos casos de formas delimitadas o lesiones focales en las que la respuesta del hospedador logra un cierto éxito de contención de la infección mediante la activación de una respuesta inmune innata y en las que la carga bacteriana, los niveles de anticuerpos y la respuesta celular son bajas. En contraste, en las formas patentes si que se observa un incremento significativo de la carga bacteriana en

tejidos y niveles de anticuerpos y de IFN- γ en suero frecuentemente detectables. Estas formas patentes englobarían a las lesiones multifocales y difusas de González y col. (2005).

II.8. DIAGNÓSTICO

La visualización de lesiones macroscópicas relacionadas con la paratuberculosis y de los signos clínicos típicos de ésta, sirve para establecer un diagnóstico de rebaño, pero puede ser insuficiente o simplemente impracticable para la detección de infecciones subclínicas. La confirmación del diagnóstico de paratuberculosis en animales con signos clínicos se realiza mediante la detección de *Map* en heces por microscopia, cultivo bacteriológico o mediante PCR. El diagnóstico post-mortem consiste en la detección de las lesiones características de la enfermedad en intestinos y con la demostración de la presencia de bacterias ácido-alcohol resistentes en frotis de las lesiones o mediante cultivo bacteriológico de las lesiones. La detección de infecciones subclínicas es menos sensible y se realiza mediante la detección de anticuerpos específicos por serología, cultivo de *Map* en heces o tejidos recogidos en la necropsia, o mediante la detección de respuestas inmunes de tipo celular.

Entre los test serológicos más comúnmente utilizados para la detección de la paratuberculosis destacan el ELISA, el test de fijación de complemento (Complement fixation; CF) y AGID. El ELISA es un test idóneo para la confirmación del diagnóstico en animales con signos clínicos asociados a la enfermedad. Entre los test más comúnmente utilizados para la detección de inmunidad celular destacan el ensayo de liberación de interferón y la intradermorreacción, pero su interpretación en ambos casos es difícil. Estas respuestas celulares se detectan en estadios tempranos de la infección pero van disminuyendo a medida que la infección progresa llegando a estar ausente en los casos clínicos. Estas respuestas celulares pueden ser inespecíficas si el animal se ha expuesto a otras micobacterias medioambientales.

Tabla XVII. Capacidad de detección de *Map* de los ensayos diagnósticos en función de la fase clínica de la enfermedad.

Tipo de Ensayo	Fase I	Fase II	Fase III y Fase IV
Signos clínicos de la enfermedad	No	No	Si
Cultivo de heces	No	En ocasiones	Si
PCR	No	En ocasiones	Si
Tinción de ácido-alcohol resistencia	No	En ocasiones	Si
IFN - γ	En ocasiones	Si	En ocasiones
Serología	No	En ocasiones	Si

II. INTRODUCCIÓN GENERAL

La elección del test depende de las circunstancias y el grado de sensibilidad requerido para la detección de *Map* individual o a nivel de rebaño. A nivel de rebaño y como ningún test diagnóstico es 100 % específico, se suelen realizar muestreos por ELISA y PCR de heces durante varios años eliminando a los animales positivos y a la cría de estos. (OIE Terrestrial Manual., 2014)

Tabla XVIII. Test disponibles para el diagnóstico de la paratuberculosis y su propósito.

Método	Objetivo					
	Rebaño libre de infección	Animales libres de la infección previo a su movimiento	Contribución a políticas de erradicación	Confirmación casos clínicos	Prevalencia infección. Vigilancia	Estado inmunológico de animales o rebaños después de la vacunación
Identificación del agente¹						
Histopatología*	+	-	+	+++	-	-
ZN de heces	-	-	-	+	-	-
Cultivo	+++	+++	+	+++	+	-
PCR	+	+	+	++	+	-
Detección de la respuesta inmune²						
Test Serológicos						
AGID**	++	-	+	+	+++	+++
ELISA	++	+	+	+	+++	+++
CF	-	+	+	+	+	+++
Test para la detección de la inmunidad mediada por células						
Ensayo IFN-γ	-	-	+	-	-	+++
DTH	-	-	+	-	-	+++

+++ = método recomendado; ++ = método adecuado; + = método que puede usarse en ciertas ocasiones pero su coste, fiabilidad u otros factores limitan su aplicación; - = no adecuado; * = usar sólo post-mortem; ** = apropiado par ovejas y cabras; 1 = se recomienda una combinación de los métodos de identificación de agentes aplicados sobre la misma muestra clínica; 2 = se recomienda una combinación de pruebas serológicas. Aunque no todas las pruebas de las categorías +++ o ++ se han sometido a validación, su rutina y el hecho de que se han utilizado ampliamente sin resultados dudosos, las hace aceptables. DTH: delayed type hypersensitivity. OIE Terrestrial Manual, 2014.

II.9. TRATAMIENTO Y MEDIDAS DE CONTROL

II.9.1. Tratamiento

Actualmente se disponen de diversos agentes farmacológicos que pueden aliviar o reducir la sintomatología clínica de la enfermedad, sin suponer una cura para ésta. En la actualidad no existe un método estándar utilizado para testar la susceptibilidad de *Map* a diversos agentes antimicrobianos, por lo que los métodos utilizados en los distintos estudios son variables. Más recientemente, se ha adaptado el sistema de cultivo automático BACTEC MGIT 960 y el medio de cultivo ParaTb como plataforma para testar la susceptibilidad de *Map* frente a diversas drogas. Utilizando este método, se han testado las concentraciones

mínimas del medicamento requerida para inhibir más del 99 % del crecimiento en comparación con el control no tratado (Minimum inhibitory concentration; MIC) de 10 compuestos antimicrobianos frente a 18 aislados de *Map* (9 de origen humano y 9 de origen animal) como se puede observar en la Tabla XIX (Krishnan y col., 2009).

Tabla XIX. MIC₅₀^a y MIC₉₀ de 18 cepas^b de *Map* y el porcentaje de cepas clasificadas^c como susceptibles, intermedias y resistentes a 10 medicamentos antimicrobianos de uso común.

Medicamento	MIC ₅₀	MIC ₉₀	Porcentaje susceptible	Porcentaje intermedio	Porcentaje resistente
Ciprofloxacino	1.0	8.0	55.5	5.5	39.0
Azitromicina	2.0	4.0	100	0	0
Claritromicina	0.25	1.0	100	0	0
Amikacina	3.12	3.12	83.3	16.7	0
Rifampicina	1.5	3.0	44.4	50.0	5.6
Rifabutina	0.5	2.0	11.1	72.2	16.7
Etambutol	5.0	5.0	27.8	66.7	5.5
Clofazimina	0.625	1.25	5.5	16.7	77.8
Dapsona	> 5	> 5	0	0	100
Isoniazida	> 8	> 8	0	0	100

^aMICs es la concentración mínima del medicamento requerida para inhibir más del 99 % del crecimiento en comparación con el control no tratado.

^b9 cepas de origen humano y 9 de origen animal

^cClasificación basada en el criterio de la NCCLS para las pruebas de sensibilidad a los medicamentos MAC (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2003).

Todos los aislados de *Map* fueron susceptibles a los antibióticos de tipo macrólidos como la claritromicina y azitromicina. Ningún aislado de *Map* fue resistente a la amikacina. La rifampicina y la rifabutina fueron la tercera y cuarta droga más efectiva frente a *Map*, seguidas del ciprofloxacino. *Map* es muy resistente a la isoniazida (droga anti-tuberculosa) y a la dapsona (droga anti-lepra). Se obtuvieron pequeñas diferencias en cuanto a la susceptibilidad de los aislados de *Map* de origen humano y animal a las drogas testadas en este estudio.

Entre los antibióticos clínicamente activos se encuentran los aminoglucósidos (gentamicina, canamicina, neomicina, estreptomycin.), la capreomicina, larifabutina, la rifampicina, la viomicina, la isoniazida, clofazimina y dapsona (Fecteau y Whitlock, 2011). Estas sustancias no suelen administrarse individualmente sino de forma combinada. Por ejemplo, St Jean (1996) demostró que el tratamiento diario con isoniazida (20 mg/kg) sólo o en combinación con rifampicina (20 mg/kg) durante la vida del animal puede reducir la progresión de la enfermedad. Sin embargo, el tratamiento con este tipo de fármacos es muy costoso, se requieren periodos de tiempo prolongados para evitar recidivas e implican que los productos obtenidos de animales tratados y destinados al consumo humano sean retirados. Por

ello, el tratamiento de la paratuberculosis raramente se lleva a cabo, o sólo de manera excepcional en animales de alto valor genético utilizados para obtener semen o embriones.

Greenstein y col. (2007) demostraron que muchas drogas anti-inflamatorias comúnmente utilizadas para el tratamiento de la enfermedad de Crohn eran capaces de inhibir el crecimiento *in vitro* de *Map* como el metotrexato, azatioprina, rapamicina, 6-mercaptopurina (6-MP, 2-4 µg/ml), ciclosporina A, ácido 5 aminosalicílico (5-ASA, 8-32 µg/ml) o tacrolimus (Greenstein y col., 2007b; Shin y Collins, 2008; Khrishnan y col., 2009). Sin embargo, desde el punto de vista de salud pública, su aplicación en animales destinados al consumo humano resulta cuestionable.

Recientemente, se han realizado algunos ensayos de tratamiento con sustancias no estrictamente farmacológicas tales como probióticos del tipo de *Dietzia* subsp. C79793-74, que en estudios preliminares en animales adultos con manifestaciones clínicas consiguió disminuir la intensidad de la respuesta humoral anti-*Map*, alargar la vida productiva y remitir la sintomatología (Click, 2011a). Entre las sustancias naturales con capacidad inhibitoria *in vitro* del crecimiento de *Map* destacan el carvacol y el trans-cinamaldehído, compuestos principales del aceite esencial de orégano y canela, respectivamente (Wong y col., 2008) o el aceite de naranja (Crandall y col., 2012).

Otra hipotética alternativa sería llevar a cabo tratamientos con micobacteriófagos pero su utilización *in vivo* tiene muchas limitaciones: necesidad de rebajar la acidez del abomaso para garantizar la supervivencia de los fagos, monitorización de la resistencia-sensibilidad de *Map* a los fagos, falta de evidencia experimental *in vivo* sobre la efectividad de este tratamiento y el potencial peligro de que la transducción o transfección con fagos incremente la virulencia de *Map* (Emery y Whittington, 2004).

Hoy en día, la sustancia quimioproláctica mejor evaluada en relación a la paratuberculosis es un ionóforo denominado Monensina, ya que su administración diaria en vacas adultas disminuye la carga bacteriana fecal, reduce las lesiones histopatológicas y disminuye la positividad a ELISA de la leche (Greenstein y col., 2009). Esta sustancia, sin embargo, se encuentra prohibida como aditivo en las dietas del ganado bovino en la Unión Europea desde el año 2006 (Reglamento (CE) N° 1831/2003, artículo 11) para reducir los riesgos de crear resistencias microbianas y preservar la eficacia de ciertos antibióticos de uso

humano. El nitrato de galio también ha ofrecido resultados preliminares prometedores (Fecteau y col., 2011).

II.9.2. Medidas de Control

Los modelos predictivos han indicado que la no instauración de medidas de control de la paratuberculosis resulta en un incremento notorio de su prevalencia (Kudahl y col., 2008). Por otro lado, el que la paratuberculosis cause pérdidas económicas significativas y pueda suponer un peligro para la salud pública, sobre todo si se confirma que *Map* es un factor causal de la enfermedad de Crohn, justifica la instauración de medidas de control de la enfermedad en términos financieros y de salud pública (Bastida y Juste, 2011). Efectivamente, tanto la propia industria ganadera como la industria agroalimentaria relacionada, así como las autoridades competentes en sanidad animal, han considerado que el impacto de la enfermedad justifica la instauración de estos programas de control.

El largo periodo de incubación de la enfermedad, la presencia de animales subclínicos en la explotación, la falta de herramientas diagnósticas adecuadas, así como la falta de conocimiento de la diversidad genética de *Map* y de la virulencia y transmisión inter-especie de los distintos aislados de *Map* son aspectos importantes a tener en cuenta a la hora de diseñar un programa efectivo de control de los niveles de infección que consiga a corto plazo el control de la paratuberculosis y a largo plazo la erradicación de ésta.

La estrategia más simple de control se basa en adoptar medidas higiénico-sanitarias generales dirigidas a reducir la carga micobacteriana; recomendándose especialmente seguir estrictas pautas de manejo de los animales más jóvenes, puesto que éstos son los más susceptibles a la infección al no estar su sistema inmune completamente desarrollado. Además de este tipo de medidas, en la actualidad existen dos estrategias de lucha frente a la paratuberculosis: i) el saneamiento o eliminación del rebaño de animales infectados que actúan como fuente de contagio para otros animales susceptibles y ii) el aumento de la resistencia a la infección de los animales susceptibles mediante la vacunación. Un programa de control tiene que cumplir dos objetivos principales:

1. disminuir el contacto de animales susceptibles con animales infectados y el medio ambiente mediante la aplicación de medidas higiénico-sanitarias; y

2. reducir el número de animales que evolucionan a un estado clínico de la enfermedad mediante el saneamiento o la vacunación.

Dentro de la UE, no existe un programa obligatorio de control de la paratuberculosis. Sin embargo, la mayoría de los países han implantado programas voluntarios de control de la enfermedad. Entre los factores a considerar a la hora de diseñar una estrategia de control de la enfermedad están los recursos financieros disponibles, la prevalencia de la infección a nivel de rebaño, región, o país; así como, la prevalencia de otras enfermedades que requieran prioridad a la hora de ser controladas. Por otro lado, dependiendo de la prevalencia de la enfermedad el objetivo a corto plazo del programa de control puede ser la erradicación (en países de baja incidencia de la enfermedad) o el control (países con alta prevalencia). En países, como en el Reino Unido, en el que la incidencia de la tuberculosis bovina va en aumento, es muy difícil que los propietarios de las explotaciones y las asociaciones de productores inicien programas de control de la paratuberculosis hasta que la tuberculosis no este bajo control, pues el control de ésta es prioritario. Recientemente, se ha propuesto un programa de control básico frente a *Map* que podría utilizarse como referente internacional mínimo y que se representa en la Figura 19 (Khol y Baumgartner, 2012). Este programa consta de tres fases: 1- el desvieje de los animales con clínica de paratuberculosis, 2- implementación de medidas higiénico-sanitarias básicas y 3- seguimiento del estado sanitario de la instalación mediante el análisis de muestras ambientales. Este programa podría implantarse con un mínimo coste y carga de trabajo para el ganadero. El objetivo del programa es la reducción de los casos clínicos así como la reducción de la eliminación de *Map* al ambiente.

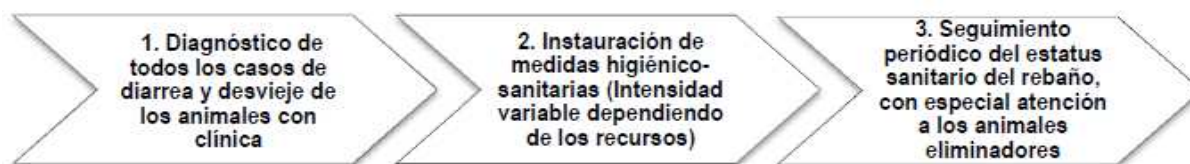


Figura 16. Representación esquemática de las 3 etapas del modelo de programa de control básico de la paratuberculosis bovina propuesto por Khol y Baumgartner en 2012.

II.9.2.1. Manejo y medidas higiénico-sanitarias

Entre las medidas de control aplicables, la primera a tener en cuenta y de cumplimiento constante durante cualquier plan de control de la paratuberculosis es la de

adoptar medidas higiénico-sanitarias generales orientadas a reducir la carga micobacteriana recomendándose especialmente seguir estrictas pautas en el manejo de los animales más jóvenes. En la Tabla XX se muestran las medidas higiénico-sanitarias básicas generalmente utilizadas para el control de la paratuberculosis en las explotaciones.

Tabla XX. Medidas higiénico-sanitarias para el control de la paratuberculosis en las explotaciones.

Medidas Higiénico-Sanitarias	
GENERALES	<ul style="list-style-type: none"> • Instauración de protocolos periódicos de limpieza y desinfección de las instalaciones • Adecuado manejo de los purines • Separación de animales con sintomatología clínica • Evaluación del estatus sanitario de los animales que se incorporan al rebaño
NEONATOS	<ul style="list-style-type: none"> • Separación física de la zona de partos y limpieza exhaustiva de la mismas tras el parto • Separación de las crías de las madres tras el parto • Alojamiento separado para recría y adultos • No criar animales procedentes de madres eliminadoras de <i>Map</i> • Pasteurización del calostro o administración de reemplazantes lácteos comerciales

Vázquez, 2014

Las vías de transmisión fecal-oral y láctea deberían ser atajadas evitando o restringiendo el contacto entre madres y crías, y entre adultos y jóvenes en general, evitando el contacto de los purines con los animales, los alimentos y la bebida, realizando tratamientos efectivos del calostro y de la leche, y manteniendo unas buenas medidas higiénicas generales. En casos de madres que excreten micobacterias en heces, puede ser aconsejable la eliminación de su descendencia pues puede encontrarse infectada por vía intrauterina. La mayoría de estas medidas son económicamente sostenibles y rentables, sobre todo para rebaños grandes, compatibles con otras estrategias de control y su adopción reduce considerablemente la prevalencia de la infección en el rebaño. Sin embargo, estas medidas no son económicamente sostenibles en el caso de rebaños pequeños e imposible de implementar en rebaños de vacuno de carne o de ovino debido a sus costes. Por otro lado, estas medidas no dan resultados inmediatos por lo que son abandonadas cuando otros problemas productivos son más acuciantes (Muskens y col., 2003).

II.9.2.2. Saneamiento

El saneamiento se emplea fundamentalmente en el ganado bovino al no ser económicamente viable en pequeños rumiantes y representa la única herramienta legal para combatir la enfermedad en esta especie, en los países en los que las autoridades sanitarias competentes no permiten el uso de la vacunación por sus posibles interferencias con los

programas de erradicación de tuberculosis. En Europa, el sanemiento de las explotaciones se realiza mayoritariamente mediante la participación en programas voluntarios, a excepción de Holanda, Noruega y Austria, en donde se realizan controles con carácter oficial (Bakker, 2010). Así, en el programa de sanemiento holandés se persigue la mejora de la calidad de la leche mediante el control trimestral de la carga de *Map* en los tanques de leche mediante ELISA, mientras que el programa austriaco está orientado a la vigilancia de la infección en rumiantes domésticos y en ciervos procedentes de explotaciones cinegéticas (Bakker, 2010). Por otro lado, en Suecia en donde la prevalencia de la paratuberculosis es menor de un 0.3 % se aplican programas de control/certificación exhaustivos dirigidos a mantener el estatus “libre” de la enfermedad mediante análisis exhaustivo por cultivo de los casos con sospecha de paratuberculosis (Sternberg y Viske, 2003). Cuando se detecta un animal infectado en una explotación se procede a la eliminación del rebaño completo, a identificar todos los animales introducidos y vendidos del rebaño en cuestión, a realizar ELISA en todos los rebaños que han tenido algún tipo de contacto con el rebaño infectado y a desinfectar las instalaciones, equipos y purines relacionados con el rebaño infectado.

La eficacia de los programas de control basados en el sanemiento está fuertemente condicionada por la sensibilidad de las pruebas diagnósticas empleadas para detectar a los animales infectados, por su alto coste y por el tiempo requerido para la obtención de los resultados diagnósticos (Garrido, 2012). La falta de sensibilidad de las técnicas de diagnóstico, sobre todo de infecciones subclínicas hace necesaria la repetición de las pruebas, de manera que se incurre en unos costes de diagnóstico periódicos y de larga duración. En la actualidad, las técnicas diagnósticas más comúnmente utilizadas en los programas de saneamiento son el ELISA como test de screening y el cultivo o PCR fecal como método confirmatorio (Garrido y col., 2012, Perez y col., 2012). Hay que tener en cuenta que al utilizar esta estrategia no todos los animales excretores serían detectados mediante ELISA. En el caso de los programas de sanemiento en los que se emplea directamente el cultivo o la PCR de muestras fecales, se suele realizar el análisis de pools de heces de hasta 5 animales con el fin de abaratar los costes, sin causar un descenso de la sensibilidad diagnóstica (Kalis y col., 2004). Sin embargo, con el cultivo o la PCR de muestras fecales se detectan a veces falsos positivos, animales no infectados que han consumido productos infectados con *Map* que es eliminada en las heces sin causar infección. En un estudio de simulación se concluyó que la estrategia más efectiva para reducir la prevalencia en el rebaño sería el desvieje tras el primer ELISA positivo (Kudhal y col., 2011).

II.9.2.3. Vacunación

Las características de la vacuna ideal frente a la paratuberculosis son: i) prevenir la infección de animales vacunados, ii) permitir diferenciar animales vacunados de animales infectados por *Map*, iii) carecer de interferencia con los test diagnósticos, fundamentalmente frente a *M. bovis* y iv) minimizar o evitar el daño lesional en el punto de inoculación.

Las primeras vacunaciones frente a la paratuberculosis bovina se llevaron a cabo en 1926 en Francia mediante inyección subcutánea con una cepa viva no virulenta de *Map* y tres sustancias adyuvantes (parafina líquida, aceite de oliva y polvo de piedra pomez). La vacuna disminuyó la aparición de sintomatología clínica y el número de animales excretores (Vallée y Rinjard 1926). En pequeños ruminantes se vienen empleando vacunas inactivadas desde los años 50, llegándose a utilizar esta pauta en los programas de control oficiales de algunos países Europeos, como Islandia, Noruega o Australia (Baker, 2010; Kennedy y Citer, 2010). En España, la vacunación con vacunas inactivadas se lleva utilizando como medida de control desde los años 70 en ovino. En un principio el Ministerio de Agricultura proporcionaba vacuna gratuita para la recria ovina, pero a partir de 1990 los productores tenían que pagar por la vacuna y por su administración. Recientemente, se ha observado un incremento de la vacunación con vacuna inactivada frente a *Map* como medida de control en la cabaña caprina (Lozano De Arcenegui y col., 2012). Por el contrario, la posible interferencia de la vacunación con el diagnóstico de la tuberculosis bovina mediante IDR (Intradermal reaction) ha hecho que su uso en el ganado bovino sea más limitado (Kohler y col., 2001; Muskens y col., 2002). El inconveniente más importante de las vacunas inactivas es que no son DIVA (no diferencian animales infectados de vacunados) por lo que interfieren con el diagnóstico serológico de la paratuberculosis e interfieren con los programas nacionales de erradicación de la tuberculosis. Sin embargo, recientes ensayos de vacunación realizados con la vacuna Silirum® han demostrado que solo un 0.5 % de animales vacunados interfieren con el diagnóstico de la tuberculosis cuando se realiza la prueba intradermal comparada (Garrido y col., 2013). Otro inconveniente de las vacunas inactivadas es que en algunos animales el adyuvante oleoso que forma parte de la vacuna puede ocasionar lesiones granulomatosas en el sitio de inyección. Aunque la vacuna inactivada no protege a los animales de la infección al 100 %, aumenta la resitencia a la progresión de la enfermedad clínica reduciendo la severidad de las lesiones, por lo que tiene un claro efecto terapéutico (Alonso-Hearn y col., 2012). Por otro lado, la carga bacteriana excretada en las heces y detectada en los tejidos se reduce

mientras que la esperanza productiva y la producción láctea se ven claramente mejoradas con un coste-beneficio significativo para el productor (Juste y col., 2009b).

En la actualidad existen varias vacunas comercializadas: Neoparasec®, Gudair®, Mycopar® y Silirum®. La primera de ellas se desarrolló en la década de los años 80 y es una vacuna viva atenuada elaborada a partir de la cepa 316F de Weybridge con un adyuvante oleoso y una concentración de bacterias de 3×10^9 unidades viables por mililitro de vacuna. Su empleo ha ofrecido buenos resultados tanto en la especie bovina (Klawonn y col., 2002) como en la especie ovina (Juste y col., 1994). La vacuna Gudair® se produce en España desde los años 90 y ha sido ampliamente utilizada en ovino y caprino (Windsor y col., 2014). Se trata de una vacuna elaborada con la misma cepa que la anterior, con 2.5 mg de bacilos desecados, inactivada por calor. Esta vacuna, además se encuentra registrada en Australia y Nueva Zelanda. En Estados Unidos además, se comercializa Mycopar®, una vacuna inactivada elaborada con la cepa 18 de *Mycobacterium avium* subespecies *avium* y que ha sido utilizada para estudios en bovino (Tewari y col., 2014). En España se han otorgado varios permisos especiales para realizar estudios de vacunación en la especie bovina con la vacuna comercial Silirum® elaborada con la cepa 316F de *Map* e inactivada por calor (Garrido y col., 2006, García-Pariente y col., 2006, Muñoz y col., 2006).

En los últimos años se han diseñado nuevos productos vacunales a base de proteínas o de DNA de *Map* como se puede observar en la Tabla XXI. Una vacuna a base de proteínas o compuesta por plásmidos bacterianas o codificando a antígenos de *Map* que sea efectiva podría resolver los problemas de interferencia diagnóstica que presentan las vacunas basadas en bacteria viva atenuada o muerta. La identificación de antígenos de *Map* capaces de estimular una respuesta inmune protectora es el primer paso necesario para el diseño de este tipo de vacunas.

II. INTRODUCCIÓN GENERAL

Tabla XXI. Resumen de los ensayos realizados en animales con candidatos vacunales basados en vacunas de proteínas y DNA de *Map*.

Tipo de vacuna	Otro nombre	K D a	Función	Especie animal en la que se testa la vacuna	Cepa de <i>Map</i> usada en el desafío	Dosis y ruta de infección	Inmunización y resultado	Referencia
Vacunas basadas en Proteínas								
Proteína de fusión MAP3527–MAP1519	MAP 74F	74	MAP3527 (Pep A) es una proteasa de 34 KDa. MAP1519 es una proteína hipotética que pertenece a la familia de las proteínas PPE	Ratones C57BL/6	MAP 66115-98 (de una vaca infectada)	- 10 ⁹ UFC - Intraperitoneal - El desafío se realizó 3 semanas después la última inmunización	Inmunizados por vía subcutánea dos veces (3 semanas de diferencia) con 50 µg / animal de la proteína de fusión en MPL. El grupo control recibió sólo MPL. Reducción en la carga bacteriana: en hígado a las 12 semanas, en bazo a 8-16 semanas, en nódulos linfáticos a 12 semanas.	Chen y col., 2008
MAP3840	Hsp70, dnaK	70	Chaperonina	40 terneros hembras	Map de vaca infectada	- Al menos 2 x 10 ⁴ UFC - Oral - 9 dosis durante un periodo de 21 días	Inmunizados por vía subcutánea dos veces, 308 días de diferencia, con 200 µg de Hsp70 recombinante en DDA. Reducción en la excreción de <i>Map</i> en las heces durante los 2 años siguientes al desafío.	Koets y col., 2006
MAP0216 MAP1609c MAP3531c MAP0187c	Ag85AA g85BAg 85C SOD	32 30 32 23	El complejo del antígeno 85 (Ag85) incluye Ag85A, Ag85B y Ag85C, que son micolil-transferasas implicadas en la síntesis de la pared celular. SOD es una superóxido dismutasa.	24 terneros	MAP 66115-98	- 1 x 10 ⁷ UFC - Oral - 7 días consecutivos - 4 semanas después última inmunización	Inmunizados por vía subcutánea con la mezcla de 100 µg de cada proteína en MPL o por vía intramuscular con MPL + 100 µg de de DNA de IL-12 bovina. Se induce cierta protección pero no se observan diferencias significativas entre los grupos vacunados.	Kathaperu mal y col., 2008
Vacunas basadas en DNA								
Mezcla de 26 plásmidos que codifican para los antígenos de <i>Map</i> 0448, 1301, 1308, 2491, 3498c, 1239c, 1493c, 1912, 2239, 3049c, 3131, 3171c, 0047c, 1003c, 2191, 2192, 3737, 1796c, 1871c, 2171c, 2174c, 2175c, 2230c, 2604c, 3742, 3764c			Estos 26 genes codifican proteínas transportadoras de unión, antígenos ricos en prolina de la familia PPE, proteínas de membrana, proteínas de entrada a los macrófagos, sintetasas de micobactina y policétidos.	Ratones BALB/c	MAP 6112	- 1 x 10 ⁸ UFC - Intraperitoneal - Al de 2 semanas de la última inmunización	Inmunizados con pistola génica con 2 µg de un pool de los 26 plásmidos y estimulados 3 semanas después. No se observó protección.	Huntley y col., 2005b

II. INTRODUCCIÓN GENERAL

Tipo de vacuna	Otro nombre	K D a	Función	Especie animal en la que se testa la vacuna	Cepa de <i>Map</i> usada en el desafío	Dosis y ruta de infección	Inmunización y resultado	Referencia
Mezcla de pDNA codificante MAP0216 MAP1609c MAP3531c MAP0187c MAP2121c	Mezcla de Ag85A Ag85B Ag85C SOD MMP-1	32 30 32 23 35	El complejo del antígeno 85 (Ag85) incluye Ag85A, Ag85B y Ag85C, que son micolil - transferasas involucradas en la síntesis de la pared celular. SOD es superóxido dismutasa. MMP-1 es una proteína de membrana de función desconocida.	Ratones C57BL/6	<i>Map</i> de vaca infectada	- 1 x 10 ⁹ UFC - Intravenosa - El desafío se efectuó 3 semanas después de la última inmunización	Inmunizados por vía intramuscular con 50 µg de cada DNA 3 veces en intervalos de 3 semanas. Se observó una reducción significativa de la carga bacteriana en el bazo y el hígado de los vacunados en relación a los controles sin vacunar. Gravedad de las lesiones histopatológicas en el hígado y bazo en concordancia con los resultados de cultivo.	Park y col., 2008
MAP0586c (pDNA)		33	Transglicosilasa	Ratones BALB/c C57BL/6	<i>MAP</i> ATCC 19698	- 2 x 10 ⁶ UFC - Intravenosa - Al de 6 semanas de la última inmunización	Inmunizados por vía intramuscular con 100 µg de DNA cuatro veces en intervalos de 3 semanas o tres veces con el DNA y potenciado con 50 µg de proteína recombinante. Tanto el DNA como el DNA combinado con proteínas redujo de forma efectiva el número de bacterias en el bazo.	Roupie y col., 2008a
MAP3936 (pDNA) BCG3866c MAV0214	Hsp65 Ag85A Ag85A	65 32 32	Chaperona GroEl- Tipo I	Corderos	<i>Map</i> de un paciente don la enfermedad de Crohn	- 2 x 10 ⁹ UFC - Oral - El desafío se realizó 3 meses después de la última vacunación	Inmunizados intramuscularmente tres veces en intervalos de 20 días. Las secciones histopatológicas del tejido post-mortem revelaron ausencia de lesiones o de bacterias en los grupos vacunados con los tres tipos de vacuna de DNA.	Sechi y col., 2006

MPL: Monophosphoryl lipid. SOD: Superóxido dismutasa. DDA: Dimethyl dioctadecyl ammonium. MMP: matrix metalloproteinase. Hsp: Heat shock protein. Huygen y col., 2010

II.10. MODELOS DE INFECCIÓN PARATUBERCULOSA

II.10.1. Modelos de infección animal

La ventaja de las infecciones experimentales, respecto a las infecciones naturales, es que se pueden controlar los diferentes factores que influyen en la infección. Sin embargo, estas experiencias resultan dificultosas debido, entre otras, a las características propias de esta bacteria como son su lento crecimiento y su tendencia a la aglutinación, lo que dificulta la administración de una suspensión homogénea y por lo tanto de una dosis exacta a todos los animales, o el largo periodo de tiempo necesario para desarrollar lesiones evidentes o signos clínicos (Chiodini y col., 1984; Saxegaard, 1990; Clarke, 1997), siendo frecuente que haya animales que no muestren signos de infección (Gilmour y col., 1978; Thorel y col., 1992). El éxito de un estudio experimental de paratuberculosis depende de factores tan importantes como tipo del inóculo, dosis, método de cuantificación o vía de administración del mismo, el intervalo en que se administra éste, así como la selección de animales (Begg y Whittington, 2008).

La paratuberculosis se ha reproducido experimentalmente en bovinos, ovinos, caprinos y cervidos (apartado II.10.4.). La infección experimental de terneros y cabras con *Map* ha permitido estudiar la respuesta génica del hospedador a la infección (Khare y col., 2012), eficacia de prototipos vacunales (Hines y col., 2014) e identificar biomarcadores bacterianos (Facciuolo y col., 2013) y del hospedador (David y col., 2014) con potencial diagnóstico. A pesar de que estos animales son los hospedadores naturales de la infección y se puede observar en ellos los distintos estadios de la enfermedad conforme la infección progresa, se necesitan grandes espacios para la realización de los ensayos experimentales con estos animales y sus costes de mantenimiento son muy elevados sobre todo teniendo en cuenta que se requieren de varios años para que puedan observarse los signos clínicos asociados a la enfermedad. Con idea de reducir los costes asociados a los modelos experimentales de rumiantes se han realizado ensayos de infección con *Map* en animales de laboratorio como los hamsters (Francis, 1943; Larsen y Miller, 1978), cobayas (Francis, 1943; Merkal y col., 1982), jerbos (Larsen y col., 1976), conejos (Francis, 1943; Mokresh y Butler, 1990; Vaughan y col., 2005), ratas (Chandler, 1961a; Koets y col., 2000) y ratones (Collins y col., 1983; Hamilton y col., 1991; Thomsen y col., 2001).

II. INTRODUCCIÓN GENERAL

Tabla XXII. El ratón y el conejo como modelos de infección paratuberculosa.

Característica	Modelo	
	Ratón	Conejo
Raza	C57/BL6, BALB/c, SCID	White New Zealand
Ruta de administración	Oral, intraperitoneal	Oral
Dosis de infección	10 ⁷ –10 ⁸ UFC/animal	10 ⁵ –10 ⁹ UFC/animal
Recogida de muestras	Hígado, bazo, intestino, ganglios linfáticos, suero	Hígado, bazo, intestino, ganglios linfáticos
Diarrea	Nunca	Frecuente
Excreción fecal	Raramente	Ocasional
Criterios de valoración	UFC, histopatología, evaluación inmunológica	UFC, histopatología, signos clínicos
Carencias	Raramente se desarrollan signos clínicos de la paratuberculosis	Falta de reactivos y algunos signos clínicos de la paratuberculosis

Talaat, 2010.

El modelo experimental murino es uno de los más empleados para la evaluación de vacunas frente a la paratuberculosis, para testar la virulencia de mutantes de *Map* y para el estudio de la interacción *Map*-hospedador durante la infección (Scandurra y col., 2010). Este modelo también se ha utilizado para analizar la implicación de determinados genes del sistema inmune del hospedador en la mayor o menor susceptibilidad a la infección con *Map* (Tanaka y col., 2000). La formación de granulomas específicos de *Map* pueden observarse en ratones infectados a las 3-6 semanas de la infección (Shin y col., 2006). Utilizando ratones inmunodeprimidos (Severe combined immunodeficiency; SCID), se han observado lesiones intestinales características de la paratuberculosis que incluyen infiltración luminal con células mononucleares que contienen *Map* (Mutwiri y col., 2001). Además se observó secreción de hierro en los intestinos infectados y daño celular del epitelio intestinal. También se ha utilizado el modelo de ratón para el estudio de la antigenicidad de determinados antígenos de *Map* con aplicación diagnóstica (Paustian y col., 2004). Empleando el modelo de ileón de ratón pudieron determinarse algunos de los factores de virulencia de *Map* implicados en la invasión del epitelio intestinal, como la proteína de unión a fibronectina (Secott y col., 2002, 2004). A pesar de las ventajas del modelo murino, existen diferencias anatómicas, fisiológicas e inmunológicas entre los rumiantes y los ratones, que pueden afectar al desarrollo de la infección. Es por esto que, algunos de los signos clínicos característicos de la enfermedad en ganado como la diarrea, así como las lesiones intestinales severas características de la enfermedad no son reproducibles en ratón.

Otro modelo de infección animal que se ha utilizado es el conejo, al ser un hospedador susceptible de ser infectado por *Map* en condiciones naturales. Mokresh y col. (1990) observaron episodios diarreicos intermitentes a los 4 meses post-infección en el 70 % de los conejos (White New Zealand) infectados con una cepa bovina de referencia (ATCC 19698) y con otra cepa de campo (10^8 UFC/animal). En algunos de los conejos infectados con la cepa de referencia, que presentaban diarrea, se observaron también granulomas multifocales. Sin embargo, no se obtuvieron cultivos positivos de heces de los animales infectados y tampoco se observó pérdida de peso ni reducción de la grasa abdominal en ningún animal. Por el contrario, Vaughan y col. (2005), sí observaron signos clínicos como diarrea, pérdida de peso, reducción de grasa corporal y lesiones intestinales leves al cabo de 2 años de la infección de conejos con una cepa de campo de origen bovino. Sin embargo, no observaron siempre excreción bacteriana, no obteniéndose cultivos positivos de heces de los animales infectados en medio sólido. Hay ciertos aspectos de la enfermedad como los relacionados con la inducción de diarrea, pérdida de peso o colonización intestinal que pueden ser estudiados de manera más óptima en el modelo de conejo que en el de ratón. Sin embargo, el modelo de conejo no es tan utilizado como el de ratón en la investigación de la paratuberculosis por la falta de reactivos inmunológicos y por el coste del mantenimiento de los conejos en relación al modelo de ratón.

Otras especies monogástricas empleadas como modelo experimental de paratuberculosis han sido las aves (Collins y col., 1983; Valente y col., 1997). Para infectar pollos se han empleado tanto cepas de *Map* aisladas de vacuno (Larsen y Moon, 1972) como de pacientes con la enfermedad de Chron (van Kruiningen y col., 1991). Las lesiones se encontraron principalmente en ciego, bolsa de Fabricio, pulmones, hígado o pericardio. No obstante, en tan sólo dos de seis de los animales inoculados por vía oral se encontraron lesiones granulomatosas en tejido linfoide intestinal coincidiendo con lo observado en rumiantes (Juste y col., 1994; Pérez y col., 1996). El caballo es una especie que también se ha utilizado para el estudio de la paratuberculosis (Larsen y col., 1972). Mediante la infección experimental de potros con un aislado bovino de *Map* por vía endovenosa y oral se comprobó que ambas vías eran adecuadas para conseguir la infección ya que, además de que dos animales infectados por vía endovenosa presentaron diarrea y adelgazamiento a los 35 y 84 días p.i., todos los animales del experimento desarrollaron lesiones granulomatosas, siendo de mayor gravedad en dos potros que presentaban una enteritis y linfadenitis granulomatosa difusa, así como engrosamiento de la porción distal del intestino delgado y nódulo linfático

mesentérico adyacente (Larsen y col., 1972). Finalmente, el ganado porcino ha sido utilizado con éxito para reproducir la infección granulomatosa utilizando para ello tanto cepas aisladas de ganado porcino (Ringdal, 1963; Jorgensen, 1969) como de ganado vacuno (Jorgensen, 1969; Larsen y col., 1971). Aunque no se han observado signos clínicos de paratuberculosis en esta especie, si se han hallado las típicas lesiones en intestino y nódulos linfáticos asociados tras la infección oral (Jorgensen, 1969; Larsen y col., 1971) e intravenosa de *Map* acompañado, en algunos casos, de excreción de bacterias por heces (Larsen y col., 1971).

II.10.2. Modelos de infección *in vitro*

La experimentación animal ha sido y es en muchos casos imprescindible, sin embargo, existen razones científicas y éticas para buscar alternativas a los métodos que utilizan animales de experimentación, con objeto de reducir el número de animales empleados y cuando sea posible, sustituir los experimentos realizados con animales por otros procedimientos que no los precisen. Según su finalidad, los modelos *in vitro* pueden ser pruebas sustitutivas de los modelos con animales, o bien pruebas de criba previa a las de aquellos, o con el carácter de complementarias para mejorar la sensibilidad y especificidad de los estudios con animales.

De los modelos *in vitro* los cultivos celulares son los más comúnmente utilizados. Los cultivos celulares aportan una serie de ventajas frente a modelos *in vivo* como la caracterización y homogeneidad de la muestra y el bajo coste. Por otro lado, el empleo de cultivos celulares permite identificar mejor los efectos directos de un compuesto, una cepa bacteriana o una vacuna sobre un determinado tejido o célula diana aislado, al descartar posibles influencias indirectas de otros tejidos o células del organismo, así como de cambios endocrinos. La gran limitación del empleo de cultivos celulares es que su comportamiento es distinto al del organismo completo ya que las células no están interaccionando con tejidos ni órganos. En la Tabla XXIII se pueden observar algunos de los modelos de experimentación *in vitro* basados en cultivos celulares indicando las ventajas y desventajas de cada uno de ellos.

Tabla XXIII. Algunos métodos de experimentación basados en cultivos celulares. Ventajas e inconvenientes.

Modelo	Ventajas	Inconvenientes
Cultivo primario de células dispersadas	<ul style="list-style-type: none"> Se obtienen de fluidos o tejidos manteniendo características específicas 	<ul style="list-style-type: none"> Crecimiento limitado Inhibición por contacto Vida corta (7-10 días)
Sistemas de Co-cultivo	<ul style="list-style-type: none"> Cultivo conjunto de distintos tipos celulares Mayor información sobre las interacción patógeno-hospedador 	<ul style="list-style-type: none"> Vida corta (7-10 días)
Cultivo de líneas celulares	<ul style="list-style-type: none"> Proceden de cultivos primarios que se adaptan al cultivo indefinido Cultivos homogéneos Disponibles para la mayoría de los órganos y para bastantes especies animales 	<ul style="list-style-type: none"> Pueden perder algunas de las características específicas del tejido Envejecen y pueden modificarse al subcultivarse
Cultivo de agregados celulares	<ul style="list-style-type: none"> Arquitectura tridimensional y fisiológica similar a la <i>existente in vivo</i> Buena comunicación intercelular 	<ul style="list-style-type: none"> Vida corta (7-10 días)

Los cultivos de células aisladas directamente de la sangre o tejido de un animal reciben el nombre de cultivos primarios. Éstos mantienen las características de las células del órgano que fueron aisladas aunque su crecimiento *in vitro* es limitado y hay inhibición por contacto. Cuando en el cultivo coexisten dos tipos de células de linajes diferentes recibe el nombre de co-cultivo. Cuando uno o varios tipos de células de un cultivo primario se re-siembran en una nueva placa (sub-cultivo), el cultivo obtenido se denomina cultivo secundario y en este caso la heterogeneidad es menor. De los modelos *in vitro* basados en los cultivos celulares los más comúnmente utilizados son fundamentalmente las líneas celulares establecidas, que se obtienen por sub-cultivo y selección de cultivos secundarios. Este tipo de cultivo tiene como característica principal no tener inhibición por contacto y crecer de manera indefinida. La gran ventaja de las líneas celulares es su homogeneidad y disponibilidad, aunque en la mayor parte de los casos no suelen mantener totalmente las características diferenciales del tejido de origen por lo que no reproducen fielmente el tejido maduro. Otra ventaja es su fácil manipulación genética, que permite modelarlas en diferentes sentidos como la activación o represión de genes. También existe el cultivo de agregados celulares donde se intenta reproducir una estructura tridimensional que simule el tejido original donde se consigue una arquitectura tridimensional y fisiológica similar a la existente *in vivo* y una buena comunicación intercelular. Por último, el cultivo de órganos y tejidos se puede definir

como el mantenimiento de fragmentos de tejidos u órganos completos *in vitro*. Este tipo de cultivos mantienen la estructura tridimensional del tejido u órgano pero no permiten la proliferación celular, por lo que se requiere nuevo material del animal para cada experimento lo que conlleva una elevada heterogeneidad y una disminución de las ventajas que supone el cultivo celular propiamente dicho.

La mayoría de los trabajos para estudiar la patogenia de la paratuberculosis *in vitro* se centran en la interacción de *Map* con un tipo celular concreto, ya sea con los macrófagos o con células epiteliales del hospedador. Lo más utilizado son las líneas celulares establecidas tanto de células epiteliales (MAC-T, MDBK) como de macrófagos (BoMac, MOCL-4, RAW 264.7). La gran ventaja de estas líneas celulares es su homogeneidad, con morfología y composición uniformes, mientras que su mayor desventaja es que envejecen y pueden modificarse con los sucesivos pases de cultivo, además de que pueden perder algunas características específicas. Por otro lado, también se han utilizado mucho los cultivos primarios de células mononucleares de sangre periférica (peripheral blood mononuclear cells; PBMCs) y de macrófagos derivados de monocitos (MDMs). Estas células se obtienen de sangre periférica y su gran ventaja es que mantienen sus características, mientras que la mayor desventaja es que tienen una vida corta y sólo son cultivables alrededor de 10 días. Recientemente se están llevando a cabo estudios con sistemas de co-cultivo donde participan tanto células epiteliales como macrófagos, lo cual permite estudiar la comunicación intercelular entre los distintos tipos celulares y proporcionan mayor información sobre la interacción *Map*-hospedador en las primeras etapas de la infección paratuberculosa (Lamont y col., 2013; Everman y col., 2015). Estos modelos de co-cultivo permiten por tanto estudiar la colonización de las células epiteliales, la interacción temprana entre *Map* y los macrófagos y su posterior respuesta inmune en un mismo experimento.

II.11. DIFERENCIAS ENTRE LOS DISTINTOS AISLADOS DE *MAP*

II.11.1. Diferencias genómicas entre diversos aislados de *Map*

Tradicionalmente las cepas de *Map* se han clasificado en dos grupos dependiendo de la especie animal de la que mayoritariamente han sido aisladas: cepas "Sheep" o Tipo S aisladas principalmente de ovinos y caprinos y cepas "Cattle" o Tipo C aisladas de bovinos, animales silvestres y enfermos de Crohn. Collins y col. (1990) empleando las técnicas de

polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción para la secuencia de inserción IS900 (IS900 Restriction fragment length polymorphism; IS900-RFLP) y electroforesis en gel de campo pulsado (Pulsed field gel electrophoresis; PFGE) identificaron otro grupo bacteriano al que denominaron "intermedio"(I) y que agrupaba a ciertos aislados de ovejas procedentes de Canadá. Según estos autores, las cepas "intermedias" tendrían características genotípicas intermedias a las cepas C y S. Mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa y análisis con endonucleasas de restricción (PCR-Restriction endonuclease analysis; PCR-REA), Whittington y col. (2001a) identificaron un polimorfismo genético en la secuencia de inserción IS1311 de *Map* que permitía clasificar a las cepas de *Map* en tipos C, S y B. Las cepas tipo C, S y B se diferenciaron en función del número de copias con una C o T en el nucleótido 223 de la secuencia de inserción IS1311. Todas las copias de la secuencia de inserción IS1311 en las cepas Tipo B presentaban una T en la posición 223 mientras que en las cepas Tipo S todas presentaban una C y en las de Tipo C tenían una o más copias con una C o una T en esta posición. Las cepas Tipo B caracterizadas en este estudio se aislaron fundamentalmente de bisontes americanos y pequeños rumiantes originarios de la India. La secuencia completa del genoma de estos aislados de Tipo B reveló que los aislados Tipo B procedentes de animales de la India eran diferentes de los aislados de bisontes americanos y por ello pasaron a denominarse “Indian Bison type” (Singh y col., 2013). Empleando la técnica de PFGE, Stevenson y col. (2002) agruparon las cepas de *Map* en dos grandes grupos o tipos de cepas: el Tipo I, comparable al Tipo S y el Tipo II, semejante al Tipo C. Posteriormente y empleando también PFGE, se determinó la existencia de un tercer genotipo de cepas (Tipo III) que agrupaba a aislados de *Map* procedentes de cabras españolas (de Juan y col., 2005; Castellanos y col., 2007b). En la Tabla XXIV se muestra un resumen de las distintas clasificaciones de las cepas de *Map* y las técnicas de tipado utilizadas en cada caso.

Tabla XXIV. Nomenclatura de las cepas de *Map* determinado por diferentes técnicas de tipado.

Método de Tipado	Tipo de cepa			Referencias
IS900-RFLP	Ovino (S)	Intermedia (I)	Bovino (C)	Collins y col., 1990 Pavlik y col., 1999
PFGE	Tipo I	Tipo III	Tipo II	Stevenson y col., 2002 De Juan y col., 2005
IS1311 PCR-REA	Ovino (S)	Bisonte (B)	Bovino (C)	Marsh y col., 1999 Whittington y col., 2001a
DMC-PCR	Tipo Ovino		Tipo Bovino	Collins y col., 2002
RDA-PCR	Tipo I		Tipo II	Dohmann y col., 2003
<i>gyr</i> -PCR	Tipo I	Tipo III	Tipo II	Castellanos y col., 2007b
<i>inhA</i> -PCR	Tipo I	Tipo III	Tipo II	Castellanos y col., 2007a
PPE-DGGE	Tipo I	Tipo III	Tipo II	Griffiths y col., 2008

Stevenson, 2010

II. INTRODUCCIÓN GENERAL

Empleando la tecnología de microarrays o mediante análisis *in silico* de secuencias del genoma completo se han identificado regiones o polimorfismos de secuencia larga (Long Sequence Polymorphisms; LSPs), inserciones o deleciones, presentes en las cepas Tipo S y ausentes en las cepas Tipo C y viceversa. Las cepas de Tipo S presentan 4 grupos de fases de lectura abierta (Open Reading Frame; ORF) que están ausentes en la cepa bovina de referencia de *Map* (K-10) y que aparecen indicados en la Tabla XXV. Estos 4 polimorfismos se han detectado consistentemente en todos los aislados de Tipo S analizados hasta la fecha. Posteriormente, Castellanos y col. (2009b) identificaron ciertos polimorfismos ausentes en las cepas de Tipo C que no habían sido detectados previamente (MAV_0339, MAV_2223, MAV_254, MAV4125-MAV4130).

Tabla XXV. Polimorfismos presentes en las cepas Tipo S y ausentes en las cepas Tipo C.

Polimorfismo ORF Clúster	Denominación	Función	Referencias
MAV_1975- MAV_2008	PIG-RDA 20 LSPA 4-II MAV-7 INDEL10	MAP_2178 truncado involucrado en síntesis micobactina. Regulador transcripcional Tet R. Proteínas PPE, Hsp, Pap A2, transportador ABC-2, IS1311.	Dohmann y col., 2003 Semret y col., 2006; Alexander y col., 2009 Wu y col., 2006 Castellanos y col., 2009a
MAV_2978 - MAV_2998	PIG-RDA 30 MAV-14 INDEL5	Citocromo P450, la proteína SecD, arilsulfatasa. Metabolismo de los lípidos.	Dohmann y col., 2003 Wu y col., 2006; Alexander y col., 2009 Castellanos y col., 2009a
MAV_3258 - MAV_3270	MAV-17 INDEL3 GPL	Biosíntesis glicopeptidolípidos	Wu y col., 2006 Castellanos y col., 2009a Paustian y col., 2008; Alexander y col., 2009
MAV_5225 - MAV_5243	PIG-RDA 10 LSPA18 MAV-24 INDEL16	Metabolismo lipídico	Dohmann y col., 2003 Semret y col., 2006; Alexander y col., 2009 Wu y col., 2006 Castellanos y col., 2009a

Stevenson, 2010

Utilizando la tecnología de microarrays, Marsh y col. (2006) identificaron tres grandes deleciones en el genoma de las cepas Tipo C que estaban ausentes en las cepas Tipo S. Estas 3 deleciones incluían las 24 ORFs que se muestran en la Tabla XXVI. Tras realizar comparaciones de la secuencia genómica de varios aislados de Tipo S, Castellanos y col. (2009a) reportaron la ausencia de MAP_3584 en los aislados Tipo III de *Map*.

Tabla XXVI. Resumen de las deleciones en las cepas Tipo S con respecto a las cepas Tipo C.

Delección cepas Tipo S	Posición de inicio	Posición Final	pb	ORF	Gen	Función
1	1625179	1633227	8,049	Par MAP1484c MAP1485c MAP1486c MAP1487c MAP1488c MAP1489c MAP1490 Par MAP1491		Dioxigenasa Acetil-Coa sintasa Enoil-CoA hidratasa Piruvato deshidrogenasa Piruvato deshidrogenasa Deshidrogenasa Alfa-metilacil-CoA racemasa Alfa-metilacil-CoA racemasa
2	1888735	1908664	19,930	MAP1728c MAP1729c MAP1730c MAP1731c MAP1732c MAP1733 MAP1734 MAP1735 MAP1736 MAP1737 MAP1738 MAP1739c MAP1740c MAP1741c MAP1742c MAP1743c MAP1744	<i>yfnB</i> <i>lipW_1</i> <i>mmpS5</i> <i>mmpL5</i> <i>fabG3_1</i>	Deshalogenasa ácido 2 haloalcano Tioesterasa II Proteína de unión ATP/GTP Proteína hipotética Regulador transcripcional Tet R Precursor de prolina Familia de las proteínas PPE Probable esterasa Tet R regulador transcripcional Proteína de membrana Proteína de membrana 3-Oxoacyl- (ACP) reductasa Sensor histidina quinasa Proteína hipotética conservada Proteína hipotética conservada Proteína hipotética conservada Proteína hipotética
3	2608297	2609525	1,229	MAP2325		Proteína de supervivencia intracelular

Par: Parcial. CoA: coenzima A. ACP: acyl carrier protein. Marsh y col., 2006

En 2005, se publicó la secuencia completa de la cepa bovina K-10 de *Map* (Li y col., 2005) y en 2012 la secuencia completa de la cepa ovina S397 (Bannantine y col., 2012). Las secuenciaciones del genoma completo de las cepas bovina K-10 y ovina S397 supusieron dos pasos de gran relevancia científica, ya que confirmaron el carácter genómico diferencial que presentan los dos grandes tipos de cepas de *Map*. Las principales similitudes y diferencias encontradas entre las cepas bovina y ovina secuenciadas fueron las siguientes:

Características genómicas generales: El número de genes anotados en el genoma de la cepa ovina (4700) es mayor que los de la cepa bovina (4350). Sin embargo, ambas cepas contienen un operón rRNA y 46 tRNA. En la Figura 17 se muestra el análisis comparativo del genoma de la cepa S397y K-10.

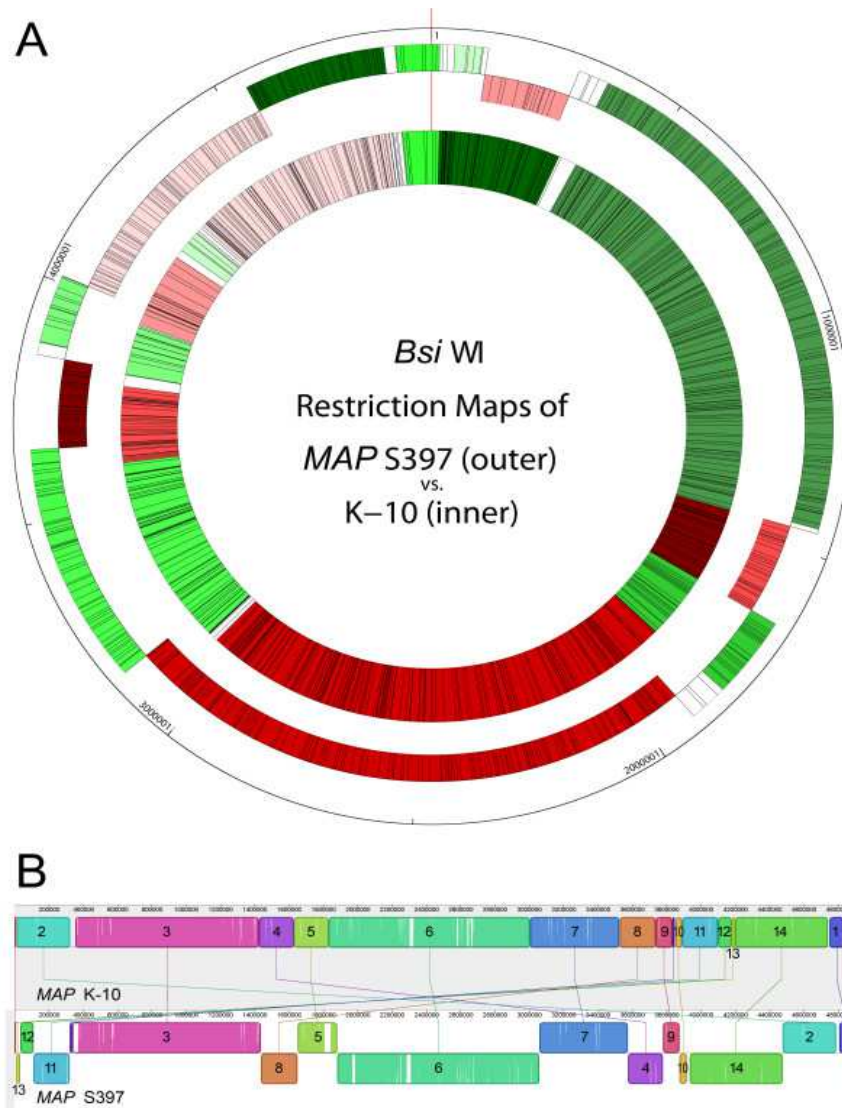


Figura 17. Análisis comparativo del genoma de la cepa K-10 y la cepa ovina S397. **(A)** Comparación de los mapas de restricción Bsi WI entre la cepa K-10 (círculo interno) y la S397 (círculo exterior). Cada bloque representa un fragmento de restricción. Los bloques verdes son regiones en la misma dirección y los bloques de color rojo son las regiones que están invertidas entre los dos genomas. Los bloques blancos son fragmentos que no están alineados. La delgada línea roja a las 12 horas es el locus del gen *dnaA*. **(B)** Alineación del genoma S397 (parte inferior) con el genoma de la cepa K-10 (parte superior). Los bloques de colores representan regiones homólogas presentes en cada genoma, que también están conectados por líneas. Los bloques de la parte inferior del genoma S397 indican regiones con orientación inversa. Dentro de cada bloque las áreas blancas indican las secuencias específicas del genoma. Bannantine y col., 2012.

Inserciones genómicas. El análisis comparativo de la secuencias de los genomas de las cepas S397 y *Map* K-10 reveló que 10 LSPs que contenían 4 o más ORFs estaban presentes en la cepa Tipo S y ausentes en la cepa K-10 de *Map*. La más larga de estas inserciones tiene un tamaño de 9 Kb y se extiende desde la ORF MAP-15940 a MAP-16060. Cuatro de estas LSPs habían sido previamente identificadas mediante hibridación genómica y análisis mediante microarrays (Castellanos y col., 2009a). En conjunto, un total de 70 ORFs están presentes en *Map* S397 pero ausentes en *Map* K-10 y de ellas 57 están presentes en la cepa

104 de *M. avium hominissuis* (Mah104) y 13 son únicas a *Map* S397. Se espera que a medida que se vayan conociendo las secuencias de más cepas de Tipo S, se pueda determinar si estas 13 secuencias son exclusivas de todas las cepas de Tipo S.

Delecciones genómicas. El análisis genómico comparativo del las cepas S397 y K-10 de *Map* reveló también la presencia de 32 ORFs en el genoma de la cepa K-10 de *Map* que estaban ausentes en la cepa *Map* S397 (Bannantine y col., 2012). Estas ORFs incluían a dos grandes delecciones previamente descritas; MAP1848-MAP1491 y MAP1728c-MAP1744 (Marsh y col., 2006). En la Tabla XXVII se muestran los genes presentes en la cepa K-10 y ausentes en la cepa MAP S397.

Tabla XXVII. Genes presentes en la cepa K-10 (Tipo C) y ausentes en la cepa ovina S397 (Tipo S).

ORF	Inicio	Fin	Tamaño	Gen	Descripción
MAP1432	1564255	1565745	1490	----	proteína de la familia REP
MAP1433c	1565742	1567487	1745	----	3-oxoesteroide 1-deshidrogenasa
MAP1434	1567583	1568701	1118	----	oxigenasa ftalato putativo
MAP1435	1569096	1569809	713	----	deshidrogenasa de cadena corta
MAP1436c	1569916	1570698	782		oxidorreductasa putativo
MAP1437c	1570719	1571705	986		proteína hipotética
MAP1438c	1571838	1572821	983	lipH	probable lipasa
MAP1484c	1624930	1626315	1385	----	putativa dioxigenasa
MAP1485c	1626606	1627856	1250		acil-CoA sintasa
MAP1486c	1627866	1628738	872		enol-CoA hidratasa/isomerasa
MAP1487c	1629019	1630029	1010		piruvato deshidrogenasa componente E1 subunidad [beta]
MAP1488c	1630041	1631033	992		piruvato deshidrogenasa componente E1 subunidad [alfa]
MAP1489c	1631038	1631910	872	----	deshidrogenasa putativa
MAP1490	1632173	1633054	881	----	alfa-metilacil-CoA racemasa
MAP1491	1633129	1633404	275	----	alfa-metilacil-CoA racemasa
MAP1728c	1889230	1889952	722	yfnB	deshalogenasa ácido 2-haloalcano
MAP1729c	1891100	1891927	827		tioesterasa II
MAP1730c	1891954	1892976	1022	----	proteína putativa ATP / GTP vinculante
MAP1731c	1893076	1893345	269		proteína hipotética
MAP1732c	1893345	1893992	647	----	regulador transcripcional (familia TetR/AcrR)
MAP1733	1894235	1894861	626		proteína precursora rica en prolina
MAP1734	1895243	1896526	1283	----	proteína de la familiaPPE
MAP1735	1896774	1897700	926	lipW_1	probable esterasa
MAP1736	1897902	1898510	608		putativo regulador de la transcripción tetR
MAP1737	1898826	1899242	416	mmpS5	pequeña proteína de membrana conservada
MAP1738	1899239	1902139	2900	mmpL5	proteína grande de membrana conservada
MAP1739c	1902213	1902995	782	fabG3_1	3-oxoacyl- [ACP] reductasa
MAP1740c	1903102	1904640	1538	----	sensor de histidina quinasa
MAP1741c	1904670	1905554	884	----	proteína hipotética conservada
MAP1742c	1905715	1906596	881	----	proteína hipotética conservada
MAP1743c	1906663	1907664	1001	----	proteína hipotética conservada
MAP1744	1907910	1908374	464		proteína hipotética

Bannantine y col., 2012

Inversiones genómicas. *Map* S397 presenta 14 inversiones de secuencia con respecto a la cepa K-10. Estas inversiones varían en tamaño de 22 a 1174 pb y constituyen 2.4 Mb del genoma de la cepa S397. Siete de estas inversiones son más largas de 22 Kb y 13 tienen al menos una secuencia de inserción en las regiones flanqueantes. Las inversiones resultan en un cambio en el orden de los genes y en las micobacterias parecen estar mediadas por secuencias de inserción. Las micobacterias pueden utilizar estas inversiones de secuencia para modificar la expresión de ciertos genes y obtener así algún beneficio durante el proceso infeccioso, aunque este aspecto debe ser contrastado mediante análisis transcriptómico y proteómico.

Duplicaciones genómicas. Dos grandes duplicaciones en tándem designadas VG1-17 y VG1-18 se han identificado en varios aislados humanos de *Map* (Wynne y col., 2011). Estas duplicaciones tienen 63 y 109 ORFs respectivamente y están flanqueadas por la secuencia de inserción IS4 lo que sugiere que la recombinación mediada por transposones podría ser responsable de la duplicación de ciertas secuencias. Se especula con la posibilidad de que estas duplicaciones puedan conferir una ventaja selectiva a las cepas de *Map* que las presentan favoreciendo su persistencia en un hospedador determinando y aumentando su virulencia.

Secuencias de inserción. Las secuencias de inserción juegan un papel muy importante en la diversidad genética entre las micobacterias y suelen utilizarse como dianas en el diagnóstico molecular. La cepa K-10 de *Map* contiene 19 secuencias de inserción diferentes con un total de 58 copias incluyendo la IS1311, y las secuencias de inserción específicas de *Map* IS900, IsMav2, IS-MAP02, IS-MAP04 y secuencias homólogas al REP13E2. Estas secuencias de inserción están presentes en la cepa S397 en el mismo número de copias que en la cepa K-10 y no se han identificado secuencias de inserción específicas para las cepas S o C. Sin embargo, el número de copias de la secuencia de inserción IS900 varía entre distintas cepas de Tipo C.

Secuencias repetidas. El número total de secuencias repetidas y el número de copias de estas repeticiones es muy variable entre distintas cepas de *Map* y puede servir para distinguir entre las cepas S y C y también entre algunas cepas Tipo C (Thibault y col., 2008; Biet y col., 2012).

Polimorfismos de nucleótido simple (Single, nucleotide polymorphisms, SNPs). Se han identificado más de 3000 SNPs diferentes entre las cepas Tipo C y S de *Map*. Dentro de las

cepas Tipo C también se han encontrado SNPs responsables de variaciones genéticas entre cepas del mismo tipo. Se han localizado alrededor de 1000 SNPs diferentes entre las cepas Tipo I y Tipo III de *Map* y otros 100 entre las cepas de camello y la cepa ovina *Map* S397. No todos los SNPs tienen porque ocasionar cambios epidemiológicos o patológicos pero generan una variabilidad genética importante.

Estabilidad genómica y tasa de mutación. Como *Map* replica muy lentamente (22-26 h) la tasa de mutación genética se espera que sea baja (Thibault y col., 2007). Empleando análisis Bayesiano de más de 100 secuencias de *Map*, se ha estimado que la tasa de mutación es de 0.3 SNPs por genoma por año (Stevenson, 2015). La tasa de mutación y la consiguiente variación genética introducida también están influenciadas por la presión selectiva del ambiente en el que reside la bacteria y por consiguiente se ve afectada por las respuestas inmunes del hospedador y/o por la presencia de antibióticos. A pesar de que se han descrito cambios genéticos en cepas de *Map* tras sucesivos pases en cultivo, no se han detectado cambios genéticos por IS900-RFLP tras realizarse pases *in vivo* de las cepas (Kasnitz y col., 2013).

Recientemente, se han secuenciado los genomas de una cepa aislada de camello (JQ5) (Ghosh y col., 2012), de una cepa aislada de una cabra (S5) (Singh y col., 2013) y de una cepa aislada de leche de un paciente con enfermedad de Crohn (MAP4) (Bannantine y col., 2014). En la Tabla XXVIII se muestra un resumen de las características genómicas de todas las cepas de *Map* secuenciadas hasta la fecha.

Tabla XXVIII. Comparación de las características genómicas de las cepas K-10, S397, JQ5 y MAP4 de *Map*.

Características Genómicas	Referencias
• Cepa K-10 bovina. Único cromosoma circular (4.829.781 pb): 69,3% G+C, 4.350 ORF, 46tRNAs, 1 rRNA	
• Cepa S397 ovina. Único cromosoma circular (4.814.922 pb): 69,3 % G+C, 4.700 ORF, 46tRNAs, 1 rRNA	Li y col., 2005 Bannantine y col., 2012
• Cepa JQ5 camello: Único cromosoma circular (4.813.711pb): 69.3 % G+C, 4,395 ORF, 46tRNAs, 1 rRNA	Ghosh y col., 2012 Singh y col., 2013
• Cepa S5 caprina: Único cromosoma circular (4.798.157 pb): 69.3 % G+C, 4.288 ORF, 46 tRNAs, 3 rRNAs	Bannantine y col., 2014
• Cepa MAP4 humana: Único cromosoma circular (4.829.424pb): 69,3 % G+C, 4.326 ORF, 46 tRNAs, 1 rRNA	

Tras la secuenciación del genoma completo de varios aislados de *Map* se ha clasificado a los aislados de *Map* en dos grandes grupos; Tipo I (o S) y Tipo II (o C) (Stevenson, 2015). Por análisis del genoma completo, se ha determinado también que las

cepas “intermedias” o “Tipo III” son en realidad un subtipo de cepas Tipo S (Alexander y col., 2009). De la misma manera, los aislados ovinos de *Map* que daban colonias pigmentadas en medios de cultivo (Stevenson y col., 2002) y un aislado de camello recientemente secuenciado también se han considerado como subtipos del Tipo S (Ghosh y col., 2012). Un análisis más detallado de las cepas Tipo B mediante secuenciación completa de su genoma ha revelado que las cepas de este tipo aisladas de animales de la India eran diferentes de los aislados de bisonte de Estados Unidos y ambos se consideran subtipos del Tipo C (Stevenson, 2015). El árbol filogenético de cepas de *Map* de acuerdo al análisis de polimorfismos de un nucleótido presentes en el genoma completo se muestra en la Figura 21.

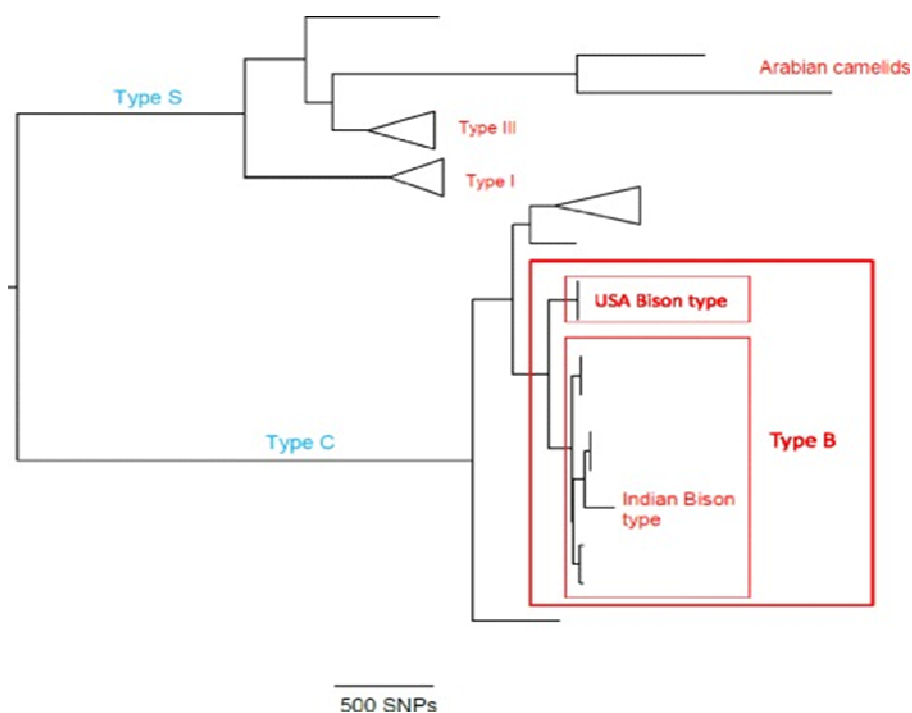


Figura 18. Filogenia de los distintos aislados de *Map* basada en la presencia de SNPs en todo el genoma. Stevenson, 2015.

Así mismo, se han publicado los resultados de la secuencia completa de una cepa humana de *Map* (MAP4) aislada de la leche de un paciente de Crohn, cuyos resultados indican que la cepa humana de *Map* es esencialmente idéntica a la cepa bovina de referencia K-10 (Bannantine y col., 2014).

II.11.2. Diferencias en la capacidad de crecimiento de diversos aislados de *Map* en médios de cultivo

La existencia de dos tipos distintos de cepas de *Map* atendiendo a su capacidad y velocidad para crecer en medios de cultivo artificiales se sospechó desde principios de 1930 pero no pudo confirmarse hasta que se identificaron medios de cultivo que permitían el crecimiento de ambos tipos de cepas (Taylor, 1945; Taylor, 1951). Los aislados de *Map* de Tipo C son relativamente fáciles de aislar de muestra clínicas y crecen razonablemente bien en medios sólidos o líquidos suplementados con micobactina, formando colonias detectables a las 4-16 semanas post-siembra, dependiendo del inóculo inicial y del medio de cultivo utilizado. Los aislados Tipo S son más difíciles de aislar y tardan de 16 a 53 semanas en crecer. En la Tabla XXIX se muestran las características descritas para el aislamiento y cultivo de aislados de *Map* de Tipo S y C.

Tabla XXIX. Características de cultivo descritas para los aislados Tipo S y Tipo C de *Map*.

Característica	Tipo S	Tipo C
Aislamiento primario	Difícil	Fácil
Detección en medio sólido	4-12 meses	5-16 semanas
Detección en medio líquido	7-12 semanas	4-10 semanas
Requerimiento de yema de huevo para aislamiento primario	Requerido	No requerido

El medio Middlebrook 7H11 suplementado con micobactina es probablemente el medio sólido más apropiado para el aislamiento primario de aislados de *Map* de pequeños rumiantes de Tipo C y S (Dimarelli-Mari y col., 2013). Recientemente, Whittington y col. (2013) han desarrollado un nuevo medio de cultivo líquido (M7H9C) compuesto de medio Middlebrook 7H9 suplementado con casitona, albumina, dextrosa, catalasa, yema de huevo, micobactina J y un cocktail de antibióticos que permite el cultivo de aislados de *Map* de Tipo C y S. La micobactina J se añade generalmente a los medios de cultivo aunque algunos autores han reportado crecimiento de cepas de *Map* de Tipo S en medio 7H11 sin micobactina (Aduriz y col., 1995; Whittington y col., 2011). La adición de yema de huevo al medio parece ser beneficiosa para el aislamiento de los aislados de *Map* de Tipo S; sin embargo, el medio de Herrold's que contiene yema de huevo no permite el crecimiento de las cepas Tipo S probablemente porque algún componente del medio este inhibiendo su crecimiento o porque la concentración de yema de huevo no sea suficiente (Whittington y col., 1999). También se ha demostrado que la adición de piruvato sódico al medio de cultivo; así como, la adición de

vancomicina o ampicilina pueden inhibir el crecimiento de los aislados de Tipo S (Stevenson, 2015).

En general, los aislados de *Map* no pueden diferenciarse de acuerdo a la morfología de las colonias. En medios sólidos, las colonias aparecen normalmente pequeñas, firmes, convexas, húmedas y de color blanco-crema (Merkal y Curran, 1974). Sin embargo, algunos aislados ovinos pueden dar lugar a colonias más lisas, suaves, y brillantes, coloreadas de un pigmento amarillo anaranjado que es estable con los pases *in vitro* e *in vivo* (Stevenson y col., 2002). Hasta la fecha, todos los aislados pigmentados de *Map* se han clasificado dentro del Tipo I. No se ha identificado ningún polimorfismo genético ni la presencia o ausencia de algún gen específico que pudiese estar asociado con la pigmentación de estos aislados por lo que la causa de la pigmentación de las colonias de algunos aislados de *Map* sigue siendo desconocida.

Map, como otras bacterias, emite componentes volátiles orgánicos (volatile organic components, VOCs) durante su crecimiento. Trefz y col. (2013) identificaron 34 VOCs emitidos por *Map* durante su crecimiento en medio HEY (Herrold's egg yolk). Entre estos, el 2-ethylfurano, 2-methylfurano, 3-methylfurano, 2-pentylfurano, acetato etílico, y el dimetildisulfuro se correlacionaban con la densidad bacteriana. Diferentes aislados de *Map* pudieron ser identificados de acuerdo a su patrón de emisión de VOCs lo que demuestra que los aislados de *Map* varían en cuanto a su crecimiento y actividad metabólica. En este estudio en concreto, un aislado de Tipo S pudo distinguirse de la cepa referencia de Tipo C (ATCC 19689), mientras que las emisiones de tres cepas de *Map* de Tipo C no mostraron diferencias significativas. También se ha observado que las cepas Tipo C de *Map* a diferencia de las cepas de Tipo S son capaces de acumular hierro en condiciones deficitarias en este metal (Janagama y col., 2010b).

En análisis de la secuenciación del genoma completo de diversos aislados de *Map* no ha evidenciado la existencia de genotipos específicos de áreas geográficas determinadas. Sin embargo, los aislados pigmentados de *Map* parecen estar restringidos a zonas geográficas concretas del Reino Unido y no se han aislado en otras zonas geográficas (Stevenson y col., 2002). Ciertos subtipos del Tipo C se han aislado exclusivamente en Canadá y en las Islas Azores. Sin embargo, hasta que no se realice el análisis del genoma completo de estos aislados no se podrá concluir que sean específicos de estas áreas geográficas.

II.11.3. Comparación de las características epidemiológicas de diversos aislados de *Map*

Se ha sugerido que los distintos tipos de cepas de *Map* podrían ser diferentes desde el punto de vista epidemiológico sobre todo atendiendo a su hospedador preferente y a los factores implicados en su transmisión. Sin embargo, hay que tener en cuenta que en muchos de los estudios epidemiológicos realizados en el pasado no se emplearon medios de cultivo que permitieran el crecimiento de los distintos tipos de cepas de *Map* ni tampoco se realizó el genotipado de estas.

Aunque las cepas de Tipo C se aíslan predominante de ganado bovino, no muestran un hospedador preferente y se han aislado de un amplio rango de hospedadores domésticos y silvestres, de rumiantes pero también de especies monogástricas. Hasta la fecha todos los aislados de *Map* procedentes de muestras de pacientes de Crohn se han genotipado dentro del Tipo C (Whittington y col., 2000a; Bull y col., 2003; Paustian y col., 2008). Aunque en Australia las cepas Tipo C se han aislado raramente de ovino (Whittington y col., 2000a), en Europa tanto las cepas Tipo S como las de Tipo C han sido identificadas en ovino y caprino (Sevilla y col., 2007, Sevilla y col., 2008, Stevenson y col., 2009). Estas diferencias pueden ser debidas a los tipos de cepas predominantes en cada región, a las diferencias relativas en cuanto al número de ovejas o vacas en producción en cada país, a la posibilidad de que ambas especies compartan pastos o a la virulencia de cada tipo de cepa en particular.

Las cepas Tipo B, consideradas actualmente como un subtipo del Tipo C, se describieron por primera vez en ejemplares de la especie *Bison bison* en el continente americano (Whittington y col., 2001a) y después en pequeños rumiantes originarios de la India (Sevilla y col., 2005). Posteriormente, el subtipo Bisonte se ha aislado también de otras especies de animales silvestres, como por ejemplo de búfalo (*Bubalus bubalis*) (Yadav y col., 2008), de antílope (*Boselaphus tragocamelus*) (Kumar y col., 2008) y de humanos (Singh y col., 2009).

Tradicionalmente, las cepas de Tipo S se han aislado predominantemente de ovino y caprino, lo que sugirió cierta preferencia por esta especie de hospedadores. En bovino, la mayoría de las infecciones con cepas de Tipo S se han identificado en toros de lidia o en casos en los que hubo un frecuente contacto directo o indirecto entre ovejas infectadas con cepas Tipo S y terneras, más susceptibles a la infección con *Map* que el ganado adulto (de Juan y

col., 2006). Moloney y Whittington (2008) estimaron que la prevalencia de infecciones con cepas de *Map* de Tipo S en ganado vacuno australiano no sería mayor de un 0.8 %. En ocasiones, se han aislado cepas Tipo S de ciervos criados en cautividad (de Lisle y col., 1993). Sin embargo, estos aislamientos no son comunes, como tampoco lo son los aislamientos de este tipo de cepas en otras especies silvestres. Solo hay descritos aislamientos de cepas Tipo S en gamo (*Dama dama*) (Machakova y col., 2004); en ratón (*Mus musculus*) (Florou y col., 2008) y en camello (Ghosh y col., 2012). Se ha estimado que el riesgo de transmisión natural de cepas de Tipo S de pequeños rumiantes a ganado o ciervo es bajo y la transmisión probablemente sólo tiene lugar cuando los animales susceptibles están en contacto con animales infectados y se exponen a altas dosis de este tipo bacteriano. Un estudio reciente de Verdugo y col. (2014) demuestra que aislados de *Map* de Tipo S son más comunes en vacuno de carne en Nueva Zelanda que los de Tipo C y el mismo subtipo de cepas de Tipo C estaba presente en vacuno de carne y en ovejas que compartían los mismos pastos. El tipo de manejo empleado en las granjas puede por tanto ser determinante para la transmisión de *Map* entre especies animales que comparten los mismos pastos.

La transmisión de *Map* entre especies puede depender también de la capacidad de las distintas cepas de *Map* para subsistir en el medio ambiente. Solamente un estudio se ha centrado en investigar como los distintos tipos de cepas de *Map* sobreviven en determinadas condiciones medioambientales (Eppelston y col., 2014). En condiciones áridas se ha demostrado que la supervivencia de un aislado de Tipo C de *Map* no se veía afectada, pero las posibilidades de que una cepa de Tipo S muriera en estas condiciones era 2.3 veces más alta (Eppelston y col., 2014). *Map* tiene la capacidad de formar esporas que son resistentes al calor y que permiten su supervivencia en el medio ambiente (Lamont y col., 2012). Hasta el momento no se ha determinado si existen diferencias en la capacidad de los distintos genotipos de *Map* de formar esporas y/o de subsistir en suelo, agua, en el alimento o en las heces de animales infectados.

II.11.4. Comparación de la virulencia de diversos aislados de *Map* en infecciones experimentales realizadas en hospedadores naturales

En infecciones experimentales, se ha evidenciado variación en el grado de patogenicidad o virulencia entre cepas de *Map* de distinto origen en un mismo hospedador, así como la diferente virulencia que puede tener una cepa concreta de *Map* en una especie animal

u otra. En la Tabla XXX se muestra un resumen de algunas infecciones experimentales realizadas con el objetivo de comparar la virulencia de distintas cepas de *Map* en bovino, ovino, caprino y en cervidos.

Tabla XXX. Infecciones experimentales realizadas en rumiantes para estudiar la virulencia de distintos aislados de *Map*.

Especie	Cepa utilizada	Resultado	Referencias
Bovino	Ovina	Enfermedad clínica	Taylor, 1953
	Caprina	No enfermedad clínica. Sí aislamiento de <i>Map</i>	Saxegaard, 1990
	Bovina/Conejo	Enfermedad clínica. Similar con ambas cepas	Beard y col., 2001c
	Bovina/Bisonte	Mayor patogenicidad de las cepas de bisonte	Stabel y col., 2003
	Bovina/Ovina	Mayor patogenicidad de las cepas bovinas	Stewart y col., 2007
Ovino	Bovina/Ovina	Mayor patogenicidad de las cepas ovinas	Verna y col., 2007
	Bovina/Ovina	Patrones de respuesta, enfermedad clínica similar	Stewart y col., 2004
	Bovina (Tipo C)	Enfermedad clínica con ambas cepas. Las lesiones inducidas por las cepas bovinas tienden a disminuir a medida que progresa la infección.	Fernández y col., 2014
	Ovina (Tipo S)		
Caprino	Bovina/Ovina	Mayor patogenicidad de las cepas bovinas	Stewart y col., 2006
Cervidos	Bovina (Tipo C)	Mayor patogenicidad de la cepa Tipo C	O'Brien y col., 2006
	Ovina (Tipo S)		
	Bovina/Ovina	Mayor patogenicidad de la cepa bovina	Mackintosh y col., 2007

Stewart y col. (2004, 2006 y 2007) demostraron que bovinos, ovinos y caprinos podían infectarse con cepas de *Map* de origen bovino y ovino, si bien el efecto de dichas cepas era diferente según el hospedador. Mientras que en bovino y caprino se observó una mayor patogenicidad de las cepas bovinas frente a las ovinas, en las ovejas infectadas con cepas bovinas u ovinas, los patrones de respuesta y la enfermedad clínica fueron similares. A pesar de que las tres especies eran susceptibles a ambas cepas, al haberse evidenciado signos de infección en los tres casos, las vacas fueron más resistentes que las ovejas y las cabras resultaron las más sensibles. Taylor (1953) observó que terneras infectadas con cepas ovinas desarrollaban la enfermedad clínica. Saxegaard en 1990, infectó terneros con una cepa de *Map* aislada de caprino, no observándose en ninguno de ellos signos clínicos de la enfermedad, ni tampoco respuesta inmune humoral. Sin embargo, cuando los terneros se sacrificaron se consiguió aislar la bacteria de tejidos intestinales y de nódulos linfáticos mesentéricos. Beard y col. (2001c) inocularon terneros con una cepa de *Map* aislada de conejo, encontrando lesiones histopatológicas similares a las observadas en otros terneros infectados con una cepa bovina. Finalmente, Stabel y col. (2003) infectaron terneros y bisontes con cepas de *Map* de origen bovino y de bisonte. Los resultados de este estudio demostraron que los bisontes eran más susceptibles a la cepa bovina que los terneros, mientras que los terneros fueron más susceptibles a la cepa de bisonte.

En ovino, las infecciones experimentales realizadas en corderos parecen confirmar que el tipo de cepa de *Map* tiene un impacto significativo en la severidad de la patología observada y en el número de casos clínicos. Así, en un estudio realizado por Verna y col. en 2007 se demostró que, las cepas ovinas provocaban lesiones más severas que las cepas bovinas en ovejas infectadas. Estos resultados contradecían a las evidencias obtenidas previamente por Stewart y col. 2004 quienes habían evidenciado patrones de respuesta y de enfermedad clínica similares en ovinos infectados con cepas bovinas y ovinas. En un estudio reciente, Fernández y col. (2014) estudiaron el efecto de distintos tipos de cepas de *Map*, ovinas (Tipo S) y bovinas (Tipo C), en la patogénesis de la enfermedad en ovino realizando una evaluación del desarrollo de las lesiones y de las respuestas inmunes inducidas tras la infección. Los investigadores detectaron una mayor producción de anticuerpos específicos y de IFN- γ en corderos infectados con aislados de *Map* de Tipo C que en los infectados con aislados de Tipo S. En corderos infectados con las cepas Tipo S se observaron lesiones granulomatosas focales y restringidas al tejido linfoide, no observándose diferencias en la intensidad de la lesión a lo largo del tiempo. Sin embargo, las lesiones ocasionadas por las cepas de Tipo C ocurrían en el tejido linfoide pero también en la lámina propia y se caracterizaban por la aparición de células gigantes. Este resultado sugería que la presencia de células gigantes podría estar asociada al tipo de cepa de *Map* más que ser una consecuencia de las respuestas inmunes inducidas por el hospedador. En los corderos infectados con las cepas de Tipo C las lesiones eran más graves a los 150 días que a los 390 días p.i., lo que sugeriría que las lesiones inducidas por las cepas de Tipo C en corderos podrían tener un carácter regresivo a medida que progresa la infección. Por otro lado, en este estudio se observaron también diferencias en el tipo de lesiones ocasionadas por un aislado de campo de Tipo C y por la cepa de referencia K-10 a los 150 días p.i.. La cepa K-10 producía un menor número de lesiones severas de tipo multifocal sugiriendo que la cepa K-10 podría ser menos virulenta como consecuencia de los sucesivos pases en cultivo a los que había sido sometida. En este estudio no se observaron diferencias entre los dos aislados de campo de Tipo S empleados. En el caso del ganado caprino, los datos de las infecciones experimentales realizadas parecen indicar que estos animales son menos resistentes a la infección que el ganado bovino y ovino y susceptibles de ser infectados tanto con cepas de origen bovino como ovino, no habiéndose identificado hasta el momento una cepa específica de *Map* en caprino (de Juan y col., 2005).

En el caso de los ciervos, estos animales parecen ser menos susceptibles a la infección experimental con las cepas ovinas que con cepas bovinas. O'Brien y col. (2006) infectaron

ciervos con cepas bovinas (Tipo C) y ovinas (Tipo S), observando una mayor respuesta inmune, así como mayor tasa de detección de *Map* en tejido y heces en aquellos ciervos infectados con la cepa Tipo C. Cuando la infección se realizó con la cepa Tipo C, el 100 % de los animales se infectó, mientras que cuando la infección se realizó con la misma dosis de la cepa de Tipo S solo el 69 % de los animales se infectó lo que sugería que las cepas de *Map* de Tipo S podrían ser menos virulentas para los ciervos o que los ciervos son más resistentes a este tipo de cepa de *Map*. De la misma manera, Mackintosh y col. (2007) observaron que la cepa ovina era menos virulenta para los ciervos que la cepa bovina aunque ambas provocaban enfermedad clínica. Por tanto, estos resultados sugieren una mayor sensibilidad de los ciervos a cepas bovinas de Tipo C, lo que explicaría el aislamiento tan frecuente de dichos genotipos de ciervos en granjas con casos naturales de paratuberculosis.

II.11.5. Comparación de la patogénesis de diversos aislados de *Map in vitro*

La primera etapa en la infección por *Map* es la invasión de la barrera intestinal a través de las células M y de las células epiteliales, donde la adherencia bacteriana puede jugar un papel crucial (Arsenault y col., 2014). La hemaglutinina de unión a heparina (Heparin-binding hemagglutinin; HBH) es una proteína de adherencia situada en la superficie de *Map* y que media en la unión de *Map* a las células epiteliales y fibroblastos (Menozzi y col., 1996). Las regiones C-terminal del gen de la HBHA difieren entre las cepas de Tipo C y Tipo S de *Map*, siendo las cepas Tipo S las que tienen mayor capacidad de adhesión al tener más repeticiones ricas en lisina, que son importantes para la unión de la HBHA a los glicosaminoglicanos sulfatos de heparina (Heparan sulfate glycosaminoglycan; HS-GAG). No se han encontrado diferencias en la estructura de la HBHA entre los subtipos I y III de las cepas Tipo S.

Una vez cruzada la barrera del epitelio intestinal a través de las células M y células epiteliales, el bacilo es fagocitado por macrófagos subepiteliales. La capacidad de supervivencia de *Map* depende de su capacidad para inhibir la acidificación del fagosoma y la fusión del fagolisosoma. A pesar de que las distintas cepas de *Map* emplearían un único protocolo de infección, su capacidad para entrar y sobrevivir en los macrófagos del hospedador parece depender del genotipo bacteriano (Gollnick y col., 2007, Stevenson, 2015). Hasta la realización de la presente tesis doctoral, los estudios de comparación de la virulencia de diversas cepas de *Map* se habían realizado únicamente en macrófagos bovinos, utilizando pocas cepas y sin genotipo determinado y nunca se habían incluido cepas silvestres de *Map* en

los análisis. El único estudio que hasta la fecha de inicio de esta tesis había comparado la virulencia de distintas cepas de *Map* en modelos *in vitro*, es el de Janagama y col. (2006), en el que se evaluó la capacidad de tres de cepas de *Map* de origen bovino, humano y ovino para persistir en el interior de macrófagos bovinos de la raza Hosltein. Los resultados de este estudio demostraron que las cepas bovinas y humanas eran capaces de sobrevivir mejor que las cepas ovinas en el interior de macrófagos bovinos infectados a las 24, 48 y 96 horas p.i. Sin embargo, para evaluar el número de bacterias en el interior de los macrófagos infectados se utilizó la técnica de PCR, que al cuantificar DNA tanto de bacteria viva como muerta, sobre-estima la carga bacteriana. Previamente, solo algunos estudios habían evaluado *in vitro* los perfiles de expresión de genes del sistema inmune inducidos por cepas bovinas de *Map* en macrófagos bovinos obtenidos de animales sanos y en líneas celulares de macrófagos bovinos (Weiss y col., 2004; Janagama y col., 2006; Murphy y col., 2006). En conjunto, los resultados de estos estudios transcriptómicos sugieren que tras una infección con *Map* se produciría un bloqueo de los mecanismos de defensa pro-inflamatorios, lo que explicaría la persistencia y la inhibición de la apoptosis de las cepas virulentas de *Map* en el interior de los macrófagos infectados. Además, se ha demostrado que las respuestas inmunes inducidas en macrófagos bovinos frente a una infección con *Map* dependerían del genotipo bacteriano (Gollnick y col., 2007). En concreto, en este estudio se utilizaron cepas de origen bovino, ovino y humano, demostrándose que las cepas bovinas y humanas se comportaban de manera similar y que serían más virulentas que las cepas ovinas atendiendo al perfil de expresión de ciertos marcadores inmunológicos del hospedador. Mientras las cepas bovinas y humanas indujeron una respuesta celular de tipo anti-inflamatorio, que les permitiría sobrevivir en el interior del macrófago infectado, las cepas de origen ovino provocaron una respuesta pro-inflamatoria en los macrófagos infectados, dirigida a eliminar a la bacteria del macrófago infectado. Motiwala y col. (2006) compararon las respuestas inmunes inducidas por la línea celular de monocitos humanos (THP-1) frente a la infección con 3 cepas de *Map* (bovina, humana y ovina). Las respuestas inducidas por la cepa humana y bovina fueron idénticas y estaban asociadas con inhibición de la expresión de genes implicados en procesos pro-inflamatorios o en la inducción de muerte celular programada o apoptosis y con sobre-expresión de genes necesarios para la correcta persistencia bacteriana en el hospedador. Sin embargo, en células infectadas con la cepa ovina se observó sobre-expresión de 21 genes relacionados con respuestas inflamatorias e invasoras y con la inducción de respuestas apoptóticas dirigidas a eliminar *Map* en los macrófagos infectados. Janagama y col. (2006) y Borrmann y col. (2011) analizaron la respuesta inmune inducida por diferentes tipos de cepas de *Map* en MDMs

bovinos y en la línea celular de monocitos humanos THP-1 respectivamente. Ambos estudios concluyen que las cepas Tipo S producen menor cantidad de la citoquina IL-10 y mayor cantidad de TNF que las cepas de Tipo C. También se ha investigado la expresión de proteínas de las cepas Tipo S y Tipo C bajo condiciones de estrés oxidativo, nitrosativo, hipoxia etc. que imitan el entorno de los macrófagos. Entre las cepas Tipo C y S se han observado diferencias en la expresión de ciertas proteínas de 10 proteínas implicadas en respuesta al estrés oxidativo (Kawaji y col., 2010), de 9 implicadas en respuesta al estrés nitrosativo (Kawaji y col., 2010), de 27 en respuesta al flujo de temperatura (Gumber y col., 2009b), 21 a la hipoxia (Gumber y col., 2009a) y 26 en respuesta a la inanición (Gumber y col., 2009a). Otro factor de estrés que encuentra *Map* al infectar los macrófagos es la baja disponibilidad inicial de hierro. Algunos estudios sugieren que las cepas Tipo S y Tipo C de *Map* responden de distinta manera a condiciones de baja disponibilidad de hierro siendo las cepas Tipo C las que son capaces de acumular más hierro que las cepas Tipo S, lo que proporciona una ventaja a la hora de sobrevivir en el interior de los macrófagos infectados (Janagama y col., 2010b).

III. OBJETIVOS

III. OBJETIVOS

El objetivo principal de esta tesis ha sido el de comparar la virulencia de 11 aislados de *Map* de diversos genotipos y procedentes de distintas localizaciones geográficas y hospedadores en modelos de infección *in vitro* bovinos y ovinos en dos estadios diferenciados de la infección. Para ello se ha determinado:

- 1- La entrada, crecimiento y supervivencia intracelular de aislados de *Map* de diversos genotipos, localizaciones geográficas y hospedadores en macrófagos bovinos y ovinos.
- 2- La respuesta inmune de los macrófagos bovinos y ovinos frente a una infección con las cepas de *Map* seleccionadas.
- 3- La capacidad de diversas cepas de *Map* para inducir la formación de microgranulomas empleando modelos *in vitro* de granulomas.

Empleando los conocimientos obtenidos durante la realización de esta tesis doctoral, se han desarrollado modelos de infección *in vitro* de macrófagos bovinos, ovinos y caprinos más específicos y se ha demostrado recientemente su utilidad como plataforma para la evaluación de la eficacia de candidatos vacunales. Estos modelos *in vitro* permiten reducir el número de animales sometidos a ensayos de infección *in vivo* y facilitan la identificación de marcadores inmunológicos de protección que pueden servir para refinar el diseño vacunal.

La consecución de esta tesis doctoral ha permitido:

1. Desarrollar modelos de infección *in vitro* para la evaluación de la virulencia de diversas cepas de *Map* en diversos estadios de la infección; así como, para la evaluación de la eficacia y mecanismo de acción de prototipos vacunales.
2. Determinar que aislados/genotipos de *Map* representan un riesgo potencial para la salud de las especies bovina y ovina.

III. OBJETIVOS

3. Determinar como el aislado/genotipo de *Map* influye en el tipo de respuesta inmune y en la patogénesis de la enfermedad en estadios iniciales y más avanzados de la enfermedad.
4. Determinar si es necesario incluir el tipado de las cepas de *Map* en los programas de control y certificación de la paratuberculosis.
5. Establecer si es necesario introducir medidas de control que eviten el contacto y la transmisión de *Map* entre diversas especies animales.
6. Conocer los riesgos biológicos imputables a aislados/genotipos de *Map* procedentes de hospedadores silvestres en relación con la producción ganadera.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

IV.1. Declaración ética

Los procedimientos experimentales fueron realizados por veterinarios clínicos en estricta conformidad con las recomendaciones de la Guía Ética Española para el cuidado de los animales utilizados para la experimentación y otros fines científicos (Real Decreto Legislativo 53/2013).

IV.2. Animales y extracción de muestras de sangre periférica

Se recogió sangre periférica de la vena yugular de vacas de la raza Holstein mayores de 24 meses y de ovejas de la raza Latxa mayores de 48 meses en tubos Vacutainer heparinizados (Becton, Dickinson and Company, Sparks, Estados Unidos). Las extracciones de sangre se realizaron con un mínimo de 14 días entre ellas con el objetivo de asegurar la renovación de las células rojas y se recogió como máximo el 1 % del peso del animal en cada extracción sanguínea.

El procedimiento de recogida de sangre fue aprobado por el Comité Institucional para el Cuidado y uso de Animales (Institutional Animal Care and Use Committee; IACUC) de NEIKER-Tecnalia y por el Departamento de Agricultura de la Diputación Foral de Bizkaia, España (Permiso N° 14.133).

IV.3. Selección y crecimiento en medio líquido de diversos aislados de *Map*

Para este estudio se seleccionaron 11 aislados de *Map* procedentes de diversos hospedadores (bovino, ovino, caprino, ciervo, gamo, jabalí y bisonte), de diversas localizaciones geográficas (España, Estados Unidos, India y Portugal) y con distintos genotipos (C, S y B) como indica la Tabla XXXI. Como cepa control se utilizó la cepa K-10 de *Map* obtenida de la ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, Estados Unidos). Los otros 10 aislados de *Map* se habían aislado previamente de muestras fecales o tejidos de los animales domésticos y silvestres indicados y se mantuvieron en glicerol a - 80 °C como parte de la colección de aislados del laboratorio de Micobacteriología de NEIKER-

Tecnalia. Los aislados de *Map* seleccionados se cultivaron en frascos de cultivo T25 a 37 °C durante un máximo de 3 meses en 10 ml de medio Middlebrook 7H9 (Difco Laboratories, Detroit, Estados Unidos) suplementado con 10 % (vol/vol) de OADC (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, Estados Unidos), 0.05 % (peso/vol), de Tween-80 (Sigma-Aldrich, St. Louis, Estados Unidos) y 2 mg/L de micobactina J (Allied Monitor Inc, Fayette, Estados Unidos). El medio de cultivo se centrifugó a 3.000 rpm durante 20 min en una centrífuga Beckman Coulter Allegra X-12. Los pellets bacterianos correspondientes se resuspendieron en 2 ml de solución salina de Hanks (Hank's balanced salt solution; HBSS) (Lonza, Verviers, Bélgica) y la suspensión resultante se pasó 20 veces a través de una aguja de calibre 27 para disgregar los grumos formados por agrupación bacteriana durante el crecimiento. La turbidez de la suspensión bacteriana se ajustó a un estándar 1 de McFarland con un densitómetro Densimat (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Francia). Sólo la fracción superior de la suspensión que contiene bacterias dispersas se utilizó para los ensayos de infección.

Tabla XXXI. Aislados de *Map* incluidos en el estudio.

Código cepa	Region/ País	Especie de procedencia	Perfil IS 1311 PCR/REA	Perfil PFGE
K10	Estados Unidos	Bovino	C	1-1
6	Cantabria/España	Bovino	C	52-1
P38I	Aragón/España	Ovino	C	2-1
2349/06-1	Portugal	Ovino	S	-
334	India	Ovino	B	60-1
711	Bizkaia/España	Caprino	C	2-1
311	Menorca/España	Caprino	S	16- 47
855	Toledo/España	Ciervo	C	68-1
622/07	Asturias/España	Gamo	C	-
681	Toledo/España	Jabalí	C	2-1
6.1	Estados Unidos	Bisonte	B	2-1

IV.4. Genotipado de las cepas seleccionadas para el estudio

Los aislados seleccionados habían sido previamente genotipados utilizando dos técnicas moleculares: IS1311 PCR-REA y PFGE (Sevilla y col., 2005). Con el objetivo de confirmar el genotipo de las cepas de manera rápida, se diseñaron primers para la amplificación por PCR de 4 fragmentos de DNA correspondientes a 4 ORFs (MAP1487, MAP1485, MAP1738, MAP2325) que están presentes en el genoma de las cepas de *Map* de Tipo C y ausentes en las cepas Tipo S (Marsh y col., 2005; Marsh y col., 2006). En las reacciones de PCR se utilizó como molde DNA genómico extraído de las 11 cepas de *Map*. Para la extracción del DNA genómico, una suspensión de cada cepa de *Map* se ajustó a un McFarland de 1 y se centrifugó durante 20 min a 2250 X g. Los pellets bacterianos se

resuspendieron en 180 µl de lisozima (20 mg/ml) (Sigma-Aldrich) en 20 mM de tampón Tris-HCl (pH 8,0) y se incubaron durante toda la noche a 37 °C. Al día siguiente, se añadieron a cada vial 20 µl de proteinasa K (2 mg/ml) y los lisados resultantes se incubaron 3 horas a 56 °C y posteriormente 15 min a 96 °C para inactivar a la proteína K. Después de la adición de 200 µl de etanol, los lisados se dispensaron en minicolumnas DNeasy (QIAamp DNA Blood Mini Kit; Qiagen Inc, Valencia, Estados Unidos) y se centrifugaron durante 1 min a 6000 X g. A continuación, el DNA unido a las columnas QIAamp, se lavó y eluyó de las columnas en 100 µl de tampón Tris-EDTA estéril (TE) (pH 8,0) siguiendo las instrucciones del fabricante. La concentración de DNA se determinó empleando un espectrofotómetro NanoDrop 1000 (Thermo Scientific, Wilmington, Estados Unidos).

Las reacciones de PCR con los cebadores específicos (0,2 µM de cada primer) para la amplificación de los fragmentos de DNA de MAP1485, MAP1487, MAP1738, MAP2325 y MAP16S rRNA se realizaron empleando 250 ng de DNA genómico como molde y el kit de GC-Rich PCR (Roche, Mannheim, Alemania) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los productos de PCR amplificados se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 1 % (peso/vol) teñidos con GelRed (Biotium Inc, Hayward, Estados Unidos).

En la Tabla XXXII se muestran las secuencias de los primers utilizados para la detección de estos 4 fragmentos del genoma de *Map*, las temperaturas de alineamiento empleadas y la concentración del buffer GC-Rich en cada una de las reacciones de PCR.

Tabla XXXII. Primers específicos utilizados para la detección de MAP1485, MAP1487c, MAP1738, MAP2325 y MAP16S por PCR.

Fase de lectura abierta	Función	Código Primer	Secuencia 5'-3'	T° Alineamiento (°C)	Concentración Buffer GC-rich (M)
MAP1485c	Acil-Coa sintasa	1/F 2/R	TCACGAGCAGGTTCTCGACTT CGTCAAGCACCGGATGATG	62.3	0.5
MAP1487c	Piruvato deshidrogenasa	3/F 4/R	ACCAAGAGATGACGATGCG ^a AATCGTCTCGATGAACAGGC ^a	55.7	2
MAP1738	Proteína de membrana	5/F 6/R	ACCACGATGCTGACCATGTA ^a ATCAGGCACAGCGAAGAGAT ^a	55.7	0.5
MAP2325	Proteína intracelular	7/F 8/R	GTTTGACCATCCGGCACTC ^a CCGCGTAGGCGACAATAAC ^a	55.7	0.5
MAP16S	16S RNA ribosomal	9/F 10/R	CGAACGGGTGAGTAACACG TGCACACAGGCCACAAGGGA	62.3	0.5

^a Primers diseñados de acuerdo a Marsh y col. (2006)

IV.5. Modelos celulares *in vitro* para el estudio de las fases iniciales de la infección

Para el estudio de la interacción de las distintas cepas de *Map* con los macrófagos del hospedador en los primeros estadios de la infección se utilizaron:

- La línea celular de macrófagos bovinos (BoMac).
- MDMs bovinos y ovinos.

En la Figura 19 se muestra una fotografía al microscopio invertido de contraste de fases de los modelos de infección *in vitro* utilizados.

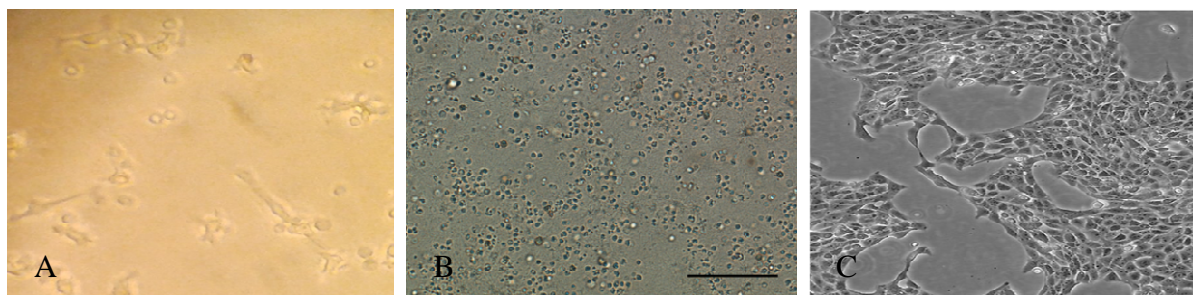


Figura 19. Modelos de infección: (A) MDMs bovinos, (B) MDMs ovinos y (C) BoMac.

La línea celular BoMac la proporcionó la Dra. J.R. Stabel (United States Department of Agriculture; USDA) (Stabel and Stabel, 1995). Las células BoMac se cultivaron en un frasco de 175 cm² (Corning, Nueva York, Estados Unidos) con RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute) suplementado con 20 mM de L-glutamina, 10 % de suero fetal bovino inactivado, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina (Lonza). Para los ensayos de infección, las células BoMac se tripsinizaron del frasco de cultivo y se sembraron a una densidad de 1×10^6 células/ml en placas de cultivo de 24 pocillos (Corning) y se incubaron a 37 °C en una estufa de CO₂ al 5 %.

Para la obtención de PBMCs bovinos y ovinos, linfocitos y monocitos, se llevó a cabo un gradiente de Ficoll, con la idea de separar los diferentes tipos celulares por densidad. Veinticinco mililitros de sangre diluida 1:2 en HBSS fueron añadidos sobre 10 ml de Ficoll-Paque (1,084 g/cm³) (GE Healthcare Bio-Sciences, Uppsala, Suecia) en tubos de centrifuga de 50 ml. Las células se centrifugaron a 900 X g durante 30 min para separar los eritrocitos y las células polimorfonucleares de las PBMCs. Tras la centrifugación, la primera fase del gradiente que contiene el plasma sanguíneo se aspiró. Las PBMCs se recogieron con pipeta

pasteur de la interfase creada tras la centrifugación, se transfirieron a tubos de 50 ml y se lavaron 3 veces en HBSS mediante centrifugación a 400 X g 10 minutos a 20 °C para eliminar las plaquetas. El pellet final conteniendo los PBMCs bovinos se resuspendieron en RPMI-1640 suplementado con 20 mM de L-glutamina, 10 % de suero fetal bovino inactivado, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomycin. Los PBMCs ovinos se resuspendieron en medio específico de macrófagos (Macrophage SFM; Invitrogen, Carlsbad, Estados Unidos) suplementado con 20 mM de L-glutamina, 10 % de suero de cordero inactivado, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomycin. Tanto los PBMCs bovinos como los ovinos se sembraron en placas de cultivo de 24 pocillos a una densidad de 1×10^6 células/ml y se incubaron durante 2 horas a 37 °C en una estufa a 5 % de CO₂. Pasado este tiempo de incubación, las células que no se adhirieron a la base de los pocillos (los linfocitos) se retiraron y las células adheridas a la placa de cultivo (los monocitos) se incubaron a 37 °C durante 7 días en medio de cultivo para lograr su diferenciación a macrófagos. Al cabo de los 7 días de cultivo, la mayoría de las células adherentes tenían un aspecto estrellado con superficie irregular, gran núcleo celular y vesículas/vacuolas en el citoplasma, típica morfología de los macrófagos.

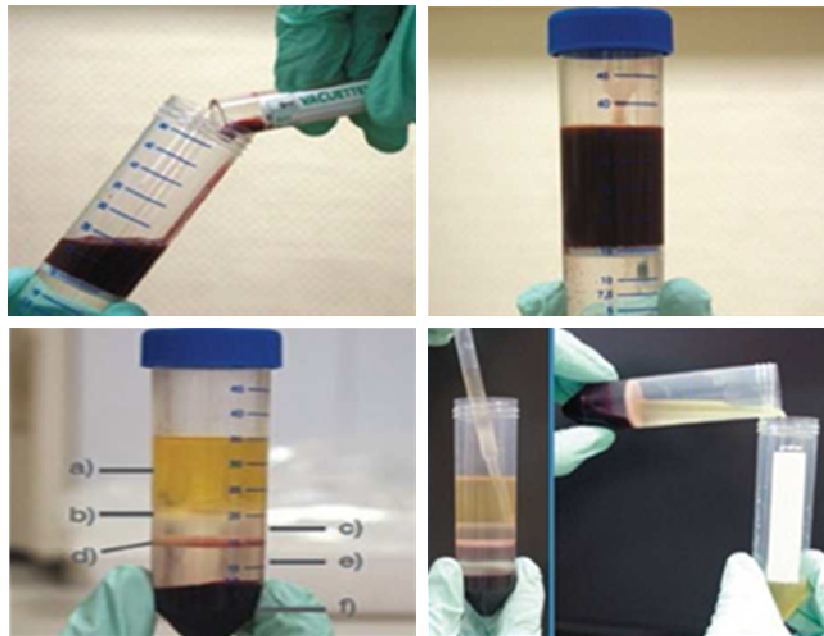


Figura 20. Esquema de la obtención de PBMCs mediante un gradiente con Ficoll. **a)** Plaquetas. **b)** PBMCs. **c)** Ficoll-Paque. **d)** Membrana. **e)** Granulocitos. **f)** Eritrocitos.

IV.6. Infección de la línea celular BOMAC y MDMs bovinos y ovinos con *Map*

Los macrófagos bovinos y ovinos se infectaron por triplicado con 100 μ l de cada una de las cepas de *Map* a una concentración de McFarland 1 (3×10^8 UFC/ml), empleando una multiplicidad de infección (Multiplicity of infection; MOI) de 10:1 (bacteria:célula). Tras la infección, los correspondientes lisados celulares se recogieron a las 2 horas (para medir la entrada) y a los 7 días p.i. (para medir la supervivencia y multiplicación bacteriana). A las 2 h p.i., se recogió el sobrenadante de las células y las células se lavaron dos veces con HBSS para eliminar la bacteria extracelular. Los macrófagos infectados se lisaron a las 2 h p.i. (día 0) o se añadió medio de cultivo fresco para cultivarlos 7 días más (día 7). Para la lisis de los macrófagos infectados a día 0 y día 7 se utilizaron 500 μ l de Triton X-100 (0.1 %) en agua estéril durante 10 min.

IV.7. Cuantificación de *Map* en el interior de los macrófagos infectados empleando el Sistema BACTEC MGIT 960

Como métodos para realizar la cuantificación de *Map* en el interior de macrófagos infectados, se probaron: PCR cuantitativa (ParaTbKuant, Vacunek, Bizkaia, España), el plaqueo en medio sólido y el sistema de cultivo en medio líquido BACTEC MGIT 960 (Becton, Dickinson and Company) (Tabla XXXIII).

Tabla XXXIII. Crecimiento en medio líquido (7H9) y sólidos (HEYM, LJ, y 7H11) de los aislados de *Map* seleccionados.

Nº Muestra Código cepa	Hospedador	Perfil IS 1311 PCR/REA	7H9	HEYM	LJ	7H11
14-35	Bovino	C	+	+	+	+
2-P381	Ovino	C	+	+	+	+
3-ovicap41	Ovino	S	+	-	-	+
4-2349/06-1	Ovino	S	+	-	+	Nd
5-334	Ovino	B	+	-	+	Nd
6-711	Caprino	C	+	-	+	+
7-3334	Caprino	S	+	-	+	-
9-855	Ciervo	C	+	+	+	+
10-622	Gamo	C	+	+	-	+
11-681	jabalí	C	+	+	+	+
12-6.1.	Bisonte	B	+	-	+	-
13-K10	Bovino	C	+	+	+	+

+ Positivo - Negativo nd: no determinado

Aunque la técnica de PCR cuantitativa se puso a punto para el recuento de *Map* en células infectadas, este método no permite diferenciar bacteria viva de muerta por lo que se descartó. Como puede observarse en la Tabla XXXIII, no todas las cepas incluidas en el estudio fueron capaces de formar colonias fácilmente cuantificables en todos los medios sólidos ensayados (HEY, LJ o 7H11) por lo que el método de cuantificación de *Map* mediante conteo de colonias en medio sólido fue también descartado.

Sin embargo, todas las cepas incluidas en el estudio crecieron eficientemente en tubos indicadores de crecimiento micobacteriano (mycobacterial growth indicator tube; MGIT) que contienen medio líquido Middlebrook 7H9 modificado. El sistema de cultivo en medio líquido BACTEC MGIT 960 (Becton, Dickinson and Company) es capaz de cuantificar la carga bacteriana viable en el interior de los macrófagos infectados y además fue el método que aportó resultados más repetitivos y rápidos de los tres ensayos. Por todo ello, este sistema fue el método elegido para poder evaluar la capacidad de cada cepa para entrar y sobrevivir en el interior de los macrófagos del hospedador. El sistema BACTEC MGIT 960 determina el tiempo de detección (Time to detection, TTD) en días/horas que se tarda en detectar el crecimiento bacteriano. Este tiempo es proporcional al tamaño del inóculo inicial. Los tubos MGIT presentan un sensor con un componente fluorescente (tris-4,7-diphenyl-1,10-phenanthroline ruthenium chloride pentahydrate) en la base que es sensible a la presencia de oxígeno. Inicialmente, el oxígeno del tubo bloquea la emisión de fluorescencia. Con el tiempo, los microorganismos consumen el oxígeno lo que resulta en emisión de fluorescencia. La fluorescencia emitida en cada tubo es monitorizada automáticamente cada hora por el instrumento BACTEC MGIT 960. En la Figura 21 se muestra el sistema BACTEC MGIT 960.



Figura 21. Sistema de cultivo micobacteriano BACTEC MGIT 960.

Este sistema se utiliza habitualmente para la detección de *Map* pero no para su cuantificación, por lo que se tuvo que poner a punto para utilizarlo como método de cuantificación (Abendaño y col., 2012). Para ello, se prepararon suspensiones de cada uno de los aislados de *Map* seleccionados en HBSS a una concentración de McFarland=1 (3×10^8 UFC/ml). A partir de estas suspensiones se prepararon 7 diluciones decimales sucesivas. De cada dilución se tomaron 100 μ l que se inocularon por duplicado en los tubos MGIT. Cada tubo MGIT contiene 7 ml de medio Middlebrook 7H9 modificado con caseína peptona. Cada tubo se suplementa con 800 μ l de un suplemento compuesto por OADC (BBL MGIT OADC growth supplement, Becton, Dickinson and Company). Además los tubos se suplementaron con 2 μ g/ml de micobactina y con una mezcla de antibióticos compuesta por polimixina B, anfotericina B, ácido nalidíxico, trimetoprina, y azlocilina (BBL MGIT PANTA antibiotic mix, Becton Dickinson and Company). Los tubos se incubaron a 37 °C en el sistema BACTEC MGIT 960 durante 42 días. Los tubos son positivos cuando la carga bacteriana alcanza concentraciones en un rango de 10^5 - 10^6 UFC/ml. Cuando los tubos son positivos, el aparato proporciona el tiempo que cada tubo tarda hasta alcanzar la positividad, el TTD. Para generar curvas patrón específicas para cada aislado incluido en el ensayo, el TTD de cada tubo (en días) se relacionó con el \log_{10} de las UFC estimadas que estaban presentes en cada dilución mediante análisis de regresión no lineal (GraphPad Prism 6, GraphPad Software, San Diego, Estados Unidos). De esta manera se generaron ecuaciones que permitían estimar el log UFCs presentes en un inóculo determinado de cada una de los aislados de *Map* incluidos en el estudio con un 95 % de intervalo de confianza.

El log de UFCs presentes en cada dilución se cuantificó también mediante PCR a tiempo real empleando un kit específicamente diseñado para la detección de la secuencia de inserción F57 que se encuentra en copia única en el genoma de *Map* (ParaTbKuant, Vacunek). Para ello, se extrajo DNA a partir de 100 μ l de cada una de las siete diluciones decimales de cada aislado de *Map* empleando el procedimiento descrito en el apartado IV.4. El DNA extraído de cada dilución decimal se amplificó por PCR empleando el kit ParaTbKuant. Este kit utiliza una sonda específica para la secuencia de inserción F57 de *Map* marcada con el fluoróforo 5-carboxifluoresceína (FAM) en el extremo 5'. El kit también utiliza una sonda interna marcada con 6-carboxy-4',5'-dichloro-2',7'-dimethoxyfluorescein, succinimidyl ester (JOE) para controlar que no exista inhibición de la amplificación. Las reacciones de qPCR se llevaron a cabo en el sistema ABI Prism 7500 (Applied Biosystem, Carlsbad, Estados Unidos) con las siguientes condiciones de amplificación: 1 ciclo de

desnaturalización a 95 °C durante 10 min, 45 ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 15 s, y un ciclo de alineamiento/extensión de 60 °C durante 60 s. Para la cuantificación del DNA se generó una curva estándar empleando concentraciones de DNA conocidas de un plásmido que contenía la secuencia de inserción F57 siguiendo las instrucciones del proveedor. Esta curva estándar se empleo para extrapolar los valores de Ct de las muestras problema y obtener la concentración de DNA correspondiente en muestras desconocidas, en nuestro caso en cada una de las diluciones decimales de las 11 cepas de *Map*. La curva estándar y las concentraciones de DNA en las muestras problema se analizaron empleando el software ABI Prism v 1.4. Por último, el número de copias de DNA de *Map* en cada una de las diluciones seriadas de los aislados de *Map* incluidos en el estudio se correlacionó con el log de las UFCs cuantificadas con el sistema BACTEC MGIT 960 mediante un análisis de correlación lineal (Microsoft Office Excel) y mediante un test t de Student (GraphPad Prism 5, GraphPad Software).

Además de generar ecuaciones para la cuantificación de cada aislado en el sistema BACTEC MGIT 960, caracterizamos también el crecimiento de cada aislado en los tubos MGIT. Para ello, las medias de los valores de TTD obtenidos para todos los aislados del estudio se compararon empleando un análisis de varianza (ANOVA) unidireccional con la corrección posterior de Duncan (SAS Institute Inc, Estados Unidos). Para definir los grupos, los valores de TTD de cada una de los aislados se compararon con los de la cepa de referencia K-10. Las diferencias en relación al crecimiento se consideraron significativas cuando los valores de $P < 0.05$. Al comparar las medias de los valores de TTD, pudimos agrupar a los aislados de *Map* incluidas en el estudio en dos grupos distintos de acuerdo a su crecimiento en el sistema BACTEC MGIT 960.

Una vez que se puso a punto el sistema BACTEC MGIT 960 para la cuantificación de *Map*, este método se utilizó para comparar la capacidad de los 11 aislados de *Map* incluidos en el estudio para entrar, multiplicarse y persistir en el interior de las células BoMac y en MDMs bovinos y ovinos (Abendaño y col., 2013a, Abendaño y col., 2014). El inóculo y los lisados celulares recogidos a las 2 h (día 0) y 7 p.i. se inocularon en tubos MGIT y se incubaron a 37 °C en el sistema BACTEC MGIT 960. Los tiempos de detección para cada muestra se transformaron en UFCs siguiendo la fórmula previamente obtenida para cada aislado. El porcentaje de entrada de cada aislado se calculó como el porcentaje de bacteria inoculada que se recuperó de cada lisado celular recogido a día 0. El crecimiento intracelular

de cada aislado se expresó como el incremento de log UFCs entre el día 0 y 7 p.i. calculado como la diferencia en el log UFCs estimado en ambos tiempos p.i. El ratio de crecimiento de cada aislado se calculó dividiendo el log UFCs a día 0 entre el log UFCs a día 7. Un ratio de crecimiento mayor que 1 indicaba que el aislado se multiplicó dentro del macrófago infectado entre los días 0 y 7 mientras que un ratio menor que 1 indicaba destrucción bacteriana dentro del macrófago infectado.

Para comparar los porcentajes de entrada de cada cepa en los macrófagos se utilizó un test de Fisher (GraphPad Software). El valor medio estimado de UFCs en los inóculos iniciales y los días 0 y 7 después de la infección se utilizaron para generar un modelo general lineal (GLM) (SAS version 9, SAS Institute Inc). En el análisis el modelo celular (BoMac, MDM bovino, MDM ovino), tiempo p.i. (inóculo, días 0 y 7 p.i.), el genotipo de la cepa (C, S y B) y la especie animal del que se aislaron las cepas (bovino, ovino, caprino, ciervo, jabalí, gamo) fueron las variables independientes. Las diferencias se consideraron significativas cuando el valor de $P < 0.05$

IV.8. Extracción de RNA, síntesis de c-DNA y amplificación mediante qRT-PCR de citoquinas y proteínas implicadas en apoptosis y destrucción tisular

Para evaluar la respuesta inmune inducida en macrófagos infectados con cada uno de los aislados de *Map* se puso a punto un ensayo cuantitativo de qRT-PCR que permitía analizar la expresión de varias citoquinas y proteínas implicadas en apoptosis y destrucción tisular.

Para la selección de los genes incluidos en el análisis se realizó una revisión bibliográfica de análisis transcriptómicos anteriores realizados en macrófagos infectados con *Map*. De esta manera se seleccionaron un panel de genes (IL1- α , IL-2, IL-6, MMP3-1, TIMP-1, IL-10, TGF β -1, TNF- α , BCL2-1, IFN- γ) cuya expresión se había demostrado que estaba alterada tras una infección con cepas de *Map* de origen bovino (Abendaño y col., 2013b). Los primers se diseñaron empleando el software Primer Express 3.0 de acuerdo a las secuencias publicadas en el GenBank para cada uno de los genes seleccionados. Los primers diseñados presentaban el mismo contenido en GC y la misma Tm. Empleando cDNA de células sin infectar como molde, se estimó mediante qPCR a tiempo real la concentración óptima (50, 100 o 200 nM) de cada par de primers que propiciaba una menor Ct y mínimo ΔRn . También se realizaron reacciones de qPCR en las que no se añadió molde y que permitieron verificar

que los primers seleccionados no formaban primer-dimers entre ellos y asegurar así la especificidad de la amplificación. Todos los primers presentaron la misma eficiencia de amplificación ($\geq 90\%$) y fueron capaces de amplificar por PCR a la misma temperatura de alineamiento ($60\text{ }^{\circ}\text{C}$) amplicones con un tamaño de entre 100-250 pb. Como genes endógenos control se utilizaron los genes constitutivos B-actina o gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) que permitieron normalizar los resultados obtenidos. En las Tabla XXXIV y XXXV se muestran los primers seleccionados.

Tabla XXXIV. Genes bovinos seleccionados, primers correspondientes utilizados en las reacciones de qRT-PCR y concentración óptima para cada gen.

Código Secuencia GenBank	Nombre	Abreviatura	Código cebador / secuencia (5'-3')	Concentración (nM)
AAA30583	Interleukina 1-alpha	IL1- α	1F/CAGTTGCCCATCCAAAGTTGTT 2R/TGCCATGTGCACCAATTTTT	200
ABX72069	Interleukina 6	IL-6	5F/GCTGCTCCTGGTGATGACTTC 6R/GGGTGGTGTGTCATTTTTGAAATCTT	100
XP_586521	Matriz metallopeptidasa 3	MMP3-1	15F/TGATGTGCGACGGCATTTCAGT 16R/GGGCACCACAGGGTCATTAG	200
NP_776896	Metallopeptidasa inhibidor 1	TIMP-1	17F/ATGCTGCTGGTTGTGAGGAAT 18R/TGTCGCTCTGCAGTTTGCA	200
ABX72072	Interleukina 10	IL-10	25F/CTTGTCGGAAATGATCCAGTTTT 26R/TCAGGCCCGTGGTTCTCA	200
XP_592497	Factor transformador de crecimiento, beta 1	TGF β -1	27F/TGAGCCAGAGGCGGACTACT 28R/TGCCGTATTCCACCATAGCA	200
NP_776391	Factor de necrosis tumoral, miembro 2	TNF α -2	29F/CGCATTGCAGTCTCCTACCA 30R/GGGCTCTTGATGGCAGACA	100
NP_776511	Interferon gamma	IFN- γ	33F/GGTCATTCAAAGGAGCATGGA 34R/GCTGCCATTCAAGAACTTCTGA	100
NP01070954	Proteína mitocondrial	BCL2-1	41F/CACCCCAGGGACAGCATA 42R/CGTCCCAGGAGGTTTCATTC	100
AAM98378	Beta-actina	β -actina	43F/ATGCTTCTAGGCGGACTGTAG 44R/ACAAATAAAGCCATGCCAATCT	200

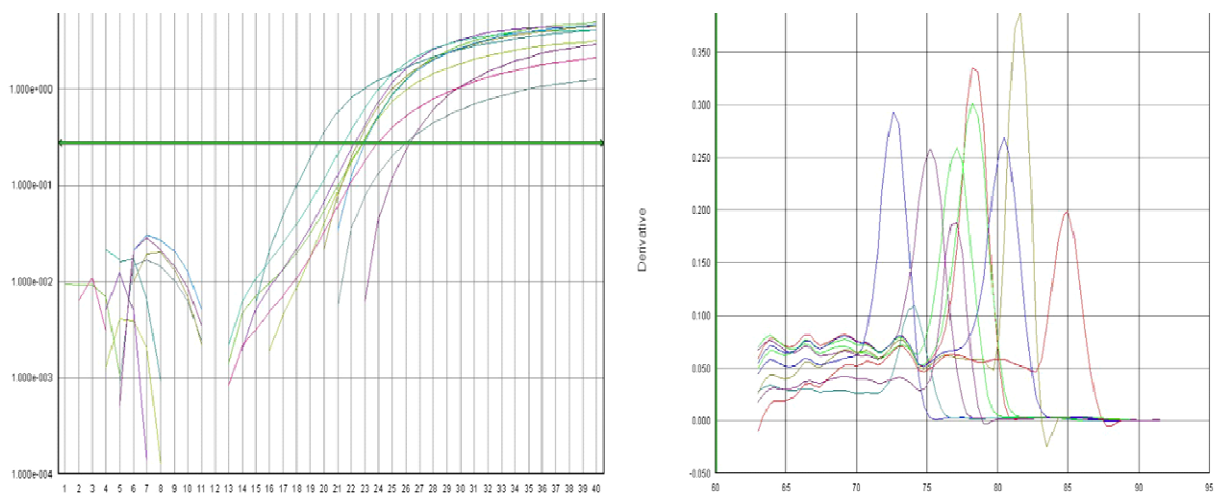


Figura 22. Curvas de amplificación y curvas de disociación de los genes bovinos seleccionados.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

Tabla XXXV. Genes ovinos seleccionados, primers correspondientes utilizados en las reacciones de qRT-PCR y concentración óptima para cada gen.

Código Secuencia GenBank	Nombre	Abreviatura	Código cebador / secuencia (5'-3')	Concentración (nM)
NM001009806.1	Interleukina 2	IL-2	169F/ACAACCCTTGTCTTGCATTGC 170R/CTTGAAGTAGGTGCACCGTTTG	200
NM001009319.2	Metallopeptidasa inhibidor 1	TIMP-1	173F/TGCTCATCTATCCCCTGCAAA 174R/TGGTCCGTCCACAAGCAA	200
NM001009327.1	Interleukina 10	IL-10	191F/TTCTTTCAAATGAAGGACCAACTG 192R/CCCTTAAAGTCATCCAGCAGAGA	200
X55152.1	Factor de necrosis tumoral, miembro 2	TNF α - 2	177F/CCATCAGCCGCATTGCA 178R/TTGATGGCAGAGAGGATGTTGA	200
NM001009226.1	Proteína mitocondrial	BCL2-1	181F/GGGCACTGTGCGTGGAA 182R/TGCGATCCGACTCACCAATA	200
NM_001009400.1	Factor transformador de crecimiento, beta 1	TGF β -1	179F/AAGCGGAAGGGCATCGA 180R/CGAGCCGAAGTTTGGACAAA	200
AF030943.1	Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa	GAPDH	187F/TGCCGCCTGGAGAAACC 188R/CGCCTGCTTACCACCTT	200

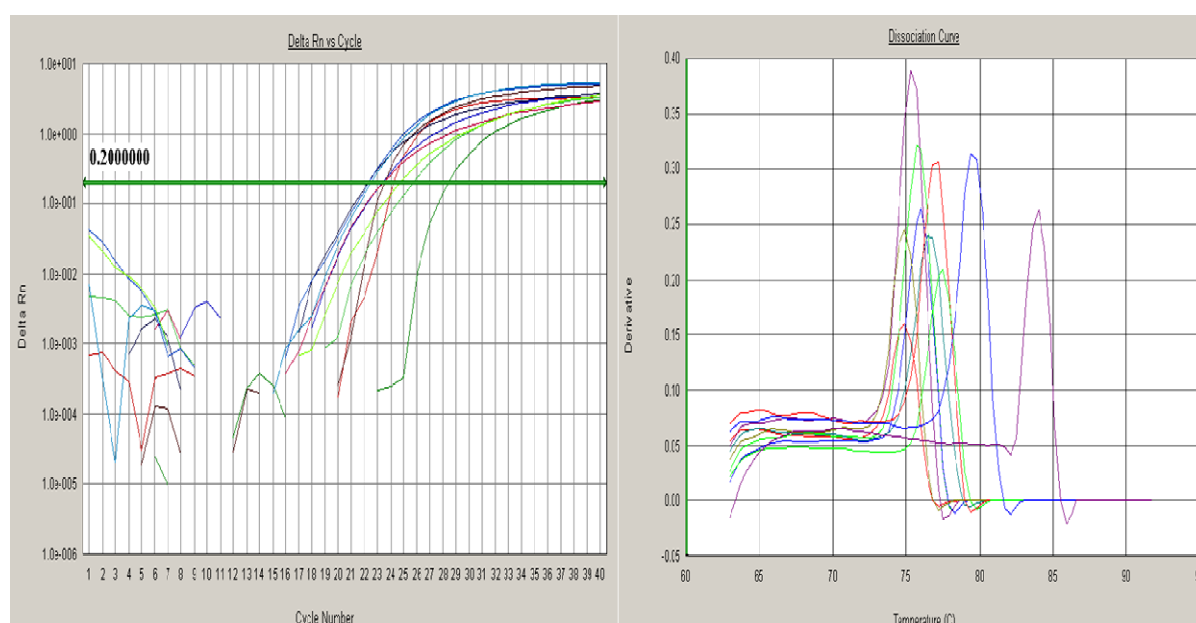


Figura 23. Curvas de amplificación y curvas de disociación de los genes ovinos seleccionados.

Para el análisis transcriptómico, las células BoMac se infectaron con dos cepas de *Map* (Bovino-C y Ovino-S) que habían demostrado claras diferencias en cuanto a su capacidad para multiplicarse y sobrevivir en su interior. En el caso de los MDMs ovinos, dos cepas de Tipo C aisladas de bovino y ovino fueron seleccionadas para el análisis de expresión génica. El mismo experimento se realizó por separado con dos cepas ovinas de distinto genotipo (C y S) con el objetivo de evaluar si el genotipo de la bacteria podría influir significativamente en la respuesta inmune inducida en MDMs ovinos infectados. Las infecciones se realizaron de la misma manera a la descrita en el apartado IV.6. Como control se utilizaron células no infectadas.

A las 4, 14 y 24 h p.i., las células BoMac infectadas se lavaron con 0.5 ml de HBSS y el RNA total se extrajo empleando Trizol de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Life Technologies, Carlsbad, Estados Unidos). El RNA extraído se trató con Turbo DNase I (Life Technologies) durante 20 min a 37 °C para eliminar el DNA genómico y se transcribió a cDNA empleando el kit SuperScript VILO cDNA synthesis siguiendo las instrucciones del fabricante (Life Technologies). Las reacciones de PCR cuantitativo se llevaron a cabo empleando el SYBR® GreenER qPCR SuperMix Universal (Life Technologies) empleando 1 µl de cDNA como molde y la concentración óptima previamente determinada para cada par de primers. Para el caso de los MDMs ovinos, la extracción de RNA, síntesis de cDNA y qRT-PCR se realizó empleando el kit Power SYBR® Green Cells-to-Ct siguiendo las instrucciones del fabricante (Life Technologies).

Las amplificaciones de cDNA mediante qPCR se llevaron a cabo en todos los casos en el termociclador ABI Prism 7500 (Applied Biosystem) empleando las siguientes condiciones: 1 ciclo de 95 °C durante 10 min, 40 ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 15 s, hibridación a 60 °C durante 60 s, y una curva de disociación para medir la especificidad de la amplificación.

Para determinar la expresión relativa (Relative quantification; RQ) de cada gen, se utilizó la siguiente fórmula: $RQ=2^{-\Delta(\Delta CT)}$, donde ΔCT es la resta entre el CT del gen diana y el CT del gen endógeno y $\Delta(\Delta CT)$ es la resta entre el ΔCT de la muestra experimental y el ΔCT de la muestra control sin infectar. Los resultados se expresaron como cuantificaciones relativas de transcripción en comparación con los de las células no infectadas.

La producción de citoquinas a las 4, 14 y 24 h p.i. se comparó con el procedimiento GLM del SAS (SAS version 9, SAS Institute Inc). En el análisis, el origen de las cepas (bovino, ovino) y el tiempo p.i. (4, 14 y 24 h p.i.) fueron las variables independientes. Las diferencias se consideraron significativas cuando el valor de $P < 0.05$.

IV.9. Generación de modelos tridimensionales de granuloma *in vitro*

IV.9.1. Generación de microgranulomas bovinos y ovinos *in vitro*

Para la generación de microgranulomas *in vitro*, PBMCs bovinos y ovinos purificados por gradiente de Ficoll, tal y como se ha explicado en el apartado IV.5., se sembraron sobre una matriz extracelular de colágeno y fibronectina. Esta matriz se preparó mezclando: 0,8 ml de 3 mg/ml de colágeno Purecoll (Nutacon BV, Leimuden, Países Bajos), 0,1 ml de 10 X buffer fosfato salino de Dulbecco (DPBS) (Lonza) y 4 ml de 1 mg/ml de fibronectina humana (BD Biosciences). El pH de la matriz se ajustó a 7.2-7.6 usando 0.1 M de NaOH estéril (Sigma-Aldrich). El volumen final de la solución se ajustó a 1 ml con agua estéril. Para evitar la gelificación, la temperatura de la mezcla se mantuvo a 4 °C. A continuación, 5×10^5 de PBMCs, preparados tal y como se describe en el apartado IV.5., se sembraron en pocillos de placas de 96 pocillos encima de 50 μ l de matriz extracelular. A continuación, las PBMCs se infectaron por separado con la cepa bovina de referencia K-10 o con la cepa ovina de Tipo S a tres MOIs (bacteria:células) (1:8, 1:16 y 1:33) y se incubaron durante 2 horas a 37 °C en una estufa a 5 % de CO₂. Finalmente el volumen en cada pocillo se ajustó a 200 μ l con RPMI-1640 suplementado con 20 % de suero fetal y las muestras se incubaron a 37 °C en una estufa de 5 % CO₂ durante 10 días. La agregación celular se observó a los 5 y 10 días p.i. en un microscopio invertido de contraste de fase (Olympus IX81) equipado con una cámara digital Nikon DS-Fi1. Las imágenes se editaron utilizando el Software Fiji/Imagen J (v 1.48). Los agregados generados *in vitro* se cuantificaron a los 5 y 10 días p.i.. En la Figura 24 se muestra una fotografía al microscopio invertido de contraste de fases de microgranulomas generados tras la infección de PBMCs ovinos con *Map*.



Figura 24. Fotografía al microscopio invertido de contraste de fases de microgranulomas generados tras la infección de PBMCs ovinos con *Map* (20 X).

IV.9.2. Análisis histológico de los agregados celulares

Los agregados celulares se recogieron a los 10 días p.i. para realizar histología. Para ello, el medio se retiró cuidadosamente de cada pocillo y se reemplazó con 0.2 ml de formalina tamponada al 10 %. Las placas se incubaron toda la noche en estufa a 37 °C. Al día siguiente, la formalina se retiró y se añadió a cada pocillo 0.2 ml de hematoxilina diluida con PBS (1:1) a cada pocillo. Pasados 10 minutos de incubación a temperatura ambiente, se retiró la tinción y se añadió 0.2 ml de agarosa LE-2 (Lonza, España) al 2 % previamente calentada a 42-45 °C. La placa se incubó 15 minutos a 4 °C para permitir que se solidificara la agarosa. Los bloques de agarosa que contenían los agregados celulares fueron retirados de cada pocillo y se almacenaron en placas de seis pocillos con etanol al 70 % antes de su procesamiento histológico. Para ello, se añadió una gota de eosina a los bloques de agarosa que contenían los agregados celulares. Cada bloque de agarosa se envolvió en papel, se colocó en un cassette y se procesó en un procesador de tejidos Shandon Citadel 2000 (Fisher Scientific Company, Pittsburgh, Estados Unidos) durante 17 h. Cada bloque de agarosa se incluyó en parafina, se cortó en secciones de 4 µm con el microtomo LEICA RM 2035 (Leica Microsystems, Barcelona, España) y por último, los cortes se tiñeron con hematoxilina-eosina (HE) y con ZN. Finalmente, los agregados celulares se observaron en un microscopio Olympus BX51 equipado con una cámara digital Olympus U-CMAD3.

El número de granulomas generados *in vitro* se comparó mediante un test ANOVA con el posterior análisis de comparación múltiple de Tukey Kramer (GraphPad Software). Las diferencias se consideraron significativas cuando el valor de $P < 0.05$.

IV.10. Selección positiva de monocitos CD14 + de rumiantes

IV.10.1. Selección positiva de monocitos CD14 + de rumiantes a partir de PBMCs

Para el enriquecimiento de monocitos CD14 + de bovino, ovino y caprino se emplearon nanopartículas magnéticas funcionalizadas con un anticuerpo monoclonal anti-CD14 humano (mAb) en combinación con la tecnología MACS (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania). Para ello, las PBMCs se purificaron a partir de sangre heparinizada (50 ml) de una cabra de raza Azpigorri, de una oveja de raza Latxa y de una vaca de raza Holstein

mediante un gradiente de densidad de Ficoll-Paque ($1,084 \text{ g/cm}^3$) (GE HealthCare Bio-Sciences) como se ha descrito anteriormente (Apartado IV.5.). Para el enriquecimiento de los monocitos CD14 +, una suspensión de las PBMCs de cada especie animal (2×10^7) se incubó con 40 μl de MicroBeads magnéticas unidas a un mAb anti-CD14 humano (ClonTUK4, Miltenyi Biotec) durante 15 minutos a 4 °C. Tras el marcaje magnético, las células se lavaron con 4 ml de tampón MACS (PBS 0.5 % de FCS) y se centrifugaron a 300 X g durante 10 minutos. El sobrenadante se aspiró completamente y el pellet celular se resuspendió en 500 μl de tampón MACS. La suspensión celular resultante se transfirió a columnas magnéticas MS colocadas en un imán magnético (Separador MiniMACS, Miltenyi Biotec). La columna se lavó 3 veces con el tampón MACS. Después se retiró la columna del campo magnético, se añadió 1ml de tampón MACS a la columna y las células CD14 + magnéticamente retenidas se eluyeron presionando firmemente un émbolo sobre la columna. En la Figura 25 se muestra un esquema de la separación inmunomagnética utilizando la tecnología MACS.

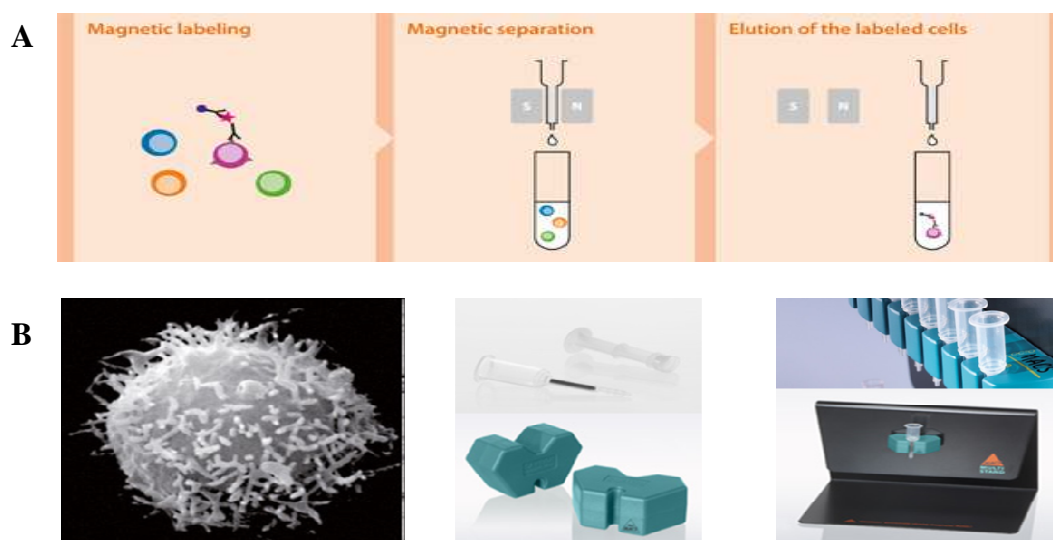


Figura 25. (A) Esquema de la separación inmunomagnética utilizando la tecnología MACS. (B) MicroBeads magnéticas, columnas MS, imán y separador MiniMACS.

IV.10.2. Selección positiva de monocitos CD14+ de rumiantes a partir de sangre periférica

Para la purificación de monocitos CD14 + a partir de sangre entera se utilizaron las MicroBeads "Whole Blood CD14" y las columnas magnéticas "Whole Blood" siguiendo las instrucciones del fabricante (Miltenyi Biotec). A 15 ml de sangre de una oveja Latxa recogida en tubos Vacutainer heparinizados se añadieron 750 μl de Whole Blood CD14 MicroBeads unidas a un mAb anti-CD14 humano (Clon TUK4, Miltenyi Biotec). La mezcla de sangre y

MicroBeads se incubó durante 15 minutos a 4 °C. A continuación, las células marcadas con las MicroBeads se lavaron con 10 ml de tampón MACS y se centrifugaron a 445 X g durante 10 minutos. El sobrenadante fue aspirado completamente y el pellet celular se resuspendió en 15 ml de tampón MACS. La suspensión celular resultante se añadió a las columnas colocadas sobre un imán magnético (Miltenyi Biotec). Las columnas se lavaron 3 veces con tampón MACS para separar las células sin marcar de las marcadas que quedan retenidas en la columna. Después la columna se separó del campo magnético, se añadieron 5 ml de tampón MACS a la columna y las células CD14 + magnéticamente retenidas se eluyeron presionando firmemente un émbolo sobre la columna.

IV.10.3. Análisis por citometría de flujo de la pureza de monocitos CD14 + purificados empleando la tecnología MACS

Para determinar el grado de pureza de los monocitos CD14 + en cada etapa de la purificación se analizaron por citometría de flujo las siguientes fracciones celulares: 1- la fracción de PBMCs recogida tras realizar el gradiente con el Ficoll (fracción Post-Ficoll), 2- la fracción de PBMCs marcada con las MicroBeads (fracción original), 3- la fracción de PBMCs incubada con las CD14 + MicroBeads y purificada por las columnas (fracción positiva) y 4- la fracción celular que se obtuvo en los lavados de la columna (fracción negativa). Alícuotas de 50 µl cada una de las fracciones celulares (Post-Ficoll, Original, Negativa y Positiva) se incubaron con 10 µl de una dilución 1:11 de un mAb anti-CD14 humano (Clon TUK4, Miltenyi Biotec) conjugado con ficoeritrina durante 5 min en oscuridad a 4 °C. Las fracciones marcadas se lavaron con 2 ml de tampón MACS y se centrifugaron a 300 X g. Los pellets resultantes se resuspendieron en 300 µl de tampón MACS y se analizaron por citometría de flujo. Para distinguir la especificidad de la unión del mAb monoclonal anti-CD14 a las CD14 MicroBeads, una alícuota de la fracción celular original (50 µl) se tiñó a 4 °C durante 10 min con 10 µl de una dilución 1:11 de un anticuerpo control de isotipo IgG2a de ratón conjugado a PE. Este anticuerpo (clone S43.10) es específico del hapteno 4-hydroxy-3-nitro-phenyl acetyl y no se expresa en ningún tipo celular. Las fracciones celulares obtenidas a partir de sangre caprina se analizaron en un citómetro MACSQuant FACSCAN con el Software MACSQuantify (Miltenyi Biotec). Para el análisis de las fracciones celulares de ovino y bovino se utilizó el citómetro Beckman Coulter y el Software Gallios 1.2. Se seleccionó un área observacional alrededor de los monocitos identificados por su tamaño eliminando a las células muertas del análisis. A continuación, se

calculó el porcentaje de células fluorescentes en la población celular seleccionada a la que se substrajo la autofluorescencia de las células que no se tiñeron con el anticuerpo monoclonal.

IV.10.4. Funcionalidad de los monocitos CD14 + purificados con la tecnología MACS

La funcionalidad de los monocitos CD14 + purificados con la tecnología MACS se estimó midiendo su capacidad para fagocitar *M. bovis* o *Map*. Para ello, monocitos CD14 + bovinos y caprinos purificados con la tecnología MACS a partir de PBMCs de diversos donantes sanos se sembraron en placas de 24 pocillos a una densidad de 4×10^5 y 4×10^4 células/ml, respectivamente. El medio de cultivo empleado fue RPMI-1640 suplementado con 20 mM de L-glutamina, 10 % de suero fetal bovino inactivado, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina. Después de 2 horas a 37 °C en estufa de CO₂, las células no adherentes se eliminaron al lavar cada pocillo con HBSS. Las células adherentes se incubaron en RPMI-1640 suplementado a 37 °C para permitir su diferenciación a MDMs. Los MDMs bovinos y caprinos se infectaron por triplicado con un asilado de campo de *M. bovis* (Neiker 1403, espoligotipo SB0339) o con un aislado de cabra de *Map* (Neiker 711; Genotipo C), respectivamente a una MOI de 10:1 (bacteria:célula), tal y como se describe en el apartado IV.6. La cuantificación de la carga bacteriana del inóculo y en el interior de los macrófagos al de 2 h p.i. se cuantificó utilizando el sistema BACTEC MGIT 960 tal y como se explica en el apartado IV.7.

La comparación de las UFCs presentes en los MDMs a las 2 h de la infección, se llevó a cabo generando un GLM con el paquete estadístico SAS versión 9 (SAS Institute Inc). En primer lugar, la especie micobacteriana (*M. bovis* y *Map*) y la especie animal donante (bovino y caprino) se consideraron como las variables principales. Una vez demostrado que ninguna de estas dos variables afectaba al número de UFCs presentes en las células infectadas a las 2 h p.i., se paso a comparar las UFCs presentes en los MDMs purificados de cada animal incluido en el análisis de manera individual. Las diferencias se consideraron significativas cuando el valor de $P < 0.05$.

IV.11. Análisis estadístico

En la Tabla XXXVI se muestra un resumen de de los test estadísticos utilizados en esta tesis doctoral.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

Tabla XXXVI. Resumen de los test estadísticos utilizados.

Objetivo	Muestras	Test	Software
Generación de las curvas patrón para la cuantificación de los distintos aislados de <i>Map</i> en el sistema BACTC MGIT 960.	- Cepas de <i>Map</i>	Análisis de regresión no lineal	GraphPad Prism 6 GraphPad Software
Correlación entre número de copias DNA estimado por qRT-PCR y UFCs estimadas en el BACTEC-MGIT para cada aislado de <i>Map</i> .	- Cepas de <i>Map</i>	Análisis de correlación lineal Test t Student	GraphPad Prism 5 GraphPad Software
Clasificación de los distintos aislados de <i>Map</i> de acuerdo a su crecimiento en el sistema BACTEC MGIT 960.	- Cepas de <i>Map</i>	ANOVA + Agrupamiento Duncan	SAS versión 9
UFCs en los inóculos y a las 2 h y 7 días p.i.	- MDMs bovinos infectados con los distintos aislados de <i>Map</i> . - MDM ovinos infectados con distintos aislados de <i>Map</i> . - Células BoMac	GLM	SAS versión 9
Porcentajes de entrada de los aislado <i>Map</i> en macrófagos	- Células BoMac infectadas con los distintos aislados de <i>Map</i> . - MDMs bovinos infectadas con los distintos aislados de <i>Map</i> . - MDMs ovinos infectadas con los distintos aislados de <i>Map</i> .	Fisher	GraphPad Software
Producción de citoquinas	- Células BoMac - MDMs Ovinos	GLM	SAS versión 9
Número de granulomas generados	- PBMCs bovinos - PBMCs ovinos	ANOVA + Tukey Kramer	GraphPad Software
UFCs en los inóculos y a las 2 h tecnología MACS	- MDMs bovinos purificados con la tecnología MACS e infectados con <i>M. bovis</i> y <i>Map</i> . - MDMs caprinos	GLM	SAS versión 9

V. RESUMEN

V. RESUMEN

Map es el agente causal de la paratuberculosis en una gran variedad de rumiantes domésticos y silvestres. Una vez que *Map* entra en el hospedador, generalmente a través de la vía fecal-oral, atraviesa el epitelio intestinal para ser posteriormente fagocitado por los macrófagos subepiteliales. Generalmente, los macrófagos responden frente al ataque de cualquier microorganismo induciendo una respuesta inmune dirigida a su eliminación. Sin embargo, las cepas virulentas de *Map* han desarrollado ciertas estrategias que les permiten evadir la respuesta inmune del hospedador y sobrevivir intracelularmente. La interacción *Map*-macrófagos del hospedador que se produce en los estadios iniciales de la infección es un indicador de la virulencia de *Map* y determina el riesgo de progresión de la enfermedad. El objetivo general de esta tesis doctoral es el de comparar la interacción de aislados de *Map* procedentes de rumiantes domésticos y silvestres y con distintos genotipos con macrófagos bovinos y ovinos, al ser éstas las dos especies animales en las que la paratuberculosis causa mayores pérdidas económicas. Este análisis permitirá determinar la virulencia, patogenicidad y adaptación a un determinado hospedador de distintos aislados de *Map* y sentará las bases para tratar de mejorar las estrategias de manejo y control de la paratuberculosis en granjas donde el ganado doméstico comparte pastos con animales silvestres potencialmente infectados con *Map*.

Con objeto de determinar diferencias en la virulencia en los primeros estadios de la infección, se comparó la entrada, multiplicación y supervivencia de 11 aislados de *Map* de diversos genotipos (C, S y B) y procedentes de distintas localizaciones geográficas y hospedadores (bovino, ovino, caprino, jabalí, bisonte, ciervo y gamo) en modelos de infección *in vitro* bovinos y ovinos. Así mismo, se analizó la respuesta de los macrófagos a la infección con los aislados de *Map* seleccionados mediante el análisis de los perfiles de expresión de determinadas citoquinas y proteínas implicadas en apoptosis y destrucción tisular. Ambos parámetros, capacidad de supervivencia de los distintos aislados de *Map* y respuesta de los macrófagos a la infección, se correlacionaron con objeto de determinar la virulencia de cada aislado en los hospedadores bovino y ovino. Así mismo, y con el fin de comparar la virulencia de diversos aislados de *Map* en estadios más avanzados de la infección se determinó su capacidad para generar microgranulomas en condiciones *in vitro*. Por último y con objeto de adaptar los modelos de macrófagos desarrollados en este tesis doctoral a otros objetivos,

como por ejemplo para su utilización en la evaluación de actividad fagocítica inducida por prototipos vacunales, se desarrolló un método inmunomagnético de enriquecimiento de monocitos CD14 + de bovino, ovino y caprino utilizando nanopartículas magnéticas funcionalizadas con un anticuerpo monoclonal anti-CD14 humano en combinación con la tecnología MACS.

V. PUBLICACIONES

VI. PUBLICACIONES

Los resultados obtenidos en esta tesis doctoral han dado lugar a cinco publicaciones científicas:

En la PUBLICACION I el sistema BACTEC MGIT 960 se adaptó para cuantificar la carga bacteriana en el interior de los macrófagos infectados a distintos tiempos p.i. y poder evaluar así la capacidad de aislados de *Map* de diversos hospedadores y de distintos genotipos, para entrar, sobrevivir y multiplicarse en el interior de macrófagos bovinos y ovinos.

En la PUBLICACIÓN II resumimos los estudios transcriptómicos realizados previamente en macrófagos bovinos y humanos infectados *in vitro* con *Map*. Esta revisión bibliográfica permitió determinar cuáles eran las citoquinas y proteínas implicadas en apoptosis y destrucción tisular que podrían utilizarse como marcadores de infección y los tiempos p.i. óptimos para su cuantificación transcriptómica.

En las PUBLICACIÓN III se analizó por un lado la entrada, la multiplicación y la supervivencia de los 11 aislados de *Map* en macrófagos bovinos. Por otro lado, se analizaron los perfiles de expresión de los marcadores de infección seleccionados en la Publicación II en macrófagos bovinos infectados con diversos aislados/genotipos de *Map*. Ambos parámetros, capacidad de supervivencia de los aislados de *Map* y respuesta de los macrófagos a la infección, se correlacionaron para poder determinar así la capacidad de cada aislado de *Map* para iniciar una infección productiva en los macrófagos infectados.

En la PUBLICACIÓN IV resumimos las condiciones de cultivo utilizadas previamente para la generación de granulomas humanos *in vitro* tras una infección con *M. tuberculosis*, *M. bovis* y *M. leprae*. Esta revisión bibliográfica permitió establecer las condiciones de cultivo e infección que podrían resultar también en la formación de granulomas bovinos y ovinos tras una infección con *Map* en condiciones *in vitro*.

En la PUBLICACIÓN V se analizó por un lado, la entrada, multiplicación y supervivencia de diversos aislados de *Map* en macrófagos ovinos. Por otro lado, se analizaron

los perfiles de expresión de citoquinas y proteínas implicadas en apoptosis y destrucción tisular en macrófagos ovinos infectados con los aislados de *Map* seleccionados. Por último, se evaluó la capacidad de los distintos aislados de *Map* para inducir la formación de granulomas ovinos en condiciones *in vitro*. De esta manera se determinó que aislados/genotipos de *Map* serían capaz no solo de iniciar sino también de establecer una infección productiva en el hospedador ovino.

Los resultados obtenidos en esta tesis doctoral han dado lugar a un manuscrito científico que se encuentra en este momento en fase de revisión pero que también se ha incluido en el compendio de publicaciones:

En la PUBLICACIÓN VI de esta tesis doctoral, se describe un método de purificación selectiva de monocitos de rumiantes con un alto grado de pureza empleando la tecnología de selección celular magnética MACS. Los monocitos purificados con esta tecnología son completamente funcionales en términos de capacidad fagocítica y producción de citoquinas y proporcionan una excelente plataforma para la evaluación de la eficacia de prototipos vacunales.

Los resultados obtenidos en esta tesis doctoral han dado lugar a dos manuscritos que se encuentran en este momento en fase de preparación y que aunque no se incluyen en el compendio de publicaciones si se discuten en el apartado de discusión general de esta tesis doctoral:

PUBLICACION VII. “*Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* fatty acid composition might determine its interaction with bovine macrophages and influence the intracellular survival of the bacillus”. Alonso-Hearn M, Abendaño N, Rubirar A, Aznar R, Juste RA. En esta publicación se comparó la composición de ácidos grasos de dos aislados de *Map* de origen bovino (genotipo C) y ovino (genotipo S) que habían demostrado previamente distinta capacidad para sobrevivir en macrófagos bovinos y que habían inducido expresión diferencial de citoquinas y de proteínas implicadas en apoptosis y destrucción tisular (Publicación III). La composición de ácidos grasos de ambos aislados fue diferente en condiciones extracelulares observándose diferencias significativas en el contenido del ácido tuberculoestérico, oleico y palmítico entre ambos aislados. Estos tres ácidos grasos son componentes importantes de la envuelta de *Map* y son los encargados de unir el componente

manosilado del lipoarabinomanano (Man-LAM) a la envuelta de *Map*. Diferencias en la composición de estos ácidos grasos podrían afectar a la conformación del Man-LAM de la envuelta de cada aislado de *Map* y afectar a su reconocimiento por los receptores de manosa de los macrófagos; y podrían consecuentemente explicar las diferencias observadas en cuanto a la capacidad de ambas cepas para sobrevivir en el interior de macrófagos bovinos.

PUBLICACION VIII. “Enhanced early mycobacterial clearing by macrophages from sensitized cattle suggests that trained innate immunity may be critical for the control of tuberculosis progression”. Juste RA, Alonso-Hearn M, Garrido JM, Abendaño N, Sevilla IA, Gortazar C, de la Fuente J, Dominguez L. En esta publicación, macrófagos purificados de sangre periférica de terneras sin vacunar y vacunadas por vía parenteral con una vacuna inactivada frente a *M. bovis* se purificaron con la tecnología MACS e infectaron *ex vivo* con *Map*. Los resultados demostraron diferencias significativas en cuanto a la capacidad de los macrófagos procedentes de animales vacunados y sin vacunar para fagocitar *Map* y demostraron la utilidad de los modelos de MDMs desarrollados en esta tesis doctoral para evaluar la eficacia vacunal.

PUBLICACIÓN I

**Quantification of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* Strains
Representing Distinct Genotypes and Isolated from Domestic and Wildlife
Animal Species by Use of an Automatic Liquid Culture System.**

Abendaño N, Sevilla I, Prieto JM, Garrido JM, Juste RA, Alonso-Hearn M.

Journal of Clinical Microbiology, 50(8):2609-2617.

Quantification of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* Strains Representing Distinct Genotypes and Isolated from Domestic and Wildlife Animal Species by Use of an Automatic Liquid Culture System

Nalara Abendaño,^a Iker Sevilla,^a José M. Prieto,^b Joseba M. Garrido,^a Ramon A. Juste,^a and Marta Alonso-Hearn^a

Department of Animal Health, NEIKER-Tecnalia, Basque Institute for Agricultural Research and Development, Barreaga 1, Derio Bizkaia, Spain,^a and Serida, Department of Agriculture of the Regional Government of the Principality of Asturias, Grado, Asturias, Spain^b

Quantification of 11 clinical strains of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolated from domestic (cattle, sheep, and goat) and wildlife (fallow deer, deer, wild boar, and bison) animal species in an automatic liquid culture system (Bactec MGIT 960) was accomplished. The strains were previously isolated and typed using IS1311 PCR followed by restriction endonuclease analysis (PCR-REA) into type C, S, or B. A strain-specific quantification curve was generated for each *M. avium* subsp. *paratuberculosis* strain by relating the time to detection in the liquid culture system to the estimated log₁₀ CFU in each inoculum. According to their growth curves, the tested *M. avium* subsp. *paratuberculosis* strains were classified into two distinct groups. The first group included the S-type strain isolated from goat and all the sheep strains with C, S, and B genotypes. A second group contained the C- and B-type strains isolated from cattle, goat, and wildlife animals with the exception of the fallow deer strain. The strains isolated from cattle or sheep showed similar strain-specific standard curves irrespective of their genotype. In contrast, the strains isolated from goat or from wildlife animal species varied in their rates of growth in liquid culture. Universal-standard curves and algorithms for the quantification of each group of strains were generated. In addition, the liquid culture system was compared with a real-time quantitative PCR system for the quantification of the 11 *M. avium* subsp. *paratuberculosis* strains. Correlations between the estimated log₁₀ CFU and *M. avium* subsp. *paratuberculosis* DNA copy numbers were very high for all the tested strains ($R \geq 0.9$).

Mycobacterium avium subsp. *paratuberculosis* is the causative agent of paratuberculosis in domestic and wildlife animals, including cattle, sheep, goat, deer, bison, wild boar, and other ruminant and nonruminant animal species. *M. avium* subsp. *paratuberculosis* may also have human health significance as a possible cause of Crohn's disease in humans (6). Molecular typing techniques, such as PCR followed by restriction endonuclease analysis (PCR-REA), pulsed-field gel electrophoresis (PFGE), multilocus short sequence repeat (MLSSR), and variable-number tandem repeats (VNTR), have been used to allow a profound genetic discrimination between *M. avium* subsp. *paratuberculosis* strains (5, 17, 37, 38). Broadly speaking, *M. avium* subsp. *paratuberculosis* strains can be classified into two host-associated types based on culture characteristics and on genome analysis: sheep strains (also called "S type" or "type I") and cattle strains (also called "C type" or "type II") (7, 42). A subtype of type I strains was designated "intermediate" or "type III" (7, 10). The type III strains are highly similar genetically to and difficult to distinguish from type I strains. Single nucleotide polymorphism analysis in the IS1311 insertion sequence distinguishes three types of strains: S, C, and B (45). It is important to point out that single nucleotide polymorphism analysis of the IS1311 sequence cannot distinguish between types I and III. The culture of S-type strains has been historically more difficult, with very low isolation rates on the solid media routinely used for culture of C-type strains (20). In 2005, the complete, annotated genome sequence of the bovine isolate K10 was published (22). Since then, the genomes of multiple isolates of *M. avium* subsp. *paratuberculosis* of different provenance have been subjected to whole-genome sequencing (44).

Preliminary results suggest that the human isolates are essentially identical to the bovine isolate K10, while the sheep isolates contain some large sequence deletions, three of which had been previously described (25, 26, 32, 35, 40, 47). Recently, the genomes of three U.S. sheep isolates of *M. avium* subsp. *paratuberculosis* have been sequenced, and a novel deletion comprising the open reading frames (ORFs) MAP1432 through MAP1438c (partial) was identified as absent from the ovine isolates (4). Although the classification of strains into C, S, or B types may reflect a host preference, multiple strains of *M. avium* subsp. *paratuberculosis* can cross the species barriers and be isolated from a broad range of animal species (28, 29, 41). While the diverse *M. avium* subsp. *paratuberculosis* strains use a similar mechanism of infection, invasion and survival efficiency of *M. avium* subsp. *paratuberculosis* within the host cells appears to differ with respect to the *M. avium* subsp. *paratuberculosis* genotype (14, 18, 21). A deeper understanding of the pathogenesis of *M. avium* subsp. *paratuberculosis* requires first the development of precise methods that allow for the quantification of viable *M. avium* subsp. *paratuberculosis* cells inside the host.

Received 27 February 2012 Returned for modification 28 March 2012

Accepted 20 May 2012

Published ahead of print 30 May 2012

Address correspondence to Marta Alonso-Hearn, m.alonso@neiker.net.

Copyright © 2012, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/JCM.00441-12

TABLE 1 *M. avium* subsp. *paratuberculosis* strains used in this study

Strain code	Region/country	Species of origin	IS1311 PCR-REA type	PFGE profile
K10	United States	Cattle	C	1-1
6	Cantabria/Spain	Cattle	C	52-1
P38I	Aragon/Spain	Sheep	C	2-1
2349/06 1	Portugal	Sheep	S	
354	India	Sheep	B	60-1
711	Bizkaia/Spain	Goat	C	7-1
311	Menorca/Spain	Goat	S	16-47
855	Toledo/Spain	Deer	C	68-1
622/07	Asturias/Spain	Fallow deer	C	
681	Toledo/Spain	Wild boar	C	2-1
6.1	United States	Bison	B	2-1

Although cultivation of mycobacteria on a solid medium such as Lowenstein Jensen or Middlebrook agar is relatively straightforward, it is insensitive and may take several weeks. Culture techniques that use liquid medium, such as the nonradiometric Bactec Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT) 960 system, are able to detect mycobacteria within a considerably shorter time (33). In addition, the Bactec MGIT 960 system allows for good growth of most mycobacterial species (43). MGITs have been successfully used for the detection and culture of *M. avium* subsp. *paratuberculosis* from animal tissues (8, 11), milk (15), and breast milk and gut tissues of Crohn's disease patients (30, 34). The quantitative capabilities of the Bactec MGIT 960 system have been previously explored only for C-type *M. avium* subsp. *paratuberculosis* strains isolated from either cattle or humans based on the observation that generation time is proportional to inoculum size (39). The similarity of strain-specific standard curves for cattle strains was in agreement with previous evidence that cattle strains are genetically conserved. Therefore, a relevant measure of phenotypic diversity within genomically diverse *M. avium* subsp. *paratuberculosis* strains can be found in their ability to grow in liquid medium. In the present study, we generated standard curves for the quantification in a liquid culture system of strains of *M. avium* subsp. *paratuberculosis* with distinct genotypes and isolated from a diverse range of hosts, including sheep, goat, and nondomestic animal species such as deer, fallow deer, wild boar, and bison.

MATERIALS AND METHODS

***M. avium* subsp. *paratuberculosis* strains, bacterial culture, and preparation of bacterial suspensions.** Ten low-passage-number *M. avium* subsp. *paratuberculosis* strains isolated from cattle (*Bos taurus*), sheep (*Ovis aries*), goat (*Capra aegagrus hircus*), red deer (*Cervus elaphus*), fallow deer (*Dama dama*), bison (*Bison bison*), and wild boar (*Sus scrofa*) species were used in this study and are presented in Table 1. These clinical isolates were previously recovered from fecal or tissue samples of domestic or wildlife animal species and maintained as glycerol stocks at -80°C (2, 38). Most of the samples were collected in several geographic areas of Spain, but some strains isolated in India, Portugal, and the United States were also included in the study. *M. avium* subsp. *paratuberculosis* strain K10, a sequenced and laboratory-adapted isolate recovered from a clinical case of paratuberculosis, was obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA). The 11 *M. avium* subsp. *paratuberculosis* strains selected in our study were grown in T25 tissue culture flasks at $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$ for up to 3 months in 10 ml of Middlebrook 7H9 media (Difco Laboratories, Detroit, MI) supplemented with 10% (vol/vol) oleic acid-albumin-dextrose-catalase (OADC) (Becton, Dickinson and Company,

Franklin Lakes, NJ), 0.05% (wt/vol) Tween 80 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), and 2 mg liter $^{-1}$ of mycobactin J (Allice Monitor Inc., Fayette, MO). Bacterial cells were harvested by centrifugation at $2,000 \times g$ for 20 min in a Beckman Coulter Allegra X 12 centrifuge. Bacterial pellets were washed three times with sterile Hanks balanced salt solution (HBSS) and resuspended in 2 ml of HBSS, and the resultant suspension was passed 30 times through a 27-gauge needle in order to declump cells. The turbidity of the bacterial suspension was adjusted to a McFarland standard of 1 with a Densimat (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France). Only the top fraction of the suspension containing dispersed bacteria was used for the assays.

Confirmation of the presence or absence of four ORFs located in three deletions previously identified in S strains. The *M. avium* subsp. *paratuberculosis* strains included in this study were previously characterized in C, S, or B types by IS1311 PCR-REA (38). In the present study, genomic DNA extracted for each strain was tested for the presence or absence of four genes (MAP1485, MAP1487, MAP1738, and MAP2325) located in three large genomic deletions previously identified in S strains (25, 26). For genomic DNA extraction, a suspension of each strain of *M. avium* subsp. *paratuberculosis* was adjusted to a McFarland standard of 1 and centrifuged for 20 min at $2,250 \times g$, and the supernatant was discarded. Bacterial pellets were resuspended in 180 μl of lysozyme (20 mg ml $^{-1}$) (Sigma-Aldrich) in 20 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) by repeated pipetting and incubated overnight at 37°C . The next day, 20 μl of proteinase K (2 mg ml $^{-1}$) was added to each vial and the resultant lysates were incubated at 56°C for 3 h and for a further 15 min at 95°C to inactivate proteinase K. After the addition of 200 μl of ethanol, the entire mixtures were loaded on DNeasy minicolumns (QIAamp DNA Blood Mini Kit, Qiagen Inc., Valencia, CA) and centrifuged for 1 min at $6,000 \times g$. DNA bound to the QIAamp membranes was washed and subsequently eluted from the columns in 100 μl of sterile Tris-EDTA buffer (TE) (pH 8.0) following the manufacturer's instructions. The concentration of the DNA was calculated by using a NanoDrop 1000 spectrophotometer (Thermo Scientific, Wilmington, DE). PCRs with specific primers (0.2 μM each) for the amplification of DNA fragments of MAP1485, MAP1487, MAP1738, MAP2325, and MAP165 rRNA genes were performed from 250 ng of genomic DNA using the GC-Rich PCR system (Roche, Mannheim, Germany) according to the manufacturer's instructions. Specific primers for the amplification of each ORF, their annealing temperatures, and the concentration of GC-Rich resolution solution used to generate each PCR product are shown in Table 2. Amplified products were analyzed by electrophoresis in 1% (wt/vol) agarose gels stained with GelRed nucleic acid gel stain (Biotium Inc., Hayward, CA).

Generation of strain-specific standard curves. Serial dilutions (10-fold; 100 μl of 10^8 to 10^2 CFU) of suspensions of each of the 11 *M. avium* subsp. *paratuberculosis* strains (McFarland standard of 1) were prepared in HBSS with vortexing between dilution steps. Two supplemented B3L MGIT tubes (Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD) were inoculated with 0.1 ml of each dilution. Each MGIT tube contained 7 ml of modified Middlebrook 7H9 broth base with casein peptone and an oxygen-sensitive fluorescent compound (tris-4,7-diphenyl-1,10-phenanthroline ruthenium chloride pentahydrate) embedded in silicone on the bottom of the tube. Each tube was supplemented with 800 μl of an enrichment supplement containing oleic acid, bovine serum albumin with glucose, dextrose, and catalase (BBL MGIT OADC growth supplement), and a reconstituted lyophilized antibiotic mixture of polymyxin B, amphotericin B, nalidixic acid, trimethoprim, and azlocillin (BBL MGIT PANTA antibiotic mixture; Becton, Dickinson and Company). The tubes were also supplemented with 2 μg ml $^{-1}$ of mycobactin J. A 100- μl inoculum from each of up to seven serial 10-fold dilutions made for each *M. avium* subsp. *paratuberculosis* strain was inoculated in duplicate into MGIT tubes. The vials were incubated at $37 \pm 2^{\circ}\text{C}$ for up to 41 days in the Bactec MGIT 960 instrument (Becton, Dickinson and Company) and were monitored automatically every hour for an increase of fluorescence. The earliest instrumental indication of positivity (i.e., time to detection [TTD]) for each tube was recorded. Any tube that was identified as posi-

TABLE 2 Specific PCR primers used in this study to examine the presence or absence of MAP1485, MAP1487c, MAP1738, and MAP2325

ORF	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> equivalent	Pntative function	Primer code	Sequence (5'-3')	Annealing temp (°C)	GC-rich solution concn (M)
MAP1485c	Rv0214	Acyl-coenzyme A synthase	1/F 2/R	TCACGAGCAGGTTCTCGACTT CGTCAAGCACCGGATGATG	62.3	0.5
MAP1487c	Rv2496c	Pyruvate dehydrogenase	3/F 4/R	ACCAAGAGATGACGATGCG ^a AATCGTCTTGATGAAACAGGC ^a	55.7	?
MAP1738	Rv0676c	Conserved large membrane protein	5/T 6/R	ACCACGATGCTGACCATGTA ^a ATCAGGCACAGCGAAAGAGAT ^a	55.7	0.5
MAP2325	Rv2416c	Enhanced intracellular survival protein (MmpL5)	7/F 8/R	GTTTGACCATCCGGCACTC ^{a,b} CCGGGTAGGGACAATAAC ^{a,b}	55.7	0.5
MAP16S		16S rRNA	9/F 10/R	CGAACGGGTGACTAACACG TGACACAGGCCACAAGGGA	62.3	0.5

^a According to Marsh et al. (25).

^b Primers 7 and 8 were designed to bridge MAP2325.

tive was removed from the instrument, and a sample was tested by PCR to confirm the presence of *M. avium* subsp. *paratuberculosis*. If a tube did not signal positive before 42 days (6 weeks) of incubation, it was removed from the instrument and determined to be negative. In order to generate strain-specific standard curves for each tested strain, the TTD for each tube (in days) was plotted against the estimated \log_{10} number of *M. avium* subsp. *paratuberculosis* cells present in each inoculum.

***M. avium* subsp. *paratuberculosis* quantification by real-time qPCR.** \log_{10} CFU predictions for the same *M. avium* subsp. *paratuberculosis* cell suspensions were determined by both the Bactec MGIT 960 and real-time quantitative PCR assay (qPCR) methods. For the real-time qPCR, genomic DNA was isolated from 100 μ l of each of up to seven serial 10-fold dilutions made for each *M. avium* subsp. *paratuberculosis* strain as described above. Real-time qPCR assays to detect the single-copy F57 insertion sequence of *M. avium* subsp. *paratuberculosis* were performed in duplicate using the ParaTB Kuantu VK kit following the manufacturer's instructions (Vacunek, Bizkaia, Spain). The kit uses a F57 TaqMan probe labeled with the fluorescent reporter dye 5-carboxyfluorescein (FAM) at the 5' end. Inhibition of the amplification reaction is ruled out by including an internal hybridization probe labeled with 6-carboxy-4',5'-dichloro-2',7'-dimethoxyfluorescein, succinimidyl ester (JOE) at the 5' end. Real-time qPCR amplifications were performed on an ABI Prism 7500 detection system (Applied Biosystems, Carlsbad, CA) under the following conditions: 1 cycle of denaturation at 95°C for 10 min, 45 cycles of denaturation at 95°C for 15 s, and annealing/extension at 60°C for 60 s. Quantification of the starting amount of target DNA in unknown samples was accomplished by using a standard curve generated with a series of known quantities of the target sequence according to the manufacturer's instructions. The results were analyzed with ABI Prism software v. 1.4.

Statistical analysis. The relationship between the predicted \log_{10} CFU in the inoculum and the MGIT detection times was assessed by nonlinear regression analysis. Equations for predicting log CFU in the inoculum with 95% confidence intervals were determined using GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, San Diego, CA). Mean TTD values for all the strains recorded from the Bactec MGIT 960 instrument were compared by one-way analysis of variance (ANOVA) with the Duncan posttest of the SAS statistical package (SAS Institute Inc., Cary, NC) or with the Student-Newman-Keuls multiple-comparison posttest of the GraphPad InStat version 3.10 for Windows 95 (GraphPad Software). Differences in relation to the duration of growth were considered significant when *P* values were <0.05. The relations between the predicted \log_{10} CFU and *M. avium* subsp. *paratuberculosis* DNA copy numbers were evaluated by linear correlation analysis (Microsoft Office Excel) and by an unpaired Student *t* test using GraphPad Prism 5 (GraphPad Software).

RESULTS

Confirmation of the presence or absence of four ORFs located in three deletions previously identified in S strains. The 11 field strains included in the present study were previously isolated from samples of 7 different domestic and wildlife animal species and typed into distinct IS1311 PCR-REA and PFGE profiles (Table 1). In the present study, genomic DNA extracted from the 11 strains was tested for the presence or absence of four ORFs (MAP1485, MAP1487, MAP1738, and MAP2325) located in three large deletions previously identified in S-type strains (25). As shown in Fig. 1, our results confirmed the absence of DNA fragments corresponding to these four ORFs in the genome of the sheep and goat strains with an S genotype. Conversely, our results showed that these four regions were present in the C-type strains isolated from sheep and fallow deer and in the two cattle strains tested. In contrast, a 466-bp fragment of MAP1487 could not be amplified from genomic DNA of the bison, goat, wild boar, and deer strains with a C genotype (Fig. 1B). As expected, the MAP16S rRNA gene was present in the genomes of all the tested strains (Fig. 1E).

Generation of strain-specific standard curves. Strain-specific standard curves were generated in duplicate for each of the 11 *M. avium* subsp. *paratuberculosis* strains shown in Table 1. Since no statistically significant differences were observed between duplicates of each strain-specific curve by using a paired *t* test, duplicate MGIT data recorded as TTD for each strain were pooled. Inoculum sizes were determined according to the dilution factor and inoculum volume and plotted against TTD or days of incubation for each strain. When the data were subjected to regression analysis, the results indicated that a linear relationship did not exist between TTD and the predicted \log_{10} CFU in each inoculum, with a significant curvature for all the strains. Therefore, the curves were fitted to a one-phase exponential-decay model with three parameters according to the following equation: \log_{10} inoculum size = span $\times e^{(-K \times \text{TTD})}$ + plateau. Span is the difference between TTD at time zero and the plateau, *K* is the degree of decay for the \log_{10} CFU, and plateau is the value for log CFU curve flattening. All the strain-specific standard curves fitted to this model with *R*² values between 0.97 and 0.99. Estimations of span, *K*, plateau, and the *R*² of goodness-of-fit val-

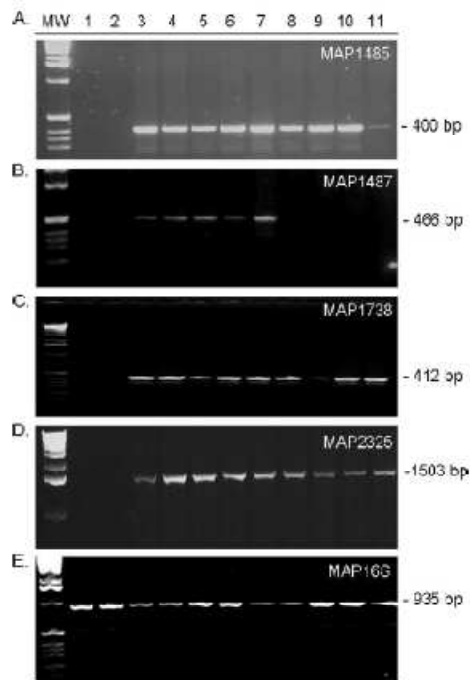


FIG 1. PCR assays to test the presence or absence of four ORFs located in three long deletions previously identified in S strains. Panels A, B, C, D, and E show the amplified products corresponding to the MAP1485, MAP1487, MAP1738, MAP2325, and MAP163 rRNA genes, respectively. Genomic DNAs extracted from the following strains were used as templates (strain type is in parentheses): lane 1, sheep (S); lane 2, goat (S); lane 3, sheep (C); lane 4, sheep (B); lane 5, fallow deer (C); lane 6, cattle (C) (strain K10); lane 7, cattle (C); lane 8, bison (B); lane 9, wild boar (C); lane 10, goat (C); lane 11, deer (C). MW, 1-kb DNA ladder (Invitrogen).

ues between TTD and \log_{10} CFU for each strain-specific curve are shown in Table 3.

Comparison of strain-specific standard curves and generation of universal-standard curves. Multiple comparisons of the TTD means of all the strains recorded by the Bacter MGIT 960 instrument were made by one-way ANOVA. Differences among the standard deviations (SDs) of the TTD means were not significant (Bartlett's test, $P = 0.6564$). Means, sample size, and cluster analysis of the TTD data using the Duncan post-ANOVA test are shown in Table 4. When the Student-Newman-Keuls multiple-comparison posttest was used, similar cluster results were obtained. By comparing the mean TTDs of all the strains with the mean TTD of the reference strain K10, two groups of strains were generated. A first group containing *M. avium* subsp. *paratuberculosis* strains that took longer to reach a TTD for a given inoculum size than the K10 strain was identified. All the strains in group I had significant differences between their mean TTD and the mean TTD of the K10 strain ($P < 0.05$). Group I included the S-type strain isolated from goat and all the sheep strains with C, S, and B genotypes. Interestingly, a C-type strain isolated from fallow deer (strain 622/07) took longer to reach a TTD for a given inoculum size than all the strains included in group II, and therefore it was

TABLE 3. Estimations of span, K , plateau, and the R^2 of goodness-of-fit values between TTD and estimated \log_{10} CFU for each strain-specific curve^a

Strain code	Host PCR-REA type	Span	K	Plateau	R^2
K10	Cattle-C	11.48	0.0503	-1.316	0.9909
6	Cattle-C	16.44	0.0220	-6.080	0.9887
P381	Sheep-C	9.972	0.0211	-0.634	0.9971
2349/06-1	Sheep-S	11.82	0.0724	3.222	0.9808
334	Sheep-B	11.86	0.0298	0.460	0.9713
/11	Goat-C	17.25	0.0301	-8.208	0.9979
311	Goat-S	9.511	0.0612	3.016	0.9958
855	Deer-C	10.95	0.1927	1.317	0.9840
622/07	Fallow deer-C	15.15	0.0257	-2.965	0.9976
622/07	Fallow deer-C	12.34	0.0236	-2.159	0.9770
681	Wild boar-C	8.755	0.0486	0.760	0.9876
6.1	Bison-B	17.34	0.0253	-6.077	0.9959
6.1	Bison-B	20.84	0.0256	9.508	0.9898
6.1	Bison-B	18.33	0.1104	2.516	0.9901

^a Equation for exponential-decay model: \log_{10} inoculum size = span \times ($-K \times$ TTD) + plateau (see the text). Data from two and three standard curves of the fallow deer (strain 622/07) and bison (strain 6.1) isolates, respectively, are shown.

clustered within group I. Statistical analysis indicated that group I strains behaved in a similar manner in terms of a relationship between TTD and estimated inoculum size (ANOVA, $P = 0.5544$). Since clustering analysis revealed that the TTD means of the S-type strains were closer, cluster A containing the sheep and goat strains with an S genotype was created within group I strains. Cluster B included the C and B type strains isolated from sheep, and cluster C included only the fallow deer strain (strain 622/07). Figure 2A depicts fitted plots of predicted \log_{10} CFU in the inoculum against TTD for all the *M. avium* subsp. *paratuberculosis* strains included in group I.

Group II contained the C-type strains isolated from cattle, goat, wild boar, and deer and the B-type strain from bison. No significant differences were observed between the TTD of all the strains included in this group and the TTD of the reference strain K10 isolated from cattle ($P > 0.05$). Two clusters within group II were made up; cluster D included the cattle (strain 14-35), the

TABLE 4. Comparison of TTD data recorded in the Bacter MGIT 960 system and cluster analysis of *M. avium* subsp. *paratuberculosis* strains^a

Strain code	Host-PCR-REA	Sample size (n)	Mean TTD	SD	Clustering analysis	P value
2349/06-1	Sheep-S	14	32.264	10.852	A	<0.05
311	Goat-S	14	31.814	11.455	A	<0.05
P381	Sheep-C	14	31.164	11.208	B	<0.05
334	Sheep-B	14	30.993	10.279	B	<0.05
622/07	Fallow deer-C	28	29.754	10.443	C	<0.05
6	Cattle-C	14	24.800	11.758	D	>0.05
6.1	Bison-B	42	23.412	11.337	D	>0.05
681	Wild boar-C	14	23.157	13.375	D	>0.05
K10	Cattle-C	14	18.186	11.384	E	>0.05
711	Goat-C	14	14.800	11.915	E	>0.05
855	Deer-C	14	9.736	6.194	E	>0.05

^a No significant differences were observed between the TTDs of the strains included in group II and the TTD of strain K10. Group C contained strains that took longer to reach a TTD for a given inoculum size than the reference strain. Strains with the highest similarity in TTD were clustered within categories labeled A to D. Differences with P values of <0.05 were considered significant.

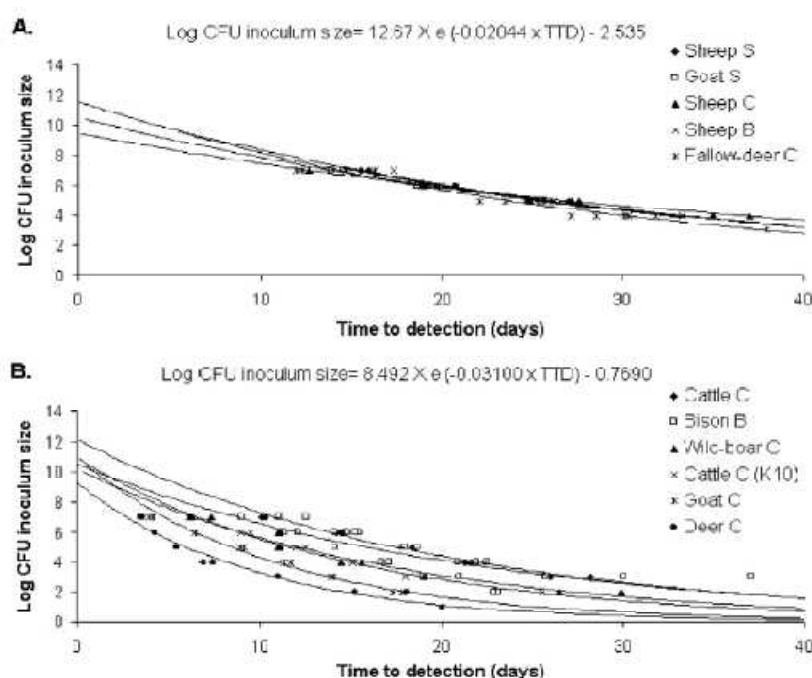


FIG 2 Relationship between estimated \log_{10} CFU inoculum size and TTD for group I strains (A) and group II strains (B) by nonlinear regression. Universal standard curves from the pooled data of each group of strains were generated, and their corresponding equations are shown in the upper part of the panels.

bison, and the wild boar strains, and cluster E contained the laboratory-adapted strain K10 and the goat and the deer strains. It should be noted that the mean TTD for the deer isolate (strain 855) was shorter than the TTD of any other strain in the Bactec MGIT 960 system and statistically different from the mean TTD of cluster D strains. Figure 2B depicts fitted curve plots of predicted \log_{10} CFU in the inoculum against TTD for group II strains.

The relationship between the predicted \log_{10} CFU of the inoculum and the MGIT detection times was assessed for group I and group II strains by nonlinear regression analysis. Universal curves and the corresponding equations for predicting \log_{10} CFU in the inoculum with 95% confidence intervals were determined for group I and group II strains and are shown in the upper parts of Fig. 2A and B, respectively.

Comparison between universal-standard curves and strain-specific curves. The validity of applying the universal-standard curve for each strain was determined by cross-validation. The predicted \log_{10} CFU obtained from the strain-specific curve generated for each strain was compared with the estimated \log_{10} CFU obtained by using group I or group II universal-standard curves. For all the strains tested in the study, high correlations were obtained between the predicted \log_{10} CFU for each inoculum estimated by both standard curves, universal and strain specific ($R > 0.9$). For the deer isolate (strain 855), the correlation between the strain-specific and the universal-standard curves had the lowest R value ($R = 0.9193$). Differences between mean TTD values for each *M. avium* subsp. *paratuberculosis* strain calculated using either the strain-specific standard curve or the universal-standard

curve were considered to be statistically nonsignificant (unpaired t test, $P > 0.05$).

Reproducibility of the MGIT counting method. Two *M. avium* subsp. *paratuberculosis* strains, the bison and the fallow deer strains, were selected for reproducibility analysis of standard curves. Standard curves were repeated for these strains, and the algorithms for predicting \log_{10} CFU in the inoculum of each replicate are shown in Table 3. When the mean TTD values were compared using a paired t test, no significant variation in recorded detection times was noted in any of the experiments performed in triplicate with the bison strain ($P = 0.6477$ and $P = 0.6861$) and in duplicate with the fallow deer isolate (strain 622/07) ($P = 0.8772$). The consistency of the replicates was measured by the correlation coefficient (R), which indicates the linearity of the \log_{10} CFU values plotted. When \log_{10} CFU estimations were compared at the same inoculum sizes, the correlation (R) between the \log_{10} CFU estimations predicted by each experiment was 0.99 for the bison strain and 0.97 for the fallow deer strain.

Comparison of the *M. avium* subsp. *paratuberculosis* quantitative capabilities of the Bactec MGIT 960 and qPCR methods. \log_{10} CFU predictions from the same *M. avium* subsp. *paratuberculosis* cell suspensions calculated using qPCR or the Bactec MGIT 960 system were compared. The relationships between the predicted \log_{10} CFU and DNA copy numbers were evaluated using the correlation coefficients (R) for group I and group II *M. avium* subsp. *paratuberculosis* strains and are shown in Fig. 3 and 4, respectively. A significant linear correlation with R values between 0.90 and 0.99 was obtained for all the tested strains. Predicted \log_{10}

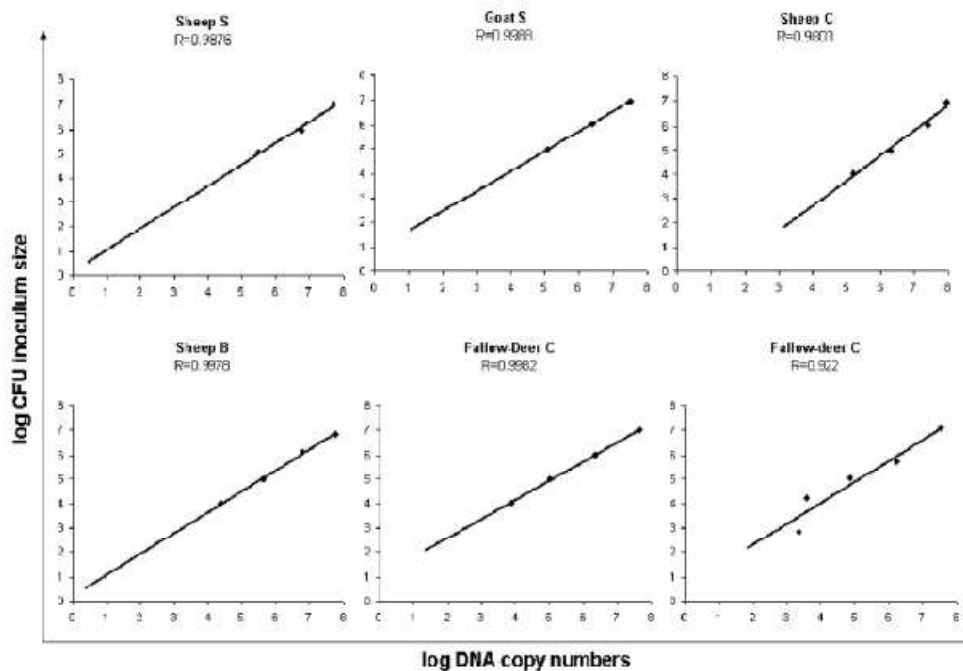


FIG 3 Correlation between real-time qPCR and MGIT estimations for group I strains. Data from two independent standard curves of the fallow deer isolate (strain 622/07) are shown. Correlation coefficients (R) are shown.

CFU concentrations for each *M. avium* subsp. *paratuberculosis* strain based on the strain-specific curve did not differ significantly from DNA copy numbers (unpaired t test, $P > 0.05$).

DISCUSSION

Understanding the interaction of *M. avium* subsp. *paratuberculosis* with its host is important to have a better knowledge of the pathogenesis of the infection. However, *M. avium* subsp. *paratuberculosis*-host interactions are not well understood, in part because of the lack of reliable methods for quantifying numbers of viable *M. avium* subsp. *paratuberculosis* cells. Because of its very slow replication rate (average generation time in liquid media, 1.4 days) and its tendency to clump, *M. avium* subsp. *paratuberculosis* has been difficult to quantify by routine bacteriological methods (13). A microscopic fluorescence-based method to semiquantify both the number of host macrophages and the number of *M. avium* subsp. *paratuberculosis* bacteria in *in vitro* assays was previously developed (27). However, this method is very time-consuming and, as with all microscopy-based assays, very subjective. Culture in solid media is considered the "gold standard" method to detect and quantify viable *M. avium* subsp. *paratuberculosis* cells in the laboratory in spite of some of its limitations (46). Standard plate counting methods for slowly growing mycobacteria are laborious, expensive, and time-consuming and frequently fail due to either contamination or medium dehydration during the long incubation period. Because of this bacterium's tendency to form clumps, *M. avium* subsp. *paratuberculosis* culture in solid media underestimates the number of CFU present in a sample. In com-

parison, systems that use a liquid medium for *M. avium* subsp. *paratuberculosis* culture, such as the Bactec MGIT 960 system, have better analytical sensitivity and require less time to grow mycobacteria (9). Since the software of this system does not estimate the number of CFU present in a sample, an algorithm for converting TTD in days into the predicted number of inoculated *M. avium* subsp. *paratuberculosis* cells was previously reported for C-type *M. avium* subsp. *paratuberculosis* strains isolated from either cattle or humans (39). However, the quantitative capabilities of the Bactec MGIT 960 system had not been previously explored for *M. avium* subsp. *paratuberculosis* strains isolated from wildlife animals or from domestic species other than cattle or sheep.

In the present study, growth rates in a liquid culture system of 11 *M. avium* subsp. *paratuberculosis* strains isolated from diverse hosts were estimated. These strains were previously isolated and typed into distinct IS131 PCR-REA and PFGE profiles. Genomic DNA extracted from the 11 strains was tested here for the presence or absence of four ORFs (MAP1485, MAP1487, MAP1738, and MAP2325) located in three deletions previously identified in S strains (25). The S strains isolated from goat and sheep lacked DNA fragments corresponding to MAP1485 and MAP1738, while fragments of these genes were detected in all the C-type strains tested. This result confirms that MAP1485 and MAP1738 are true markers that clearly differentiate the two main *M. avium* subsp. *paratuberculosis* genotypes. MAP2325 was initially identified as being absent from Australian sheep isolates of *M. avium* subsp. *paratuberculosis* via microarray analysis, but sequencing of the sheep isolate *M. avium* subsp. *paratuberculosis* S397 identified an

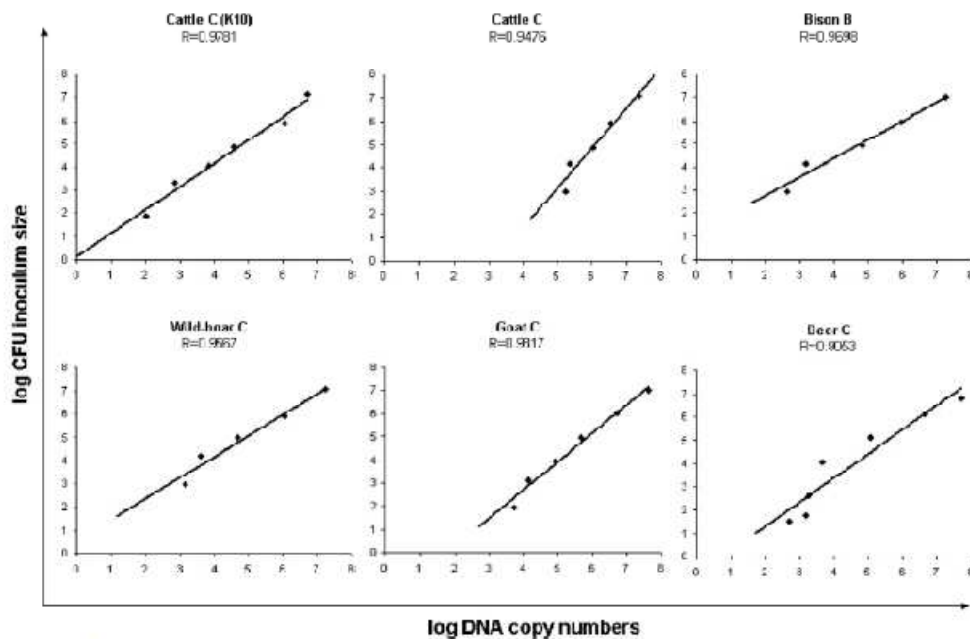


FIG 4 Correlation between MGIT and real-time estimations for group II strains. Correlation coefficients (R) are shown.

GRF with 100% identity to MAP2325 (MAP34380) (4). Using PCR primers to bridge MAP2325, we confirmed the absence of MAP2325 in the two S strains tested. This region was present in all the C-type strains. Interestingly, a DNA fragment of MAP1487 could not be amplified from genomic DNA of the C-type strains isolated from goat, bison, wild boar, and deer, which confirms that even within types of strains significant genomic variability exists. In a previous report, we were able to successfully obtain a PCR product corresponding to a sequence spanning MAP1490 to MAP1484c (LSP^Δ20) in the deer strain (strain 855) (36), although a 466-bp portion situated in MAP1487 is missing. It remains unclear what effect the presence or absence of each of these genes may have on the C and S strain phenotypes. PCR-based methods, as the one used here, have been developed to compensate for the limitations of genotyping methods that are time-consuming and require large quantities of high-quality DNA (12, 16, 35).

Standard curves for each of the strains included in the study and equations for their quantification were generated. A one-phase exponential-decay relationship between the estimated \log_{10} CFU and TTD was demonstrated for the 11 *M. avium* subsp. *paratuberculosis* strains. By comparing the mean TTDs of all the strains with the mean TTD of the reference K10 strain, two groups of strains were generated. Group I contained *M. avium* subsp. *paratuberculosis* strains that took longer to reach a TTD for a given inoculum size than the reference strain. No significant differences were observed between the TTDs of the strains included in group II and the TTD of the K10 strain. While group I contained the S-type strain isolated from goat and all the sheep strains with C, S, and B genotypes, C-type strains isolated from cattle, goat, wild boar, and deer and the B-type strain from bison were grouped in group II. The grouping of the bison strain within group II strains

is consistent with previous observations showing that this strain is much closer to C-type than to S-type strains (37). A characteristic of group I strains was their almost identical strain-specific standard curves ($R \geq 0.99$). This common growth rate of the sheep strains with C, S, and B genotypes suggests a lack of correlation between genotype and growth rate for the ovine isolates, although all the S strains tended to grow slower. Therefore, we can speculate that the lower growth rate of the C- and B-type strains isolated from sheep in liquid medium compared with that of *M. avium* subsp. *paratuberculosis* strains with the same genotypes isolated from other animal species might be due to the accumulation of different polymorphisms resulting in slower growth. Another possibility would be that C- and B-type *M. avium* subsp. *paratuberculosis* strains growing in sheep may have become adapted to the host by modifications in the expression of several genes resulting in slower growth. Previous studies have shown that the environment to which *M. avium* subsp. *paratuberculosis* is exposed can alter the transcriptional regulation of genes, affecting its envelope composition and its ability to grow and survive in host cells (3, 31). Recent data also suggest that specific mycobacterial epitopes are present only within a given host (19). Therefore, it is reasonable to hypothesize that C- and B-type *M. avium* subsp. *paratuberculosis* strains growing in sheep may have become adapted to the host by modifications in the expression of some genes that might, in turn, affect the strains' ability to grow in liquid medium. This specific host modification of the bacterial phenotype would occur only in B- and C-type strains isolated from infected sheep, since *M. avium* subsp. *paratuberculosis* strains with these genotypes isolated from other host species were able to grow at higher rates in liquid culture. Further investigation is needed to confirm this hypothesis.

Although group II strains grew faster than group I strains, more strain-to-strain difference in growth curves was observed for group II strains. Group II strains had previously known diversity (in host origin, RFLP pattern, etc.); therefore, the differences found were not really surprising. In fact, the type-C strain isolated from deer (strain 855) had a significantly shorter mean TTD than those of the cattle and wildlife strains with a C genotype included in cluster D. It should be noted that this strain showed a novel and distinct PFGE profile (68-1), identified only in deer as far as we know. The fact that the deer strain grew faster than any of the *M. avium* subsp. *paratuberculosis* strains tested in liquid medium is associated with the observed strong infectivity of C-type *M. avium* subsp. *paratuberculosis* strains in farmed deer. In contrast to the chronicity of paratuberculosis in cattle, an acute form of paratuberculosis often occurs in farmed red deer under 1 year of age, which has dramatic consequences for the whole breeding group (23, 24). It is debatable whether this increased virulence in farmed red deer under 1 year of age compared to bovine paratuberculosis is due to specific farm management practices, to specific host modification of the bacterial phenotype, to intrinsic genotypic modifications of the strains isolated from deer, or to a combination of these factors. Another C-type strain isolated from a cervid, in particular from fallow deer (strain 622/07), had a very different phenotype from that of the deer strain (strain 855) in liquid culture medium. In fact, the C-type strain isolated from fallow deer took longer to be detected at a given inoculum size than the C-type strains included in cluster E; therefore, it was included in group I.

The TTD data reported by the Bactec MGIT 960 system highly correlated with DNA copy numbers determined by real-time qPCR, suggesting that the qPCR of the F57 single-copy gene is a fast and accurate method to estimate total *M. avium* subsp. *paratuberculosis* cell numbers in a sample grown to exponential phase in liquid medium. It should be noted that the precision of the liquid system used here is lowest when small numbers of organisms are present. The Bactec MGIT 960 system was capable of detecting *M. avium* subsp. *paratuberculosis* growth in a sterile saline suspension that originally contained $>10^3$ to 10^4 CFU/ml for group I strains and $>10^2$ to 10^3 CFU/ml for group II strains within 41 days. For the deer strain, the system was shown to be capable of detecting as few as 10 cells within the same time period. When the real-time qPCR method was used under optimum conditions, a similar detection limit (10 copies per reaction) was obtained. A potential drawback in the use of the Bactec MGIT 960 system is the contamination of the vials. However, contamination rates in our cultures were less than 6%. Usually, contamination is easily recognized and is unlikely to confuse enumeration attempts.

Once a regression relationship between inoculum size and TTD was established for each *M. avium* subsp. *paratuberculosis* strain included in our study, the measurement of TTD provided a fast and useful way to predict viable numbers of each particular strain. For instance, we have been able to predict the numbers of viable *M. avium* subsp. *paratuberculosis* organisms in cultured macrophages at different times postinfection by using our mathematical model, which relates TTD in days to the estimated \log_{10} number of *M. avium* subsp. *paratuberculosis* cells (1). Having established that the Bactec MGIT 960 system provides a precise method for evaluating *in vitro* intracellular growth dynamics, this method is being used in ongoing pathogenesis studies.

In summary, we describe a simple and fast method for quantifying *M. avium* subsp. *paratuberculosis* strains isolated from di-

verse hosts, including wildlife animal species. For the cattle strains, the similarity of their strain-specific curves confirmed previous observations that *M. avium* subsp. *paratuberculosis* strains isolated from cattle are very conserved. Although a few strains isolated from sheep were included in the study, we observed high similarity in the standard curves of these strains, irrespective of their genotype, which suggested a lack of correlation between genotype and growth rate in liquid medium for the ovine strains. In contrast, the *M. avium* subsp. *paratuberculosis* strains isolated from goat and from nondomestic species, in particular from cervids, showed greater phenotypic diversity.

ACKNOWLEDGMENTS

Financial support for this work was provided by a grant from the Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA, Spain) and from European Funds for Regional Development (FAU2008-00018-C02-00). Marta Alonso-Itearn's tenure is partly covered by the INIA tenure track program for the incorporation of PhD graduates into research institutions. Naiara Abendaño has a fellowship from the department of Agriculture of the Basque Government.

We thank the farmers and veterinarians who helped with the collection of the animal samples used in this study. We thank Kyle Itearn for the careful editing of the manuscript.

REFERENCES

- Abendaño N, et al. 2012. A large-scale study of differential virulence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* strains with distinct genotypes and isolated from diverse hosts in bovine macrophages. *abstr OR-037*, p 96. *Abstr. 11th Int. Colloq. Paratuberc.* International Association of Paratuberc, Rehoboth, MA.
- Aduriz J, Juste RA, Cortabarna N. 1995. Lack of mycobactin dependence of mycobacteria isolated on Middlebrook 7H11 from clinical cases of ovine paratuberculosis. *Vet. Microbiol.* 45:211–217.
- Alonso-Itearn M, Eckstein TM, Sommer S, Bermudez LE. 2010. A *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* LuxX regulates cell envelope and virulence. *Innate Immun.* 16:235–247.
- Bannantine JP, et al. 2012. Genome sequencing of ovine isolates of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* offers insights into host association. *BMC Genomics* 13:89. doi:10.1186/1471-2164-13-89.
- Castellanos E, Juan LD, Domínguez L, Aranz A. 2012. Progress in molecular typing of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Res. Vet. Sci.* 92:169–179.
- Chamberlin W, et al. 2001. Review article: *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* as one cause of Crohn's disease. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 15:337–346.
- Collins DM, Gabric DM, de Lisle GW. 1990. Identification of two groups of *Mycobacterium paratuberculosis* strains by restriction analysis and DNA hybridization. *J. Clin. Microbiol.* 28:1591–1596.
- Cousins DV, Evans RJ, Francis BR. 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: 458–462.
- Cruciani M, et al. 2004. Meta-analysis of BACTEC MGIT 960 and BACTEC 460 TB, with or without solid media, for detection of mycobacteria. *J. Clin. Microbiol.* 42:2321–2325.
- de Juan L, Mateos A, Domínguez L, Sharp JM, Stevenson K. 2005. Genetic diversity of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* isolates from goats detected by pulsed-field gel electrophoresis. *Vet. Microbiol.* 106:249–257.
- de Lisle GW, Yates GF, Cavaignac S, Collins DM. 1995. Evaluation of MGIT system for culturing *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* and characterization of strains by polymerase chain reaction test, p 511. *In* Manning EJB, Collins MT (ed), *Proc. 6th Int. Colloq. Paratuberc.* International Association of Paratuberculosis, Rehoboth, MA.
- Donnarre PF, Cashman W, Ruckley J, Coffey A, O'Mahony J. 2012. High resolution melting PCR to differentiate *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* "cattle type" and "sheep type". *J. Microbiol. Methods* 88:172–174.

13. Elguezal N, et al. 2011. Estimation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* growth parameters: strain characterization and comparison of methods. *Appl. Environ. Microbiol.* 77:8615–8624.
14. Gollnick NS, et al. 2007. Survival of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in bovine monocyte-derived macrophages is not affected by host infection status but depends on the infecting bacterial genotype. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 120:93–105.
15. Grant IR, Kirk RB, Hitchings EI, Rowe MT. 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.
16. Griffiths TA, Rioux K, de Buck J. 2008. Sequence polymorphisms in a surface PPE protein distinguish types I, II and III of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.* 46:1207–1212.
17. Harris NB, Payeur JB, Kapur V, Sreevatsan S. 2006. Short-sequence-repeat analysis of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and *Mycobacterium avium* subsp. *avium* isolates collected from animals throughout the United States reveals both stability of loci and extensive diversity. *J. Clin. Microbiol.* 44:2970–2973.
18. Janagama HK, Jeong KI, Kapur V, Coussens P, Sreevatsan S. 2006. Cytokine responses of bovine macrophages to diverse clinical *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* strains. *BMC Microbiol.* 6:10. doi:10.1186/1471-2180-6-10.
19. Janagama HK, et al. 2010. Primary transcriptomes of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* reveal proprietary pathways in tissue and macrophages. *BMC Genomics* 11:561. doi:10.1186/1471-2164-11-561.
20. Juste RA, Marco JC, Saez de Ocariz C, Aduriz JJ. 1991. Comparison of different media for the isolation of small ruminant strains of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Vet. Microbiol.* 28:385–390.
21. Kabara E, et al. 2010. A large-scale study of differential gene expression in monocyte-derived macrophages infected with several strains of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Brief. Funct. Genomics* 9:220–237.
22. Li L, et al. 2005. The complete genome sequence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102:12344–12349.
23. Mackintosh CG, et al. 2010. Age susceptibility of red deer (*Cervus elaphus*) to paratuberculosis. *Vet. Microbiol.* 143:255–261.
24. Mackintosh CG, de Lisle GW, Collins DM, Griffin JF. 2004. Mycobacterial diseases of deer. *N. Z. Vet. J.* 52:163–174.
25. Marsh IB, et al. 2006. Genomic comparison of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* sheep and cattle strains by microarray hybridization. *J. Bacteriol.* 188:2290–2293.
26. Marsh IB, Whittington RJ. 2005. Deletion of an *mmpL* gene and multiple associated genes from the genome of the S strain of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* identified by representational difference analysis and in silico analysis. *Mol. Cell. Probes* 19:371–384.
27. Mitchell RM, Gollnick NS, Sreevatsan S, Russell DG, Schukken YH. 2011. Quantification of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) survival in monocyte-derived macrophages. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 139:73–78.
28. Moloney BJ, Whittington RJ. 2008. Cross species transmission of ovine Johne's disease from sheep to cattle: an estimate of prevalence in exposed susceptible cattle. *Aust. Vet. J.* 86:117–123.
29. Muskens J, Bakker D, de Boer J, van Keulen L. 2001. Paratuberculosis in sheep: its possible role in the epidemiology of paratuberculosis in cattle. *Vet. Microbiol.* 78:101–109.
30. Naser SA, 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.
31. Patel D, et al. 2006. The ability of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* to enter bovine epithelial cells is influenced by preexposure to a hyperosmolar environment and intracellular passage in bovine mammary epithelial cells. *Infect. Immun.* 74:2849–2855.
32. Paustian MI, et al. 2008. Comparative genomic analysis of *Mycobacterium avium* subspecies obtained from multiple host species. *BMC Genomics* 9:135. doi:10.1186/1471-2164-9-135.
33. Pfyffer GE, et al. 1997. Comparison of the Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT) with radiometric and solid culture for recovery of acid-fast bacilli. *J. Clin. Microbiol.* 35:364–368.
34. Schwartz D, et al. 2000. Use of short-term culture for identification of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in tissue from Crohn's disease patients. *Clin. Microbiol. Infect.* 6:303–307.
35. Semret M, Turenne CY, de Haas P, Collins DM, Behr MA. 2006. Differentiating host-associated variants of *Mycobacterium avium* by PCR for detection of large sequence polymorphisms. *J. Clin. Microbiol.* 44:881–887.
36. Sevilla I, et al. Inter and intra-subtype genotypic differences that divide *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* strains, abstr P-196, p 56. Abstr. 10th Int. Colloq. Paratuberc. International Association of Paratuberculosis, Rehoboth, MA.
37. Sevilla I, Garrido JM, Geijo M, Juste RA. 2007. Pulsed-field gel electrophoresis profile homogeneity of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* isolates from cattle and heterogeneity of those from sheep and goats. *BMC Microbiol.* 7:18. doi:10.1186/1471-2180-7-18.
38. Sevilla I, et al. 2005. Molecular typing of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* strains isolated from different host species and geographic locations. *Rev. Sci. Tech.* 24:1061–1066.
39. Shin SJ, Han JH, Manning EJ, Collins MT. 2007. Rapid and reliable method for quantification of *Mycobacterium paratuberculosis* by use of the BACTEC MGIT 960 system. *J. Clin. Microbiol.* 45:1941–1948.
40. Sohal JS, et al. 2009. Genomic analysis of local isolate of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Vet. Microbiol.* 134:375–382.
41. Stevenson K, et al. 2009. Occurrence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* across host species and European countries with evidence for transmission between wildlife and domestic ruminants. *BMC Microbiol.* 9:212. doi:10.1186/1471-2180-9-212.
42. Stevenson K, et al. 2002. Molecular characterization of pigmented and non-pigmented isolates of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.* 40:1798–1804.
43. Stitt DT, Sturm KM, Hagemann PA. 1997. Preliminary methods for growing *Mycobacterium paratuberculosis* using the BBL[®] MGIT Mycobacteria Growth Indicator Tube, p 290–295. In Chiodini RJ, Hines ME, Collins MT (ed), *Proc. 5th Int. Colloq. Paratuberc. International Association of Paratuberculosis, Rehoboth, MA.*
44. Thibault VC, et al. 2012. Genome sequencing to identify phylogenetic diversity and single nucleotide polymorphisms in *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, abstr OR-048, p 111. Abstr. 11th Int. Colloq. Paratuberc. International Association of Paratuberculosis, Rehoboth, MA.
45. Whittington RJ, Marsh IB, Whitlock RH. 2001. Typing of IS1311 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.
46. Whittington RJ, Sergeant ES. 2001. Progress towards understanding the spread, detection and control of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in animal populations. *Aust. Vet. J.* 79:267–278.
47. Wu CW, Glasner J, Collins M, Naser S, Talaat AM. 2006. Whole-genome plasticity among *Mycobacterium avium* subspecies: insights from comparative genomic hybridizations. *J. Bacteriol.* 188:711–723.

PUBLICACIÓN II

Anti-inflammatory and antiapoptotic responses to infection: a common denominator of human and bovine macrophages infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*.

Abendaño N, Juste RA, Alonso-Hearn M.

BioMed Research International, 908348.

Review Article

Anti-Inflammatory and Antiapoptotic Responses to Infection: A Common Denominator of Human and Bovine Macrophages Infected with *Mycobacterium avium* Subsp. *paratuberculosis*

Naiara Abendaño, Ramon A. Juste, and Marta Alonso-Hearn

Department of Animal Health, Basque Institute for Agricultural Research and Development, NEIKER-Tecnalia, Technological Park of Bizkaia, 48160 Derio, Bizkaia, Spain

Correspondence should be addressed to Marta Alonso-Hearn; malonso@neiker.net

Received 27 September 2012; Accepted 26 December 2012

Academic Editor: Reinaldo B. Oriá

Copyright © 2013 Naiara Abendaño et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Mycobacterium avium subsp. *paratuberculosis* (*Map*) is the causative agent of a chronic intestinal inflammation in ruminants named Johne's disease or paratuberculosis and a possible etiopathological agent of human Crohn's disease (CD). Analysis of macrophage transcriptomes in response to *Map* infection is expected to provide key missing information in the understanding of the role of this pathogen in establishing an inappropriate and persistent infection in a susceptible host and of the molecular mechanisms that might underlie the early phases of CD. In this paper we summarize transcriptomic studies of human and bovine peripheral blood mononuclear cells (PBMC), monocyte-derived macrophages (MDMs), and macrophages-like cell lines *in vitro* infected with *Map*. Most studies included in this paper consistently reported common gene expression signatures of bovine and human macrophages in response to *Map* such as enhanced expression of the anti-inflammatory cytokines IL-10 and IL-6, which promote bacterial survival. Overexpression of IL-10 could be responsible for the *Map*-associated reduction in the expression of the proapoptotic TNF- α gene observed in bovine and human macrophages.

1. Association of *Mycobacterium avium* Subsp. *paratuberculosis* (*Map*) with Chronic Inflammatory Bowel Diseases of Cattle and Humans

Mycobacterium avium subsp. *paratuberculosis* (*Map*) is the causal agent of Johne's disease or paratuberculosis, a chronic inflammatory bowel disease of domesticated ruminants and wildlife species worldwide. Johne's disease causes major economic losses to the global dairy industry due to reduced milk production, lower weight gains, infertility, premature culling, and increased cow replacement costs [1]. *Map* has a worldwide distribution and is of considerable concern in cattle, sheep, goats, and farmed red deer. Although it is still controversial, *Map* has been implicated as a causal or exacerbating agent in human Crohn's disease (CD), a chronic inflammatory bowel disease characterized by transmural inflammation and granuloma formation [2–4]. Evidences

that *Map* may be associated to CD in humans include similarity between the clinical signs of CD in humans and those found in animals with paratuberculosis; detection of *Map* in feces, intestinal tissues, breast milk, macrophages, and peripheral blood of patients with CD; association between *Map* DNA in blood and cellular and humoral immune responses in CD; and anti-*Map* antibiotic therapy resulting in reduction of bacteremia and remission or substantial improvement in disease condition in many patients [5–10]. In addition, meta-analysis and epidemiological studies have confirmed an association of *Map* with CD [11, 12].

Map may enter the food chain from a variety of sources. The organism, shed from infected animals, may contaminate pastures and potable water, where it is resistant to standard purification with chlorine [13]. Because *Map* can survive pasteurization conditions, dairy products such as milk and cheese have been proposed as possible sources of exposure of humans to *Map* [14]. Recently, we have

demonstrated that *Map* can be detected and cultured from diaphragm muscle of *Map*-infected cattle destined for human consumption and suggested a possible risk of exposure of humans to *Map* via contaminated meat [15]. After oral ingestion, *Map* invades the intestinal wall preferably through epithelial cells or M cells present in the follicle-associated epithelium covering the continuous Peyer's patches in the distal ileum [16–18]. Although the mechanism of entry in the mucosa is important in establishing *Map* infection, most of the bacterial components involved in the interaction with the intestinal epithelium are still unknown. It has been recently demonstrated that *Map*3464 gene encodes an NADH-flavin oxidoreductase involved in invasion of bovine epithelial cells through the activation of host cell Cdc42 [19]. After translocation of *Map* across the intestinal epithelium, *Map* is subsequently phagocytised by macrophages in the intestinal lamina propria and submucosa. Upon phagocytosis of *Map* by naïve macrophages, there is both intracellular replication of *Map* and bacterial killing by the host, which reflects an initial T helper 1 (Th 1) or proinflammatory immune response [20–24]. Bacterial killing is due to a rapid phagosomal acidification response by the host that enables phagosome-lysosome fusion and presentation of antigens to T cells via MHC to occur in some infected cells. However, since many phagosomes containing *Map* fail to acquire significant amounts of lysosomal-associated membrane protein (LAMP-1) and to fuse with lysosomes, this can allow *Map* to survive and proliferate inside macrophages. An active role for *Map* in preventing phagosome-lysosome fusion is supported by the observation that live bacteria are able to persist within phagosomes, while phagosome maturation is not interrupted following the uptake of killed *Map* [25, 26]. In addition, recent studies have suggested that *Map* alters the ability of infected macrophages to react to extracellular signals from T cells, particularly through the CD154-CD40 system [27]. This leads to an enhanced IL-10 and TGF- β expression in *Map*-infected macrophages, which favor bacterial survival by suppression of Th-1 responses and IFN- γ in T cells [28–31]. In cattle, clinical signs of infection and bacterial shedding are usually not evident until 2–5 years post-infection (p.i.) [32]. During the subclinical phase of the infection, *Map* persists and slowly proliferates within macrophages of the gut without the innate system being able to clear the infection.

2. Anti-Inflammatory, Antiapoptotic, and Anti-Invasive Responses Induced in Bovine Macrophages Infected with *Mycobacterium avium* Subsp. *paratuberculosis*

Several *in vitro* studies have investigated gene expression profiles induced by *Map* on bovine macrophages obtained from uninfected cattle and on a bovine macrophage cell line (Table 1). Compared to uninfected cultures, *in vitro* challenges of monocytes-derived macrophages (MDMs) from healthy cows with live *Map* resulted in enhanced production of the anti-inflammatory cytokine interleukin-10 (IL-10) at 6, 24, and 72 h p.i. that antagonizes the proinflammatory immune response by downregulating the production of

interleukin-12 (IL-12), tumor necrosis factor- α (TNF- α), and interferon- γ (IFN- γ) as estimated by qRT-PCR [33]. Similarly, other authors also observed a downregulatory trend in TNF- α mRNA expression from 16 h to 96 h p.i. and upregulation of IL-10 mRNA levels that peak from 48 h to 96 h p.i. [34]. Using microarray technology, three cytokines including transforming growth factor- β (TGF- β), interleukin-6 (IL-6), and macrophage inflammatory protein 1 β (MIP 1 β) had greater expression in *Map* infected MDM at 16 h p.i. when compared with inactivated control macrophages [35]. The matrix metalloproteinase (MMP-12) and the thrombospondin-1, both involved in cell migration and tissue destruction, were also significantly upregulated. In contrast, the TNF- β receptor and the major histocompatibility complex (MHC) class II DQ- β had lower expression in *Map*-infected macrophages. Decreased expression of the cell surface MHC class I and class II molecules was previously documented in macrophages phagocytising *Map* organisms indicating a reduced capacity to present antigens to T lymphocytes [44]. Consistently with these results, Murphy et al. also detected high levels of the anti-inflammatory cytokines TGF- β and IL-6 in MDM infected with *Map* at 24 h p.i. [36]. In another study, significantly downregulation in expression of the proinflammatory cytokine IL-1 and of the metalloproteinases MMP-1, MMP-23, and MMP-9 involved in tissue destruction was observed in *Map*-stimulated PBMC when compared with control cells [37]. Using cDNA microarrays focused on expressed sequences from a bovine total leukocyte library (BOLT5) and 10 distinct *Map* strains to measure total transcriptomic alterations in *Map*-infected MDM, a total of 78 annotated bovine genes were found to be differentially expressed at 6 h p.i., relative to uninfected cells [38]. Within the group of differentially expressed genes significant downregulation of two proapoptotic genes, BCL2 antagonist of cell death (BAD) and TNF receptor (TNFR), was observed in *Map*-infected MDM cells relative to uninfected cells. Upregulation of the apoptotic inhibitor BCL2A1 and of the proinflammatory cytokines IL-1 α , IL-1 β , and IL-8 relative to uninfected control cells was also observed. By using a pan-genomic analysis of bovine MDM gene expression in response to *in vitro* infection with *Map*, Machugh et al. revealed that many of the highly upregulated genes at 2 h p.i. had proinflammatory related functions, particularly IL-1 α , IL-1 β , TNF, IL-6, chemokine ligand 2 gene (C-X-C motif CXCL2), and the chemokine ligand 20 gene (C-C motif CCL20) [39]. At 6 h p.i. immune-related genes were among the differentially expressed genes showing the highest relative increase in expression; however, the fold-change induction of these genes was not as high as those detected at 2 h p.i. Upregulated genes at 6 h p.i. included IL-1 β , TNF, CXCL2, CCL4, CCL5, CCL20, CD40, and the complement factor B gene (CFB). Of the differentially expressed gene identified 24 h p.i. that had a known immune function were the serum amyloid A3 genes (SAA3), C-type lectin domain family 4 member E (CLEC4E), C-type lectin domain family 2 member D (CLEC2D), CD40, and CFB. Overall, several pro- and anti-apoptotic genes were upregulated at 2 h and 6 h p.i. suggesting that this process is highly regulated. Pro- and antiapoptotic genes upregulated included TNF (proapoptotic), caspase 1,

TABLE 1: Immune related, apoptosis-related and tissue destruction genes differentially expressed relative to uninfected cells in monocytes-derived macrophages (MDM), peripheral blood mononuclear cells (PBMC), and in a bovine macrophage cell line after stimulation with live bovine isolates of *Map*. Genes upregulated or downregulated in at least three of the studies are shown in bold.

Cell model	<i>Map</i> strain	<i>Map</i> /cells ratio	Assay	Time p.i. (h)	Upregulated genes	Downregulated genes	Reference
MDM ¹	ATCC 19698	10:1	qRT-PCR	6 h	IL-10, GM-CSF	IFN- γ , TNF-	[33]
				24 h	IL-10, GM-CSF		
				72 h	IL-10, GM-CSF; and IL-8	IL-12	
MDM	Field strain B1018	5:1	qRT-PCR	16 h		IL-10, TNF-	[34]
				24 h		IL-10, TNF-	
				48 h	IL-10	TNF-	
MDM	ATCC 19698	10:1	Microarray	96 h	IL-10	TNF-	[35]
				16 h	IL-6, TGF β , Thrombospondin-1, MIP-1 β , and MMP-12	TNFR, MHC class II DQ- β	
				24 h	IL-6, TGF-		
PBMC ²	ATCC 19698	10:1	Microarray	16 h		IL-1, MMP1, MMP23, and MMP9	[37]
MDM	ATCC 19698	5:1	Microarray	6 h	IL-1 β , IL-8, IL-1, and ECL2A1	TNFR, BAD	[38]
MDM	Field strain	2:1	Microarray	2 h	IL-10, IL-6, IL-1, IL-1 β , TNF, CXCL2, CCL20, CFB, CASP-1, CASP-4, CASP-3, CASP-6, BIRC-3, CFLAR, and CD40		[39]
				6 h	IL-1 β , TNF, CXCL2, CCL4, CCL5, CCL20, CD40, CFB, CASP-1, CASP-4, CASP-6, BIRC-3, and CFLAR		
				24 h	SAA3, CLEC4E, CLEC2D, CD40, and CFB		
				4 h	IFN- γ , IL-1, BCL2-1, and TGF-1	IL-6	
BoMac ³	K10	10:1	qRT-PCR	14 h	IL-6, BCL2-1		[40]
				24 h	IL-6, TGF-1, and TNFR-2	MMP2-1, IL-1 α , and BCL2-1	

¹MDM: monocytes-derived macrophages; ²PBMC: peripheral blood mononuclear cells; ³BoMac bovine macrophage cell line.

TABLE 2: Cytokine, apoptosis related, and tissue destruction proteins differentially expressed in a transformed human monocytic cell line, in peripheral blood mononuclear cells (PBMC), and monocytes-derived macrophages (MDM) obtained from Crohn's disease (CD) patients after stimulation with bovine or human isolates of *Map*.

Cell Model	<i>Map</i> strain	<i>Map</i> /cells ratio	Assay	Time p.i. (h)	Upregulated cytokines	Downregulated cytokines	Reference
THP-1 ¹²	Bovine 1018	5:1	Microarray	2h		IL-18, IL-12B, IL-23A, TNF- α , LRDD, and PDC28	[41]
PBMC from CD patients ³	Human ATCC 43019	1:1	Flow cytometry	72 h	IL-10, IL-6, and TNF α	IFN- γ	[42]
MDM from CD patients ³	Human ATCC 43015	10:1	Flow cytometry	3h 72 h	IL-23	TNF- α	[43]

¹THP-1, human monocytic cell line.

²Comparisons were made between uninfected and infected cells.

³Comparisons were made between *Map*-infected macrophages from CD patients and controls.

4, 6, and 8 genes (CASP-1, CASP-4, CASP-6, and CASP-8; all proapoptotic), the baculoviral IAP repeat containing 3 gene (BIRC-3; antiapoptotic), and the FADD-like apoptosis regulator gene (CFLAR; pro- and antiapoptotic).

We recently examined whether *Map* isolates with differential abilities to grow within a bovine macrophage cell line (BoMac) induced a characteristic early immune-inflammatory response [40]. Our results showed significant differences in the expression of several cytokines (IL-6, TGF- β 1, TNF- α 2, IFN- γ , and IL-1 α), proteins related to apoptosis (BCL2-1), or tissue destruction (MMP3-1) after the infection of BoMac cells with a bovine or an ovine isolate of *Map*. The bovine isolate that grew within BoMac cells was a good inducer of the apoptotic inhibitor BCL2-1 at 4 or 14h p.i. which might cause lower levels of apoptosis than in BoMac cells infected with the ovine isolate. In addition, infection of BoMac cells with the bovine isolate resulted in a significant upregulation of the anti-inflammatory cytokines IL-6 and TGF- β 1 at 24 h p.i., when compared with cells infected with the ovine isolate. Although we did not observe significant differences in IL-10 or TNF- α 2 gene expression in BoMac cells infected with the bovine or the ovine isolates at any of the time points, the bovine isolate did induce more IL-10 at 14 and 24 h p.i. and less TNF- α 2 at 4 and 14 h p.i. than did the ovine isolate. These results suggest that lower TNF- α 2 production and an induction of IL-10 are associated with the growth within bovine macrophages of virulent isolates of *Map*. We also observed that cells stimulated with the bovine isolate exhibited lower levels of the metalloproteinase MMP3-1 involved in tissue destruction at 4 h and 24 h p.i. relative to cells stimulated with the ovine isolate. Differences in induction of the metalloproteinase inhibitor TIMP-1 were not statistically significant at any of the time points studied but the bovine isolate did induce more TIMP-1 at 4 h p.i. than did the ovine isolate. The ovine isolate was significantly attenuated in growth in BoMac cells and this decrease in survival within the infected cells correlated with a reduced anti-inflammatory response in the infected cells and with a significantly upregulated proinflammatory immune response generally associated with elimination of *Map* and protection. In particular, the expression of the proinflammatory cytokine

IL-1 α was highly upregulated in cells infected with the ovine isolate at 14 and 24 h p.i. and downregulated in BoMac cells infected with the bovine isolate at 24 h p.i. Because a strong correlation between the intracellular multiplication of the tested isolates and patterns of production of IL-6, TGF- β , MMP3-1, BCL2-1, and IL-1 α was observed, the levels of expression of these specific proteins might be used to discriminate between isolates with differential virulence in the BoMac cellular model.

All together, the results of the transcriptomic studies in bovine macrophages included in this paper suggested that *Map* might stimulated an initial proinflammatory immune response mediated by IL-1 α that is followed by an enhanced anti-inflammatory response mediated by IL-6, IL-10, and TGF- β . In addition, downregulation of the proapoptotic gene TNF- α was consistently observed in different studies. Stimulation of anti-inflammatory and antiapoptotic responses might allow *Map* to successfully persist in bovine macrophages during the persistent, subclinical phase of the infection.

3. Immune-Inflammatory Responses Induced in Human Macrophages Infected with *Map*

Despite the possible role of *Map* in CD, there is not much known about the interaction of *Map* with the human innate immune system (Table 2). A transformed human monocytic cell line (THP1) stimulated with *Map* has shown to differentially respond to infections with well-characterized clinical isolates of *Map* when compared with unstimulated cells. When human THP1 cells were stimulated with bovine or human isolates of *Map* several genes associated with apoptosis and cytokine signalling (LRDD, PDCD-8, IL-12, IL-18, IL 23, and TNF α) were significantly downregulated [41]. Data from this study suggested that the human macrophage responses to *Map* isolates from cattle or human sources, regardless of genotype, follow a common theme of antiapoptotic and anti-inflammatory responses within the host cells, an attribute likely associated with successful infection and persistence.

The response of macrophages from CD patients to live *Map* has been recently addressed. Following *in vitro* exposure to *Map*, PBMC from CD patients secreted significant more amounts of TNF- α , IL-6, and IL-10 when compared to the levels released by PBMC from healthy volunteers [42]. In contrast, the IFN- γ response to *Map* was significantly elevated in PBMC isolated from healthy volunteers compared to PBMC derived from CD patients. In another study, human MDMs obtained from CD patients and controls were infected with *Map*, *Mycobacterium avium* subsp. *avium* (*Mav*), and other live intestinal bacteria such as *Escherichia coli* or *Enterococcus faecalis*, and cytokine levels were evaluated at different time points [43]. The results of this study indicated that macrophages from CD patients showed impaired TNF- α secretion in response to bacterial challenge but augmented IL-23 secretion as compared to macrophages from healthy individuals. It is plausible that the MAP-dependent IL-23 secretion enhancement occurred as consequence of phagocytosis, because the high IL-23 concentrations obtained at 3 h p.i. were not observed at 3 d and 7 d p.i. Differences in cytokine expression after bacterial challenge were not *Map* specific, as other bacteria (*E. coli* and *Mav*) showed similar effects.

Although most of the studies presented in this paper used PBMC or MDM cells *in vitro* stimulated with *Map*, we should indicate that recently Olsen et al. [45] isolated intestinal T cells from intestinal biopsies of CD patients to investigate cellular immune responses to *Map*. Interestingly, they observed that CD patients had a high frequency of *Map* reactive T cells and also a higher frequency of response to *Map* compared to other bacterial antigens. After stimulation with *Map*, intestinal T cells secreted the proinflammatory cytokines IFN- γ and IL-17, and, therefore, a role for *Map* in the excessive inflammation seen in CD cannot be excluded.

4. Conclusions

Despite development of cell-mediated immune responses shortly after infection, *Map* has the capacity to survive and grow in macrophages from human and cattle hosts. Gene expression studies included in this paper allow us to conclude that the inhibition of apoptosis and enhanced expression of inhibitors of macrophage activation could contribute to the early survival and immune escape of *Map*. Common gene expression signatures of bovine and human macrophages in response to *Map* such as enhanced expression of the anti-inflammatory cytokines IL-10 and IL-6, which promote bacterial survival, have been consistently observed. Overexpression of IL-10 could be responsible for the *Map*-associated reduction in the expression of the proapoptotic TNF- α gene observed in many studies. Differential effects on macrophage gene regulation between studies might be caused by the different *in vitro* models, multiplicities of infection, time p.i., and/or microarray platforms used. Although this paper does not suggest a causal effect for *Map*, it does compile the findings that *Map* is able to alter the normal host immune response against a pathogen in susceptible humans and cattle

and contribute to the pathogenesis of Crohn's and John's diseases.

Acknowledgments

Financial support for this work was provided by Grants from the Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA) and by European Funds for Regional Development (FEDER) (FAU2008-00018-C02 and RTA2011-06049). Dr. M. Alonso-Hearn's tenure is partly covered by the INIA tenure track program for the incorporation of Ph. D. graduates into research institutions. N. Abendaño has a fellowship from the Department of Agriculture of the Basque Government. We thank Dr. Luiz Bermudez for helpful discussions. We are grateful to Kyle Hearn for the careful editing of the paper.

References

- [1] S. L. Ott, S. J. Wells, and B. A. Wagner, "Herd-level economic losses associated with John's disease on US dairy operations," *Preventive Veterinary Medicine*, vol. 40, no. 3-4, pp. 179-192, 1999.
- [2] W. Chamberlin, D. Y. Graham, K. Huiten et al., "Review article: *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* as one cause of Crohn's disease," *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, vol. 15, no. 3, pp. 337-346, 2001.
- [3] R. Juste, "Slow infection control by vaccination," *Veterinary Immunology and Immunopathology*, vol. 148, pp. 190-196, 2012.
- [4] R. Juste, "Current strategies for eradication of paratuberculosis and issues in public health," *Veterinary Immunology and Immunopathology*, vol. 148, pp. 16-22, 2012.
- [5] S. A. Naser, I. Shafran, D. Schwartz, F. El-Zaatari, and J. Biggerstaff, "In situ identification of mycobacteria in Crohn's disease patient tissue using confocal scanning laser microscopy," *Molecular and Cellular Probes*, vol. 16, no. 1, pp. 41-48, 2002.
- [6] S. A. Naser, G. Ghobrial, C. Romero, and J. F. Valentine, "Culture of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* from the blood of patients with Crohn's disease," *The Lancet*, vol. 364, no. 9439, pp. 1039-1044, 2004.
- [7] R. B. Gearry, J. M. Aitken, R. L. Roberts, S. Ismail, J. Keenan, and M. L. Barclay, "Gastrointestinal: *Mycobacterium avium paratuberculosis* and Crohn's disease," *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, vol. 20, no. 12, p. 1943, 2005.
- [8] A. M. Scanu, T. J. Bull, S. Cannas et al., "*Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection in cases of irritable bowel syndrome and comparison with Crohn's disease and John's disease: common neural and immune pathogenicities," *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 45, no. 12, pp. 3883-3890, 2007.
- [9] R. A. Juste, N. Elguezaal, A. Pavón et al., "Association between *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* DNA in blood and cellular and humoral immune response in inflammatory bowel disease patients and controls," *International Journal of Infectious Diseases*, vol. 13, no. 2, pp. 247-254, 2009.
- [10] R. A. Juste, N. Elguezaal, J. M. Garrido et al., "On the prevalence of *M. avium* subspecies *paratuberculosis* DNA in the blood of healthy individuals and patients with inflammatory bowel disease," *PLoS ONE*, vol. 3, article e2537, 2008.
- [11] I. Abubakar, D. Myhill, S. H. Aliyu, and P. R. Hunter, "Detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* from

- patients with Crohn's disease using nucleic acid-based techniques: a systematic review and meta-analysis," *Inflammatory Bowel Diseases*, vol. 14, no. 3, pp. 401–410, 2008.
- [12] M. Feller, K. Huwiler, R. Stephan et al., "Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis and Crohn's disease: a systematic review and meta-analysis," *Lancet Infectious Diseases*, vol. 7, no. 9, pp. 607–613, 2007.
- [13] E. S. Pierce, "Possible transmission of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis through potable water: lessons from an urban cluster of Crohn's disease," *Gut Pathogens*, vol. 23, p. 17, 2009.
- [14] R. J. Chiodini and J. Hermon-Taylor, "The thermal resistance of *Mycobacterium paratuberculosis* in raw milk under conditions simulating pasteurization," *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, vol. 37, pp. 1645–1648, 1993.
- [15] M. Alonso-Hearn, E. Molina, M. Geijo et al., "Isolation of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis from muscle tissue of naturally infected cattle," *Foodborne Pathogens and Disease*, vol. 6, no. 4, pp. 513–518, 2009.
- [16] E. Momotani, D. L. Whipple, A. B. Thiermann, and N. F. Cheville, "Role of M cells and macrophages in the entrance of *Mycobacterium paratuberculosis* into domes of ileal Peyer's patches in calves," *Veterinary Pathology*, vol. 25, no. 2, pp. 131–137, 1988.
- [17] N. B. Harris and R. G. Barletta, "Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in veterinary medicine," *Clinical Microbiology Reviews*, vol. 14, no. 3, pp. 489–512, 2001.
- [18] L. E. Bermudez, M. Petrofsky, S. Sommer, and R. G. Barletta, "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," *Infection and Immunity*, vol. 78, no. 8, pp. 3570–3577, 2010.
- [19] M. Alonso-Hearn, D. Patel, L. Danelishvili, L. Meunier-Goddik, and L. E. Bermudez, "The *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis MAP3464 gene encodes an oxidoreductase involved in invasion of bovine epithelial cells through the activation of host cell Cdc42," *Infection and Immunity*, vol. 76, no. 1, pp. 170–178, 2008.
- [20] S. Alonso, K. Pethe, D. G. Russell, and G. E. Purdy, "Lysosomal killing of *Mycobacterium* mediated by ubiquitin-derived peptides is enhanced by autophagy," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 104, no. 14, pp. 6031–6036, 2007.
- [21] M. T. Rowe and I. R. Grant, "Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis and its potential survival tactics," *Letters in Applied Microbiology*, vol. 42, no. 4, pp. 305–311, 2006.
- [22] S. R. Woo, J. A. Heintz, R. Albrecht, R. G. Barletta, and C. J. Czuprynski, "Life and death in bovine monocytes: the fate of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis," *Microbial Pathogenesis*, vol. 43, no. 2, pp. 106–113, 2007.
- [23] B. Y. Zhao, C. J. Czuprynski, and M. T. Collins, "Intracellular fate of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis in monocytes from normal and infected, interferon-responsive cows as determined by a radiometric method," *Canadian Journal of Veterinary Research*, vol. 63, no. 1, pp. 56–61, 1999.
- [24] M. P. Kuehnel, R. Goethe, A. Habermann et al., "Characterization of the intracellular survival of *Mycobacterium avium* ssp. paratuberculosis: phagosomal pH and fusogenicity in J774 macrophages compared with other mycobacteria," *Cellular Microbiology*, vol. 3, no. 8, pp. 551–566, 2001.
- [25] J. P. Bannantine and J. R. Stabel, "Killing of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis within macrophages," *BMC Microbiology*, vol. 2, no. 1, p. 2, 2002.
- [26] J. Hostetter, E. Steadham, J. Haynes, T. Bailey, and N. Cheville, "Phagosomal maturation and intracellular survival of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis in J774 cells," *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, vol. 26, no. 4, pp. 269–283, 2003.
- [27] S. Sommer, C. B. Pudrith, C. J. Colvin, and P. M. Coussens, "Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis suppresses expression of IL-12p40 and iNOS genes induced by signalling through CD40 in bovine monocyte-derived macrophages," *Veterinary Immunology and Immunopathology*, vol. 128, no. 1–3, pp. 44–52, 2009.
- [28] P. M. Coussens, "Model for immune responses to *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis in cattle," *Infection and Immunity*, vol. 72, no. 6, pp. 3089–3096, 2004.
- [29] M. S. Khalifeh and J. R. Stabel, "Effects of gamma interferon, interleukin-10, and transforming growth factor β on the survival of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis in monocyte-derived macrophages from naturally infected cattle," *Infection and Immunity*, vol. 72, no. 4, pp. 1974–1982, 2004.
- [30] D. J. Weiss, O. A. Evanson, C. de Souza, and M. S. Abrahamsen, "A critical role of interleukin-10 in the response of bovine macrophages to infection by *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis," *American Journal of Veterinary Research*, vol. 66, no. 4, pp. 721–726, 2005.
- [31] D. E. de Almeida, C. J. Colvin, and P. M. Coussens, "Antigen-specific regulatory T cells in bovine paratuberculosis," *Veterinary Immunology and Immunopathology*, vol. 125, no. 3–4, pp. 234–245, 2008.
- [32] R. J. Chiodini, H. J. Van Kruijningen, and R. S. Merkal, "Ruminant paratuberculosis (Johne's disease): the current status and future prospects," *The Cornell Veterinarian*, vol. 74, no. 3, pp. 218–262, 1984.
- [33] D. J. Weiss, O. A. Evanson, A. Moritz, M. Q. Deng, and M. S. Abrahamsen, "Differential responses of bovine macrophages to *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis and *Mycobacterium avium* subsp. avium," *Infection and Immunity*, vol. 70, no. 10, pp. 5556–5561, 2002.
- [34] H. K. Janagama, K. I. Jeong, V. Kapur, P. Coussens, and S. Sreevatsan, "Cytokine responses of bovine macrophages to diverse clinical *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis strains," *BMC Microbiology*, vol. 6, p. 10, 2006.
- [35] D. J. Weiss, O. A. Evanson, M. Deng, and M. S. Abrahamsen, "Gene expression and antimicrobial activity of bovine macrophages in response to *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis," *Veterinary Pathology*, vol. 41, no. 4, pp. 326–337, 2004.
- [36] J. T. Murphy, S. Sommer, E. A. Kabara et al., "Gene expression profiling of monocyte-derived macrophages following infection with *Mycobacterium avium* subspecies avium and *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis," *Physiological Genomics*, vol. 28, no. 1, pp. 67–75, 2006.
- [37] P. M. Coussens, C. J. Colvin, G. J. M. Rosa, J. Perez Laspiur, and M. D. Elftman, "Evidence for a novel gene expression program in peripheral blood mononuclear cells from *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis-infected cattle," *Infection and Immunity*, vol. 71, no. 11, pp. 6487–6498, 2003.
- [38] E. Kabara, C. C. Kloss, M. Wilson et al., "A large-scale study of differential gene expression in monocyte-derived macrophages

- infected with several strains of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*,” *Briefings in Functional Genomics and Proteomics*, vol. 9, no. 3, pp. 220–237, 2010.
- [39] D. E. Machugh, M. Taraktsoglou, K. E. Killick et al., “Pan-genomic analysis of bovine monocyte-derived macrophage gene expression in response to in vitro infection with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*,” *Veterinary Research*, vol. 43, p. 25, 2012.
- [40] N. Abendaño, I. A. Sevilla, J. M. Garrido, J. M. Prieto, R. A. Juste, and M. Alonso-Hearn, “*Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* isolates from sheep and goats show reduced persistence in bovine macrophages than cattle, bison, deer and wild boar strains regardless of genotype,” *Veterinary Microbiology*. In press.
- [41] A. S. Motiwala, H. K. Janagama, M. L. Paustian et al., “Comparative transcriptional analysis of human macrophages exposed to animal and human isolates of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* with diverse genotypes,” *Infection and Immunity*, vol. 74, no. 11, pp. 6046–6056, 2006.
- [42] S. Sibartie, P. Scully, J. Keohane et al., “*Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) as a modifying factor in Crohn’s disease,” *Inflammatory Bowel Diseases*, vol. 16, no. 2, pp. 296–304, 2010.
- [43] N. Campos, F. Magro, A. R. Castro et al., “Macrophages from IBD patients exhibit defective tumour necrosis factor- α secretion but otherwise normal or augmented pro-inflammatory responses to infection,” *Immunobiology*, vol. 216, no. 8, pp. 961–970, 2011.
- [44] D. J. Weiss, O. A. Evanson, D. J. McClenahan, M. S. Abrahamson, and B. K. Walcheck, “Regulation of expression of major histocompatibility antigens by bovine macrophages infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* or *Mycobacterium avium* subsp. *avium*,” *Infection and Immunity*, vol. 69, no. 2, pp. 1002–1008, 2001.
- [45] I. Olsen, S. Tollefsen, C. Aagaard et al., “Isolation of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* reactive CD4 T cells from intestinal biopsies of Crohn’s disease patients,” *PLoS ONE*, vol. 22, p. 5641, 2009.

PUBLICACIÓN III

***Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* isolates from sheep and goats show reduced persistence in bovine macrophages than cattle, bison, deer and wild boar strains regardless of genotype.**

Abendaño N, Sevilla IA, Prieto JM, Garrido JM, Juste RA, Alonso-Hearn M.

Veterinary Microbiology, 163:325-334.



Mycobacterium avium subspecies *paratuberculosis* isolates from sheep and goats show reduced persistence in bovine macrophages than cattle, bison, deer and wild boar strains regardless of genotype

Naiara Abendaño^a, Iker A. Sevilla^a, José Miguel Prieto^b, Joseba M. Garrido^a, Ramon A. Juste^a, Marta Alonso-Hearn^{a,*}

^a Department of Animal Health, Basque Institute for Agricultural Research and Development, NEIKER-Tecnalia, Technological Park of Bizkaia, Berreaga 1, Derio, E-48160 Bizkaia, Spain

^b Department of Agriculture of the Regional Government of the Principality of Asturias, Serida, Grado, Asturias, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 14 August 2012

Received in revised form 17 December 2012

Accepted 24 December 2012

Keywords:

M. avium subsp. *paratuberculosis*

Bovine macrophages

Host–pathogen interaction

Host adaptation

Host response

Strain diversity

Pathogenesis

ABSTRACT

Assessment of the virulence of isolates of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (*Map*) exhibiting distinct genotypes and isolated from different hosts may help to clarify the degree to which clinical manifestations of the disease in cattle can be attributed to bacterial or to host factors. The objective of this study was to test the ability of 10 isolates of *Map* representing distinct genotypes and isolated from domestic (cattle, sheep, and goat), and wildlife animal species (fallow deer, deer, wild boar, and bison) to enter and grow in bovine macrophages. The isolates were previously typed using IS1311 PCR followed by restriction endonuclease analysis into types C, S or B. Intracellular growth of the isolates in a bovine macrophage-like cell line (BoMac) and in primary bovine monocyte-derived macrophages (MDM) was evaluated by quantification of CFU numbers in the initial inoculum and inside of the host cells at 2 h and 7 d p.i. using an automatic liquid culture system (Bactec MGIT 960). Individual data illustrated that growth was less variable in BoMac than in MDM cells. All the isolates from goat and sheep hosts persisted within BoMac cells in lower CFU numbers than the other tested isolates after 7 days of infection regardless of genotype. In addition, BoMac cells exhibited differential inflammatory, apoptotic and destructive responses when infected with a bovine or an ovine isolate; which correlated with the differential survival of these strains within BoMac cells. Our results indicated that the survival of the tested *Map* isolates within bovine macrophages is associated with the specific host from which the isolates were initially isolated.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Mycobacterium avium subsp. *paratuberculosis* (*Map*) is the causal agent of Johne's disease or paratuberculosis, a chronic gastrointestinal disease of domestic and wildlife animal species. Broadly speaking, *Map* isolates can be

classified in two genotypes based on culture characteristics and on genome analysis: sheep isolates (also called "S type" or "type I") and cattle isolates (also called "C type" or "type II") (Collins et al., 1990; Stevenson et al., 2002). Single nucleotide polymorphism analysis of the IS1311 insertion sequence distinguishes three types of strains: S, C and B (Whittington et al., 2001a). Although the classification of strains into C, S or B types may reflect a host preference, isolates of *Map* can cross these species barriers and be isolated from a broad range of animal species

* Corresponding author. Tel.: +34 944 034350; fax: +34 944 034310.
E-mail address: malonso@neiker.net (M. Alonso-Hearn).

(Muskens et al., 2001; Moloney and Whittington, 2008; Stevenson et al., 2009). *Map* is endocytosed by the M cells of the ileal Peyer's patches and subsequently phagocytosed by subepithelial and intraepithelial macrophages (Harris and Barletta, 2001; Bermudez et al., 2010). Once inside host macrophages, there is both intracellular replication of *Map* and bactericidal activity by the host which reflects an initial T-helper 1 (Th1) cellular immune response (Zhao et al., 1999; Rowe and Grant, 2006; Alonso et al., 2007; Woo et al., 2007). However, since many phagosomes containing *Map* fail to mature, this can lead to intracellular persistence.

We recently refined a method to quantitate *Map* by generating equations that relate the time to detection (TDD) recorded in an automatic liquid culture system (Bactec MGIT 960) to the estimated \log_{10} CFU numbers present in an inoculum (Abendaño et al., 2012). In the present study, this method was used to assess the growth in bovine macrophages of 10 isolates of *Map* representing distinct genotypes and isolated from a diverse range of hosts. We then evaluated the characteristics of the cytokine profile generated in bovine macrophages by two of the *Map* isolates that exhibited differential intracellular growth pattern. The identification of isolates of *Map* with differential virulence may assist in further elucidating the pathogenesis of paratuberculosis and in the design of better strategies for controlling the infection.

2. Materials and methods

2.1. *Map* isolates, bacterial culture and preparation of bacterial suspensions

Nine *Map* isolates from cattle (*Bos taurus*), sheep (*Ovis aries*), goat (*Capra aegagrus hircus*), red deer (*Cervus elaphus*), fallow deer (*Dama dama*), bison (*Bison bison*) and wild boar (*Sus scrofa*) species were selected from the collection of isolates at the Mycobacteria laboratory, NEIKER-Tecnalia, on the basis of varied hosts and genomic profiles as per Sevilla et al. (2007). These isolates of *Map* were previously recovered from fecal or tissue specimens of domestic or wildlife animal species and maintained as glycerol stocks at -80°C (Aduroz et al., 1995; Sevilla et al., 2005). Aliquots of these glycerol stocks were utilized to directly inoculate all subsequent cultures for use in infection of macrophages, so that all infections were performed with organisms which had undergone only one previous laboratory passage. Most of the specimens were collected in several geographic areas of Spain, but two strains isolated in Portugal and United States were also included in the study. *Map* reference strain K10, a sequenced and laboratory-adapted strain recovered from a clinical case of paratuberculosis, was obtained from the American Type Culture Collection (ATCC) (Manassas, VA). The 10 isolates of *Map* selected for our study were grown in T25 tissue culture flasks at $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$ for up to 3 months in 10 ml of Middlebrook 7H9 broth (Difco Laboratories, Detroit, MI) supplemented with 10% (v/v) oleic acid-albumin-dextrose-catalase (OADC) (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ), 0.05% (w/v) Tween-80 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) and

2 mg l^{-1} of Mycobactin J (Allied Monitor Inc., Fayette, MO). Bacterial cells were harvested by centrifugation at $2000 \times g$ for 20 min in a Beckman Coulter Allegra X-12 centrifuge. Bacterial pellets were washed three times with sterile Hanks balanced salt solution (HBSS), resuspended in 2 ml of HBSS, and the resultant suspension was passed 20 times through a 27-gauge needle in order to declump cells. The turbidity of the bacterial suspension was adjusted to a McFarland standard of 1 with a Densimat (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France). Only the top fraction of the suspension containing dispersed bacteria was used for the infection assays.

2.2. BoMac and monocyte-derived macrophages culture

A SV40-transformed bovine peritoneal macrophage cell line (BoMac) was obtained from Dr. J.R. Stabel and maintained as previously described (Stabel and Stabel, 1995). For isolation of bovine mononuclear cells, peripheral blood was collected from the jugular vein of healthy Holstein cows older than 24 months at the time of slaughter. The blood was collected into heparinised Vacutainer tubes (Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD), transferred under sterile conditions into sterile glass bottles and diluted 1:2 in HBSS. Twenty-five millilitres of blood:HBSS were layered over 10 ml of Ficoll-Paque (1084 g/cm^3) (GE HealthCare Bio-Sciences, Uppsala, Sweden) in 50-ml centrifuge tubes. Cells were centrifuged at $900 \times g$ for 30 min to separate erythrocytes and polymorphonuclear cells from peripheral blood mononuclear cells (PBMC). PBMC were collected from the HBSS-Ficoll-Paque interface and washed three times with HBSS by centrifugation at $400 \times g$ for 10 min. The isolated PBMC were resuspended in RPMI-1640 supplemented with 20 mM L-glutamine, 10% heat-inactivated fetal bovine serum, 100 U/ml of penicillin and $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ of streptomycin (Lonza, Verviers, Belgium). PBMC were seeded at a density of 1×10^6 PBMC/ml into 24-well tissue culture plates and incubated for 2 h at 37°C in a 5% CO_2 incubator. Non-adherent cells were removed by washing twice with HBSS. Adherent cells were incubated for 7 days at 37°C in supplemented RPMI-1640 medium to allow differentiation to monocyte-derived macrophages (MDM) prior to infection with *Map*.

2.3. Infection of BoMac cells and bovine MDM with *Map*

Briefly, BoMac cells or differentiated MDM were inoculated in triplicate with 100 μl of single-cell suspensions of each of the 10 *Map* isolates (McFarland standard of 1). This level of infection did not alter cell viability over a 1-week assay as was previously assessed by Trypan blue staining. After a 2 h infection time, the supernatant was removed and the cells were washed twice with HBSS to remove extracellular bacteria. Infected macrophages were lysed at this time point (considered as day 0) or cultured in supplemented RPMI-1640 medium without antibiotics at 37°C for 7 days (day 7). At each time point, the supernatant was aspirated and infected macrophages were lysed by vigorous pipetting with 0.5 ml of 0.1% Triton X-100 (Sigma-Aldrich) in sterile water for 10 min.

Table 1
IS1311 PCR-REA types, PFGE profiles, and estimations of span, K, and plateau for the quantification of each *Map* isolate in the Bactec MGIT 960 system.^a

Isolate code	Region/country	Host	IS 1311 PCR-REA type	PFGE profile	Span	K	Plateau
K10	United States	Cattle	C	1-1	11.48	0.0503	-1.316
6	Cantabria/Spain	Cattle	C	52-1	16.44	0.0220	-6.080
P381	Aragón/Spain	Sheep	C	2-1	9.972	0.0211	-0.634
2349/06-1	Portugal	Sheep	S	–	11.82	0.0724	3.222
711	Bizkaia/Spain	Goat	C	2-1	17.25	0.0301	-8.208
311	Menorca/Spain	Goat	S	16-47	9.511	0.0612	3.016
855	Toledo/Spain	Deer	C	68-1	10.95	0.1927	1.317
622/07	Asturias/Spain	Fallow Deer	C	–	21.06	0.0106	-11.25
681	Toledo/Spain	Wild boar	C	2-1	8.755	0.0486	0.760
6.1	United States	Bison	B	2-1	13.35	0.0881	1.710

^a Growth of all the isolates in the Bactec MGIT 960 system fitted to a one-phase exponential-decay model according to the following equation (\log_{10} inoculum size = span $\times e^{-K \times \text{TTD}}$ + plateau). Span is the difference between TTD at time zero and the plateau, K is the degree of decay for the \log_{10} CFU, and plateau is the value for \log_{10} CFU curve flattening.

2.4. Viable *Map* quantification using the Bactec MGIT 960 system

Supplemented Mycobacteria Growth indicator tubes (MGIT) (Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD) were inoculated with 0.1 ml of each initial bacterial suspension or with 0.5 ml of the cell lysates for each time point. Each MGIT tube contained 7 ml of modified Middlebrook 7H9 broth base with casein peptone and an oxygen-sensitive fluorescent compound (tris-4,7-diphenyl-1,10-phenanthroline ruthenium chloride penta-hydrate) embedded in silicone on the bottom of the tube. Each tube was supplemented with 800 μ l of an enrichment supplement (BBL MGIT OADC growth supplement) and an antibiotic mixture (BBL MGIT PANTA Antibiotic Mixture) (Becton, Dickinson and Company). It is very well established that egg yolk is necessary for *Map* primary isolation but not for subculture (Cousins et al., 1995). Since all infections in MDM and BoMac cells were performed with *Map* organisms which had undergone one previous laboratory passage, the addition of egg yolk to MGIT tubes was unnecessary. The tubes were also supplemented with 2 μ g ml⁻¹ of Mycobactin J. Inoculated vials were incubated at 37 \pm 2 °C for up to 41 days in the Bactec MGIT 960 instrument (Becton, Dickinson and Company) and were monitored automatically every hour for an increase of fluorescence. The earliest instrumental indication of positivity (i.e., time to detection (TTD)) for each tube was recorded. Any tube that was identified as positive was removed from the instrument, and a sample was tested by PCR to confirm the presence of *Map*. If a tube did not signal positive before 42 days (6 weeks) of incubation, it was removed from the instrument and determined to be negative. The predicted number of bacilli in each positive tube was calculated by using previously generated mathematical formulas which relates TTD (in days) to estimated \log_{10} CFU numbers for each specific *Map* isolate (Table 1) (Abendaño et al., 2012).

2.5. Assessment of uptake, intracellular growth and persistence of *Map* isolates in BoMac cells

Mean \log_{10} CFU numbers from three replicate assays were calculated and statistically analyzed to compare the uptake, growth and persistence of the selected *Map* isolates

in BoMac cells. The percentages of uptake were calculated as the percentages of the inoculated bacteria that were recovered from each cell lysate at day 0. The intracellular growth of each isolate was expressed as the mean \log_{10} increases in numbers of intracellular CFU from day 0 through day 7 of infection, calculated as the difference between day 7 and day 0 \log_{10} CFU numbers. Growth ratios (fold) between day 0 and day 7 were calculated by dividing the number of \log_{10} CFU numbers at day 7 by that at day 0. A growth ratio greater than 1 indicated that the strain exhibited multiplication inside bovine macrophages, whereas a growth ratio of less than 1 indicated that the bacteria was engulfed and gradually killed by macrophages. The ability of each *Map* isolate to persist within host cells is presented as the \log_{10} CFU at day 7.

2.6. RNA isolation, c-DNA synthesis, and detection of several cytokines and proteins involved in apoptosis or tissue destruction by a two-step quantitative reverse-transcription PCR (qRT-PCR)

BoMac cells were cultured and inoculated with two isolates of *Map* exhibiting differential growth pattern in bovine macrophages (isolates 6 and 2349/06-1). Uninfected cells were used as controls. At 4, 14 and 24 h p.i., the infected BoMac cells were lysed in 1 ml of Trizol and the total RNA was extracted following the manufacturer's instructions (Life Technologies, Carlsbad, California). The extracted RNA was treated with Turbo DNase I (Life Technologies) for 20 min at 37 °C to eliminate genomic DNA contamination from the total RNA. The purity and yield of the RNA samples was analyzed using a NanoDrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific, Wilmington, DE). RNA quality was determined by measuring the 260/280-nm absorbance ratio, and ratios of 1.8 or higher were considered acceptable for purified RNA. Total RNA was then reverse transcribed to c-DNA using the SuperScript VILO cDNA synthesis kit following the manufacturer's instructions (Life Technologies). The reaction mixtures contained 2 μ l of 10 X SuperScript Enzyme Mix, 4 μ l of 5 X VILO Reaction Mix and 0.5 μ g of RNA in a 20 μ l cDNA synthesis reaction. Control reactions, lacking reverse transcriptase, were performed for every RNA sample. The reaction mixtures were incubated at 25 °C for 10 min,

Table 2
Genes and primer sequences used in the qRT-PCR assays.

Code sequence protein in GenBank	Name	Abbreviation	Primers code/sequence (5'–3')	Concn. (nM)
AAA30583	Interleukin 1-alpha	IL1 α	1F CAGTTGCCATCCAAAGTTGTT 2R TGCCATGTGCACCAATTTT	200
ABX72069	Interleukin 6	IL6	5F GGTGCTCCTG-GTGATGACTTC 6R GGGTGGTGTCTATTTTGAAATCTT	100
XP_586521	Matrix metalloproteinase 3	MMP3-1	15F TGATGTCGACGGCATTTCAGT 16R GGGCACCACA GGGTCATTAG	200
NP_776896	TIMP Metalloproteinase inhibitor 1	TIMP-1	17F ATGCTGCTGGTTGTGAGGAAT 18R TGTCGCTCTGCAGTTTGCA	200
ABX72072	Interleukin 10	IL10	25F CTGTGCGGAAATGATCCAGTTTT 26R TCAGGCCCGTGGTCTCA	200
XP_592497	Transforming growth factor, beta 1	TGF β -1	27F TGAGCCAGAGCGGGACTACT 28R TGCCGTATTCACCAATTAGCA	200
NP_776391	Tumor necrosis factor, member 2	TNF α -2	29F CGCATTGCAGTCTCTACCA 30R GGGCTCTTGA TGGCAGACA	100
NP_776511	Interferon gamma	IFN γ	33F GGTCAATCAAGGAGCATGGA 34R GGTGCCATTCAGAACTTCTGA	100
NP01070954	Nuclear gene encoding mitochondrial protein	BCL2-1	41F CACCCACAGGACAGCATA 42R CGTCCCGGAA GAGTTCATT C	100
AAM98378	Beta-actin	β -actin	43F ATGCTTCTAGCGGACTGT TAG 44R ACAATAAAGCCATGCCAATCT	200

42 °C for 90 min and 85 °C for 5 min. Real-time qPCR primers for the amplification of each selected host gene were designed using PrimerExpress 3.0 software and verified for theoretical non-specific annealing with Primer-Blast. Table 2 shows the list of the amplified bovine genes and the corresponding primer sequences. Briefly, real-time qPCR reactions were carried out in 20- μ l reaction mixtures containing 10 μ l of SYBR GreenER qPCR Supermix Universal (Life Technologies), the optimum concentration for each pair of primers and 1 μ l of cDNA. Previously, we determined the concentration of each pair of primers (50, 100 or 200 nM) that provided optimal assay performance (minimum C_T and maximum ΔR_n) using c-DNA synthesized from non-infected cells as template, but did not produce nonspecific product formation with negative controls (Table 2). Real-time qPCR amplifications of cDNA were accomplished using the ABIPrism 7500 detection system (Applied Biosystem, Carlsbad, CA) under the following conditions: 1 cycle of 50 °C for 2 min, 95 °C for 10 min; 40 cycles of denaturation at 95 °C for 15 s, annealing at 60 °C for 60 s, and a melting curve analysis to measure the specificity of the amplification. Since the β -actin gene is constitutively expressed, it was used as the endogenous control in the assays. To determine the changes in gene expression (n-fold) or relative quantitation (RQ), the following formula was used: $RQ = 2^{-\Delta(\Delta C_T)}$ where ΔC_T is C_T (target) – C_T (β -actin) and $\Delta(\Delta C_T)$ is ΔC_T (experimental) – ΔC_T (control). Results were expressed as relative quantification of transcription compared to those of control uninfected cells.

2.7. Statistical analysis

Fisher's exact test was employed to compare percentages of uptake (GraphPad Software, San Diego, CA). Intracellular growth after 7 days calculated as the mean \log_{10} increase in

numbers of intracellular CFU between days 0 and 7 of culture, and \log_{10} CFU at day 7 for all the isolates were compared by one-way analysis of variance (ANOVA) with the Tukey–Kramer multiple-comparison post-test of the InStat v 3.10 for Windows 95 (GraphPad Software). \log_{10} CFU numbers in the initial inoculum and at day 0 and 7 in BoMac and MDM were also compared by ANOVA with the GLM procedure of the SAS Software (SAS Institute Inc., Cary, NC). In the analysis; time p.i. (0 and 7 days), strain genotype (C, S and B), host of origin (cattle, sheep, goat, deer, bison, wild-boar, and fallow-deer) and cell model (BoMac and MDM) were considered as main effects. Statistical analysis of cytokine production, and \log_{10} CFU numbers at days 0 and 7 for each *Map* isolate were compared by a *t*-test (GraphPad Software). In all analyses, differences were considered significant when *P* values were <0.05.

3. Results

3.1. Infection with *Map* isolates is less variable in BoMac than MDM cells

BoMac cells were inoculated in triplicate with 10 *Map* isolates. Isolate code, genotype, country of isolation, and host of origin for each isolate are summarized in Table 1. The estimated \log_{10} CFU present in the initial bacterial inoculum and after 2 h (day 0) or 7 days (day 7) of infection were estimated for each *Map* isolate using previously generated mathematical equations (Abendaño et al., 2012). These algorithms relate TTD (in days) recorded in the Bactec MGIT 960 system to the estimated \log_{10} CFU numbers present in a bacterial inoculum (Table 1). Since these equations are isolate-specific, they take into account the specific ability of each *Map* isolate to grow in MGIT tubes. Variations among the means of the estimated initial inoculums for all the isolates included in triplicate assays

Table 2
Genes and primer sequences used in the qRT-PCR assays.

Code sequence protein in GenBank	Name	Abbreviation	Primers code/sequence (5'–3')	Concn. (nM)
AAA30583	Interleukin 1-alpha	IL1 α	1F CAGTTGCCATCCAAAGTTGTT 2R TGCCATGTGCACCAATTTT	200
ABX72069	Interleukin 6	IL6	5F GGTGCTCCTGGTGATGACTTC 6R GGGTGGTGTCTATTTTGAATCTT	100
XP_586521	Matrix metalloproteinase 3	MMP3-1	15F TGATGTCGACGGCATTTCAGT 16R GGGCACCACA GGGTCATTAG	200
NP_776896	TIMP Metalloproteinase inhibitor 1	TIMP-1	17F ATGCTGCTGGTTGTGAGGAAT 18R TGTCGCTCTGCAGTTTGCA	200
ABX72072	Interleukin 10	IL10	25F CTGTGCGAAATGATCCAGTTTT 26R TCAGGCCCGTGGTCTCA	200
XP_592497	Transforming growth factor, beta 1	TGF β -1	27F TGAGCCAGAGCGGACTACT 28R TGCCGTATTCACCAATTAGCA	200
NP_776391	Tumor necrosis factor, member 2	TNF α -2	29F CGCATTGCAGTCTCTACCA 30R GGGCTCTTGA TGGCAGACA	100
NP_776511	Interferon gamma	IFN γ	33F GGTCAATCAAGGAGCATGGA 34R GGTGCCATTCAGAACTTCTGA	100
NP01070954	Nuclear gene encoding mitochondrial protein	BCL2-1	41F CACCCACAGGACAGCATA 42R CGTCCCGGAA GAGTTCATT C	100
AAM98378	Beta-actin	β -actin	43F ATGCTTCTAGCGGACTGT TAG 44R ACAATAAAGCCATGCCAATCT	200

42 °C for 90 min and 85 °C for 5 min. Real-time qPCR primers for the amplification of each selected host gene were designed using PrimerExpress 3.0 software and verified for theoretical non-specific annealing with Primer-Blast. Table 2 shows the list of the amplified bovine genes and the corresponding primer sequences. Briefly, real-time qPCR reactions were carried out in 20- μ l reaction mixtures containing 10 μ l of SYBR GreenER qPCR Supermix Universal (Life Technologies), the optimum concentration for each pair of primers and 1 μ l of cDNA. Previously, we determined the concentration of each pair of primers (50, 100 or 200 nM) that provided optimal assay performance (minimum C_T and maximum ΔR_n) using c-DNA synthesized from non-infected cells as template, but did not produce nonspecific product formation with negative controls (Table 2). Real-time qPCR amplifications of cDNA were accomplished using the ABIPrism 7500 detection system (Applied Biosystem, Carlsbad, CA) under the following conditions: 1 cycle of 50 °C for 2 min, 95 °C for 10 min; 40 cycles of denaturation at 95 °C for 15 s, annealing at 60 °C for 60 s, and a melting curve analysis to measure the specificity of the amplification. Since the β -actin gene is constitutively expressed, it was used as the endogenous control in the assays. To determine the changes in gene expression (n-fold) or relative quantitation (RQ), the following formula was used: $RQ = 2^{-\Delta(\Delta C_T)}$ where ΔC_T is C_T (target) – C_T (β -actin) and $\Delta(\Delta C_T)$ is ΔC_T (experimental) – ΔC_T (control). Results were expressed as relative quantification of transcription compared to those of control uninfected cells.

2.7. Statistical analysis

Fisher's exact test was employed to compare percentages of uptake (GraphPad Software, San Diego, CA). Intracellular growth after 7 days calculated as the mean \log_{10} increase in

numbers of intracellular CFU between days 0 and 7 of culture, and \log_{10} CFU at day 7 for all the isolates were compared by one-way analysis of variance (ANOVA) with the Tukey–Kramer multiple-comparison post-test of the InStat v 3.10 for Windows 95 (GraphPad Software). \log_{10} CFU numbers in the initial inoculum and at day 0 and 7 in BoMac and MDM were also compared by ANOVA with the GLM procedure of the SAS Software (SAS Institute Inc., Cary, NC). In the analysis; time p.i. (0 and 7 days), strain genotype (C, S and B), host of origin (cattle, sheep, goat, deer, bison, wild-boar, and fallow-deer) and cell model (BoMac and MDM) were considered as main effects. Statistical analysis of cytokine production, and \log_{10} CFU numbers at days 0 and 7 for each *Map* isolate were compared by a *t*-test (GraphPad Software). In all analyses, differences were considered significant when *P* values were <0.05.

3. Results

3.1. Infection with *Map* isolates is less variable in BoMac than MDM cells

BoMac cells were inoculated in triplicate with 10 *Map* isolates. Isolate code, genotype, country of isolation, and host of origin for each isolate are summarized in Table 1. The estimated \log_{10} CFU present in the initial bacterial inoculum and after 2 h (day 0) or 7 days (day 7) of infection were estimated for each *Map* isolate using previously generated mathematical equations (Abendaño et al., 2012). These algorithms relate TTD (in days) recorded in the Bactec MGIT 960 system to the estimated \log_{10} CFU numbers present in a bacterial inoculum (Table 1). Since these equations are isolate-specific, they take into account the specific ability of each *Map* isolate to grow in MGIT tubes. Variations among the means of the estimated initial inoculums for all the isolates included in triplicate assays

Table 3
Entry and intracellular growth of *Map* isolates and the reference strain K10 in BoMac cells.

Isolate code	Host-IS1311 PCR/REA type	Entry (%) ^a	Estimated log ₁₀ CFU (± SD) ^b		Fold ^d	Relative increases in log ₁₀ CFU ^e
			Day 0 ^c	Day-7		
K10	Cattle C	70.91	4.03 (± 0.31)	7.42 (± 0.65)	1.84 ^f	3.39
6.1	Bison B	72.30	4.00 (± 0.68)	8.80 (± 0.22)	2.20 ^f	4.80
622/07	Fallow deer C	66.90	3.81 (± 0.36)	8.27 (± 0.82)	2.17 ^f	4.46
6	Cattle C	76.19	5.40 (± 0.44)	8.55 (± 0.51)	1.58 ^f	3.15
681	Wild boar C	82.60	4.84 (± 0.27)	7.04 (± 1.05)	1.45 ^f	2.20
855	Deer C	73.55	4.74 (± 0.00)	6.41 (± 0.19)	1.35 ^f	1.68
2349/06-1	Sheep S	61.69	4.07 (± 0.11)	5.32 (± 0.20) ^g	1.31 ^f	1.2 ^g
711P	Goat C	83.30	5.15 (± 0.61)	5.38 (± 0.11) ^g	1.04	0.2 ^g
P381	Sheep C	67.56	4.54 (± 0.13)	4.43 (± 0.30) ^g	0.98	-0.1 ^g
311	Goat S	67.91	4.24 (± 0.20)	4.03 (± 0.06) ^g	0.95	-0.2 ^g

^a Entry was calculated as the percentage of the inoculated bacteria that was recovered from each cell lysate at day 0.

^b Values shown are means of three repeated experiments ± standard deviations (SD).

^c Day 0 = 2 h post infection.

^d Growth ratios (fold) were calculated by dividing the number of log₁₀ CFU at day 7 by that at day 0 for each *Map* isolate.

^e Growth is presented as the mean log increases in numbers of intracellular CFU from day 0 through day 7 of infection.

^f Indicates a significant change between day 0 and day 7 ($P < 0.05$).

^g Indicates the isolates for which log CFU values differed significantly from that of the reference strain K10 ($P < 0.05$).

from the baseline, in a range between 2.20 and 1.35-fold (t -test, $P < 0.05$). In contrast, the sheep isolate with S-genotype and the goat isolate with C-genotype showed the smallest variations in bacterial counts over 7 days from the baseline; 1.31 and 1.04-fold, respectively. The other two isolates from small ruminants, the goat isolate with an S genotype and the C-type isolate from sheep, showed reductions in bacterial counts over 7 days from baseline which indicated that these bacterial isolates were gradually killed by macrophages (t -test, $P = 0.1575$ and $P = 0.5439$, respectively). The intracellular growth exhibited for each isolate calculated as the mean log increase in numbers of intracellular CFU within BoMac cells between days 0 and 7 of culture is shown in Table 3. The six more rapidly growing isolates were obtained from cattle, bison, fallow deer, wild boar and deer hosts; with log₁₀ CFU increases in a range between 4.80 and 1.68. By day 7, the K10 strain grew by 3.39 log₁₀ CFU. In contrast, two isolates from sheep and goat hosts (2349/06-1 and 711) only grew 1.24 and 0.23 log₁₀ CFU, respectively. The goat isolate with S genotype and the sheep isolate with C genotype showed a decrease in bacterial counts of 0.21 and 0.10 log₁₀ CFU, respectively. Statistical analysis of the data indicated that there were no significant differences between the reference strain K10 or the bovine isolate 6, and the isolates from bison, fallow deer, wild boar and deer hosts in their ability to grow in BoMac cells (ANOVA, $P > 0.05$). Between the isolates from wildlife animal species no differences in growth in BoMac cells were observed. Although the sheep isolate with an S-genotype was able to grow in BoMac cells (1.31-fold and 1.24 log₁₀ CFU increase), statistical analysis of the data indicated that all the isolates from goat and sheep hosts with S and C genotypes displayed significantly less growth than that of the K10 reference strain (ANOVA, $P < 0.05$).

The ability of each *Map* isolate to persist within BoMac cells is presented as the estimated mean log₁₀ CFU at day 7 in Table 3. After 7 days, the mean log₁₀ CFU for the K10 strain, the bovine isolate 6 and the isolates from bison, fallow deer, wild boar and deer hosts were not significantly

different (ANOVA, $P > 0.05$). Statistical analysis of the data indicated that the mean log₁₀ CFU at day 7 for the cattle, bison, fallow deer, wild boar and deer isolates were significantly higher than for all the isolates obtained from goat and sheep hosts (ANOVA, $P < 0.05$).

3.3. Differential gene expression in BoMac cells infected with a bovine or an ovine isolate of *Map*

Two *Map* isolates that showed differential growth and persistence in BoMac cells were selected for gene expression analysis in infected BoMac cells. Mean fold-changes in gene expression between infected and non-infected cells as determined through real-time qRT-PCR analysis are shown in Fig. 2. Significant differences in the expression of several cytokines (IL6, TGFβ-1, TNFα-2, IFNγ, IL1α), genes related to apoptosis (BCL2-1) or tissue destruction (MMP3-1) after the infection of BoMac cells with the bovine or the ovine isolates were observed. Infection of BoMac cells with the bovine isolate resulted in a significant up-regulation of the interleukin-6 (IL6) at 14 and 24 h p.i. when compared with cells infected with the ovine isolate (t -test, $P = 0.041$ and $P = 0.013$). A significant up-regulation of the anti-inflammatory cytokine TGFβ-1 was also detected in BoMac cells infected with the bovine isolate at 24 h p.i. when compared with cells infected with the ovine isolate (t -test; $P = 0.009$). Although differences were not statistically significant, the bovine isolate induced higher IL10 production at 14 or 24 h p.i. than the levels induced by the ovine isolate (t -test; $P = 0.327$ and $P = 0.208$, respectively). In contrast, BoMac cells infected with the ovine isolate showed a reduced anti-inflammatory response and a significant increase in the amount of the pro-inflammatory cytokine IL1α at 14 and 24 h p.i. when compared with cells infected with the bovine isolate (t -test, $P = 0.001$ and $P = 0.002$). It is possible that the increase in IL6 and TGFβ-1 expression 4 h after the infection with the ovine isolate was an initial response which was then quickly suppressed by the activation of IL1α.

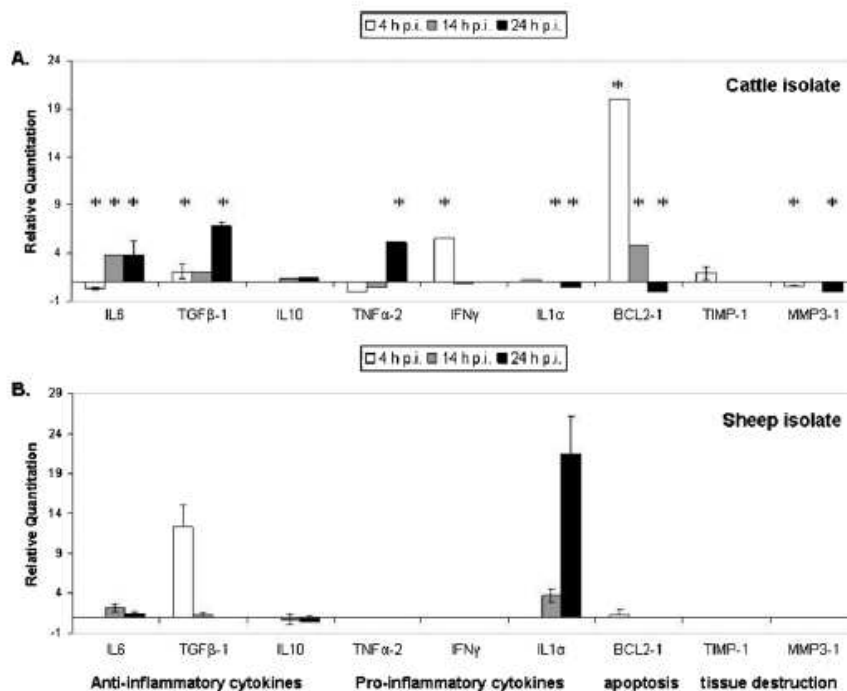


Fig. 2. Expression of cytokines and proteins involved in apoptosis or tissue destruction in BoMac cells infected with the bovine isolate 6 (A) or with the ovine isolate 2349/06-1 (B) as measured by qRT-PCR at 4, 14 and 24 h p.i. Bars represented the average results of two independent infection experiments. Error bars represent SD between the two replicates. Statistically significant differences in the expression of the indicated genes between the two isolates of *Map* are showed with an asterisk ($P < 0.05$).

In regard to the apoptotic response, BoMac cells infected with the bovine isolate for 4 and 14 h p.i. had increased levels of expression of the apoptotic inhibitor BCL2-1 which might cause lower levels of apoptosis than in BoMac cells infected with the ovine isolate (t -test, $P < 0.001$). Significant decreased MMP3-1 expression was also found in BoMac cells infected with the bovine isolate at 4 and 24 h p.i. when compared with the levels of expression of this metalloprotease in cells infected with the ovine isolate (t -test; $P = 0.002$ and $P < 0.001$, respectively). Differences in induction of the inhibitor of tissue destruction TIMP-1 were not statistically significant at any of the time points studied but the bovine isolate did induce more TIMP-1 at 4 h p.i. than did the ovine isolate.

4. Discussion

In the absence of a well characterized animal model, *in vitro* models (*i.e.*, peripheral blood MDM and BoMac cells) provide an indirect tool to study *Map*-host interactions at the early events of the infection. BoMac is an *in vitro* differentiated macrophage-like cell line of bovine origin that has advantages over MDM cells in that the variability between donors commonly encountered with MDM is avoided, and that large numbers of cells can be readily grown and differentiated. In addition, BoMac cells develop macrophage functions including the ability to phagocytize bacteria, lyse chicken red blood cells with and without opsonization, generate reactive oxygen species (ROS),

produce key cytokines, and have the ability to participate in antibody-independent and antibody-dependent cellular cytotoxicity following activation (Stabel and Stabel, 1995; Tooker et al., 2002).

Map-host cells interaction is not fully understood, in part because of the difficulties to quantify numbers of viable *Map* cells by routine bacteriological methods. Although previous studies have assessed the intracellular behavior of a few selected strains of *Map*, in the present study a panel of isolates of *Map* representing distinct genotypes and isolated from domestic and wildlife animal species were assessed for their intracellular growth in BoMac and bovine peripheral blood MDM cells by using an automatic culture system (Bactec MGIT 960). In BoMac cells we observed significant differences in intracellular growth and persistence between strains. In addition, a S-type isolate of *Map* isolated from sheep for which lower virulence is well established on epidemiological grounds (Moloney and Whittington, 2008) persisted at low levels within BoMac cells which verify the ability of this *in vitro* infection model to distinguish between strains of varying virulence. Previously, Janagama et al. (2006) using MDM from two donors consistently observed that a bovine isolate (B1018) remained in higher numbers within MDM cells relative to a sheep isolate (S7565). They used real-time amplification (qPCR) of the *Map* hsp65 gene to estimate total bacterial genome equivalents in infected MDM at 2, 16, 24, 48 and 96 h p.i., whereas we predicted numbers of viable *Map* organisms in cultured macrophages

at 2 h and 7 days p.i. by using the Bactec MGIT 960 system. It should be noted that qPCR quantifies total numbers of CFU and therefore it does not differentiate between viable and dead bacteria. In contrast, the Bactec MGIT 960 system is able to predict viable CFU numbers given a more realistic picture of the number of bacteria able to persist inside of macrophages at different times p.i. Due to the variable results obtained in MDM, we observed less robust differences in the intracellular growth and persistence of the tested isolates in this model of infection. Similarly, individual data illustrated the substantial variability in intracellular growth displayed by clinical isolates of *M. tuberculosis* in human blood monocytes from 11 subjects and this variability was observed even when monocytes from the same donor were infected with each organism (Li et al., 2002). Nevertheless, we should acknowledge that our goal was the identification of isolates of *Map* with differential behavior within bovine macrophages, rather than to compare the outcomes of infection within the two infection models (BoMac and MDM) which have inherent differences.

All the *Map* isolates included in our study were internalized by BoMac cells with similar efficiency, indicating that equivalent numbers of bacteria were ingested and that the extent of phagocytosis was independent of strain type or host animal species of origin. The isolates from cattle, bison, fallow deer, wild boar and deer hosts evaluated in our study proliferated in BoMac cells more rapidly than the isolates from goat and sheep hosts. Moreover, the sheep isolate with a C genotype and the S-type isolate from goat showed reductions in bacterial counts in BoMac and in MDM as well, indicating that these bacterial isolates were killed by macrophages. When the data of all the strains were statistically analyzed, the observed differences between isolates in bovine macrophages grouped according to the host from which the isolates were isolated (ANOVA GLM Procedure, $P=0.012$). In other words, the intracellular behavior of isolates of *Map* representing distinct genotypes varied depending of the host of origin (ANOVA GLM Procedure, $P=0.022$). Similarly, strains of environmental Mycobacteria isolated from fish and humans including strains of *M. avium*, *Mycobacterium peregrinum*, *Mycobacterium chelonae*, and *Mycobacterium salmoniphilum* also had different abilities to grow within macrophages lines from humans, mice, and carp; which grouped according to the host from which the strains were isolated (Harriff et al., 2008).

We observed that not all the strains with compatible abilities to enter and grow in macrophages shared genetic similarities (ANOVA GLM Procedure, $P=0.2491$). In fact, our results showed that type S but also type C isolates from sheep and goat hosts showed a significant attenuated phenotype after 7 days of infection in BoMac cells, when compared with type C isolates from cattle, deer, fallow deer, wild boar and bison hosts. These findings suggested that for the isolates from sheep and goat hosts the phenotype inside of bovine macrophages was not dependent of the genotype of the infecting isolate. In other words, successful survival in macrophages was not a common characteristic of all the tested C type isolates. Similarly, a lack of correlation between genotype and

growth rate in the Bactec MGIT 960 system was also observed for the ovine isolates; with the chosen limited number of C, S and B type isolates growing at equivalent rates when cultured in MGIT tubes (Abendaño et al., 2012). Since type C strains are usually virulent strains for cattle, we can speculate that the conditions encountered within ovine or goat macrophages might alter the phenotype of the bacterium with a consequent decrease in invasiveness of bovine macrophages. Several studies have shown that virulence of many bacterial species is regulated by genes which respond to changes in environmental conditions (Mekalanos, 1992; Cossu et al., 2012). For instance, it was previously shown that growth of *Map* within a bovine mammary epithelial cell line (MAC-T cells) resulted in augmented ability to subsequently invade bovine epithelial cells (Patel et al., 2006). In a more recent study, it was suggested that a LuxR regulator might be involved in the regulation of the expression of genes affecting *Map* envelope's composition and in the bacterium adaptation to the host (Alonso-Hearn et al., 2010). Recent data also suggest that specific Mycobacterial epitopes are present only within a given host (Janagama et al., 2010).

Previously, it was shown that a bovine, a bison and a human type-C isolates induced anti-inflammatory and anti-apoptotic pathways in bovine MDM, which would favor bacterial survival and persistence (Janagama et al., 2006). In the present study, gene expression induced by two clinical isolates of *Map* with differential abilities to grow and survive inside BoMac cells was analyzed using qRT-PCR and the resulting data related to their differential survival phenotype in bovine macrophages. Because a strong correlation was observed between the intracellular behavior of the tested isolates and the patterns of production of specific cytokines or proteins related to apoptosis or tissue destruction (IL6, TGF β -1, IL1 α , BCL2-1 and MMP3-1), the levels of expression of these proteins might be used to discriminate between isolates with differential virulence in the BoMac model. Bovine isolates of *Map* have been reported to induce early IL10 expression in MDM that antagonizes the pro-inflammatory cytokine response by down-regulating the production of TNF α (Weiss et al., 2005). Although we did not observed significant differences in IL10 gene expression in BoMac cells infected with our bovine or ovine isolates at any of the time points, the bovine isolate did induce more IL10 at 14 and 24 h p.i. and less TNF α -2 at 4 and 14 h p.i. than did the ovine isolate. Similarly, rapid intracellular macrophage grow rates by strains of *M. tuberculosis* correlated with rapid production of IL10 and suppression of TNF α in THP-1 cells during the early stages of infection (Theus et al., 2005). The ovine isolate was significantly attenuated in growth in BoMac cells and this decrease in survival within the infected cells correlated with a reduced anti-inflammatory response in the infected cells and with a significantly up-regulated pro-inflammatory immune response generally associated with elimination of *Map* and protection. This conclusion is supported by reduced expression of IL10 mRNA as well as normal levels of expression of IL6 and TGF β -1 (not different from the levels in uninfected cells) after 24 h of infection with the ovine isolate. In addition, the expression of the pro-inflammatory

cytokine IL1 α was highly up-regulated in cells infected with the ovine isolate at 14 and 24 h p.i. and down-regulated in BoMac cells infected with the bovine isolate at 24 h p.i. It is well known that the expression of IL1 α in the presence of intracellular bacteria is one of the first steps leading to activation of macrophages and effective bacteria killing. Because our study used single *Map* isolates from various hosts carrying C or S genotypes and because there is great diversity among *Map* isolates, further studies with multiple isolates of these same host/genotype combinations are needed.

In summary, our results showed that successful survival in BoMac cells was a common characteristic of the isolates obtained from cattle, deer, fallow deer, bison, and wild boar hosts. The successful survival within cells and the observed cytokine expression profile of the bovine isolate 6 correlated well with epidemiological data and clinical evidence of virulence, as suggested by the capacity of bovine isolates to persist for many years in different locations and to cause numerous outbreaks in cattle. In addition, the reduced survival in bovine macrophages of the isolates from goat and sheep hosts might explain why there are few reports of cattle naturally infected with S-type isolates (Whittington et al., 2001b; de Juan et al., 2005; Moloney and Whittington, 2008). It also suggests that isolates of *Map* from small ruminants may have less clinical consequences in cattle than *Map* isolates from cattle, deer, fallow-deer, bison and wild boar hosts which might have a selective advantage in causing bovine paratuberculosis.

Acknowledgements

Financial support for this work was provided by grants from the Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA) and by European Funds for Regional Development (FEDER) (FAU2-008-00018-C02 and RTA2011-06049). Dr. Marta Alonso-Hearn's tenure is partly covered by the INIA tenure track program for the incorporation of PhD graduates into research institutions. Naiara Abendaño has a fellowship from the department of Agriculture of the Basque Government.

Samples from fallow-deer were provided by Dr. Prieto from the Department of Agriculture of the Regional Government of the Principality of Asturias (Spain). Samples from wild-boar and deer were provided by the Instituto de Investigación en Recursos Cinegéticos (IREC). Samples from Portugal and USA were provided by A.C. Coelho and R. Whitlock, respectively. We thank Dr. Luiz Bermudez for helpful discussions. We are grateful to Kyle Hearn for the careful editing of the manuscript.

References

- Abendaño, N., Sevilla, I.A., Garrido, J.M., Prieto, J.M., Juste, R.A., Alonso-Hearn, M., 2012. Quantification of *Mycobacterium Avium* subsp. *paratuberculosis* strains with distinct genotypes and isolated from domestic and wild-life animal species using an automatic liquid culture system. *J. Clin. Microbiol.* 50, 2609–2617.
- Aduriz, J.J., Juste, R.A., Cortabarría, N., 1995. Lack of Mycobactin dependence of *Mycobacteria* isolated on Middlebrook 7H11 from clinical cases of ovine paratuberculosis. *Vet. Microbiol.* 45, 211–217.
- Alonso, S., Pethe, K., Russell, D.G., Purdy, G.E., 2007. Lysosomal killing of *Mycobacterium* mediated by ubiquitin-derived peptides is enhanced by autophagy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 6031–6036.
- Alonso-Hearn, M., Eckstein, T.M., Sommer, S., Bermudez, L.E., 2010. A *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* LuxK regulates cell envelope and virulence. *Innate Immun.* 16, 235–247.
- Bermudez, L.E., Petrofsky, M., Sommer, S., Barletta, R.G., 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, 3570–3577.
- Collins, D.M., Gabric, D.M., de Lisle, G.W., 1990. Identification of two groups of *Mycobacterium paratuberculosis* strains by restriction analysis and DNA hybridization. *J. Clin. Microbiol.* 28, 1591–1596.
- Cossu, A., Sechi, L.A., Zanetti, S., Rosu, V., 2012. Gene expression profiling of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in simulated multi-stress conditions and within THP-1 cells reveals a new kind of interactive intramacrophage behaviour. *BMC Microbiol.* 12, 87.
- Cousins, D.V., Evans, R.J., Francis, B.R., 1995. Use of the BACTEC radiometric culture method and polymerase chain reaction for the rapid screening of faeces and tissues for *Mycobacterium paratuberculosis*. *Aust. Vet. J.* 72, 458–462.
- de Juan, L., Mateos, A., Domínguez, L., Sharp, J.M., Stevenson, K., 2005. Genetic diversity of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* isolates from goats detected by pulsed-field gel electrophoresis. *Vet. Microbiol.* 106, 249–257.
- Harriff, M.J., Wu, M., Kent, M.L., Bermudez, L.E., 2008. Species of environmental *Mycobacteria* differ in their abilities to grow in human, mouse, and carp macrophages and with regard to the presence of *Mycobacterial* virulence genes, as observed by DNA microarray hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 275–285.
- Harris, N.B., Barletta, R.G., 2001. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in veterinary medicine—a review. *Clin. Microbiol.* 14, 489–512.
- Janagama, H.K., Jeong, K.I., Kapur, V., Coussens, P., Sreevatsan, S., 2006. Cytokine responses of bovine macrophages to diverse clinical *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* strains. *BMC Microbiol.* 6, 10.
- Janagama, H.K., Lamont, E.A., George, S., Bannantine, J.P., Xu, W.W., Tu, Z.J., Wells, S.J., Schefers, J., Sreevatsan, S., 2010. Primary transcripts of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* reveal proprietary pathways in tissue and macrophages. *BMC Genomics* 11, 561.
- Li, Q., Whalen, C.C., Albert, J.M., Larkin, R., Zukowski, L., Donald Cave, M., Silver, R.F., 2002. Differences in rate and variability of intracellular growth of a panel of *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates within a human monocyte model. *Infect. Immun.* 70, 6489–6493.
- Mekalanos, J.J., 1992. Environmental signals controlling expression of virulence gene determinants in bacteria. *J. Bacteriol.* 174, 1–7.
- Moloney, B.J., Whittington, R.J., 2008. Cross species transmission of ovine Johne's disease from sheep to cattle: an estimate of prevalence in exposed susceptible cattle. *Aust. Vet. J.* 86, 117–123.
- Muskens, J., Bakker, D., de Boer, J., van Keulen, L., 2001. Paratuberculosis in sheep: its possible role in the epidemiology of paratuberculosis in cattle. *Vet. Microbiol.* 78, 101–109.
- Patel, D., Daneli shvili, L., Yamazaki, Y., Alonso-Hearn, M., Paustian, M.L., Bannantine, J.P., Meunier-Goddik, L., Bermudez, L.E., 2006. The ability of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* to enter bovine epithelial cells is influenced by preexposure to a hyperosmolar environment and intracellular passage in bovine mammary epithelial cells. *Infect. Immun.* 74, 2849–2855.
- Rowe, M.T., Grant, I.R., 2006. *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* and its potential survival tactics. *Lett. Appl. Microbiol.* 42, 305–311.
- Sevilla, I., Singh, S.V., Garrido, J.M., Aduriz, G., Rodríguez, S., Geijo, M.V., Whittington, R.J., Saunders, V., Whitlock, R.H., Juste, R.A., 2005. Molecular typing of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* strains from different hosts and regions. *Rev. Sci. Tech.* 24, 1061–1066.
- Sevilla, I., Garrido, J.M., Guijo, M., Juste, R.A., 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.
- Stabel, J.R., Stabel, T.J., 1995. Immortalization and characterization of bovine peritoneal macrophages transfected with SV40 plasmid DNA. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 45, 211–220.
- Stevenson, K., Hughes, V.M., de Juan, L., Inglis, N.F., Wright, F., Sharp, J.M., 2002. Molecular characterization of pigmented and nonpigmented isolates of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.* 40, 1798–1804.
- Stevenson, K., Alvarez, J., Bakker, D., Biet, F., de Juan, L., Denham, S., Dimareli, Z., Dohmann, K., Gerlach, G.F., Heron, I., Kopecka, M., May, L., Pavlik, L., Sharp, J.M., Thibault, V.C., Willemsen, P., Zadoks, R.N., 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, 212.
- Theus, S.A., Cave, M.D., Eisenach, K.D., 2005. Intracellular macrophage growth rates and cytokine profiles of *Mycobacterium tuberculosis* strains with different transmission dynamics. *J. Infect. Dis.* 191, 453–460.
- Tooker, B.C., Burton, J.L., Coussens, P.M., 2002. Survival tactics of *M. paratuberculosis* in bovine macrophage cells. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 87, 429–437.
- Weiss, D.J., Evanson, O.A., de Souza, C., Abrahamsen, M.S., 2005. A critical role of interleukin-10 in the response of bovine macrophages to infection by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Am. J. Vet. Res.* 66, 721–726.
- Whittington, R.J., Marsh, I.B., Whitlock, R.H., 2001a. 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. Probe.* 15, 139–145.
- Whittington, R.J., Taragel, C.A., Ottaway, S., Marsh, I., Seaman, J., Friðriksdóttir, V., 2001b. Molecular epidemiological confirmation and circumstances of occurrence of sheep (S) strains of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in cases of paratuberculosis in cattle in Australia and sheep and cattle in Iceland. *Vet. Microbiol.* 79, 311–322.
- Woo, S.R., Heintz, J.A., Albrecht, R., Barletta, R.G., Czuprynski, C.J., 2007. Life and death in bovine monocytes: the fate of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Microb. Pathog.* 43, 106–113.
- Zhao, B.Y., Czuprynski, C.J., Collins, M.T., 1999. Intracellular fate of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in monocytes from normal and infected, interferon-responsive cows as determined by a radiometric method. *Can. J. Vet. Res.* 63, 56–61.

PUBLICACIÓN IV

Three-Dimensional *In Vitro* Models of Granuloma to Study Bacteria-Host Interactions, Drug-Susceptibility, and Resuscitation of Dormant Mycobacteria.

Fitzgerald LE, **Abendaño N**, Juste RA, Alonso-Hearn M.

BioMed Research International, 623856

Review Article

Three-Dimensional *In Vitro* Models of Granuloma to Study Bacteria-Host Interactions, Drug-Susceptibility, and Resuscitation of Dormant Mycobacteria

Liam E. Fitzgerald, Naiara Abendaño, Ramon A. Juste, and Marta Alonso-Hearn

Department of Animal Health, Basque Institute for Agricultural Research and Development, NEIKER-Tecnalia, Technological Park of Bizkaia, Derio, 48160 Bizkaia, Spain

Correspondence should be addressed to Marta Alonso-Hearn; malonso@neiker.net

Received 18 October 2013; Accepted 16 April 2014; Published 21 May 2014

Academic Editor: Edouard Tuaillon

Copyright © 2014 Liam E. Fitzgerald et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Mycobacterium tuberculosis, *Mycobacterium leprae*, *Mycobacterium bovis*, and *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* can survive within host macrophages in a dormant state, encased within an organized aggregate of immune host cells called granuloma. Granulomas consist of uninfected macrophages, foamy macrophages, epithelioid cells, and T lymphocytes accumulated around infected macrophages. Within granulomas, activated macrophages can fuse to form multinucleated giant cells, also called giant Langhans cells. A rim of T lymphocytes surrounds the core, and a tight coat of fibroblast closes the structure. Several *in vivo* models have been used to study granuloma's structure and function, but recently developed *in vitro* models of granuloma show potential for closer observation of the early stages of host's responses to live mycobacteria. This paper reviews culture conditions that resulted in three-dimensional granulomas, formed by the adhesion of cell populations in peripheral blood mononuclear cells infected with mycobacteria. The similarities of these models to granulomas encountered in clinical specimens include cellular composition, granulomas' cytokine production, and cell surface antigens. A reliable *in vitro* dormancy model may serve as a useful platform to test whether drug candidates can kill dormant mycobacteria. Novel drugs that target dormancy-specific pathways may shorten the current long, difficult treatments necessary to cure mycobacterial diseases.

1. Zoonotic Diseases Caused by Mycobacteria

Zoonotic diseases are infectious diseases naturally transmissible between vertebrate animals and humans. More than 60% of all human pathogens are zoonotic, including 75% of the past decade's emerging pathogens. Pathogens circulating human and animal populations very often risk public health as well as animal health, so both the animal and human health sectors are responsible for their detection, prevention, and control according to the "one world-one health" concept (WHO, OIE, FAO). However, the vast majority of zoonoses are labeled neglected zoonotic diseases (NZDs) because they are not prioritized by national and international health systems. The impact of NZDs is most severe in developing countries, as reliance on animals for food, transport, and farm work leads to continual close contact with animals in rural populations. Zoonotic diseases often go undiagnosed and

untreated in these regions due to lacking public awareness and education on preventive measures and also due to the lack of political commitment and funding of veterinary and health services.

Around 15 species of pathogenic mycobacteria for human beings and/or animals are known and are leading health concerns. *M. tuberculosis* causes most cases of tuberculosis (TB) in humans and is the leading cause of mortality due to a single infectious agent among human adults in the world [1, 2]. In 2011, there were an estimated 8.7 million new cases, 1.4 million deaths, and about 2 billion latent infections caused by *M. tuberculosis* [3]. Animal infection with *M. tuberculosis*, while being uncommon, has been described among nonhuman primates and several other species such as birds, elephants, and other mammals, after prolonged close contact with humans. However, the overall prevalence of disease in these susceptible species is low

and documented transmissions of *M. tuberculosis* between animals and humans are uncommon [4–6]. Along with *M. tuberculosis*, *M. bovis* causes TB in humans, though far less commonly than *M. tuberculosis* [7, 8]. As a result of milk pasteurization and *M. bovis* eradication programs in most industrialized countries, zoonotic transmission of *M. bovis* through domestic livestock is now rare. In contrast, similar eradication programs have not been conducted for wild animals. Consequently, *M. bovis* is widely prevalent in cattle and wild animals and is responsible for \$3 billion global economic losses a year [9]. Recently, two people were identified as having caught TB from cats but the risk of cat-to-human bovine TB transmission is very low [10]. Paratuberculosis or Johne's disease (JD) causes major economic losses to the global dairy industry due to lower milk production, reduced slaughter value, increased premature culling, and increased calving intervals [11]. Total losses due to JD in US dairy herds were estimated at \$200–250 million annually, and the prevalence of JD at the herd level is probably much higher than 50% in most countries with a significant dairy industry [12]. *M. avium* subsp *paratuberculosis* (*Map*), the causal agent of JD in domestic ruminants and wildlife animal species, may also have human health significance as a causal or exacerbating agent in human Crohn's disease (CD), a chronic inflammatory bowel disease characterized by transmural inflammation and granuloma formation. Evidences that *Map* may be associated with CD in humans include similarity between the clinical signs of CD in humans and those found in animals with paratuberculosis; detection of *Map* in feces, intestinal tissues, breast milk, macrophages, and peripheral blood of patients with CD; association between *Map* DNA in blood and cellular and humoral immune responses in CD; and anti-*Map* antibiotic therapy resulting in reduction of bacteremia and remission, or substantial improvement in disease condition in many patients [13–17]. In addition, meta-analysis studies have confirmed an association of *Map* with CD [18, 19].

M. leprae has been eliminated from most countries due to an aggressive push by the WHO in the 1980s and 1990s, but it continues as a public health problem in tropical and semitropical countries. A total of 219,075 new cases of leprosy were reported in 2011 according to the WHO [20]. Nonhuman reservoirs of *M. leprae* exist in monkeys and armadillos and three case-control studies have shown contact with armadillos to be a significant risk factor for leprosy in the United States [21, 22]. Naturally acquired murine leprosy has been observed in rats, mice, and cats but not in humans or any other species. Thus, in contrast to human leprosy, murine leprosy is not a zoonosis [23].

2. Mycobacterial Infections Induce Granuloma Formation

A defining aspect of the immune response against mycobacteria is the formation of organized cellular aggregates called granulomas. Following internalization of pathogenic mycobacteria by host macrophages, activated lymphocytes and infected macrophages secrete cytokines and chemokines

which trigger an inflammatory response including recruitment of blood and tissue macrophages and T-lymphocytes to the infection site. This accumulation of cells around infected macrophages is called a granuloma. Granulomas consist of lipid-loaded macrophages (foamy macrophages), epithelioid cells (differentiated macrophages) with a larger cytoplasm and interdigitated cell membranes, and multinucleated giant cells (Langhans cells) [24–26]. T and B lymphocytes surround the granuloma core, and a tight coat of fibroblasts and collagen closes the structure, now a complete granuloma [27, 28]. Mycobacteria-infected macrophages are sequestered inside the granuloma's hypoxic environment. The accumulation of intracytoplasmic lipid inclusions, the loss of acid fastness, the development of resistance to the antibiotic rifampicin, and the arrest of bacterial multiplication have all been described as the major hallmarks of dormant bacteria within granulomas [29–33].

Granulomas have long been considered as a natural defensive mechanism meant to contain the host immune response and mycobacteria in a localized area, preventing bacterial spread to surrounding healthy tissues or other organs [34]. Complete eradication of the bacteria does not occur inside granulomas because pathogenic mycobacteria have developed their own strategies to evade the host immune response and persist within the granuloma in a dormant state for decades while continual replenishment of white blood cells keeps the granuloma [35]. If the host's immunity is weakened and/or suppressed, the dormant mycobacteria may reactivate and escape from the granuloma and form lesions in other parts of the tissue [36]. For instance, *M. tuberculosis* can persist for decades within granulomas and may reactivate if the host's immunity is weakened due to an HIV infection, diabetes, cancer, malnutrition, aging, or host genetic factors [37, 38]. However, the metabolic and replicative state of the bacteria in the granulomatous lesions of asymptomatic humans remains a controversial issue [39]. Although granuloma formation has long been thought to be a host-driven process to contain infection, recent studies indicate that granulomas contribute to early bacterial growth and that pathogenic mycobacteria exploit the granuloma for local expansion and systemic dissemination [40].

As mentioned before, the secretion of various cytokines and chemokines is an essential element in the early immune response against mycobacteria infection and in the early steps of granuloma formation [41]. Following internalization of mycobacteria by host macrophages, activated macrophages release IL-8, a powerful chemoattractant for T lymphocytes, which will surround the granuloma structure [42]. Within the granuloma, activated and recruited T-lymphocytes secrete interferon ($\text{IFN-}\gamma$), which in turn activates additional macrophages [43]. Tumor necrosis factor- α ($\text{TNF-}\alpha$) is produced by infected macrophages and plays an important role in the accumulation and differentiation of macrophages into the highly bactericidal epithelioid cells present in granulomas [44]. $\text{TNF-}\alpha$ is also implicated in the maintenance of the granuloma structure by maintaining cellular recruitment [45–47]. Mycobacterial-infected macrophages also release large quantities of IL-6, which plays a role differentiating activated macrophages to multinucleated giant cells [48].

3. In Vivo and In Vitro Granuloma Models

Analysis of host-pathogen interactions inside granulomas is crucial to understand the pathogenesis of mycobacterial infections. Since the access to granulomas in human biopsy samples is often limited, animal models of TB granulomatous inflammation have been developed, including use of monkeys, mice, rabbits, and guinea pigs [49]. The most extensively used animal model, the mouse, is not a natural host of *M. tuberculosis*. Although granulomas can be seen in mice, they are small, have a different cellular organization than in humans with absence of necrotic areas and multinucleated giant cells, and are unable to establish latency [50, 51]. Rabbits are susceptible to *M. bovis* infection and guinea pigs are susceptible to *M. tuberculosis*. Although these animal models develop classical granulomas, they lack true latency, and the immune response generated in these *in vivo* models is likely quite different than the cattle or human response [52, 53]. Nonhuman primate models more closely resemble the wide spectrum of granulomas in human TB, and latency can be well established in these models. However, macaques are very expensive to maintain and difficult to handle and imply ethical considerations [54]. Cattle can be experimentally infected with *M. bovis* or *Map* but these experiments are expensive because they require several months of maintenance under BSL3 conditions for the induced granulomas to be large enough for study [55, 56]. Another common drawback of *in vivo* models is that they can only be used to study highly differentiated granulomas, preventing the analysis of the processes involved in their very early development [57].

In order to study the very first steps of the granuloma formation, *in vitro* hypoxic-induced, stress-induced, or granuloma models have been developed. The advantages of *in vitro* models include reduced cost, increased control, and that they can provide insights into host-mycobacteria interactions at early stages of granuloma formation. *In vitro* models mimic the conditions encountered by the bacteria within host granulomas (hypoxic-induced or stress-induced models) or the physiological granuloma (granuloma models). However, the granuloma constitutes a complex immune microenvironment highly affected by additional physiological signals (i.e., growth factors and cytokines) which are exclusively produced in infected tissues. As consequence, certain aspects of *in vivo* granulomas may be different or absent in *in vitro* models, including intragranulomatous necrosis, accumulation of fibrin and collagen, and presence and distribution of bacilli. Using *in vitro* models, important information has been achieved about granuloma cell differentiation as well as about cellular interactions and cell/bacteria interplay within granulomatous structures. In a hypoxic-induced environment, *M. tuberculosis* accumulates triacylglycerides (TAG) within intracytoplasmic inclusions (ILI) and enters into a nonreplicative state; upon reexposure to oxygen, the pool of TAG within ILI is drastically reduced and bacilli undergo regrowth [58]. Recently, Deb et al. developed a multistress dormancy model for *M. tuberculosis* and showed that *M. tuberculosis* exhibited all the hallmarks characteristics of dormancy [59]. Similarly, in lipid-loaded THP-1 derived macrophages, *M. tuberculosis* has been found to accumulate

TAG and stop replication [33]. Although most stress-induced models of *M. tuberculosis* dormancy are able to induce a dormant state of the bacteria, they have been unable to demonstrate resuscitation under conditions that mimic immune suppression. To achieve this goal, three-dimensional *in vitro* models of granulomas have been developed, which may more closely resemble not only dormancy but also resuscitation of the bacteria under conditions that mimic immune suppression (Table 1). Therefore, granuloma models can be used to study both latent and active stages of infection. Three-dimensional granuloma formation occurs *in vitro* only when infected peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) are cultured under conditions that inhibit surface contact.

4. Three-Dimensional In Vitro Models of M. tuberculosis Granulomas

Several reports have described three-dimensional models of *M. tuberculosis* granuloma. The first model of early granuloma formation using PBMCs infected with *M. tuberculosis* or *M. bovis* was reported by Seitzer and Gerdes [60]. PBMCs were seeded into agarose-coated wells of 96-well plates at a density of 6×10^5 in 200 μ L of supplemented RPMI-1640 medium and infected with *M. tuberculosis* strain H37Rv or *M. bovis* BCG (bacille Calmette-Guerin) at MOI (bacteria/cell) of 1:150, 1:85, 1:42, and 1:4. After 4 days of incubation only the MOI 1:150 produced aggregates. Infection at higher MOI did not result in spheroid formation but rather in several very small aggregates and a dramatic increase in the number of dead cells. The authors verified this model as comparable to *in vivo* granulomas by assessing the aggregate cell types and cell differentiation through histology and immunostaining. By histological analysis, they observed that the generated heterospheroids shared many phenotypical characteristics of granulomas, such as three-dimensional aggregation of monocytes, B cells and T cells and the presence of macrophages, multinucleated giant cells, and necrotic areas. By immunostaining, the presence of disperse CD14⁺ monocytes, CD163⁺ macrophages and CD3⁺ T cells was demonstrated in the granulomas together with a ring of CD19⁺ B cells in the peripheral zone.

Birkness et al. observed the formation of small, round, granuloma-like aggregates by combining human PBMCs, autologous macrophages, and *M. tuberculosis* in ultralow attachment tissue culture plates [61]. When the MOI was 1:400 or 1:4000, and when nonadherent PBMCs were added 2 and 5 days after infection to simulate the natural recruitment of additional lymphocytes at the infection site, small aggregates consisting of multinucleate-giant cells, epithelioid macrophages, and T-lymphocytes were observed. Immunostaining showed CD68⁺ epithelioid macrophages and small numbers of CD3⁺ T-lymphocytes that resembled the granulomas seen in clinical specimens. Acid-fast bacteria were observed between and possibly within the cells composing the granulomas. In addition to looking at the cellular differentiation of the resulting aggregates, Birkness et al. examined the immunological response of the host cells as these aggregates formed. Supernatants from

TABLE 1: Three-dimensional *in vitro* granuloma models.

Bacteria	Cells	MOI (bacteria : cells)	Extracellular matrix	Growth medium	Days	Year	Reference
<i>M. tuberculosis</i> and <i>M. bovis</i>	Human PBMCs	1 : 150	Agarose coated 96-well tissue culture plates	RPMI-1640, 100 U/mL penicillin G, 100 µg/mL streptomycin, and 10% FCS	7	2003	[60]
<i>M. tuberculosis</i>	Human PBMCs and autologous macrophages (1 : 1)	1 : 4–40 for host cell cytokine production	Ultralow attachment 24-well tissue culture plates	RPMI-1640, 10% human serum	9	2007	[61]
<i>M. tuberculosis</i>	Human PBMCs and autologous macrophages (1 : 1), extra nonadherent PBMCs added at 2 and 5 days	1 : 400–4000 for histology and immunostaining	Ultralow attachment 24-well tissue culture plates	RPMI-1640, 10% human serum	9	2007	[61]
<i>M. tuberculosis</i>	Human PBMCs	1 : 10	0.95 mL collagen solution, 50 µL 10xDPBS, 4 µL fibronectin, 10 µL 1N NaOH	RPMI-1640, 20% human serum	8	2013	[62]
<i>M. leprae</i>	Human macrophages and autologous PBMCs (1 : 5)	50 : 1	24-well tissue culture plates	RPMI-1640, 20% FCS	10	2013	[63]
<i>M. bovis</i>	Human PBMCs	1 : 10	24-well tissue culture plates	RPMI-1640, 10% human serum, 300 U/mL penicillin, 0.3 mg/mL streptomycin	15	2004	[64]
<i>M. avium</i> subsp <i>paratuberculosis</i>	Bovine PBMCs	1 : 8 and 1 : 16	0.95 mL bovine collagen solution, 50 µL 10xDPBS, 4 µL fibronectin (1 mg/mL), 10 µL 1N NaOH	RPMI-1640, 100 U/mL penicillin G, 100 µg/mL streptomycin, 20% FBS	10	2014	Current report

FCS: fetal calf serum; PBMCs: peripheral blood mononuclear cells; DPBS: Dulbecco's phosphate-buffered saline; FBS: fetal bovine serum.

the infected cells were collected at different time points, analyzed by multiplexed cytokine bead-based assay, and found to contain IL-6, IL-8, IFN- γ , and TNF- α . Secretion of detectable quantities of these proteins over the first 9 days following infection required a MOI of 1:4–1:40. Finally, it was found that the additions of IL2, IFN- γ , and/or TNF- α , which are known to play a role in cell recruitment and granuloma formation, greatly enhanced the formation of aggregates.

The three-dimensional models described above were unable to demonstrate mycobacterial dormancy and resuscitation inside the three-dimensional generated granulomas. Recently, Kapoor et al. developed a three-dimensional *in vitro* granuloma model in which *M. tuberculosis* goes into dormancy and subsequently resuscitates under conditions that mimic weakening of the immune system [62]. Human PBMCs were mixed at room temperature with an extracellular matrix (ECM) at 5×10^5 cells/50 μ L/well of a 96-well plate. *M. tuberculosis* H37Rv was added to the ECM at MOI 1:10. Samples were allowed to set by incubating at 37°C for 45 min. RPMI containing 20% of human serum was added and the samples were incubated for 8 days in a 37°C incubator. Infected PBMCs formed microgranulomas, observed by the aggregation of lymphocytes around infected macrophages and the presence of multinucleated giant cells. The ECM was prepared by mixing 0.95 mL of collagen solution (Purecol, USA), 50 μ L 10 \times DPBS (Lonza, US), 4 μ L fibronectin (BD Biosciences, USA), and 10 μ L 1N NaOH per mL of matrix. In this *in vitro* model, IFN- γ , TNF- α , subunit- β of IL12 (IL-12p40), and interferon- γ induced protein 10 (IP-10) were induced by *M. tuberculosis* infection and detected in the culture supernatants from day 8 granulomas. In this model, *M. tuberculosis* goes into a dormant state, demonstrated by loss of acid fastness, accumulation of lipid bodies, development of rifampicin tolerance, and gene expression changes. Treating granulomas with an immunosuppressant anti-TNF- α monoclonal antibody caused reactivation of dormant *M. tuberculosis*.

5. Three-Dimensional *In Vitro* Models of *M. leprae* Granulomas

Wang et al. described an *in vitro* model of *M. leprae* granuloma. Monocytes-derived macrophages were infected in a 24 well-tissue culture plate with *M. leprae* at MOI 50:1 [63]. Autologous human PBMCs were added after 24 hours and the cells cultured in RPMI containing 20% fetal calf serum (FCS) at 35°C for additional 9 days. Phase-contrast, electron, and confocal microscopy revealed the presence of monocytes around macrophages infected with *M. leprae* and the formation of multinucleated giant cells and epithelioid cells, both of which resemble the cells seen in histopathological granuloma specimens of tuberculoid leprosy lesions. Patterns of cell antigen expression and cytokine production appeared consistent with those observed in *M. leprae* lesions. *M. leprae* was seen within multinucleated giant cells, and the bacteria remained metabolically active, demonstrated by CO₂ production which fell insignificantly.

6. Three-Dimensional *In Vitro* Models of *M. bovis* Granuloma

The model of Puissegur et al. used human PBMCs and artificial beads coated with *M. tuberculosis* antigens or live *M. bovis* BCG to form aggregates displaying morphological characteristics and cellular differentiation very similar to natural granulomas [64]. *M. bovis* BCG and human PBMCs were incubated at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere for 15 days. The granulomas were collected at different times of incubation and prepared for scanning electron microscopy. At six hours, monocytes were gathering around the bacteria. After 4 to 5 days, lymphocytes began to be recruited around the structures, which then kept on growing with cell recruitment until incubation stopped. To better assess the internal structure of these *in vitro* granulomas, day 9 BCG granulomas were collected, fixed, and embedded in Epon-araldite resin. Transverse sections (0.5 μ m) of the granulomas were then stained and analysed by transmission electron microscopy. Activated lymphocytes presenting tight contacts with activated macrophages and multinucleated cells were visible in the centre of a BCG-induced granuloma.

7. Three-Dimensional *In Vitro* Models of *M. avium* Subsp. *paratuberculosis* Granulomas

Birkness et al. mention only briefly in their paper that *in vitro* granulomas also formed in response to infection with other viable mycobacteria including *Map* and that the aggregates were macroscopically similar to the granulomas formed from *M. tuberculosis* infection but did not show any images of these specific aggregates [61]. We have recently infected bovine PBMCs placed in a collagen matrix with a bovine isolate of *Map* at a MOI = 1:8 or 1:16. Our extracellular matrix was prepared according to Kapoor et al. with some minor modifications [62]. Plates were incubated for 10 days and examined for granuloma formation by phase contrast microscopy using an inverted microscope. Figure 1 shows the morphological characterization of the three-dimensional granuloma-like aggregates formed by primary bovine PBMCs infected with *Map*. Aggregates started to form 2-3 days after infection and their relative number increased with time. In addition, the aggregates become larger and more clearly defined with time. Uninfected samples from the same donor did not form these aggregates indicating aggregation is a response to *Map* infection. Fixation and paraffin-embedding of the aggregates are currently being performed for histological examination of the microgranulomas' ultrastructure.

8. Conclusions

The four mycobacterial diseases discussed in this paper cause chronic granulomatous inflammation and the treatment for each is limited by the presence of dormant bacteria within host granulomas. Granulomas have long been studied using *in vivo* models, but recent *in vitro* models may allow closer analysis of the host-pathogen interactions involved, making

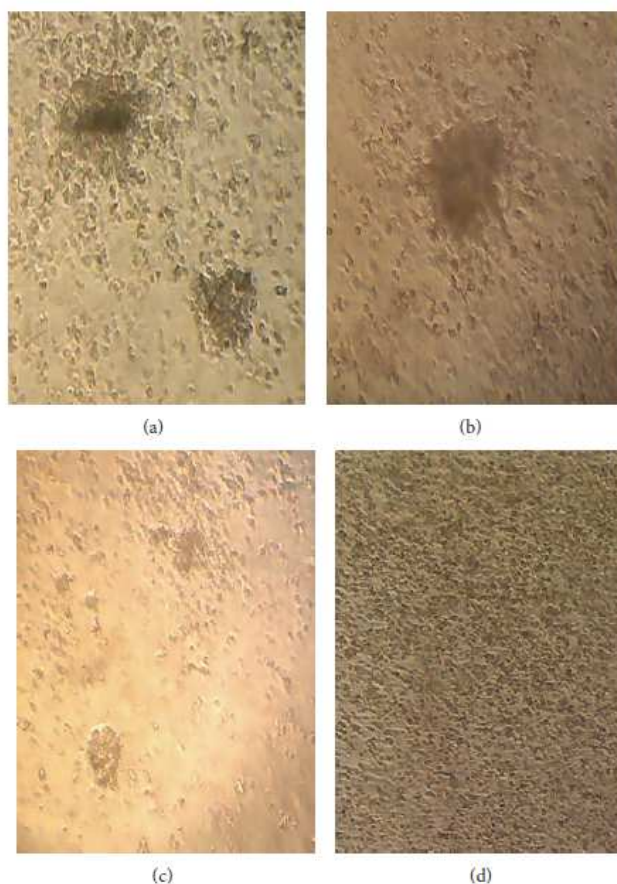


FIGURE 1: Phase contrast images showing the presence of *in vitro* granuloma-like aggregates after the infection of bovine PBMCs with the bovine K10 strain of *M. avium* subsp. *paratuberculosis* at MOI (bacteria : cells) of 1 : 16 (a) and 1 : 8 ((b) and (c)). Original magnification is 10x. Uninfected cells show an absence of granuloma formation (d).

study of these models relevant to treatment. Our review suggests that three-dimensional *in vitro* models are potentially comparable to granulomas observed in clinical specimens with respect to the cellular components involved, patterns of cell surface expression, cytokine and chemokine secretion, development of mycobacterial dormancy, and resuscitation under conditions that suppress the host immune response. These models could potentially provide insights into host-mycobacteria interactions at stages of granuloma formation too early to address with animal models. Three-dimensional *in vitro* models of granuloma formation may be useful to (i) understand what factors or molecules play a role in granuloma formation and in its continued integrity, (ii) evaluate the granuloma-inducing activity of particular antigens or attenuated mutants, (iii) provide a platform for testing vaccine and drug candidates against dormant as well as active mycobacteria, and (iv) characterize the molecular interplay between mycobacteria and host cells within granuloma structures.

Conflict of Interests

The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this paper.

Acknowledgments

Financial support for this work was provided by Grants from the Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA) and by European Funds for Regional Development (FEDER) (RTA2011-00049). Naiara Abendaño has a fellowship from the Department of Agriculture of the Basque Government. Liam E. Fitzgerald is an intern for Neiker through University of Washington and IE3 Global Internships Program. The authors thank Dr. Felix Bastida for helpful discussions. The authors thank the veterinarians at Donosti Slaughterhouse who helped with the collection of the blood animal samples used in this study.

References

- [1] J. L. Flynn and J. Chan, "Tuberculosis: latency and reactivation," *Infection and Immunity*, vol. 69, no. 7, pp. 4195–4201, 2001.
- [2] P. Tiruvilumala and L. B. Reichman, "Tuberculosis," *Annual Review of Public Health*, vol. 23, pp. 403–426, 2002.
- [3] WHO, "Fact sheet no. 104," 2013, <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/en/>.
- [4] R. J. Montali, S. K. Mikota, and L. I. Cheng, "Mycobacterium tuberculosis in zoo and wildlife species," *Revue Scientifique et Technique*, vol. 20, no. 1, pp. 291–303, 2001.
- [5] P. Oh, R. Granich, J. Scott et al., "Human exposure following Mycobacterium tuberculosis infection of multiple animal species in a metropolitan zoo," *Emerging Infectious Diseases*, vol. 8, no. 11, pp. 1290–1293, 2002.
- [6] S. K. Mikota and J. N. Maslow, "Tuberculosis at the human-animal interface: an emerging disease of elephants," *Tuberculosis*, vol. 91, no. 3, pp. 208–211, 2011.
- [7] A. Fanning, S. Edwards, and G. Hauer, "Mycobacterium bovis infection in humans exposed to elk in Alberta," *Canada Diseases Weekly Report*, vol. 17, no. 44, pp. 239–243, 1991.
- [8] J. R. Dalovisio, M. Stetter, and S. Mikota-Wells, "Rhinoceros' rhinorrhea: cause of an outbreak of infection due to airborne Mycobacterium bovis in zookeepers," *Clinical Infectious Diseases*, vol. 15, no. 4, pp. 598–600, 1992.
- [9] F. D. Menzies and S. D. Neill, "Cattle-to-cattle transmission of bovine tuberculosis," *The Veterinary Journal*, vol. 160, no. 2, pp. 92–106, 2000.
- [10] "Cat-to-human transmission of bovine TB: risk to public 'very low,'" *Veterinary Record: News and Reports*, vol. 174, no. 14, article 337, 2014.
- [11] S. L. Ott, S. J. Wells, and B. A. Wagner, "Herd-level economic losses associated with John's disease on US dairy operations," *Preventive Veterinary Medicine*, vol. 40, no. 3-4, pp. 179–192, 1999.
- [12] S. S. Nielsen and N. Toft, "A review of prevalences of paratuberculosis in farmed animals in Europe," *Preventive Veterinary Medicine*, vol. 88, no. 1, pp. 1–14, 2009.
- [13] S. A. Naser, G. Ghobrial, C. Romero, and J. F. Valentine, "Culture of Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis from the blood of patients with Crohn's disease," *The Lancet*, vol. 364, no. 9439, pp. 1039–1044, 2004.
- [14] R. B. Gearty, J. M. Aitken, R. I. Roberts, S. Ismail, J. Keenan, and M. L. Barclay, "Images of interest. Gastrointestinal: Mycobacterium avium paratuberculosis and Crohn's disease," *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, vol. 20, no. 12, Article ID 1943, 2005.
- [15] A. M. Scanu, T. J. Bull, S. Cannas et al., "Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis infection in cases of irritable bowel syndrome and comparison with Crohn's disease and John's disease: common neural and immune pathogenicities," *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 45, no. 12, pp. 3883–3890, 2007.
- [16] R. A. Juste, N. Elguezabal, J. M. Garrido et al., "On the prevalence of M. avium subspecies paratuberculosis DNA in the blood of healthy individuals and patients with inflammatory bowel disease," *PLoS ONE*, vol. 3, no. 7, article e2537, 2008.
- [17] R. A. Juste, N. Elguezabal, A. Pavón et al., "Association between Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis DNA in blood and cellular and humoral immune response in inflammatory bowel disease patients and controls," *International Journal of Infectious Diseases*, vol. 13, no. 2, pp. 247–254, 2009.
- [18] I. Abubakar, D. Myhill, S. H. Aliyu, and P. R. Hunter, "Detection of Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis from patients with Crohn's disease using nucleic acid-based techniques: a systematic review and meta-analysis," *Inflammatory Bowel Diseases*, vol. 14, no. 3, pp. 401–410, 2008.
- [19] M. Feller, K. Huwiler, R. Stephan et al., "Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis and Crohn's disease: a systematic review and meta-analysis," *The Lancet Infectious Diseases*, vol. 7, no. 9, pp. 607–613, 2007.
- [20] WHO, "Leprosy: global situation," 2012, <http://www.who.int/lep/situation/en/>.
- [21] S. Bruce, T. L. Schroeder, K. Ellner, H. Rubin, T. Williams, and J. E. Wolf Jr., "Armadillo exposure and Hansen's disease: an epidemiologic survey in southern Texas," *Journal of the American Academy of Dermatology*, vol. 43, no. 2, part 1, pp. 223–228, 2000.
- [22] B. M. Clark, C. K. Murray, L. L. Horvath, G. A. Deye, M. S. Rasnake, and R. N. Longfield, "Case-control study of armadillo contact and Hansen's disease," *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, vol. 78, no. 6, pp. 926–927, 2008.
- [23] O. Rojas-Espinosa and M. Lovik, "Mycobacterium leprae and Mycobacterium lepraemurium infections in domestic and wild animals," *Revue Scientifique et Technique*, vol. 20, no. 1, pp. 219–251, 2001.
- [24] D. G. Russell, "Mycobacterium tuberculosis: here today, and here tomorrow," *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, vol. 2, no. 8, pp. 569–577, 2001.
- [25] D. G. Russell, P. J. Cardona, M. J. Kim, S. Allain, and F. Altare, "Foamy macrophages and the progression of the human tuberculosis granuloma," *Nature Immunology*, vol. 10, no. 9, pp. 943–948, 2009.
- [26] L. Ramakrishnan, "Revisiting the role of the granuloma in tuberculosis," *Nature Reviews Immunology*, vol. 12, no. 5, pp. 352–366, 2012.
- [27] Z. Toossi and J. J. Ellner, "Host response to Mycobacterium tuberculosis," *Frontiers in Bioscience*, vol. 25, no. 3, pp. 133–140, 1998.
- [28] B. M. Saunders and A. M. Cooper, "Restraining mycobacteria: role of granulomas in mycobacterial infections," *Immunology and Cell Biology*, vol. 78, no. 4, pp. 334–341, 2000.
- [29] N. J. Garton, H. Christensen, D. E. Minnikin, R. A. Adegbola, and M. R. Barer, "Intracellular lipophilic inclusions of mycobacteria in vitro and in sputum," *Microbiology*, vol. 148, no. 10, pp. 2951–2958, 2002.
- [30] J. E. Gomez and J. D. McKinney, "M. tuberculosis persistence, latency, and drug tolerance," *Tuberculosis*, vol. 84, no. 1-2, pp. 29–44, 2004.
- [31] A. Bhatt, V. Molle, G. S. Besra, W. R. Jacobs Jr., and L. Kremer, "The Mycobacterium tuberculosis FAS-II condensing enzymes: their role in mycolic acid biosynthesis, acid-fastness, pathogenesis and in future drug development," *Molecular Microbiology*, vol. 64, no. 6, pp. 1442–1454, 2007.
- [32] P. Peyron, J. Vaubourgeix, Y. Poquet et al., "Foamy macrophages from tuberculous patients' granulomas constitute a nutrient-rich reservoir for M. tuberculosis persistence," *PLoS Pathogens*, vol. 4, no. 11, article e1000204, 2008.
- [33] J. Daniel, H. Maamar, C. Deb, T. D. Sirakova, and P. E. Kolattukudy, "Mycobacterium tuberculosis uses host triacylglycerol to accumulate lipid droplets and acquires a dormancy-like phenotype in lipid-loaded macrophages," *PLoS Pathogens*, vol. 7, no. 6, article e1002093, 2011.

- [34] E. Guirado and L. S. Schlesinger, "Modeling the *Mycobacterium tuberculosis* granuloma—the critical battlefield in host immunity and disease," *Frontiers in Immunology*, vol. 4, article 98, p. 98, 2013.
- [35] M. Sandor, J. V. Weinstock, and T. A. Wynn, "Granulomas in schistosome and mycobacterial infections: a model of local immune responses," *Trends in Immunology*, vol. 24, no. 1, pp. 44–52, 2003.
- [36] J. M. Tufariello, J. Chan, and J. L. Flynn, "Latent tuberculosis: mechanisms of host and bacillus that contribute to persistent infection," *The Lancet Infectious Diseases*, vol. 3, no. 9, pp. 578–590, 2003.
- [37] T. T. Yoshikawa, "Tuberculosis in aging adults," *Journal of the American Geriatrics Society*, vol. 40, no. 2, pp. 178–187, 1992.
- [38] O. C. Turner, R. G. Keefe, I. Sugawara, H. Yamada, and I. M. Orme, "SWR mice are highly susceptible to pulmonary infection with *Mycobacterium tuberculosis*," *Infection and Immunity*, vol. 71, no. 9, pp. 5266–5272, 2003.
- [39] D. M. Bouley, N. Ghorri, K. L. Mercer, S. Falkow, and L. Ramakrishnan, "Dynamic nature of host-pathogen interactions in *Mycobacterium marinum* granulomas," *Infection and Immunity*, vol. 69, no. 12, pp. 7820–7831, 2001.
- [40] J. M. Davis and L. Ramakrishnan, "The role of the granuloma in expansion and dissemination of early tuberculosis infection," *Cell*, vol. 136, no. 1, pp. 37–49, 2009.
- [41] H. M. Algood, J. Chan, and J. L. Flynn, "Chemokines and tuberculosis," *Cytokine & Growth Factor Reviews*, vol. 14, no. 6, pp. 467–477, 2003.
- [42] I. M. Orme and A. M. Cooper, "Cytokine/chemokine cascades in immunity to tuberculosis," *Immunology Today*, vol. 20, no. 7, pp. 307–312, 1999.
- [43] V. Lazarevic, D. Nolt, and J. L. Flynn, "Long-term control of *Mycobacterium tuberculosis* infection is mediated by dynamic immune responses," *The Journal of Immunology*, vol. 175, no. 2, pp. 1107–1117, 2005.
- [44] M. L. Bourigault, R. Vacher, S. Rose, M. L. Olleros et al., "Tumor necrosis factor neutralization combined with chemotherapy enhances *Mycobacterium tuberculosis* clearance and reduces lung pathology," *Journal of Clinical and Experimental Immunology*, vol. 2, no. 1, pp. 124–134, 2013.
- [45] D. R. Roach, A. G. Bean, C. Demangel, M. P. France, H. Briscoe, and W. J. Britton, "TNF regulates chemokine induction essential for cell recruitment, granuloma formation, and clearance of mycobacterial infection," *The Journal of Immunology*, vol. 168, no. 9, pp. 4620–4627, 2002.
- [46] S. Marino, D. Sud, H. Plessner et al., "Differences in reactivation of tuberculosis induced from anti-TNF treatments are based on bioavailability in granulomatous tissue," *PLoS Computational Biology*, vol. 3, no. 10, pp. 1909–1924, 2007.
- [47] S. D. Chakravarty, G. Zhu, M. C. Tsai et al., "Tumor necrosis factor blockade in chronic murine tuberculosis enhances granulomatous inflammation and disorganizes granulomas in the lungs," *Infection and Immunity*, vol. 76, no. 3, pp. 916–926, 2008.
- [48] Y. Zhang, M. Broser, and W. N. Rom, "Activation of the interleukin 6 gene by *Mycobacterium tuberculosis* or lipopolysaccharide is mediated by nuclear factors NF-IL6 and NF- κ B," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 91, no. 6, pp. 2225–2229, 1994.
- [49] M. S. Miranda, A. Breiman, S. Allain, F. Deknuydt, and F. Altare, "The tuberculous granuloma: an unsuccessful host defence mechanism providing a safety shelter for the bacteria?" *Clinical and Developmental Immunology*, vol. 2012, Article ID 139127, 14 pages, 2012.
- [50] B. M. Saunders, A. A. Frank, and I. M. Orme, "Granuloma formation is required to contain bacillus growth and delay mortality in mice chronically infected with *Mycobacterium tuberculosis*," *Immunology*, vol. 98, no. 3, pp. 324–328, 1999.
- [51] P. J. Cardona, R. Llatjos, S. Gordillo et al., "Evolution of granulomas in lungs of mice infected aerogenically with *Mycobacterium tuberculosis*," *Scandinavian Journal of Immunology*, vol. 52, no. 2, pp. 156–163, 2000.
- [52] J. L. Flynn, "Lessons from experimental *Mycobacterium tuberculosis* infections," *Microbes and Infection*, vol. 8, no. 4, pp. 1179–1188, 2006.
- [53] A. J. Lenaerts, D. Hoff, S. Aly et al., "Location of persisting mycobacteria in a Guinea pig model of tuberculosis revealed by r207910," *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 51, no. 9, pp. 3338–3345, 2007.
- [54] J. L. Flynn, S. V. Capuano, D. Croix et al., "Non-human primates: a model for tuberculosis research," *Tuberculosis*, vol. 83, no. 1–3, pp. 116–118, 2003.
- [55] F. Saxegaard, "Experimental infection of calves with an apparently specific goat-pathogenic strain of *Mycobacterium paratuberculosis*," *Journal of Comparative Pathology*, vol. 102, no. 2, pp. 149–156, 1990.
- [56] J. D. Rodgers, N. L. Connery, J. McNair et al., "Experimental exposure of cattle to a precise aerosolised challenge of *Mycobacterium bovis*: a novel model to study bovine tuberculosis," *Tuberculosis*, vol. 87, no. 5, pp. 405–414, 2007.
- [57] D. R. Roach, H. Briscoe, K. Baumgart, D. A. Rathjen, and W. J. Britton, "Tumor necrosis factor (TNF) and a TNF-mimetic peptide modulate the granulomatous response to *Mycobacterium bovis* BCG infection *in vivo*," *Infection and Immunity*, vol. 67, no. 10, pp. 5473–5476, 1999.
- [58] J. Daniel, C. Deb, V. S. Dubey et al., "Induction of a novel class of diacylglycerol acyltransferases and triacylglycerol accumulation in *Mycobacterium tuberculosis* as it goes into a dormancy-like state in culture," *Journal of Bacteriology*, vol. 186, no. 15, pp. 5017–5030, 2004.
- [59] C. Deb, C.-M. Lee, V. S. Dubey et al., "A novel *in vitro* multiple-stress dormancy model for mycobacterium tuberculosis generates a lipid-loaded, drug-tolerant, dormant pathogen," *PLoS ONE*, vol. 4, no. 6, article e6077, 2009.
- [60] U. Seitzer and J. Gerdes, "Generation and characterization of multicellular heterospheroids formed by human peripheral blood mononuclear cells," *Cells Tissues Organs*, vol. 174, no. 3, pp. 110–116, 2003.
- [61] K. A. Birkness, J. Guarner, S. B. Sable et al., "An *in vitro* model of the leukocyte interactions associated with granuloma formation in *Mycobacterium tuberculosis* infection," *Immunology and Cell Biology*, vol. 85, no. 2, pp. 160–168, 2007.
- [62] N. Kapoor, S. Pawar, T. D. Sirakova, C. Deb, W. L. Warren, and P. E. Kolattukudy, "Human granuloma *in vitro* model, for TB dormancy and resuscitation," *PLoS ONE*, vol. 8, no. 1, article e53657, 2013.
- [63] H. Wang, Y. Maeda, Y. Fukutomi, and M. Makino, "An *in vitro* model of *Mycobacterium leprae* induced granuloma formation," *BMC Infectious Diseases*, vol. 13, article 279, 2013.
- [64] M. P. Puissegur, C. Botanch, J.-L. Duteyrat, G. Delsol, C. Caratero, and F. Altare, "An *in vitro* dual model of mycobacterial granulomas to investigate the molecular interactions between mycobacteria and human host cells," *Cellular Microbiology*, vol. 6, no. 5, pp. 423–433, 2004.

PUBLICACIÓN V

***Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolates induce *in vitro* granuloma formation and show successful survival phenotype, common anti-inflammatory and antiapoptotic responses within ovine macrophages regardless of genotype or host of origin.**

Abendaño N, Tyukalova L, Barandika JF, Balseiro A, Sevilla IA, Garrido JM,

Juste RA, Alonso-Hearn M.

Plos One, 9(8):e104238



Mycobacterium Avium subsp. *Paratuberculosis* Isolates Induce *In Vitro* Granuloma Formation and Show Successful Survival Phenotype, Common Anti-Inflammatory and Antiapoptotic Responses within Ovine Macrophages Regardless of Genotype or Host of Origin

Naiara Abendaño¹, Lyudmila Tyukalova¹, Jesse F. Barandika¹, Ana Balseiro², Iker A. Sevilla¹, Joseba M. Garrido¹, Ramon A. Juste¹, Marta Alonso-Hearn^{1*}

¹ Department of Animal Health, Basque Institute for Agricultural Research and Development, NEIKER-Tecnalia, Technological Park of Bizkaia, Bizkaia, Spain, ² Department of Animal Health, Department of Agriculture of the Regional Government of the Principality of Asturias, SERIDA, Deva, Asturias, Spain

Abstract

The analysis of the early macrophage responses, including bacterial growth within macrophages, represents a powerful tool to characterize the virulence of clinical isolates of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (*Map*). The present study represents the first assessment of the intracellular behaviour in ovine monocyte-derived macrophages (MDMs) of *Map* isolates representing distinct genotypes (C, S and B), and isolated from cattle, sheep, goat, fallow deer, deer, and wild boar. Intracellular growth and survival of the selected isolates in ovine MDMs was assessed by quantification of CFUs inside of the host cells at 2 h p.i. (day 0) and 7 d p. i. using an automatic liquid culture system (Bactec MGIT 960). Variations in bacterial counts over 7 days from the baseline were small, in a range between 1.63 to 1.05-fold. After 7 d of infection, variations in the estimated log₁₀ CFUs between all the tested isolates were not statistically significant. In addition, ovine MDMs exhibited enhanced anti-inflammatory, antiapoptotic and antidestructive responses when infected with two ovine isolates of distinct genotype (C and S) or with two C-type isolates from distinct hosts (cattle and sheep); which correlated with the successful survival of these isolates within ovine MDMs. A second objective was to study, based on an *in vitro* granuloma model, latter stages of the infection by investigating the capacity of two *Map* isolates from cattle and sheep to trigger formation of microgranulomas. Upon 10 d p.i., both *Map* isolates were able to induce the formation of granulomas comparable to the granulomas observed in clinical specimens with respect to the cellular components involved. In summary, our results demonstrated that *Map* isolates from cattle, sheep, goats, deer, fallow-deer and wild boar were able not only to initiate but also to establish a successful infection in ovine macrophages regardless of genotype.

Citation: Abendaño N, Tyukalova L, Barandika JF, Balseiro A, Sevilla IA, et al. (2014) *Mycobacterium Avium* subsp. *Paratuberculosis* Isolates Induce *In Vitro* Granuloma Formation and Show Successful Survival Phenotype, Common Anti-Inflammatory and Antiapoptotic Responses within Ovine Macrophages Regardless of Genotype or Host of Origin. PLOS ONE 9(8): e104238. doi:10.1371/journal.pone.0104238

Editor: Srinand Sreevatsan, University of Minnesota, United States of America

Received: February 17, 2014; **Accepted:** July 9, 2014; **Published:** August 11, 2014

Copyright: © 2014 Abendaño et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: Financial support for this work was provided by a grant from the Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA) and by European Funds for Regional Development (FEDER) (RTA2011-00049). Naiara Abendaño has a fellowship from the department of Agriculture of the Basque Government. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* Email: malonso@neiker

Introduction

Mycobacterium avium subsp. *paratuberculosis* (*Map*) is the causal agent of paratuberculosis or Johne's disease (JD), a chronic inflammatory bowel disease of domesticated ruminants including cattle, sheep, goats and farmed deer, and wildlife worldwide [1,2,3]. Paratuberculosis causes major economic losses to the global dairy industry due to lower milk production and reduced slaughter value [4,5]. *Map* isolates can be classified in two genotypes based on culture characteristics and genome analysis: sheep isolates (also called "S type" or "type I") and cattle isolates (also called "C type" or "type II") [6,7]. Single nucleotide polymorphism (SNP) analysis of the *IS1311* insertion sequence distinguishes three types of strains: S, C and B or "bison" type [8]. Because S-type isolates of *Map* predominate in sheep and C-type

in cattle, different host specificities were assumed for both types of isolates.

Map is endocytosed by the M cells of the ileal Peyer's patches and subsequently phagocytosed by subepithelial and intraepithelial macrophages [9,10]. Once inside host macrophages, many phagosomes containing *Map* fail to acquire significant amounts of lysosomal-associated membrane protein (LAMP-1) and to fuse with lysosomes allowing *Map* to persist within infected macrophages [11]. In addition, it has been suggested that *Map* alters the ability of infected macrophages to react to extracellular signals from T cells, particularly through the CD154-CD40 system [12]. *Map*-infected macrophages secrete cytokines and chemokines which contribute to the recruitment of blood and tissue macrophages and T-lymphocytes to the infection site. This

organized aggregate of immune host cells around *Map*-infected macrophages is called a granuloma. Within granulomas, activated macrophages differentiate to lipid-loaded macrophages (foamy macrophages), epithelioid cells with large cytoplasm and interdigitated membranes, and/or fuse together to form multinucleated giant cells also called giant Langhans cells [13,14]. T and B lymphocytes surround the granuloma core, and a tight coat of fibroblasts and collagen closes the structure [15].

The aim of the current study was to identify differences in virulence between *Map* isolates at two different stages of the infection. Early interaction of *Map* isolates with ovine macrophages was assessed using an ovine monocyte-derived macrophage model. Later stages of the infection, such as the first stages of granuloma formation, were mimicked using an *in vitro* granuloma model. The early interaction of *Map* with subepithelial dome macrophages, its primary host cell, leads to the release of cytokines and chemokines. The differential release of proinflammatory and anti-inflammatory cytokines contributes to the overall cell activation, which may determine whether the pathogen is eradicated or not. Therefore, the analysis of the initial macrophage responses, including bacterial growth within macrophages, represents a powerful tool to rapidly characterize the virulence of clinical isolates of *Map*. By using a bovine macrophage-like cell line (BoMac) and bovine monocyte-derived macrophages (MDMs), we previously observed differences in intracellular growth and persistence in bovine macrophages between strains of *Map* that grouped according to the host of origin [16]. Our results demonstrated that *Map* isolates from goats and sheep persisted within bovine macrophages in lower CFUs than cattle, bison, deer and wild boar strains after 7 days of infection regardless of genotype. A strong correlation between the intracellular multiplication of the tested isolates and patterns of production of host IL-6, TGF- β , MMP1-6, BCL2-1 and IL-1 α was observed. Consequently, we suggested that the levels of expression of these proteins might be used to discriminate between isolates of *Map* with differential pathogenicity in bovine macrophages [17]. The intracellular survival within ovine macrophages of *Map* isolates representing distinct genotypes and isolated from a diverse range of hosts has not been fully addressed. Therefore, our first objective was to identify differences in pathogenicity between distinct isolates of *Map* by clarifying which *Map* isolates could potentially initiate disease in an ovine MDM model. For this purpose, we evaluated the capacity of a panel of 10 *Map* isolates representing distinct genotypes to grow and survive within ovine MDMs using an automatic culture system (Bactec MGIT 950). In addition, the expression of several pro- and anti-inflammatory cytokines and genes involved in apoptosis and tissue destruction were tested by qRT-PCR in ovine MDMs infected with the selected *Map* isolates. Because common changes in IL10, TGF- β , and TNF α gene expression were previously observed in human and bovine peripheral blood mononuclear cells (PBMCs), MDMs, and in macrophage-like cell lines infected with *Map* [17], these specific genes were selected for gene expression analysis in ovine MDMs. The expression of the apoptotic inhibitor BCL2-1 and the inhibitor of tissue destruction TIMP-1 was analyzed in ovine MDMs because up-regulation of both genes was previously demonstrated in BoMac cells infected with a bovine isolate of *Map* [16]. Using c-DNA microarrays focused on expressed sequences from a bovine total leukocyte library (BOLT5), significant up-regulation of the antiapoptotic BCL2-A1 gene was also observed in *Map*-infected bovine MDMs relative to uninfected cells [18].

Although MDMs can provide insights into *Map*-host interactions at the very early stages of the infection (7-10 d p. i.), this

cellular model is unable to mimic later stages of the infection, such as the first stages of granuloma formation. To address this issue, we have developed a three-dimensional *in vitro* model enabling the formation of *Map*-induced granulomas by incubating infected ovine PBMCs with an extracellular matrix. Since the ability to develop a well-defined granulomatous response was previously shown to correlate with the severity of mycobacterial infections [19,20,21], the second objective of our study was to assess whether *in vitro* granuloma formation was induced by two *Map* isolates from cattle and sheep with distinct genotypes.

By comparing the interaction of distinct *Map* isolates with ovine macrophages at two different stages of the infection, we are seeking to identify differences in host specificity and pathogenicity between *Map* isolates and to provide scientific data to support effective control management strategies against ovine paratuberculosis. This information might be very useful in situations where veterinarians and producers have to assess risks and introduce effective management strategies to control paratuberculosis in multispecies livestock operations or on farms where livestock share pastures with wildlife animals potentially infected with *Map*.

Materials and Methods

Ethics Statement

Experimental procedures were performed by clinical veterinarians in strict accordance with the recommendations in the Spanish Ethical Guide for the care of animals used for experimental and other scientific purposes (Royal Legislative Decree 53/2013). Blood collection procedure was approved by the Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) of NEIKER-Tecnalia and by the Department of Agriculture, Diputación Foral de Bizkaia, Spain (Permit N° 14135).

Map Isolates, Bacterial Culture and Preparation of Bacterial Suspensions

Nine *Map* isolates from cattle (*Bos taurus*), sheep (*Ovis aries*), goat (*Capra hircus*), red deer (*Cervus elaphus*), fallow deer (*Dama dama*), and wild boar (*Sus scrofa*) species were selected from the collection of isolates at the Mycobacteria laboratory, NEIKER-Tecnalia, on the basis of varied hosts and genomic profiles as per Sevilla et al., 2007 [22]. These isolates of *Map* were previously recovered from fecal or tissue specimens of domestic or wildlife animal species and maintained as glycerol stocks at -80°C [23,24]. Aliquots of these glycerol stocks were utilized to directly inoculate all subsequent cultures for use in infection of macrophages. Most of the specimens were collected in several geographic areas of Spain, but three isolates from India, Portugal and The United States were also included in the study. *Map* reference strain K10, a sequenced and laboratory-adapted strain recovered from a clinical case of paratuberculosis, was obtained from the American Type Culture Collection (ATCC) (Manassas, VA). The 10 isolates of *Map* selected for our study were grown in T25 tissue culture flasks at $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ for up to 3 months in 10 ml of Middlebrook 7H9 broth (Difco Laboratories, Detroit, MI) supplemented with 10% (vol/vol) oleic acid-albumin-dextrose-catalase (OADC) (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ), 0.05% (wt/vol) Tween-80 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) and 2 mg L $^{-1}$ of mycobactin J (Alied Monitor Inc., Fayette, MO). Bacterial cells were harvested by centrifugation at 3,000 x rpm for 20 min in a Beckman Coulter Allegra X-12 centrifuge. Bacterial pellets were resuspended in 2 ml of Hank's balanced salt solution (HBSS), and the resultant suspension was passed 20 times through a 27 gauge needle in order to de-clump cells. The turbidity of the bacterial suspension was adjusted to a McFarland standard

of 1 with a Densimat (bioMerieux, Marcy l'Etoile, France). Only the top fraction of the suspension containing dispersed bacteria was used for the infection assays.

Ovine Monocyte-derived Macrophages (MDMs) Culture

For isolation of ovine mononuclear cells, peripheral blood was collected from the jugular vein of a healthy Laxa sheep older than 48 months. Blood draws were separated by a period of 14 days for red blood cell renewal and a maximum of 1% of the animal's body weight was removed in each blood draw. By monitoring the hematocrit and hemoglobin of the animal, we evaluated whether the animal had sufficiently recovered from a single blood draw. The blood was collected into heparinised Vacutainer tubes (Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD), transferred aseptically into sterile glass bottles and diluted 1:2 in HBSS. Twenty-five millilitres of blood:HBSS were layered over 10 ml of Ficoll-Paque (1,084 g/cm³) (GE HealthCare Bio-Sciences, Uppsala, Sweden) in 50-ml centrifuge tubes. Cells were centrifuged at 900 × g for 30 min to separate erythrocytes and polymorphonuclear cells from PBMCs. PBMCs were collected from the HBSS-Ficoll-Paque interface and washed with HBSS by centrifugation at 400 × g for 10 min. The proportion of purified ovine monocytes was previously estimated in 35.5% of the PBMC fraction obtained by density centrifugation which in itself represents about 70% of the total white blood fraction [25]. The isolated PBMCs were resuspended in Macrophage-serum free medium (Macrophage-SFM) (Invitrogen, Carlsbad, CA) supplemented with 20 mM l-glutamine, 10% heat-inactivated lamb serum (Lonza, Basel, Switzerland), 100 U/ml of penicillin G and 100 µg/ml of streptomycin sulphate. PBMCs were seeded at a density of 1 × 10⁶ PBMC/ml into 24-well tissue culture plates and incubated for 2 h at 37°C in a 5% CO₂ incubator. Non-adherent cells were removed by washing twice with HBSS. This step is expected to increase the purity of the purified monocytes. Residual lymphocytes present in the cultures are not expected to influence significantly the experimental results because a normal macrophage-T cell interaction has been shown to be impaired in *Map*-infected macrophages [12]. Adherent cells were incubated for 7 days at 37°C in supplemented Macrophage-SFM to allow differentiation to MDMs prior to infection with *Map*. After 7 days at 37°C most adherent cells were stellate in shape, consistent with macrophage morphology. Incubation of monocytes in Teflon wells or with granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) for macrophage maturation are standard protocols for maturing monocytes after Ficoll gradient. However, it was previously suggested that ovine mononuclear blood cells are able to proliferate and differentiate in culture without the addition of growth factors [26].

Infection of Ovine MDMs with *Map* Isolates from Domestic and Wild Animal Species

Ovine MDMs were inoculated in triplicate with single-cell suspensions of each of the 10 *Map* isolates at a MOI (bacteria:cell) of 10:1. This level of infection did not alter cell viability over a 1-week assay, as was previously assessed by Trypan blue staining. After a 2 h infection time, the supernatant was removed and the cells were washed twice with HBSS to remove extracellular bacteria. Infected macrophages were lysed at this time point (considered as day 0) or cultured in supplemented Macrophage-SFM medium at 37°C for 7 days (day 7). At each time point, the supernatant was aspirated and infected macrophages were lysed by vigorous pipetting with 0.5 ml of 0.1% Triton X-100 (Sigma-Aldrich) in sterile water for 10 min.

Viable *Map* Quantification using the Bactec MGIT 960 System

Supplemented Mycobacteria Growth indicator tubes (MGIT) (Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD) were inoculated with 0.1 ml of each initial bacterial suspension or with 0.5 ml of the cell lysates for each time point. Each MGIT tube contained 7 ml of modified Middlebrook 7H9 broth base with casein peptone and an oxygen-sensitive fluorescent compound (tris-4,7-diphenyl-1,10-phenanthroline ruthenium chloride pentahydrate) embedded in silicone on the bottom of the tube. Each tube was supplemented with 800 µl of an enrichment supplement (BBL MGIT OADC growth supplement) and an antibiotic mixture (BBL MGIT PANTA Antibiotic Mixture) (Becton, Dickinson and Company). The tubes were also supplemented with 2 µg ml⁻¹ of mycobactin J. Inoculated vials were incubated at 37 ± 2°C for up to 41 days in the Bactec MGIT 960 instrument (Becton, Dickinson and Company) and were monitored automatically every hour for an increase of fluorescence. The earliest instrumental indication of positivity (i.e., time to detection [TTD]) for each tube was recorded. Any tube that was identified as positive was removed from the instrument, and a sample was tested by PCR to confirm the presence of *Map*. If a tube did not signal positive before 42 days (6 weeks) of incubation, it was removed from the instrument and determined to be negative. The predicted number of bacteria in each positive tube was calculated by using previously generated mathematical formulas which relate TTD (in days) to estimated log₁₀ CFUs for each specific *Map* isolate (Table 1) [27].

Assessment of Uptake, Intracellular Growth and Persistence of *Map* Isolates in Ovine MDMs

Mean estimated log₁₀ CFUs in the initial inocula and at days 0 and 7 from three replicate assays were calculated. The percentages of uptake were calculated as the percentages of the inoculated bacteria that were recovered from each cell lysate at day 0. Growth changes between day 0 and day 7 were calculated by dividing the estimated log₁₀ CFUs at day 7 by that at day 0 (*n*-fold). The ability of each isolate to persist within host cells is presented as the log₁₀ CFUs at day 7.

RNA isolation, c-DNA Synthesis, and Detection of Several Cytokines and Proteins Involved in Apoptosis or Tissue Destruction by a Two-step Quantitative Reverse-Transcription PCR (qRT-PCR)

Ovine MDMs were inoculated with two ovine isolates of distinct genotype (C and S) or with two C-type isolates from distinct hosts (cattle and sheep) as described above. Uninfected cells were used as controls. At 4, 14 and 24 h p. i., the infected MDMs were washed in 0.5 ml of cold HBSS, mixed with 50 µl of Lysis Solution and incubated at room temperature for five minutes to allow RNA release into the Lysis Solution (PowerSYBR[®] Green Cells-to-CT[™] Kit, Life Technologies, Carlsbad, CA). DNase I was added to the Lysis Solution to allow genomic DNA degradation at this step. The lysis procedure simultaneously prepares cell lysates for RT-PCR and removes genomic DNA. Next, 5 µl of Stop Solution were mixed into the lysate to inactivate the lysis reagents so that they would not inhibit the reverse transcription (RT) or polymerase chain reactions (PCR). Cell lysates were then reverse transcribed to synthesize cDNA using 20 X RT Enzyme Mix and 2 X SYBR RT Buffer. The reaction mixtures contained 2.5 µl of 20 X RT Enzyme Mix, 25 µl of 2 X SYBR[®] RT Buffer, 12.5 µl of Nuclease-free water and 10 µl of the lysate in a 50 µl cDNA synthesis reaction. In order to demonstrate that the template for the PCR was cDNA and not genomic DNA, minus-RT controls

Table 1. IS1371 PCR-REA types, PFGE profiles and estimations of span, K, and plateau for the quantification of each *M. avium* subsp. *paratuberculosis* isolate in the Bactec MGIT 960 system.

Isolate	Region/Country	Host	PCR-REA	PFGE	Span	K	Plateau
K10	United States	Cattle	C	1-1	11.48	0.0503	-1.316
6	Cantabria/Spain	Cattle	C	52-1	15.44	0.0220	-6.080
P181	Aragon/Spain	Sheep	C	2-1	9.972	0.0211	-0.534
2:49/06-1	Portugal	Sheep	S	-	11.82	0.0724	3.222
3:4	India	Sheep	B	60-1	11.85	0.0298	-0.480
711	Bizkaia/Spain	Goat	C	2-1	17.25	0.0301	-8.208
311	Menorca/Spain	Goat	S	16-47	9.511	0.0612	3.016
855	Toledo/Spain	Deer	C	68-1	10.95	0.1927	1.317
6:2/07	Asturias/Spain	Fallow Deer	C	-	21.06	0.0106	-11.125
6:1	Toledo/Spain	Wild boar	C	2-1	8.755	0.0486	0.760

Growth of all the isolates in the Bactec MGIT 960 system fitted to a one-phase exponential decay model according to the following equation: \log_{10} inoculum size = $\text{span} \times e^{-(K \times \text{TTD})} + \text{plateau}$. Span is the difference between TTD at time zero and the plateau, K is the degree of decay for the \log_{10} CFU, and plateau is the value for \log_{10} CFU curve flattening.
doi:10.1371/journal.pone.0104238.t001

containing all the RT components except the 20 X RT Enzyme Mix were prepared for every RNA sample. The reaction mixtures were incubated at 37°C for 60 min and then at 95°C for 5 min to inactivate the RT enzyme. Finally, the synthesized cDNAs were amplified by real-time PCR using the Power SYBR Green PCR Master Mix and the PCR primers set for the target of interest. Real-time qPCR reactions were carried out in triplicate in 25 μ l reaction mixtures containing 12.5 μ l of Power SYBR Green PCR Master Mix, the optimum concentration of each pair of primers, and 4 μ l of cDNA. Using cDNA synthesized from non-infected cells as template, we had previously determined the concentration of each pair of primers that provided optimal assay performance (i.e., low Ct and maximum Δ Rn), but did not produce nonspecific product formation (primer dimer products) with no-template negative controls (NTC). Primer-dimer products are shorter than the expected amplicons, and thus will have a lower Tm. Real-time qPCR amplifications of cDNAs were accomplished using the ABI Prism 7500 detection system (Applied Biosystem, Carlsbad, CA) under the following conditions: 1 cycle of 95°C for 10 min, 40 cycles of denaturation at 95°C for 15 s, annealing at 60°C for 60 s, and a dissociation curve to measure the specificity of the amplification. Real-time qPCR primers for the amplification of each selected host gene were designed using PrimerExpress 3.0 software and verified for theoretical non-specific annealing with Primer-Blast. Table 2 shows the list of the amplified ovine genes and the corresponding primer sequences. Since the Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GADPH) gene is constitutively expressed, it was used as the endogenous control gene in the assays. To determine the changes in gene expression (n-fold) or relative quantitation (RQ), the following formula was used: $RQ = 2^{-\Delta(\Delta C_T)}$ where ΔC_T is C_T (target gene) - C_T (GADPH) and $\Delta(\Delta C_T)$ is ΔC_T (experimental) - ΔC_T (control). Results were expressed as relative quantifications of transcription compared to those of control uninfected cells.

Ovine PBMCs Infection with *Map* Isolates Representing Distinct Genotype and *in vitro* Granuloma Formation

An extracellular matrix (ECM) was prepared according to Kapoor et al. [28] by mixing: 0.8 ml of 3 mg/ml Purecoll collagen solution (Nutacon BV, Leimuden, The Netherlands), 0.1 ml of 10 X Dulbecco's Phosphate buffered saline (DPBS) (Lonza) and 4 μ l of 1mg/ml Human Fibronectin (BD Biosciences). The pH of the mixture was adjusted to 7.2–7.6 using sterile 0.1 M NaOH (Sigma). The final volume of the matrix solution was adjusted to 1 ml with sterile water. To prevent gelation, the temperature of the mixture was maintained at 4°C. Fifty microliters of the matrix solution were added to individual wells of a 96-well tissue culture plate. Ovine PBMCs, prepared as described above, were seeded on the ECM at 5×10^5 cells/50 μ l ECM/well of a 96-well plate. *Map* K10 strain or the ovine 2349/06.1 isolate of *Map* were added to each well without touching the surface of the ECM at MOIs (bacteria: cell) of 1:8, 1:16 and 1:33. The ECM was allowed to set by incubating at 37 °C in a 5% CO₂ incubator for 2 h. The volume of each well was adjusted to 200 μ l by the addition of RPMI+20% FBS. Samples were incubated at 37°C in a 5% CO₂ incubator for 10 days. The media was changed on day 5. Cellular aggregation was observed under an inverted phase-contrast microscope (Olympus IX81) equipped with a Nikon DS Fi1 digital camera. Images were edited using Fiji/Image J Software (v 1.48). *In vitro* generated aggregates were counted at 5 and 10 days
p i

Table 2. Genes and primer sequences used in the qRT-PCR assays.

Code Protein	Name	Abbreviation	Primers code/sequence (5'-3')
NM001009806.1	Interleukin 2	IL2	169F/ACAACCCTTGCTTGCATTGC 170R/CTTGAAGTAGGTGCACCCTTTG
NM0010093192	TIMP Metalloproteinase inhibitor 1	TIMP-1	173F/TGCTCATCTATCCCCTGCAAA 174R/TGGTCCGTCCACAAGCAA
NM001009327.1	Interleukin 10	IL10	191F/TTCTTTCAAATGAAGGACCAACG 192R/CCCTTAAAGTCATCCAGCAGAGA
X55152.1	Tumor necrosis factor, member 2	TNF α -2	177F/CCATCAGCCGCATTGCA 178R/TTGATGGCAGAGAGGATGTTGA
NM001009226.1	Mitochondrial protein	BCL2-1	181F/GGGCACTGTGCGTGGAA 182R/TGCGATCCGACTCACCATA
NM0010094001	Transforming growth factor, beta 1	TGF β -1	179F/AAGCGGAAGGGCATCGA 180R/CGAGCCGAAGTTGGACAAA
AF030943.1	Glyceraldehyde 3-PO $_4$ ³ dehydrogenase	GAPDH	187F/TGCCCGCTGGAGAAAACC 188R/CGCCTGCTTCACCACCTT

doi:10.1371/journal.pone.0104238.t002

Harvesting Aggregates for Histology

After 10 days of incubation, the medium was carefully removed from each well and replaced with 0.2 ml of 10% neutral buffered formalin. Plates were incubated overnight at 37°C in a 5% CO₂ incubator overnight. Next day, the formalin was removed and 0.2 ml of hematoxylin diluted 1:1 in phosphate-buffered saline (PBS) were added to each well. After 10 min of incubation at room temperature, the stain was removed and 0.2 ml of 2% LE-2 agarose (Lonza) heated at 42–45°C was added to each well. Plates were placed at 4°C for 10–15 min to allow agarose to solidify. Agarose plugs containing cellular aggregates were removed from each well and stored in six-well dishes in 70% ethanol before processing for histopathology.

Paraffin Embedding, Sectioning and Histological Staining

A drop of eosin was applied to the agarose plugs containing aggregates. Each plug was wrapped in tissue wipers (VWR,

Radnor, PA, US), placed in a marked cassette and processed on a tissue processor Shandon Citadel 2000 (Fisher Scientific Co., Pittsburgh, PA, US) for 17 h. Each plug was embedded in paraffin wax, and sectioned at 4 μ m on a microtome Leica RM2035 (Leica Microsystems, Barcelona, Spain). Sections were mounted on treated microscope slides (Fisher Scientific Co) and stained with hematoxylin and eosin (HE) and Ziehl-Neelsen (ZN) stain for acid-fast bacteria. Aggregates were observed under a microscope Olympus BX51 equipped with an Olympus U-CMAD3 digital camera.

Statistical Analysis

Estimated log₁₀ CFUs in the initial inoculums and 0 and 7 days after infection of ovine MDMs were compared with the General Linear Model (GLM) procedure of the SAS statistical package version 9 (SAS Institute Inc., Cary, NC). In the analysis; time p.i. (inoculum and days 0 and 7), genotype (C, S and B), and host of

Table 3. Entry and intracellular growth of *Map* isolates and the reference strain K10 in ovine MDMs.

Isolate	Host-IS1311 PCR/REA type	Entry (%) ^a	log ₁₀ CFU (\pm SD) ^b		n-Fold ^d	P value
			Day 0 ^c	Day 7		
K10	Cattle-C	65.32	4.88 (\pm 2.59)	7.99 (\pm 0.35)	1.63	0.0058 ^e
681	Wild board-C	73.13	5.33 (\pm 0.99)	8.01 (\pm 0.20)	1.50	0.1901
6	Cattle-C	67.36	5.86 (\pm 2.73)	7.89 (\pm 1.50)	1.34	0.4752
334	Sheep-B	75.01	6.05 (\pm 3.28)	7.64 (\pm 3.47)	1.26	0.9942
622/07	Fallow deer-C	79.56	7.48 (\pm 1.66)	8.82 (\pm 0.19)	1.17	0.9998
711P	Goat-C	74.91	5.59 (\pm 0.80)	6.17 (\pm 1.10)	1.10	1.0000
P381	Sheep-C	86.39	7.81 (\pm 1.36)	8.44 (\pm 0.22)	1.08	1.0000
311	Goat-S	77.00	7.75 (\pm 2.44)	8.19 (\pm 2.44)	1.05	1.0000
2349/06-1	Sheep-S	51.93	4.93 (\pm 0.05)	4.90 (\pm 0.24)	0.99	1.0000
855	Deer-C	74.45	5.86 (\pm 0.73)	5.77 (\pm 0.86)	0.98	1.0000

^aUptake was calculated as the percentage of the inoculated bacteria that was recovered from each cell lysate at day 0.

^bValues shown are means of three repeated experiments \pm standard deviations (SD).

^cDay 0 = 2 h post infection.

^dGrowth changes (n-fold) were calculated by dividing the number of log₁₀ CFU at day 7 by that at day 0 for each *Map* isolate.

^eIndicates a significant change between day 0 and day 7 (P<0.05).

doi:10.1371/journal.pone.0104238.t003

origin (cattle, sheep, goat, deer, wild-boar, and fallow-deer) were the independent variables. Cytokine production at 4, 14 and 24 h p.i. was compared with the GLM procedure of the SAS Software. In the analysis; host (cattle and sheep), and time (4, 14 and 24 h p.i.) were the main effects. Numbers of *in vitro* generated granulomas were compared by one-way analysis of variance (ANOVA) with the Tukey-Kramer multiple-comparison post-test (GraphPad Software, San Diego, CA). In all analyses, differences were considered significant when P values were <0.05.

Results

Uptake, Growth and Persistence of *Map* Isolates from Cattle, Goat, Sheep, Deer, Fallow Deer and Wild Boar in Ovine MDMs

Ovine MDMs were infected in triplicate with a panel of 10 *Map* isolates. Isolate code, country of isolation, host of origin, and genotype for each isolate are summarized in Table 1. The \log_{10} CFUs present in the initial inocula and after 2 h (day 0) or 7 days (day 7) of infection were estimated for each isolate in the Bactec MGIT 960 system and the corresponding results are presented in Table 3. When the individual means of all the isolates were compared, variations between the estimated \log_{10} CFUs in the initial inocula, and at days 0 and 7 p.i. were not statistically significant. When we compared time effect on the overall means, no significant differences among the means of the estimated \log_{10} CFUs in the initial inocula and at day 7 were obtained ($P = 0.3902$). In contrast, significant differences between the mean \log_{10} CFUs in the inocula and at day 0 were observed for all the strains, which indicated that not all bacteria in the initial inocula was successfully internalized ($P < 0.0001$). As shown in table 3, the percentages of uptake in ovine MDMs were estimated in a range between 52% and 87% of the initial inocula depending on the isolate.

When time post-infection was considered as the main effect, significant differences between the overall means of the estimated \log_{10} CFUs at days 0 and 7 were observed suggesting that variations in \log_{10} CFUs occurred during the 7-day incubation period ($P < 0.0001$). The intracellular growth exhibited for each isolate between days 0 and 7 in ovine MDMs is individually represented in Table 3 as the calculated fold change. Of the ten isolates, seven isolates (681, 6, 334, 699/07, 711P, P381, 311) and the K10 reference strain were observed to increase in number the initial bacterial concentration (n-Fold >1). However, these variations in bacterial counts over 7 days from the baseline were small, in a range between 1.63 to 1.05-fold, with K10 reference strain proliferating more rapidly than the other tested isolates. Statistical analysis of the data indicated that only the K10 reference strain exhibited significantly increased bacterial counts after 7 days of infection when compared with baseline ($P = 0.0058$). Although the isolates from sheep (2349/05-1) and deer (855) were observed to minimally decrease in \log_{10} CFUs over 7 days from baseline (n-Fold <1), this variation was not statistically significant ($P = 1.000$). The ability of each isolate to persist within ovine MDMs is presented as the mean \log_{10} CFUs at day 7 in Table 3. After 7 days of infection, variations in the estimated \log_{10} CFUs at day 7 between all the tested isolates were not statistically significant.

Gene Expression in Ovine MDMs Infected with Two C-type Isolates from Distinct Hosts or with Two Ovine Isolates of *Map* with Distinct Genotypes

In order to determine whether the bacteria's host of origin affects gene expression in *Map*-infected MDMs, two C-type

isolates from cattle and sheep were selected for gene expression analysis. The same test was run separately with two ovine isolates with distinct genotypes (C or S) to assess whether the bacteria's genotype would significantly change gene expression in ovine MDMs. Mean fold changes in gene expression between infected and non-infected cells were determined through real-time qRT-PCR analysis and are shown in figures 1A and 1B, respectively. Variations in the expression levels of several cytokines (IL10, TGF β -1, IL2 and TNF α -2), the anti-apoptotic gene BCL2-1, and the tissue destruction inhibitory gene TIMP-1 in ovine MDMs infected with the two C-type isolates from cattle and sheep or with the two ovine isolates with distinct genotypes (C or S) were not statistically significant. Although from the Figure 1B it looks like that there are variations between the IL10 expression levels in ovine MDM infected with C- and S-type ovine isolates, statistical analysis of the data indicated that these variations were not statistically significant at 4 ($P = 0.2568$), 14 ($P = 0.3697$) and 24 h p.i. ($P = 0.0914$). When the expression of each gene was compared individually at the three time points assessed, ovine MDMs infected with C-type isolates from sheep and cattle for 4 and 14 h p.i. showed significantly increased levels of expression of the apoptotic inhibitor BCL2-1 when compared with the expression of this gene at 24 h p.i. In general, up-regulation of the anti-inflammatory cytokines IL10 and TGF β -1, and down-regulation of the proinflammatory cytokines IL2 and TNF α -2 were observed in ovine MDMs infected with the selected *Map* isolates. The observed increased expression of the antiapoptotic BCL2-1 gene and of the tissue destruction inhibitory gene TIMP-1 might cause low levels of apoptosis and cellular destruction and allow *Map* persistence in the infected MDMs. In summary, ovine isolates of distinct genotype (C and S) and C-type isolates from sheep or cattle induced anti-inflammatory, antiapoptotic and antedestructive responses in ovine MDMs.

Infection of Ovine PBMCs with Two *Map* Isolates from Cattle and Sheep with Distinct Genotypes (C and S) Resulted in the Formation of Three-dimensional Microgranulomas

Ovine PBMCs seeded on a collagen matrix were infected with the K10 *Map* reference strain or with the ovine isolate (2349/06-1) at three different MOIs (bacteria: cell) (1:8, 1:16, and 1:33). Previous studies demonstrated that infection of PBMCs with *M. tuberculosis* and *M. bovis* at a MOI 1:1 or lower resulted in the formation of microgranulomas [28,29]. Cellular recruitment around the bacteria was followed by light microscopy over a 10-day period. The experiment was repeated three times with a conserved time course of around 3–5 days for cellular aggregation of lymphocytes around infected macrophages and 5–10 days for the formation of a multilayer, microscopic, granuloma-like aggregate. Both *Map* isolates formed rounded granuloma-like aggregates by day 10 as shown in Figure 2. In control, uninfected PBMCs from the same healthy donor, the formation of aggregates was not observed indicating that aggregation occurs only in response to *Map* infection (data not shown).

The number of granuloma-like aggregates formed in response to the infection with both *Map* isolates at 5 and 10 days post-infection is shown in Figure 3. Statistical analysis of the data showed significant variations between the number of aggregates generated after 5 days of infection with the K10 reference strain and the 2349/06 isolate at the highest MOI (1:8), with the K10 strain inducing the formation of more aggregates than the ovine isolate ($P < 0.01$). However, after 10 days of infection the number of aggregates formed by both strains was not significantly different

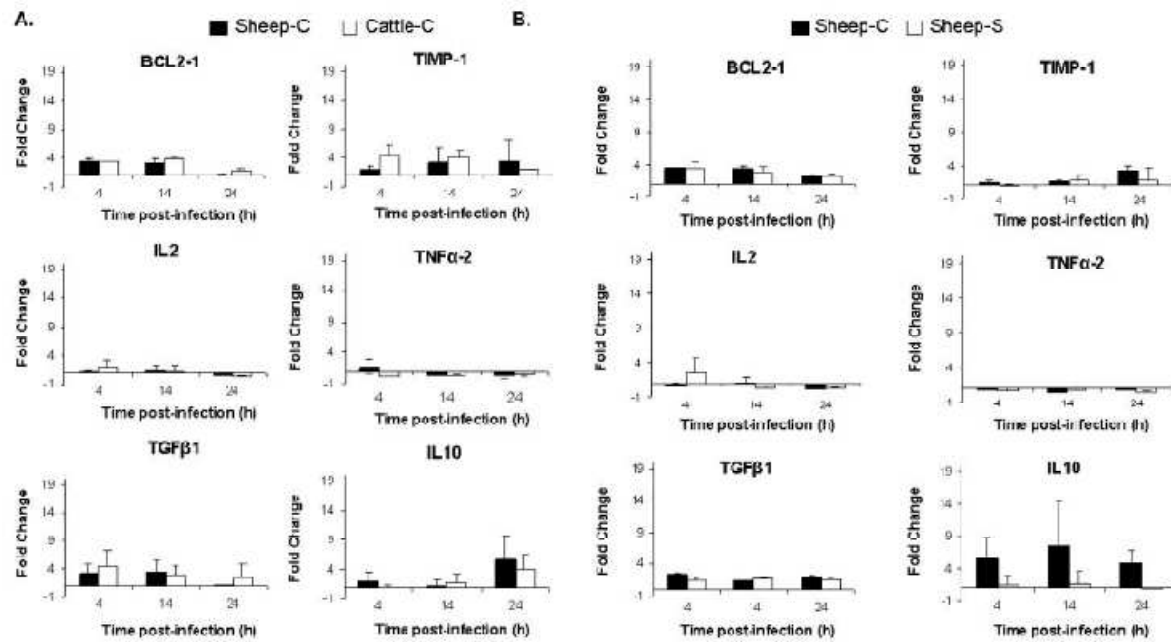


Figure 1. Expression of cytokines and proteins involved in inhibition of apoptosis or tissue destruction in ovine MDMs infected with bovine and ovine isolates of *Map*. Ovine MDMs were infected with (A) C-type *Map* isolates from cattle (K10 strain) and sheep (p381 isolate), or with (B) two ovine isolates with C- (n381 isolate) or S-genotype (2349/06-1 isolate). At 4, 14 and 24 h p.i. gene expression was assessed by qRT-PCR. Isolates are identified in the figure by their corresponding host of origin and IST1311 PCR-REA type (C or S). Bars represent the average results of two independent infection experiments (\pm SD). No statistically significant differences in the expression of the indicated genes between the tested isolates were observed.
doi:10.1371/journal.pone.0104238.g001

at any of the 3 assessed MOIs. The number of aggregates generated by both strains at the highest and lowest MOI (1:3 and 1:33) was significantly different at 10 days p.i. Significant differences in the number of aggregates triggered by both strains between days 5 and 10 were not observed which suggested that most of the granulomas were formed during the first five days of the infection with both isolates. Uninfected cells showed no granuloma formation.

After 10 days of culture, the morphological characterization of the granuloma-like aggregates was confirmed by histological staining. Figure 4 shows the morphological characterization of the aggregates formed by primary ovine PBMCs infected with the K10 *Map* reference strain and with the ovine isolate of *Map* (2349/06-1) at MOI 1:3. As shown in figures 4B and 4E, granulomas exhibited aggregation of lymphocytes around infected macrophages. When granuloma sections were stained with ZN, *Map* cells could be observed residing within the granulomas.

Discussion

The identification of *Map* isolates with differential virulence may assist in further elucidating the pathogenesis of paratuberculosis and in the design of better strategies for controlling this infection. The analysis of the initial macrophage responses, including bacterial growth and survival within macrophages, represents a powerful tool to rapidly characterize the virulence of clinical isolates of *Map*. In the current study, we examined the intracellular growth and survival within an ovine MDM model of a panel of *Map* isolates representing distinct genotypes and isolated from cattle, sheep, goats, deer, fallow deer, and wild boar.

Woo et al. previously demonstrated that following ingestion by bovine MDMs the number of viable *Map* cells increased during the first 4 days and then declined between days 4 and 8 after infection, as determined by a radiometric method [30]. In accordance with these results, we previously assessed intracellular growth and survival of our panel of *Map* isolates in a bovine macrophage-cell line (BoMac) and in bovine MDMs after 7 days of infection. To ensure consistency across *in vitro* models and to provide enough time for bacteria to grow, growth and survival of *Map* isolates within ovine macrophages was evaluated on day 7. Growth changes between days 0 and 7 were calculated by dividing the estimated \log_{10} CFUs at day 7 by that at day 0 (*n*-fold). Of the ten isolates, seven isolates (681, 6, 331, 622/07, 711P, P381, 311) and the K10 reference strain were observed to increase in number the initial bacterial concentration (*n*-Fold >1). However, these variations in bacterial counts over 7 days from the baseline were small, in a range between 1.53 to 1.05-fold. Although the isolates from sheep (2349/06-1) and deer (855) were observed to minimally decrease in \log_{10} CFUs over 7 days from baseline (*n*-Fold <1), this variation was not statistically significant ($P = 1.000$). Statistical analysis of the data indicated that only the K10 reference strain exhibited significantly increased bacterial counts after 7 days of infection when compared with baseline ($P = 0.0058$). The K10 is a laboratory-adapted strain while the other strains are recently isolated, low passage *Map* isolates. Different levels of aggregation or clumping between *Map* strains can affect the intramacrophage growth of each strain. However, we used a low bacillary inoculum which minimizes mycobacterial clumping during initial infection and more closely mimics



Figure 2. Phase contrast images showing the presence of day-10 granuloma-like aggregates after the infection of ovine PBMCs with bovine and ovine *Map* isolates. Ovine PBMCs (5×10^5) seeded on an extracellular matrix were infected with the bovine K-10 reference strain (A, B and C) or with an ovine isolate of *Map* (2349/06-1) (D, E and F) at MOI (bacteria:cells) of 1:3. Magnification in A and D = 4X, in B and E = 20X and in C and F = 40X. Bars = 300 μ m.
doi:10.1371/journal.pone.0104238.g002

conditions *in vivo*, where small numbers of *Map* cells can establish infection.

All the isolates, including the K10 strain, were able to survive in equivalent \log_{10} CFUs within ovine MDMs after 7 days of infection. Therefore, an association between a specific host of origin and intracellular survival of the tested isolates in ovine MDMs was not observed. Consequently, we can hypothesize that the conditions encountered by the tested *Map* isolates within macrophages of their respective hosts did not differentially alter the phenotype of the bacteria and their subsequent persistence within ovine MDMs. In contrast, we previously showed that type S and type C isolates from sheep and goats showed a significant attenuated phenotype in a macrophage-like cell line of bovine origin (BoMac) after 7 days of infection, when compared with type C isolates from cattle, deer, fallow deer, wild boar and bison [16]. These observed variations between isolates in bovine macrophages grouped according to the host from which the isolates were isolated and were not associated to the genotype of the isolate. Similarly, strains of environmental Mycobacteria from fish and humans including strains of *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium peregrinum*, *Mycobacterium chelonae*, and *Mycobacterium mageritense*, had different abilities to grow within

macrophages lines from humans, mice and carp; which grouped according to the host from which the isolates were isolated [31].

Our results suggested that sheep might be susceptible to infection with *Map* isolates not only from sheep and cattle but also from goats, deer, fallow deer and wild boar as well. Therefore, the importance of these isolates in the pathogenesis of *Map* shouldn't be underestimated. The successful survival within ovine MDMs of the sheep isolates correlates well with epidemiological data and clinical evidence of virulence, as suggested by the capacity of sheep isolates to cause numerous outbreaks in sheep [7]. The successful survival phenotype of the bovine isolates within ovine MDMs correlated well with clinical evidence of virulence, as suggested by the capacity of bovine isolates to infect sheep in experimental conditions [32]. However, it should be pointed out that experimental infections typically involve high doses of *Map* and therefore may not accurately assess *Map* transmission in field conditions.

When the estimated \log_{10} CFU numbers within ovine MDMs at 0 and 7 days p.i. were statistically analysed, the intracellular behaviour of the tested isolates varied depending on the time p. i. ($P < 0.001$). Small increases in the estimated \log_{10} CFU numbers from days 0 to 7 were observed for most of the isolates. In contrast,

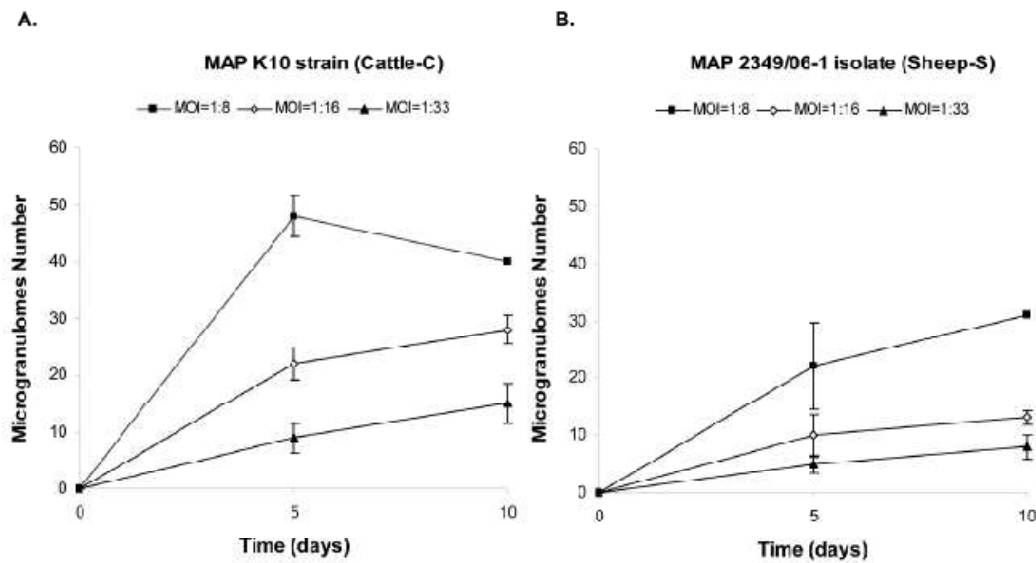


Figure 3. Number of microgranulomes generated *in vitro* 5 and 10 days after infection of ovine PBMCs with (A) the K10 reference strain and with (B) the ovine 2349/06-1 isolate. Aggregate numbers were estimated under a light microscope. The mean aggregate number estimated by triplicate is shown for each MOI (1:8, 1:16 and 1:33) \pm SD. doi:10.1371/journal.pone.0104238.g003

the genotype did not seem to significantly affect the behaviour of the selected isolates within ovine MDMs with types S, B and C showing similar survival phenotype after 7 days of infection

($P=0.635$). A lack of correlation between genotype and intracellular behaviour of *Map* isolates was also previously observed in bovine macrophages [16]. Similarly, a lack of correlation between

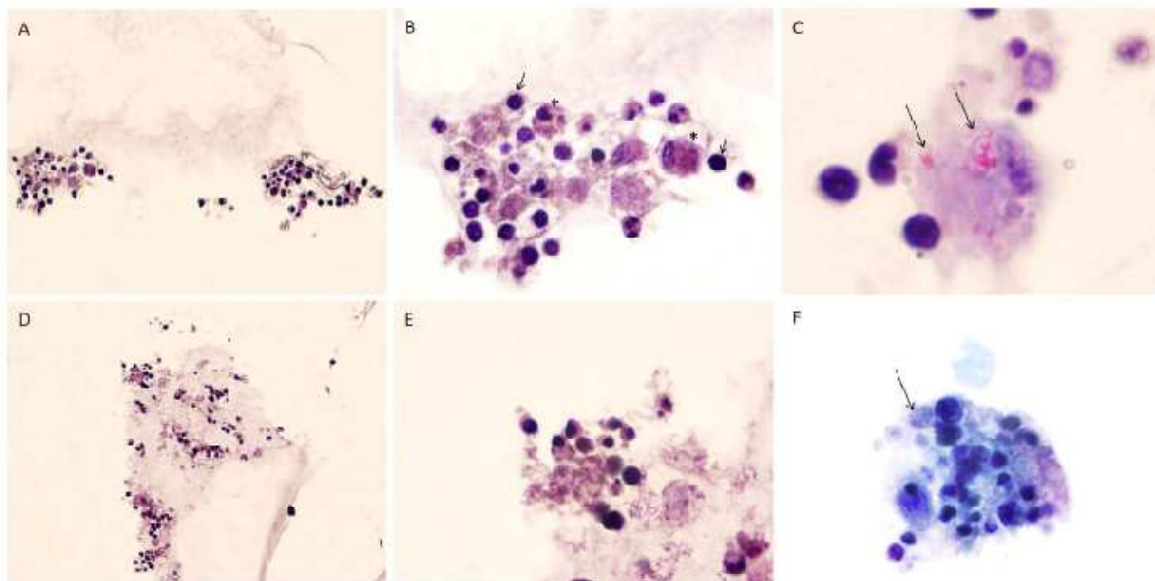


Figure 4. Morphological characterization of the cell populations recruited within *in vitro* ovine granulomas. Primary ovine PBMCs (5×10^5) were seeded on an extracellular matrix and subsequently infected with the K10 reference strain (A, B and C) or with an ovine isolate of *Map* (2349/06-1) (D, E and F) at MOI (Bacteriacells) 1:8. At 10 days p.i., the granuloma-like aggregates were harvested, processed for histopathology and stained with HE (A, B, D and E) and ZN stains (C and F). Original magnification in A and D = 200X and in B, C, E and F = 1000X. As shown in image B, macrophages (asterisks) and lymphocytes (arrows) were present in the granulomas. In images C and F, acid-fast bacilli (arrows) were observed within macrophages by ZN staining. doi:10.1371/journal.pone.0104238.g004

genotype and growth rate in the Bactec MGIT 960 system was observed for the ovine isolates; with C, S and B isolates from sheep growing at equivalent rates in MGIT cultures [27].

Previously, it was suggested that a bovine, a bison, and a human type-C isolates induced anti-inflammatory and antiapoptotic responses in bovine MDMs, which would favour bacterial survival and persistence [33]. In the current study, we showed that the successful survival of bovine and ovine isolates of *Map* within ovine MDMs correlated with an increased expression of BCL2-1, TIMP-1, TGF β -1, and IL10. In addition, a reduced proinflammatory immune response mediated by IL2 and TNF α -2 was observed in the infected cells. Our results also demonstrated that ovine macrophages infected with ovine isolates of distinct genotype (C or S) did not differentially express BCL2-1, TIMP-1, TGF β -1, IL10, IL2 and TNF α -2. Previously, the bovine isolate-6 of *Map* that grew within BoMac cells was reported to induce the expression of the anti-inflammatory cytokines TGF β -1 and IL-10 in BoMac cells that antagonized the proinflammatory response by down-regulating the production of TNF α which favour bacterial survival [16]. In regard to the apoptotic response, BoMac cells infected with the bovine isolate-6 had increased levels of expression of the apoptotic inhibitor BCL2-1 and of the inhibitor of tissue destruction TIMP-1 which might cause low levels of apoptosis. Overall, a strong correlation between the successful survival of *Map* isolates within bovine and ovine macrophages and the patterns of production of BCL2-1, TIMP-1, TGF β -1, TNF α -2 and IL10 was observed. Our results also indicated that the proinflammatory cytokines IL1 α and IL2 were down-regulated in BoMac cells and in ovine MDMs infected with bovine isolates of *Map*, respectively. It is well known that the expression of these cytokines in the presence of intracellular bacteria is one of the first steps leading to activation of macrophages and effective bacteria killing. Consistently with our results, other authors also observed an up-regulation of TGF β and/or IL10 after the infection of bovine MDMs with live *Map* that down-regulated the production of TNF α [33-38]. Similarly, rapid intracellular macrophage growth rates by strains of *M. tuberculosis* strains correlated with rapid production of IL10 that antagonizes the proinflammatory response by down-regulating the production of TNF α in THP-1 cells during the early stages of infection [39].

Although MDMs can provide insights into *Map*-host interactions at the very early stages of the infection, this cellular model is unable to mimic later stages of the infection, such as early granuloma formation. To address this issue, three-dimensional *in vitro* models of granuloma have been recently developed. The formation of small, rounded granuloma-like structures was previously reported by coculture of human blood lymphocytes with autologous macrophages infected with live *M. tuberculosis*, *M. leprae*, or *M. bovis* or stimulation with mycobacterial antigens such as purified protein derivatives or lipomannan [21,29,40,41]. In the present study, we reported for the first time the development of an *in vitro* model of ovine granuloma using *Map*-infected PBMCs cultured in an extracellular matrix composed of fibronectin and collagen, components of the surrounding tissue in which the natural granuloma is anchored. It was previously shown that the ability to develop a well-defined granulomatous response correlated with the severity of mycobacterial infections. When human PBMCs and macrophages were treated with 10⁵ heat-killed *M. tuberculosis* strain H37Rv they formed aggregates that remained very small and loose [21]. Similarly, human PBMCs infected with avirulent mycobacteria such as *M. smegmatis* and *M. avium* formed loose aggregates [20]. We observed that ovine PBMCs infected with *Map* isolates from

sheep and cattle formed well defined aggregates after 10 days of incubation at 37 °C. *Map*-induced aggregates displayed morphological characteristics similar to natural granulomas, such as three-dimensional aggregation of lymphocytes around macrophages. In accordance with our results, granulomatous lesions consistent with *Map* infection have been recently found in tissue sections from lambs experimentally infected with bovine (C-type) and ovine (S-type) isolates of *Map* [42]. The advantages of *in vitro* models of granuloma include reduced cost, increased control, and that they can provide insights into host-mycobacteria interactions at stages of granuloma formation too early to address with animal models. However, the granuloma constitutes a complex immune micro-environment highly affected by additional physiological signals (ie. growth factors and cytokines) which are exclusively produced in infected tissues. As consequence, certain aspects of *in vivo* granulomas may be different or absent in *in vitro* models, including intra-granulomatous necrosis, accumulation of fibrin and collagen, and presence and distribution of bacilli. Three-dimensional *in vitro* models of granuloma may be very useful to: (i) understand what factors or molecules play a role in granuloma formation and in its continued integrity, (ii) evaluate the granuloma-inducing activity of particular antigens or attenuated mutants, and (iii) provide a platform for testing vaccine and drug candidates.

In order to protect paratuberculosis-free herds, control programs have been developed in some countries. The success of these control programs depends on the ability to make decisions regarding on-farm management practices and the movement of animals between regions. For instance, policies regarding mixed farming of cattle and sheep have been based on the apparent host specificity of *Map*. However, our results suggested that sheep might be susceptible to infection with *Map* isolates not only from sheep but from cattle, goats, deer, fallow deer and wild boar as well. Therefore, the implementation of measures to prevent the risk of *Map* transmission from these animal species to sheep in multispecies livestock operations or on farms where sheep share pastures with wildlife animal should be recommended. Because a lack of correlation between genotype and intracellular phenotype of *Map* isolates in ovine macrophages was observed, destocking policies that aim to eliminate *Map* should assume equivalence of strains and should not be based on genotype distinction.

Conclusion

Map isolates from cattle, sheep, goats, fallow deer, deer and wild boar showed successful survival phenotype within ovine macrophages regardless of genotype. This phenotype correlated with stimulation of anti-inflammatory, antiapoptotic and anti-destructive responses within ovine macrophages. In addition, we showed that two *Map* isolates from cattle and sheep with distinct genotypes (C and S) were able to induce the formation of *in vitro* granulomas with a well-defined edge and comparable to the granulomas observed in clinical specimens with respect to the cellular components involved. All together our findings reinforce the hypothesis that *Map* isolates from cattle, goats, deer, and wild boar may have similar clinical consequences in sheep than sheep isolates of *Map* which according to our results are not expected to have a selective advantage in causing ovine paratuberculosis.

Acknowledgments

Samples from fallow deer were provided by Dr. Prieto from the Department of Agriculture of the Regional Government of the Principality of Asturias (Spain). Samples from wild-boar and deer

were provided by the Instituto de Investigación en Recursos Cinegéticos (IREC). Samples from India, Portugal and USA were kindly provided by S. V. Singh, A.C. Coelho and R. Whitlock, respectively. We thank Dr. Esmeralda Minguijon and Nieves Gomez at the Department of Histopathology (NEIKER-I Tecnalia) for excellent technical assistance. Technical and human support provided by SGiker (UPV/EHU, MINECO, GV/EJ, ERDF and ESF) is gratefully acknowledged. We thank Dr. Luiz Bernudez from Oregon State University for helpful discussions. We are

grateful to Kyle Hearn and Liam Fitzgerald for the careful editing of the manuscript.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: MAH. Performed the experiments: NA LT JB AB IS JG. Analyzed the data: NA RAJ MAH. Contributed reagents/materials/analysis tools: AB IS JG RAJ. Wrote the paper: NA RAJ MAH.

References

- Bakker D, Willemsen PT, van Zijerfeld FG (2000) Paratuberculosis recognized as a problem at last: a review. *Vet Q* 22: 200–204.
- Sergeant ES (2001) Ovine Johne's disease in Australia—the first 20 years. *Aust Vet J* 79: 484–491.
- Juste RA, Garrido JM, Gejo M, Elguizabal N, Aduriz G, Abaetandio R, Sevilla I (2005) Comparison of blood polymerase chain reaction and enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in cattle and sheep. *J Vet Diagn Invest* 17: 354–359.
- Ott SL, Wells SJ, Wagner BA (1999) Herd-level economic losses associated with Johne's disease on US dairy operations. *Prev Vet Med* 40: 179–92.
- Nielsen SS, Toft N (2009) A review of prevalences of paratuberculosis in farmed animals in Europe. *Prev Vet Med* 88: 1–14.
- Colvin DM, Galois DM, de Lisle GW (1999) Identification of two groups of *Mycobacterium paratuberculosis* strains by restriction endonuclease analysis and DNA hybridization. *J Clin Microbiol* 28: 1591–1596.
- Stevenson K, Hughes VM, de Juan L, Inglis NF, Wright F, et al. (2002) Molecular characterization of pigmented and non-pigmented isolates of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *J Clin Microbiol* 40: 1793–1804.
- Whittington RJ, Marsh IB, Whitlock RH (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.
- Harris NH, Barleta RG (2001) *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Veterinary Medicine. *Clin Microbiol Rev* 14: 489–512.
- Bernudez LE, Petrošky M, Sommer S, Barleta RG (2010) Peyer's patch-efficient 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: 3570–3577.
- Hosreiter J, Steadham E, Haynes J, Bailey T, Chevillat N (2003) Phagosomal maturation and intracellular survival of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in J774 cells. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 36: 269–283.
- Sommer S, Padrihi CJ, Colvin CJ, Coussens PM (2009) *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* suppresses expression of IL-12p40 and iNOS gene induced by signalling through CD40 in bovine monocyte-derived macrophages. *Vet Immunol and Immunopathol* 128: 269–283.
- Russel DG, Cardona PJ, Kim MJ, Allain S, Altare F (2009) Foamy macrophages and the progression of the human tuberculosis granuloma. *Nat Immunol* 10: 943–948.
- Kanakisrisnan L (2012) Revisiting the role of the granuloma in tuberculosis. *Nature Reviews Immunology* 5: 352–366.
- Sanders BM, Cooper AM (2000) Restraining mycobacteria: role of granulomas in mycobacterial infections. *Immunol Cell Biol* 78: 334–341.
- Abendaño N, Sevilla IA, Prieto JM, Garrido JM, Juste RA, et al. (2013) *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* isolates from sheep and goats show reduced persistence in bovine macrophages than cattle, bison, deer and wild boar strains regardless of genotype. *Vet Microbiol* 163: 325–334.
- Abendaño N, Juste RA, Alonso-Hearn M (2013) Review. Anti-inflammatory and anti-proliferative responses to infection: a common denominator of human and bovine macrophages infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Biomol Res Int* 2013: 008348.
- Kabara E, Kloss CC, Wilson M, Tempelman RJ, Sreevatsar S, et al. (2010) A large-scale study of differential gene expression in monocyte-derived macrophages infected with several strains of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Briefings in Functional Genomics* 9: 220–237.
- Emile JF, Paey N, Altare F, Lamhamed S, Jozarguy E, et al. (1997) Correlation of granuloma structure with clinical outcome defines two types of idiopathic disseminated BCG infection. *J Pathol* 181: 25–30.
- Lay G, Foquet Y, Salés-Peyron P, Puissegur MP, Botanch C, et al. (2007) Langhans giant cells from *M. tuberculosis*-induced human granulomas cannot recapture mycobacterial uptake. *J Pathol* 211: 76–85.
- Birkness KA, Guamer J, Sable SB, Tripp RA, Keller KL, et al. (2007) An *in vitro* model of the leukocyte interactions associated with granuloma formation in *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Immunol Cell Biol* 85: 160–168.
- Sevilla I, Garrido JM, Guip M, Juste RA (2007) Pulse-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.
- Aduriz JJ, Juste RA, Cortabarría N (1995) Lack of mycobactin dependence of mycobacteria isolated on Middlebrook 7H11 from clinical cases of ovine paratuberculosis. *Vet Microbiol* 45: 211–217.
- Sevilla I, Singh SV, Garrido JM, Aduriz G, Rodriguez S, et al. (2005) Molecular typing of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*: strains from different hosts and regions. *Rev Sci Tech* 24: 1061–1066.
- Peterson K, Koets A, Rutten VPMG, Colenbrander B, Houwers DJ (2006) Flow cytometric assessment of circulating peripheral blood monocytes in small ruminants. *Small Ruminant Research* 65: 136–141.
- Olliver M, Berthon F, Chastang J, Condier G, Lantier F (2001) Establishment and characterization of ovine blood monocyte-derived cell lines. *Vet Immunol and Immunopathol* 8: 139–151.
- Abendaño N, Sevilla IA, Garrido JM, Prieto JM, Juste RA, et al. (2012) Quantification of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* strains with distinct genotypes and isolated from domestic and wildlife animal species using an Automatic Lipid Culture System. *J Clin Microbiol* 50: 9609–9617.
- Kapoor N, Pawar S, Sinakova TD, Deo C, Warren WL, et al. (2013) Human granuloma *in vitro* model for TB dormancy and resuscitation. *PLOS One* 8: e35657.
- Steitzer U, Gerdes J (2003) Generation and characterization of multicellular heterospheroids formed by human peripheral blood mononuclear cells. *Cell Tissue Organ* 174: 110–115.
- Woo SR, Soto J, Hart AP, Barletta EG, Czuprynski CJ (2006) Bovine monocytes and a macrophage cell line differ in their ability to phagocytose and support the intracellular survival of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Vet Immunol Immunopathol* 110: 109–120.
- Harriff NJ, Wu M, Kent ML, Bernudez LE (2008) Species of environmental mycobacteria differ in their abilities to grow in human, mouse, and carp macrophages and with regard to the presence of mycobacterial virulence genes as observed by DNA microarray hybridization. *Appl Environ Microbiol* 74: 275–285.
- Verma A E, Garcia-Paniente C, Muñoz M, Moreno O, Garcia-Marin et al. (2007) Variation in the immune pathological responses of lambs after experimental infection with different strains of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Zoonoses Public Health* 54: 243–252.
- Janszaga HK, Jeong KI, Kapur V, Coussens P, Sreevatsan S (2006) Cytokine responses of bovine macrophages to diverse clinical *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* strains. *EMC Microbiol* 6: 10.
- Wess DJ, Evanson OA, Moritz A, Deng MQ, Abrahamson MS (2002) Differential responses of bovine macrophages to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and *Mycobacterium avium* subsp. *avium*. *Infect Immun* 70: 5556–5561.
- Coussens PM, Colvin CJ, Rosa GJ, Perez Laspar J, Eitman MD (2003) Evidence for a novel gene expression program in peripheral blood mononuclear cells from *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*-infected cattle. *Infect Immun* 71: 6487–6498.
- Wess DJ, Evanson OA, Deng M, Abrahamson MS (2004) Gene expression and antimicrobial activity of bovine macrophages in response to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Vet Pathol* 41: 326–337.
- Murphy JT, Sommer S, Kabara EA, Verma N, Kuehls MA, et al. (2006) Gene expression profiling of monocyte-derived macrophages following infection with *Mycobacterium avium* subspecies *avium* and *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Physiol Genomics* 9: 67–75.
- Machugh DE, Taraktoglou M, Killick KE, Nalpas NC, Broome JA, et al. (2012) Pan-genomic analysis of bovine monocyte-derived macrophage gene expression in response to *in vitro* infection with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Vet Res* 43: 25.
- Theus SA, Cave MD, Eisenach KD (2005) Intracellular macrophage growth rates and cytokine profiles of *Mycobacterium tuberculosis* strains with different transmission dynamics. *J Infect Dis* 191: 453–460.
- Puissegur MP, Botanch C, Duteyrat JL, Desol G, Caratero C, et al. (2004) An *in vitro* dual model of mycobacterial granulomas to investigate the molecular interactions between mycobacteria and human host cells. *Cell Microbiol* 6: 423–433.
- Puissegur MP, Lay G, Gilkerson M, Botella L, Nigou J, et al. (2007) Mycobacterial lipomannan induces granuloma macrophage fusion via a

- TLR2-dependent, ALAM9- and beta1 integrin-mediated pathway. *J Immunol* 178: 3161–9.
42. Fernández M, Benavides J, Sevilla IA, Fuentes M, Casano P, et al. (2014) Experimental infection with C and S-type strains of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*: immunological and pathological findings. *Veterinary Research* 45:5.

PUBLICACIÓN VI

**Improved ruminants' monocyte-derived macrophages infection models to study
Mycobacteria-host interactions and for vaccine candidates evaluation**

**Abendaño N, Tyukalova L, Barandika JF, Balseiro A, Sevilla IA, Garrido JM, Juste
RA, Alonso-Hearn**

BMC Microbiology, en revisión.

BMC Microbiology

Improved ruminants' monocyte-derived macrophages infection models to study Mycobacteria-host interactions and for vaccine candidates evaluation

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:			
Full Title:	Improved ruminants' monocyte-derived macrophages infection models to study Mycobacteria-host interactions and for vaccine candidates evaluation		
Article Type:	Methodology article		
Section/Category:	Microbe-host interactions and microbial pathogenicity		
Funding Information:	<table border="1" style="width: 100%;"> <tr> <td style="width: 60%;">Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (ES) (RTA2011-00049)</td> <td style="width: 40%;">Dr. Marta Alonso-Hearn</td> </tr> </table>	Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (ES) (RTA2011-00049)	Dr. Marta Alonso-Hearn
Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (ES) (RTA2011-00049)	Dr. Marta Alonso-Hearn		
Abstract:	<p>Background Mycobacterial infections are major causes of mortality in cattle and are also potential zoonotic agents. Two major mycobacterial pathogens of cattle are <i>Mycobacterium</i> (<i>M</i>) <i>bovis</i> and <i>M. avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i>, the causative agents of bovine tuberculosis and Johne's disease, respectively. Since macrophages provide a site where micobacteria species can potentially escape from attack by immune effector cells, they have been used to study host-pathogen interactions and for vaccine candidate evaluation. For this type of studies, an homogenous population of highly purified peripheral blood monocytes is essential.</p> <p>Results A magnetic activated cell sorter (MACS) procedure was used for enrichment of cattle, goat, and sheep CD14+ monocytes using magnetic MicroBeads conjugated with an anti-human CD14 monoclonal antibody (mAb). After magnetically labelling, cells were passed through a MACS column which is placed in a strong magnetic field. Magnetically labelled CD14+ cells were retained within the column while the unlabelled cells ran through. To determine the efficiency of the procedure, the proportion of CD14+ cells among peripheral blood mononuclear cells (PBMC) was determined before and after magnetic separation. Aliquots of these two cell fractions were stained with a phycoerythrin-conjugated mAb against the human CD14 and subsequently analyzed by flow cytometry. Our results showed that MACS procedure significantly increased the percentage of bovine, caprine, and ovine CD14+ mononuclear cells among PBMC (92.4, 74.7 and 29.1 %) compared with the percentage of CD14+ cells before magnetic separation (40.2, 8.0 and 0.2 %) ($p < 0.0001$). This represented a 2.2, 9.3 and 145.5-fold increase in CD14+ cells, respectively. Using Whole Blood CD14 MicroBeads, CD14+ monocytes were enriched directly from ovine whole blood with purity of 27 %. After 7 days in culture, CD14+ monocytes isolated using MACS technology showed typical morphology of macrophages and were able to efficiently internalize <i>M. bovis</i> and <i>M. avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i>.</p> <p>Conclusions <i>M. bovis</i> and <i>M. avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> infection of MACS-purified macrophages together with CFU quantification using an automatic liquid culture system provides an improved platform to study host-Mycobacteria interactions and to screen vaccine candidates.</p>		
Corresponding Author:	Marta Alonso-Hearn, PhD Basque Institute for Agricultural Research and Development Derio, Bizkaia SPAIN		
Corresponding Author Secondary Information:			
Corresponding Author's Institution:	Basque Institute for Agricultural Research and Development		
Corresponding Author's Secondary Institution:			
First Author:	Naiara Abendaño		

First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	Naiara Abendaño
	Eduardo Boveda
	Beatriz Ledo, PhD
	Ramon Antonio Juste, PhD
	Marta Alonso-Hearn, PhD
Order of Authors Secondary Information:	
Opposed Reviewers:	

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Improved ruminants' s monocyte-derived macrophages infection models to study Mycobacteria-host interactions and for vaccine candidates evaluation

Naiara Abendaño (nabendano@neiker.eus)¹,
Eduardo Boveda (eduardob@miltenybiotec.es)²,
Beatriz Ledo (beatriz@miltenybiotec.es)²,
Ramon A. Juste (rjuste@neiker.eus)¹,
Marta Alonso-Hearn (malonso@neiker.net)^{1*}

*Corresponding author: Marta Alonso-Hearn. malonso@neiker.net

¹ *Department of Animal Health, Basque Institute for Agricultural Research and Development, NEIKER-Tecnalia, Barreaga 1, Derio, E-48160 Bizkaia, Spain*

² *Miltenyi Biotec S.L. Friedrich-Ebert-Straße 68, 51429 Bergisch Gladbach, Germany*

Abstract

Background

Mycobacterial infections are major causes of mortality in cattle and are also potential zoonotic agents. Two major mycobacterial pathogens of cattle are *Mycobacterium (M) bovis* and *M. avium* subsp. *paratuberculosis*, the causative agents of bovine tuberculosis and Johne's disease, respectively. Since macrophages provide a site where micobacteria species can potentially escape form attack by immune effector cells, they have been used to study host-pathogen interactions and for vaccine candidate evaluation. For this type of studies, an homogenous population of highly purified peripheral blood monocytes is essential.

Results

A magnetic activated cell sorter (MACS) procedure was used for enrichment of cattle, goat, and sheep CD14⁺ monocytes using magnetic MicroBeads conjugated with an anti-human CD14 monoclonal antibody (mAb). After magnetically labelling, cells were passed through a MACS column which is placed in a strong magnetic field. Magnetically labelled CD14⁺ cells were retained within the column while the unlabelled cells ran through. To determine the efficiency of the procedure, the proportion of CD14⁺ cells among peripheral blood mononuclear cells (PBMC) was determined before and after magnetic separation. Aliquots of these two cell fractions were stained with a phycoerythrin-conjugated mAb against the human CD14 and subsequently analyzed by flow cytometry. Our results showed that MACS procedure significantly increased the percentage of bovine, caprine, and ovine CD14⁺ mononuclear cells among PBMC (92.4, 74.7 and 29.1 %) compared with the percentage of CD14⁺ cells before magnetic separation (40.2, 8.0 and 0.2 %) ($p < 0.0001$). This represented a 2.2, 9.3 and 145.5-fold increase in CD14⁺ cells, respectively. Using Whole Blood CD14 MicroBeads, CD14⁺ monocytes were enriched directly from ovine whole blood with purity of 27 %. After 7 days in culture, CD14⁺ monocytes isolated using MACS technology showed typical morphology of macrophages and were able to efficiently internalize *M. bovis* and *M. avium* subsp. *paratuberculosis*.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Conclusions

M. bovis and *M. avium* subsp. *paratuberculosis* infection of MACS-purified macrophages together with CFU quantification using an automatic liquid culture system provides an improved platform to study host-Mycobacteria interactions and to screen vaccine candidates.

Keywords: monocyte-derived macrophages infection models; ruminants; *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*

Background

1
2 Mycobacterial infections are major causes of mortality in cattle and are also potential zoonotic agents.
3
4 Two major mycobacterial pathogens of cattle are *Mycobacterium (M) bovis* and *M. avium* subsp.
5
6
7 *paratuberculosis*, the causative agents of bovine tuberculosis (BTB) and Johne's disease (JD),
8
9 respectively. Since macrophages provide a site where these mycobacteria species reside and multiply,
10
11 they have been used to study bacteria-host interactions and for vaccine candidates evaluation. However,
12
13 previous monocyte-derived macrophage (MDM) infection models were developed with peripheral
14
15 blood adherent cells and, therefore, contained contaminant lymphocytes [1]. This might explain, at
16
17 least in part, why MDM based approaches identified trends in attenuation of transposon insertion
18
19 mutant strains of *M. avium* subsp. *paratuberculosis* based on CFU counts alone, but this did not
20
21 correlate with protection in a natural host model [2]. These results suggest the need for improved and
22
23 well-defined *in vitro* MDM models.
24
25
26
27
28
29
30
31

32 The standard method for ruminant's monocytes purification from anticoagulated whole blood is the
33
34 use of Ficoll-Paque gradient centrifugation [3]. During centrifugation, peripheral blood monocytic
35
36 cells (PBMC; lymphocytes and monocytes) and thrombocytes (platelets) are separated from
37
38 erythrocytes and polymorphonuclear cells on the basis of their buoyant density, and enriched in an
39
40 interphase above the separation medium. Isolated PBMC are subsequently seeded into tissue culture
41
42 plates and incubated for 2 hours (h) at 37 °C in a 5 % CO₂ incubator. Non-adherent cells
43
44 (lymphocytes) are removed by washing twice with a salt balanced solution buffer. Although this step is
45
46 expected to increase the purity of the isolated monocytes, the rinsing steps are difficult to standardize
47
48 and, as a consequence, the percentage of contaminant lymphocytes is sometimes high [4]. For the
49
50 purification of human monocytes, their positive selection by using a human CD14 antibody directly
51
52 coupled with magnetic nanoparticles and the magnetic activated cell sorter (MACS) technology is a
53
54 well-established and reliable procedure (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). The CD14
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 antigen is part of the functional heteromeric LPS receptor complex comprised of CD14, Toll-like
2 receptor 4 (TLR4) and MD-2 protein [5]. CD14 is strongly expressed as a cell membrane protein of
3
4 most monocytes and macrophages in peripheral blood, other body fluids, and various tissues, such as
5
6 lymph nodes and spleen [6]. Like other proteins of the immune system, the CD14 antigen is
7
8 evolutionary conserved [7]. In fact, a mAb against the human CD14 antigen (Clone TUK4) cross-
9
10 reacted with CD14⁺ cells from cows, goats and sheep [8, 9].
11
12
13
14
15

16
17 The principle of the purification of CD14⁺ cells using MACS Technology can be described as follows
18
19 [10, 11]. First, CD14⁺ cells in the Post-Ficoll fraction are magnetically labelled with CD14
20
21 MicroBeads. MACS Microbeads are extremely small, superparamagnetic particles of approximately
22
23 50 nanometers in diameter. After magnetically labelling, cells are loaded onto a MACS column which
24
25 is placed in a strong permanent magnet Separator. MACS columns are filled with a matrix of
26
27 ferromagnetic steel-wool or iron-spheres able to amplify the magnetic field by 10.000-fold when
28
29 placed in a permanent magnet separator. The unlabelled cells run through and are collected as the
30
31 negative fraction depleted of labelled CD14⁺ cells. After removal of the column from the magnetic
32
33 field, the magnetically retained CD14⁺ cells can be eluted as the enriched, positively selected cell
34
35 fraction. The experimental workflow for monocytes isolation using the standard density gradient
36
37 technique and/or the MACS technology is summarized in figure 1.
38
39
40
41
42
43
44
45

46 The objective of the present study was to test whether ruminants' s MACS-purified macrophages could
47
48 keep their attitudes as phagocytes and be infected with *M. bovis* and *M. avium* subsp. *paratuberculosis*
49
50 in a low-dose model *in vitro*. The log₁₀ CFUs present in the initial inocula and within infected MDMs
51
52 after 2 h of infection were estimated for each isolate in the Bactec MGIT 960 system as previously
53
54 described [12]. Effect of the mycobacterial species and origin of MDMs in the mean log₁₀ CFUs
55
56 present in MDMs after 2 h of infection was estimated.
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Results

Magnetic enrichment of CD14⁺ monocytes from bovine PBMC

Flow cytometric analysis of CD14⁺ cells before and after magnetic separation is shown in figure 2 for one representative donor. Prior to the positive selection, the percentage of CD14⁺ cells in the post-Ficoll (6.3×10^7 cells) and original (2×10^7 cells) cell fractions were 13 and 40 %, respectively. Using CD14 MicroBeads and MACS technology we were able to select bovine CD14⁺ cells with purities of 92 % when only one MS column was used for positive selection. Therefore, CD14⁺ MACS selection allowed a 2.2-fold enrichment in the number of purified monocytes. The differences between the percentages of CD14⁺ cells in the purified and unpurified cell fractions (post-ficoll and original) were statistically significant ($p \leq 0.001$). In addition, the majority of the cells in the negative fraction were non-target cells (99.5 %) with a small amount of CD14⁺ cells (0.5 %). We hypothesize that the target cells in the negative fraction are cells that were unlabeled or became detached from their magnetic tags during the sorting process. Cell yield after enrichment was estimated in 4×10^6 cells.

Magnetic enrichment of CD14⁺ monocytes from caprine PBMC

The percentages of caprine CD14⁺ monocytes before and after magnetic separation are presented in Figure 3. Prior to selection, the frequency of CD14⁺ cells in the post-Ficoll (1.88×10^7 cells) and original (2×10^7 cells) cell populations were 7.4 % and 8 %, respectively. Using CD14 MicroBeads and MACS technology we were able to separate CD14⁺ cells to purities greater than 74 %. This represents a 9.3 fold increase in the number of CD14⁺ monocytes when compared with the number of positive cells in the original fraction. The differences between the percentages of CD14⁺ cells in the purified and unpurified cell fractions (post-ficoll and original) were statistically significant ($p \leq 0.001$). The percentage of CD14⁺ cells that were lost in the washings steps of the column was only 4.2 % of the negative cell fraction. Cell yield after enrichment was estimated in 10^6 cells.

Magnetic enrichment of CD14⁺ monocytes from ovine PBMC or directly from ovine whole blood

1
2 Since the percentage of CD14⁺ monocytes in ovine PBMCs after Ficoll-Paque purification was less
3
4 than 5 %, two strategies for CD14⁺ cell enrichment based on MACS Technology were compared: i)
5
6 positive selection of CD14⁺ cells from PBMC using CD14 MicroBeads and MS columns (figure 1 B)
7
8 and ii) positive selection of CD14⁺ cells directly from whole blood with CD14 Whole Blood
9
10 MicroBeads and Whole Blood columns (figure 1C). Using the first approach, the percentage of CD14⁺
11
12 cells was 29.1 % of the positive cell fraction (figure 4). This represents a 145.5-fold enrichment in the
13
14 number of CD14⁺ cells when compared with the number of positive cells in the original fraction. The
15
16 differences between the percentages of CD14⁺ cells in the purified and unpurified cell fractions (post-
17
18 ficoll and original) were statistically significant ($p \leq 0.001$). The percentage of CD14⁺ cells that were
19
20 lost in the washing steps of the column was only a 0.1 % of the negative cell fraction. When Whole
21
22 Blood CD14 MicroBeads were used to magnetically label ovine CD14⁺ monocytes directly from
23
24 whole blood, the percentage of CD14⁺ cells after magnetic separation was 27.2 % of the positive
25
26 fraction (figure 5). Therefore, similar levels of CD14⁺ cell recovery after positive selection were
27
28 obtained irrespective of the approach used: 29 and 27 %, respectively
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38

CD14⁺ cell morphology analysis

39
40 CD14⁺ monocytes isolated with MACS technology were incubated for 7 days at 37 ° C. Most of the
41
42 cells became adherent and differentiated to MDMs showing typical macrophage morphology when
43
44 observed under an inverted microscope after 7 days of culture. As seen in figure 6, bovine and caprine
45
46 CD14⁺ monocytes showed a stellate morphology with irregular surface, bigger cell nucleus and
47
48 vesicles/vacuoles in the cytoplasm which are typically seen in MDMs.
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Mycobacteria uptake by differentiated MDMs.

1
2 To assess their functionality, bovine and caprine MDMs isolated from several healthy donors using
3
4 CD14 MicroBeads and MACS technology were infected in triplicate with field isolates of *M. bovis* or
5
6
7 *M. avium* subsp. *paratuberculosis*, respectively. The log₁₀ CFUs present in the initial inocula and
8
9
10 within infected MDMs after 2 h of infection were estimated for each isolate in the Bactec MGIT 960
11
12 system as previously described [12] and the corresponding results are presented in Table 1. When the
13
14 overall log₁₀ CFUs means were compared, variations between the estimated log₁₀ CFUs in MDMs
15
16 infected with *M. bovis* and *M. avium* subsp. *paratuberculosis* were not statistically significant ($p =$
17
18
19 0.8834). Statistical analysis of the individual animal data showed significant differences between some
20
21 of them ($p = 0.0110$). A marked difference in the estimated log₁₀ CFUs was observed among the 15
22
23
24 bovine donors ($p = 0.0155$), but not among the 6 caprine ones ($p = 0.1941$).
25
26
27

Discussion

30
31
32 Magnetic MicroBeads conjugated with an anti-human CD14 monoclonal antibody can be used in
33
34 combination with the MACS technology for the positive selection of CD14⁺ monocytes from bovine,
35
36 caprine and ovine PBMC. CD14⁺ cells were labelled with a CD14-PE mAb before and after selection,
37
38 and were immediately analysed by flow cytometry. For comparison, a fraction of PBMC prepared by
39
40 density gradient centrifugation from the same whole blood sample was also stained and processed for
41
42 flow cytometry. Before magnetic separation, the proportion of bovine and caprine CD14⁺ in the post-
43
44 ficoll fraction was 13.06 and 7.4 %, respectively. Our results showed that MACS technology allowed a
45
46 significant enrichment of bovine and caprine CD14⁺ monocytes to purities up to 92 % and 74 %,
47
48
49 respectively. After MACS enrichment, contamination with other cell types, mainly lymphocytes, was
50
51 significantly reduced. In addition, purified monocytes showed consistent and high viabilities of
52
53
54 approximately 96 %.
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 Previous studies showed that $\gamma\delta$ T cells accounted for a much larger proportion of lymphocytes in
2 peripheral blood of sheep than in other species such as humans and cows [13]. $\gamma\delta$ T cells occurred with
3 frequencies of up to 70 % in PBMC from lambs, up to 30 % in bovine PBMC and approximately 3 %
4 among human PBMCs. Accordingly, the frequency of ovine monocytes was previously estimated by
5 flow cytometry in less than 4 % of the total white blood cell population [14]. To improve monocyte
6 recovery from ovine PBMC, two strategies for CD14⁺ cell isolation based on MACS Technology were
7 compared; i) positive enrichment of CD14 cells from PBMC using CD14 MicroBeads and MS
8 columns and ii) positive selection of CD14 cells directly from whole blood using CD14 Whole Blood
9 MicroBeads and Whole Blood columns. We found similar levels of CD14⁺ cell recovery after positive
10 selection irrespective of the approach used; 29 and 27 %, respectively. This represents approximately a
11 145-fold enrichment in the number of ovine CD14⁺ cells when compared with the low number of
12 positive cells present in the original fractions. Whole Blood MicroBeads enabled the fastest isolation
13 of CD4⁺ cells, the entire procedure took less than 30 minutes, as it did not involve any long
14 centrifugation step and less pipetting was required. It should be pointed out, however, that high
15 amounts of CD14 Whole Blood MicroBeads (750 μ l per 15 ml of whole blood) were required to retain
16 labelled CD14⁺ monocytes on the Whole Blood column matrix. In contrast, significantly lower
17 amounts of CD14 MicroBeads (160 μ l per 2 x 10⁷ cells) were required to purify similar number of
18 ovine CD14⁺ monocytes, which makes the first approach more cost effective. Although both protocols
19 resulted in significant increased numbers of ovine CD14⁺ cells after positive selection, additional gains
20 in purity might still be achieved. For isolation of rare cells such as ovine CD14⁺ cells, a negative
21 selection step allowing magnetic removal of unwanted $\gamma\delta$ T cells followed by a positive selection step
22 might be an alternative approach that should be explored.
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Due to their composition of iron oxide and polysaccharide, MicroBeads are biodegradable and typically disappear after a few days in culture. Therefore, no bead detachment is usually required. In

1 agreement with this, we observed that binding of the human CD14 mAb (which is part of the
2 MicroBeads) to the surface of ruminant's monocytes did not affect flow cytometry analysis. In
3
4 addition, the majority of the CD14⁺ monocytes isolated from cow, goat and sheep PBMC using MACS
5
6 technology showed typical morphology of macrophages after 7 days in culture. Isolated CD14⁺ cells
7
8 could then be used for *in vitro* experiments requiring MDMs with high level of purity. For instance, we
9
10 demonstrated here that CD14⁺ cells isolated from bovine and caprine PBMC of several donors were
11
12 able to differentiate *in vitro* to MDMs and to subsequently internalize *M. bovis* and *M. avium* subsp.
13
14 *paratuberculosis*, respectively. After 2 h of infection, log₁₀ CFU numbers inside bovine and caprine
15
16 MDMs were estimated in the Bactec MGIT 960 system and statistically analyzed. Log₁₀ CFU means
17
18 of triplicate infection assays showed a 15 % coefficient of variation which suggested that MACS-
19
20 isolated MDMs were able to internalize *M. bovis* and *M. avium* subsp. *paratuberculosis* with high
21
22 reproducibility. Individual data illustrated that the estimated *M. bovis* log₁₀ CFUs inside bovine MDMs
23
24 after 2 h of infection depends on each particular donor which suggested genetic variability to
25
26 intracellular infection of macrophages. In fact, genetic predisposition to intracellular infection of
27
28 bovine and caprine macrophages has been previously documented [15-17]. These studies suggested
29
30 that host genetics may play an important role in susceptibility to mycobacterial infections and,
31
32 therefore, are a possible reason for differences in phagocytic and killing ability of MDMs from hosts
33
34 of the same animal species.

35
36 Variations between the overall log₁₀ CFUs means in MDMs infected with *M. bovis* and *M. avium*
37
38 subsp. *paratuberculosis* were not statistically significant ($p = 0.88348$) which suggested that bovine
39
40 and caprine MDMs did not differ in their ability to internalize these mycobacteria species. Similar
41
42 ingestion levels of mycobacteria in bovine and caprine MDMs might reflect that a similar receptor
43
44 mediated pathway is being utilized. Although ingestion of mycobacteria can occur via several kinds of
45
46 phagocytic receptors, complement receptor 3 (CD11b/Cd18) is thought to be the major receptor
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 involved in phagocytosis of *M. avium* subsp. *paratuberculosis* and *M. bovis* [18-20]. Once internalized
2 by macrophages, *M. bovis* and *M. avium* subsp. *paratuberculosis* have differential survival strategies,
3
4 which in turn, may underline the divergent immunopathology associated with BTB and JD [1].
5
6
7
8

9 **Conclusions**

10 In conclusion, a monocyte population of improved quantity and homogeneity was obtained by adding
11
12 a CD14+ positive selection step to the standard method for ruminant's monocytes purification. With a
13
14 low dose infection as would be expected *in vivo*, infection of MACS-purified macrophages followed
15
16 by CFU numbers quantification using an automatic liquid culture system provides an improved
17
18 platform to study host-Mycobacteria interactions and to screen vaccine candidates.
19
20
21
22
23
24

25 **Methods**

26 **Ethics Statement**

27 Blood collection procedure was performed by clinical veterinarians in strict accordance with the
28
29 recommendations in the Spanish Ethical Guide for the care of animals used for experimental and other
30
31 scientific purposes (Royal Legislative Decree 53/2013). Blood collection procedure was approved by
32
33 the Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) of NEIKER-Tecnalia and by the
34
35 Department of Agriculture, Diputación Foral de Bizkaia, Spain (Permit N° 14133).
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46

47 **Isolation of mononuclear cells from bovine, caprine and ovine peripheral blood by density 48 gradient centrifugation**

49 Peripheral blood (50 ml) was collected from the jugular vein of healthy specimens of Azpigorri goats,
50
51 Latxa sheep and Holstein cattle into heparinised Vacutainer tubes (Becton, Dickinson and Company,
52
53 Sparks, MD), transferred aseptically into sterile glass bottles and diluted 1:2 in Hank's balanced salt
54
55 solution (HBSS; pH 7.2). Twenty-five millilitres of blood:HBSS from each animal were carefully
56
57 layered over 10 ml of Ficoll-Paque (1,084 g/cm³) (GE HealthCare Bio-Sciences, Uppsala, Sweden) in
58
59
60
61
62
63
64
65

1 a 50-ml centrifuge tube. The tubes were centrifuged at $900 \times g$ for 30 min at $20^\circ C$ in a swinging-
2 bucket rotor without brake to separate erythrocytes and polymorphonuclear cells from PBMC and
3 platelets. The upper layer (plasma) was aspirated leaving the PBMC undisturbed at the interphase. The
4 cell interphase layer was collected with a Pasteur pipette and carefully transferred to a 50-ml centrifuge
5 tube. For removal of platelets, the tube was filled with HBSS and centrifuged at $400 \times g$ for 10 min at
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

The pellet containing purified PBMC was resuspended in 10 ml of HBSS.

Positive selection of CD14⁺ monocytes from PBMC using MACS technology

For enrichment of CD14⁺ monocytes, a single-cell suspension of PBMC (2×10^7) was incubated with
40 μ l of MicroBeads bound to an anti-human CD14 mAb (Clone TUK4, Mouse IgG2a, Miltenyi
Biotec) for 15 minutes at $4^\circ C$. Following the labelling step, the cells were washed by adding 4 ml of
MACS buffer (PBS, 0.5 % FCS) and centrifuged at $300 \times g$ for 10 minutes. The supernatant was
completely aspirated and the cellular pellet was resuspended in 500 μ l of MACS buffer. The resultant
cell suspension was applied onto a prerinsed MS column which was placed in the magnetic field of a
MiniMACS separator (Miltenyi Biotec). MS column capacity is estimated in 1×10^7 magnetically
labeled cells from up to 2×10^8 total cells. The column was washed three times with 3 ml of buffer, and
the total effluent containing the CD14⁺ depleted cell fraction was collected. After removing the column
from the magnetic field, 1 ml of MACS buffer was added to the column and the magnetically retained
CD14⁺ cells were immediately eluted as the positively selected cell fraction by firmly pushing a
plunger into the column.

Positive selection of CD14⁺ monocytes directly from whole blood using MACS technology

Fresh drawn whole blood (15 ml) was collected from a Latxa sheep in heparinised Vacutainer tubes.
For magnetic labelling, 750 μ l of Whole Blood CD14 MicroBeads conjugated to an anti-human CD14

1 mAb (isotype: mouse IgG2a; Miltenyi Biotec) were incubated in a 50-ml tube with 15 ml of blood for
2 15 minutes at 4 °C. Following the labelling step, cells were washed by adding 10 ml of MACS buffer
3 and centrifuged at 445 x g for 10 min at room temperature in a swinging bucket rotor without brake.
4
5 The supernatant was carefully aspirated and the cellular pellet was resuspended in 15 ml of MACS
6
7 buffer. The magnetically labelled cell suspension was loaded onto a Whole Blood column, which was
8
9 placed in the magnetic field of a MACS separator. The magnetically labelled CD14⁺ cells were
10
11 retained within the column, while the unlabelled cells ran through and were collected. The Whole
12
13 blood column was washed three times with 3 ml of MACS buffer and the unlabelled cells that passed
14
15 through the column were collected and combined with the effluent from the previous step as the
16
17 negative cell fraction. The Whole Blood column was then removed from the separator and placed on a
18
19 new 15-ml collection tube. Five millilitres of Whole Blood elution buffer were added onto the column
20
21 and the magnetically retained CD14⁺ cells were immediately flushed out by firmly pushing the plunger
22
23 into the column.
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33

34 **Flow cytometry analysis**

35
36 Fifty microliters of purified PBMC (post-ficoll cell fraction) were incubated with 10 µl of a 1:11
37
38 dilution of phycoerythrin (PE)-conjugated anti-human CD14 mAb (Clone TUK4; Mouse IgG2a,
39
40 Miltenyi Biotec) for 5 minutes in the dark at 4 °C. After magnetically labelling of the PBMC and
41
42 before magnetic separation, a 50 µl aliquot of the labelled cells was stained for flow cytometry as the
43
44 original cell fraction. After magnetic separation, unlabeled cells that passed through the column were
45
46 collected, centrifuged at 300 x g for 10 min, resuspended in 100 µl of MACS buffer and subsequently
47
48 stained with the PE-conjugated anti-human CD14 mAb as the negative cell fraction. A 50 µl aliquot of
49
50 the CD14⁺ monocytes collected after magnetic separation was also stained with the PE-conjugated
51
52 anti-human CD14 mAb for flow cytometry as the positive cell fraction. The stained post-Ficoll,
53
54 original, negative and positive cell fractions were washed by adding 2 ml of MACS buffer. After 10
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 min of centrifugation at 300 x g, the cellular pellets were resuspended in 300 µl of MACS buffer and
2 analyzed by flow cytometry. The four cellular fractions recovered from goat's blood were analyzed
3 using MACSQuant FaCScan Analyzer and the MACSQuantify Acquisition and Analysis Software
4 (Miltenyi Biotec). For analysis of the sheep and cattle cellular fractions, the Beckman Coulter
5 cytometer analyzer and Gallios 1.2 Software were used. In all cases, major populations of PBMC
6 (lymphocytes and monocytes) were identified based on linear forward (FS LIN) and side (SS LIN)
7 light scatters characteristics. A bitmap (electronically defined observation area) was drawn around the
8 monocytes according to its specific FS/SS characteristics. Cell debris and dead cells were excluded
9 from the analysis. Percentage of cells fluorescing and the level of expression of CD14 molecules (log
10 mean intensity fluorescence [FL INT LOG]) were recorded by measuring the fluorescence associated
11 with the gated mononuclear cell population. Background fluorescence of cells with no mAb staining
12 was subtracted. To distinguish specific from non-specific binding of the PE-conjugated anti-CD14
13 mAb to the CD14⁺ cells, an aliquot of the original cell population (50 µl) was stained with 10 µl of a
14 1:11 dilution of a mouse IgG2a isotype control antibody conjugated to PE (Miltenyi Biotec) for 10 min
15 in the dark at 4 °C and subsequently analyzed by flow cytometry. The mouse IgG2a isotype control
16 antibody (clone S43.10) is specific for the hapten NP (4-hydroxy-3-nitro-phenyl acetyl). This hapten is
17 not expressed on cells or cell lines.

43 ***In vitro* differentiation of MACS-isolated CD14⁺ monocytes to macrophages**

44 Bovine and caprine CD14⁺ monocytes isolated using MACS technology were washed with HBSS by
45 centrifugation at 400 x g for 10 min and subsequently resuspended in RPMI-1640 supplemented with
46 20 mM L-glutamine, 10 % heat-inactivated bovine serum, 100 U ml⁻¹ of penicillin G and 100 mg ml⁻¹
47 of streptomycin sulphate (Lonza, Basel, Switzerland). Bovine and caprine CD14⁺ monocytes were
48 seeded into 24-well plates at a density of 4 x 10⁵ and 4 x 10⁴ cells ml⁻¹, respectively. After 2 h at 37 °C
49 in a humidified 5 % CO₂ incubator, non-adherent cells were removed by washing each well with
50

1 HBSS. Adherent cells were incubated in supplemented RPMI-1640 at 37 °C to allow differentiation to
2 monocyte-derived macrophages (MDM). After 7 days of culture, cell morphology was assessed by
3
4 light microscopy using an inverted microscope.
5
6
7
8

9
10 ***M. bovis* and *M. avium* subsp. *paratuberculosis* isolates, bacterial culture and preparation of**
11 **bacterial suspensions**

12
13 A *M. avium* subsp. *paratuberculosis* isolate from goat (*Capra hircus*) (Neiker 711; C genotype),
14 and a field isolate of *M. bovis* (Neiker 1403; spoligotype SB0339) obtained from a naturally infected
15 wild boar (*Sus scrofa*) were selected for infection assays. Both isolates were grown in T25 tissue
16 culture flasks at 37 °C ± 1°C in 10 ml of Middlebrook 7H9 broth (Difco Laboratories, Detroit, MI)
17 supplemented with 10 % (vol/vol) oleic acid-albumin-dextrose-catalase (OADC) (Becton, Dickinson
18 and Company, Franklin Lakes, NJ), and 0.05 % (wt/vol) Tween-80 (Sigma-Aldrich, St Louis, MO).
19 For *M. avium* subsp. *paratuberculosis* growth, the 7H9 broth was supplemented with 2 mg L⁻¹ of
20 mycobactin J (Allied Monitor Inc., Fayette, MO). Bacterial cells were harvested by centrifugation at
21 3000 x rpm for 20 min in a Beckman Coulter Allegra X-12 centrifuge. Bacterial pellets were then
22 resuspended in 2 ml of HBSS, and the resultant suspension was passed 10 times through a 27-gauge
23 needle in order to declump cells. The turbidity of the bacterial suspension was adjusted to a McFarland
24 standard of 1 with a Densimat (bioMerieux, Marcy l'Étoile, France). Only the top fraction of the
25 suspension containing dispersed bacteria was used for the infection assays.
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46

47 **Infection assays with *M. bovis* and *M. avium* subsp. *paratuberculosis***

48 Differentiated bovine and caprine MDMs were inoculated with single-cell suspensions of *M. bovis* or
49 *M. avium* subsp. *paratuberculosis* isolates at a MOI (multiplicity of infection; bacteria:cell) of 10:1,
50 respectively. This level of infection did not alter cell viability over a 1-week assay, as was previously
51 assessed by Trypan blue staining. After a 2 h infection time, the supernatant was removed and the cells
52 were washed twice with HBSS to remove extracellular bacteria. Infected macrophages were lysed by
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 vigorous pipetting with 0.5 ml of 0.1% Triton X-100 (Sigma-Aldrich) in sterile water for 10 min.
2
3 Supplemented Mycobacteria Growth indicator tubes (MGIT) (Becton, Dickinson and Company,
4 Sparks, MD) were inoculated with 0.1 ml of each initial bacterial suspension or with the cell lysates
5
6 recovered after 2 h of infection. Inoculated vials were incubated at 37 ± 2 °C for up to 41 days in the
7
8 Bactec MGIT 960 instrument (Becton, Dickinson and Company) and were monitored automatically
9
10 every hour for an increase of fluorescence. The earliest instrumental indication of positivity (i.e., time
11
12 to detection [TTD]) for each tube was recorded. The predicted number of bacteria in each tube was
13
14 calculated by using previously generated mathematical formulas which relate TTD (in days) recorded
15
16 in the Bactec MGIT 960 system to estimated \log_{10} CFUs present in a bacterial inoculum (Abendaño et
17
18 al., 2012). Since these equations are isolate-specific they take into account the specific ability of each
19
20 bacterial isolate to grow in MGIT tubes. Growth of *M. bovis* (isolate 1403) and *M. avium* subsp
21
22 *paratuberculosis* (isolate 711) in the Bactec MGIT 960 system fitted both to a one phase exponential-
23
24 decay model according to the following equations: [\log_{10} inoculum size = $9.579 \times e^{(-0.09819 \times \text{TTD})}$
25
26 + 0.3708] and [\log_{10} inoculum size = $13.21 \times e^{(-0.2963 \times \text{TTD})} + 2.850$], respectively. The
27
28 percentages of entry were calculated as the percentages of the inoculated bacteria that were recovered
29
30 from each cell lysate at 2 h post-infection (p. i.).
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40

41 **Statistical analysis**

42
43 Percentages of CD14⁺ cells among PBMC before and after magnetic separation were compared by a
44
45 two-tailed Fisher's exact t-test (GraphPad Software, San Diego, CA). Comparison of the estimated
46
47 \log_{10} CFUs present in MDMs after 2 h of infection, was carried out with the General Lineal Model
48
49 (GLM) procedure of the SAS statistical package version 9 (SAS Institute Inc, Cary, NC). First,
50
51 mycobacterial species (*M. bovis* and *M. avium* subsp. *paratuberculosis*) and donor species (bovine and
52
53 caprine) were considered as the main effects. Once we demonstrated that there was no effect of the
54
55 mycobacterial species and origin of MDMs in the mean \log_{10} CFUs present in MDMs after 2 h of
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 infection, a comparison of the individual animal data was carried out. In all analyses, differences were
2 considered significant when p values were < 0.05 .
3
4
5

6 7 **Abbreviations**

8
9
10 MACS, magnetic activated cell sorter; h, hours; TLR4, Toll-like Receptor 4; PE, phycoerythrin; FS
11
12 LIN, linear forward scatters; SS LIN, linear side scatters; FL INT LOG, log mean intensity
13
14 fluorescence; 4-hydroxy-3-nitro-phenyl acetyl, hapten NP; MDM, monocyte-derived macrophages;
15
16 OADC, oleic acid-albumin-dextrose-catalase; M, *Mycobacterium*; MOI, multiplicity of infection;
17
18 MGIT, Mycobacteria Growth indicator tube; PBMC, peripheral blood monocytic cells; TTD, time to
19
20 detection; p. i., post-infection; ANOVA, one-way analysis of variance
21
22
23
24
25
26

27 **Competing interests**

28
29
30 The authors declare that they have no competing interest.
31
32
33
34

35 **Author's contributions**

36
37
38 MAH and EB conceived and designed the study; NA performed the experiments and prepared the
39
40 figures; BL carried out flow cytometry analysis; RAJ performed the statistical analysis and revised the
41
42 manuscript critically; RAJ and MAH analysed and interpreted the data; MAH and NA drafted the
43
44 manuscript. All authors read and approved the final manuscript.
45
46
47
48
49

50 **Acknowledgements**

51
52
53 Financial support for this work was provided by grants from the Instituto Nacional de Investigación y
54
55 Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA) and by European Funds for Regional Development (FEDER)
56
57 (RTA2011-00049). Naiara Abendaño has a fellowship from the department of Agriculture of the
58
59 Basque Government. We thank the animal owners and veterinarian (Dr. Jesse Barandika) for their help
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

in collecting blood samples. The *M. avium* subsp. *paratuberculosis* and *M. bovis* isolates used in this study were provided by Dr. Iker A. Sevilla from NEIKER-Tecnalia. The authors thank for technical and human support provided by the flow cytometry laboratory at the Biomedicine Microscopy Service (SGIker) of UPV/EHU. We are grateful to Kyle Hearn for the careful editing of the manuscript.

References

- [1] Rue-Albrecht K, Magee DA, Killick KE, Nalpas NC, Gordon SV, MacHugh DE. **Comparative functional genomics and the bovine macrophage response to strains of the mycobacterium genus.** *Front Immunol.* 2014;**5**:536. Review.
- [2] Lamont EA, Talaat AM, Coussens PM, Bannantine JP, Grohn YT, Katani R, et al. **Screening of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* mutants for attenuation in a bovine monocyte-derived macrophage model.** *Front Cell Infect Microbiol.* 2014;**4**:87.
- [3] Böyum A. **Separation of leukocytes from blood and bone marrow.** *Scand J Clin Lab Invest Suppl.* 1968;**97**:7.
- [4] Preobrazhensky SN, Bahler DW. **Immunomagnetic bead separation of mononuclear cells from contaminating granulocytes in cryopreserved blood samples.** *Cryobiology.* 2009;**59**(3):366-368
- [5] Plóciennikowska A, Hromada-Judycka A, Borzęcka K, Kwiatkowska K. **Co-operation of TLR4 and raft proteins in LPS-induced pro-inflammatory signaling.** *Cell Mol Life Sci.* 2015;**72**(3):557-581. Review.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

[6] Jersmann IIP. **Time to abandon dogma: CD14 is expressed by non-myeloid lineage cells.** *Immunol Cell Biol.* 2005;**83**(5):462-467. Review.

[7] Kabitthe E, Hillegas J, Stokol T, Moore J, Wagner B. **Monoclonal antibodies to equine CD14.** *Vet Immunol Immunopathol.* 2010;**138**(1-2):149-153.

[8] Jacobsen CN, Aasted B, Broe MK, Petersen JL. **Reactivities of 20 anti-human monoclonal antibodies with leucocytes from ten different animal species.** *Vet Immunol Immunopathol.* 1993;**39**(4):461-466.

[9] Davis WC, Drbal K, Mosaad AE, Elbagory AR, Tibary A, Barrington GM, et al. **Use of flow cytometry to identify monoclonal antibodies that recognize conserved epitopes on orthologous leukocyte differentiation antigens in goats, llamas, and rabbits.** *Vet Immunol Immunopathol.* 2007;**119**(1-2),123-130.

[10] Grützkau A, Radbruch A. **Small but mighty: how the MACS-technology based on nanosized superparamagnetic particles has helped to analyze the immune system within the last 20 years.** *Cytometry.* 2010;**77**(7):643-647. Review.

[11] Adams JD, Kim U, Soh H.T. **Multitarget magnetic activated cell sorter.** *Proc Natl Acad Sci USA.* 2008;**105**(47):18165-18170.

[12] Abendaño N, Sevilla I, Prieto JM, Garrido JM, Juste RA, Alonso-Hearn M. **Quantification of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* strains representing distinct genotypes and**

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

isolated from domestic and wildlife animal species by use of an automatic liquid culture system. *J Clin Microbiol.* 2012;**50**(8):2609-2617.

[13] Smith HE, Jacobs RM, Smith C. **Flow cytometric analysis of ovine peripheral blood lymphocytes.** *Can J Vet Res.* 1994; **58**(2):152-155.

[14] Peterson K, Koets A, Rutten VPMG, Colenbrander B, Houwers DJ. **Flow cytometric assessment of circulating peripheral blood monocytes in small ruminants.** *Small Ruminant Research.* 2006;**65**:136-141.

[15] Korou LM, Liandris E, Gazouli M, Ikonomopoulos J. **Investigation of the association of the SLC11A1 gene with resistance/sensitivity of goats (*Capra hircus*) to paratuberculosis.** *Vet Microbiol.* 2010;**144**:353-358.

[16] Castillo-Velázquez U, Gomez-Flores R, Tamez-Guerra R, Tamez-Guerr, P, Rodríguez-Padilla C. **Differential responses of macrophages from bovines naturally resistant or susceptible to *Mycobacterium bovis* after classical and alternative activation.** *Vet Immunol Immunopathol.* 2013;**154**(1-2):8-16

[17] Vázquez P, Ruiz-Larrañaga O, Garrido JM, Iriondo M, Manzano C, Agirre M, Estonba A, Juste RA. **Genetic association analysis of paratuberculosis forms in holstein-friesian cattle.** *Vet Med Int.* 2014;321327.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

[18] Woo SR, Sotos J, Hart AP, Barletta RG, Czuprynski CJ. **Bovine monocytes and a macrophage cell line differ in their ability to phagocytose and support the intracellular survival of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*.** *Vet Immunol Immunopathol.* 2006;**110**(1-2):109-120.

[19] Souza CD, Evanson OA, Sreevatsan S, Weiss DJ. **Cell membrane receptors on bovine mononuclear phagocytes involved in phagocytosis of *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis*.** *Am J Vet Res.* 2007;**68**(9):975-980.

[20] Gollnick NS, Mitchell RM, Baumgart M, Janagama HK, Sreevatsan S, Schukken YH. **Survival of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in bovine monocyte-derived macrophages is not affected by host infection status but depends on the infecting bacterial genotype.** *Vet Immunol Immunopathol.* 2007;**120**(3-4):93-105.

Figures

Figure 1. Workflow for the isolation of CD14⁺ monocytes by a standard method (A), or by using MACS Technology from isolated PBMCs (B) or directly from whole blood (C).

Figure 2. Enrichment of CD14⁺ monocytes from bovine PBMC using CD14 MicroBeads and MS columns. Histograms indicate the percentage of CD14⁺ cells after ficoll-paque separation, after labelling with CD14 MicroBeads and the percentage of negatively and positively selected CD14⁺ cells after magnetic separation. The four cellular populations were stained with a PE-conjugated anti-human CD14 mAb and analyzed on a Beckman Coulter cytometer analyzer. A. Lineal forward scatter (FS LIN) and side scatter (SS LIN) of each cell fraction. A monocyte gate was set according to the FS/SS LIN characteristics of the cells. B. The gated cells (monocytes) were used for analysis of CD14⁺ staining. FL INT LOG = Log of fluorescence intensity. C. The table summarizes cell counts and CD14⁺ cell frequencies in PBMC from one representative donor prior to and after selection of CD14⁺ cells using CD14 MicroBeads and MS columns.

Figure 3. Flow cytometry analysis of caprine CD14⁺ cells using a PE-conjugated anti-human CD14 mAb. Histograms indicate the percentage of CD14⁺ cells after ficoll-paque separation, after labelling with CD14 MicroBeads and the percentage of negatively and positively selected CD14⁺ cells after magnetic separation. The four cellular populations were stained with a PE-conjugated anti-human CD14 mAb and analyzed on a MACSQuant FaCScan analyzer. A. Lineal forward scatter (FS LIN) and side scatter (SS LIN) of each cell fraction. A monocyte gate was set according to the FS/SS LIN characteristics of the cells. B. The gated cells (monocytes) were used for analysis of CD14⁺ staining. FL INT LOG= Log of fluorescence intensity. C. The table summarizes cell counts and CD14⁺ cell frequencies in PBMC from one representative donor prior to and after selection of CD14⁺ cells using CD14 MicroBeads and MS columns.

1 **Figure 4. Flow cytometry analysis of ovine CD14⁺ cells using a PE-conjugated anti-human CD14**
2 **mAb.** Histograms indicate the percentage of CD14⁺ cells after ficoll-paque separation, after labelling
3
4 with CD14 MicroBeads and the percentage of negatively and positively selected CD14⁺ cells after
5
6 magnetic separation. The four cellular populations were stained with a PE-conjugated anti-human
7
8 CD14 mAb and analyzed on a Beckman Coulter cytometer analyzer. A. Lineal forward scatter (FS
9
10 LIN) and side scatter (SS LIN) of each cell fraction. A monocyte gate was set according to the FS/SS
11
12 characteristics of the cells. B. The gated cells (monocytes) were used for analysis of CD14⁺ staining.
13
14 FL INT LOG= Log of fluorescence intensity in channel 2. C. Cell counts and CD14⁺ cells ratio before
15
16 and after MACS separation.
17
18
19
20
21
22
23

24 **Figure 5. Flow cytometry analysis of ovine CD14⁺ cells purified using Whole Blood CD14**
25 **Microbeads and Whole Blood columns.** An aliquot of the positive fraction was stained with a PE-
26
27 conjugated anti-human CD14 mAb and analyzed on a Beckman Coulter cytometer analyzer. Cell
28
29 counts and CD14⁺ cells ratio after MACS separation were determined from triplicate cytometric
30
31 analysis (A, B and C).
32
33
34
35
36
37
38
39

40 **Figure 6. CD14⁺ cell morphology analysis.** Bovine (A) and caprine (B) CD14⁺ monocytes purified
41
42 using MACS technology were incubated for 7 days 37 °C to allow differentiation to MDMs.
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Table 1

[Click here to download Table: Table 1.docx](#)

Table 1. Entry of *M. bovis* and *M. avium subsp. paratuberculosis* isolates in MACS-purified MDMs

Donor	Animal species	Strain	Entry ^a (%)	log ₁₀ CFU (± SD) ^b
1	Cattle	<i>M. bovis</i>	78.18	4.704 (± 1.00)
2	Cattle	<i>M. bovis</i>	75.54	4.545 (± 1.49)
3	Cattle	<i>M. bovis</i>	61.86	3.722 (± 0.04)
4	Cattle	<i>M. bovis</i>	65.29	3.928 (± 0.86)
5	Cattle	<i>M. bovis</i>	61.26	3.686 (± 0.21)
6	Cattle	<i>M. bovis</i>	75.41	4.537 (± 0.66)
7	Cattle	<i>M. bovis</i>	88.27	5.311 (± 0.59)
8	Cattle	<i>M. bovis</i>	61.07	3.674 (± 0.14)
9	Cattle	<i>M. bovis</i>	65.55	3.944 (± 0.00)
10	Cattle	<i>M. bovis</i>	86.66	5.215 (± 0.07)
11	Cattle	<i>M. bovis</i>	93.04	5.598 (± 0.33)
12	Cattle	<i>M. bovis</i>	86.21	5.187 (± 0.30)
13	Cattle	<i>M. bovis</i>	74.80	4.501 (± 0.59)
14	Cattle	<i>M. bovis</i>	54.01	3.250 (± 0.16)
15	Cattle	<i>M. bovis</i>	71.72	4.316 (± 1.24)
1	Goat	<i>M. avium subsp. paratuberculosis</i>	84.43	5.387 (± 0.07)
2	Goat	<i>M. avium subsp. paratuberculosis</i>	87.87	4.808 (± 0.18)
3	Goat	<i>M. avium subsp. paratuberculosis</i>	79.57	5.044 (± 1.29)
4	Goat	<i>M. avium subsp. paratuberculosis</i>	88.97	4.530 (± 0.19)
5	Goat	<i>M. avium subsp. paratuberculosis</i>	75.33	3.725 (± 0.06)
6	Goat	<i>M. avium subsp. paratuberculosis</i>	89.89	5.007 (± 0.15)

^a Entry was calculated as the percentage of the inoculated bacteria that was recovered from each cell lysate at 2 h p.i.

^b Values shown are means of three replicates + SD

Figure 1
[Click here to download Figure: Figure 1F.jpg](#)

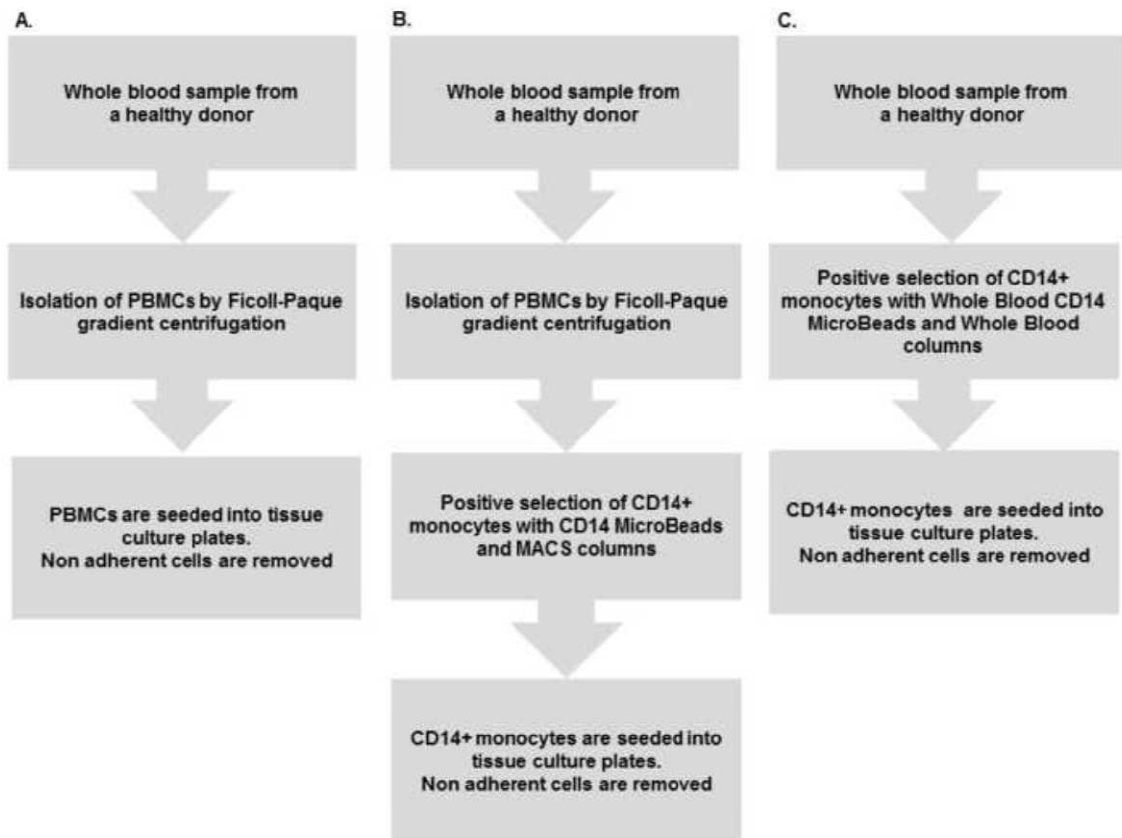


Figure 2
[Click here to download Figure: Figure 2F.jpg](#)

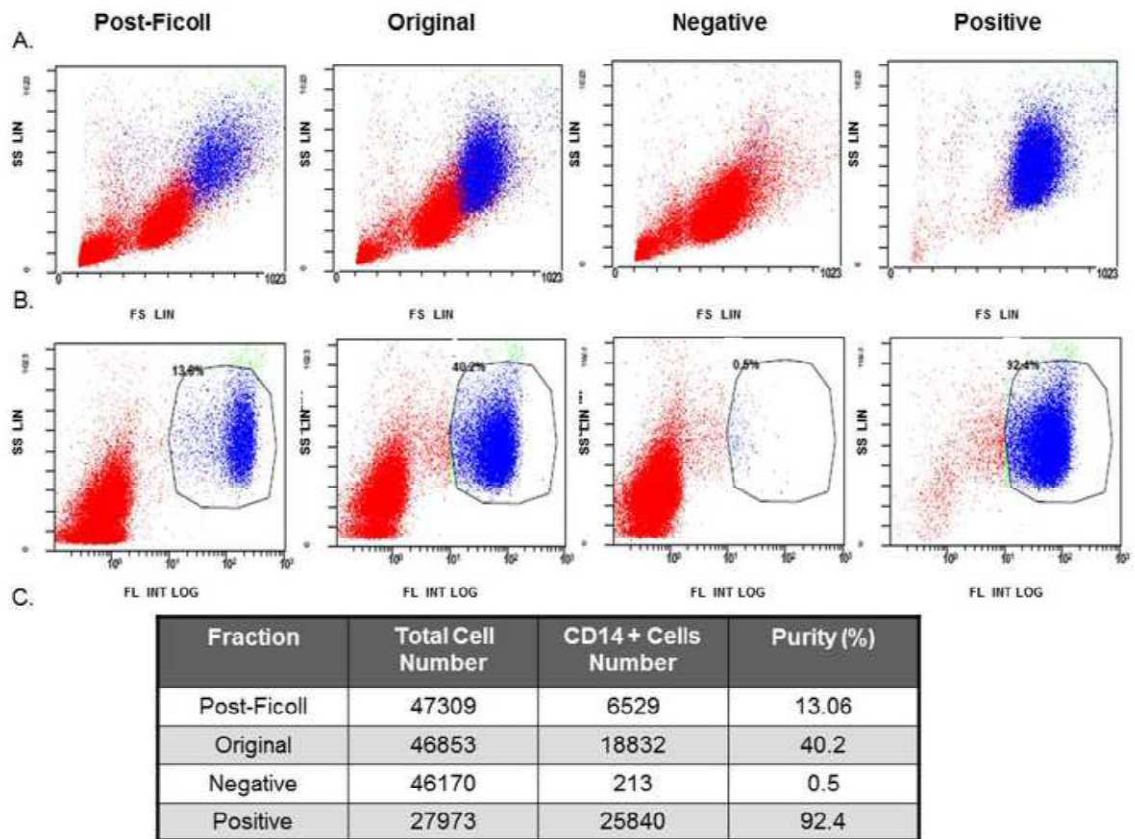
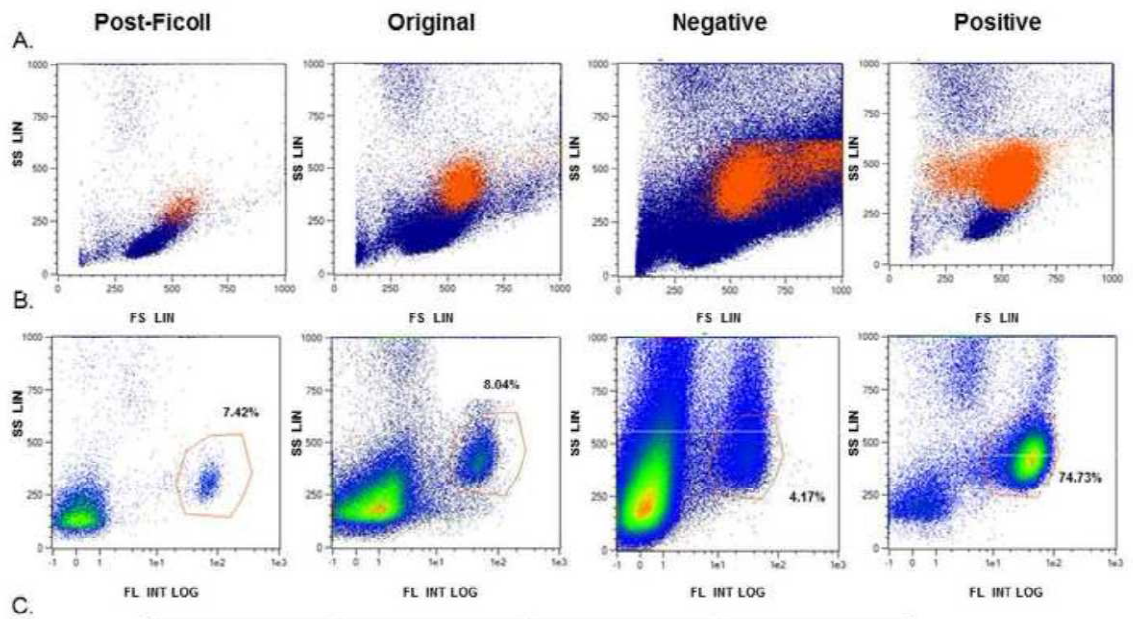
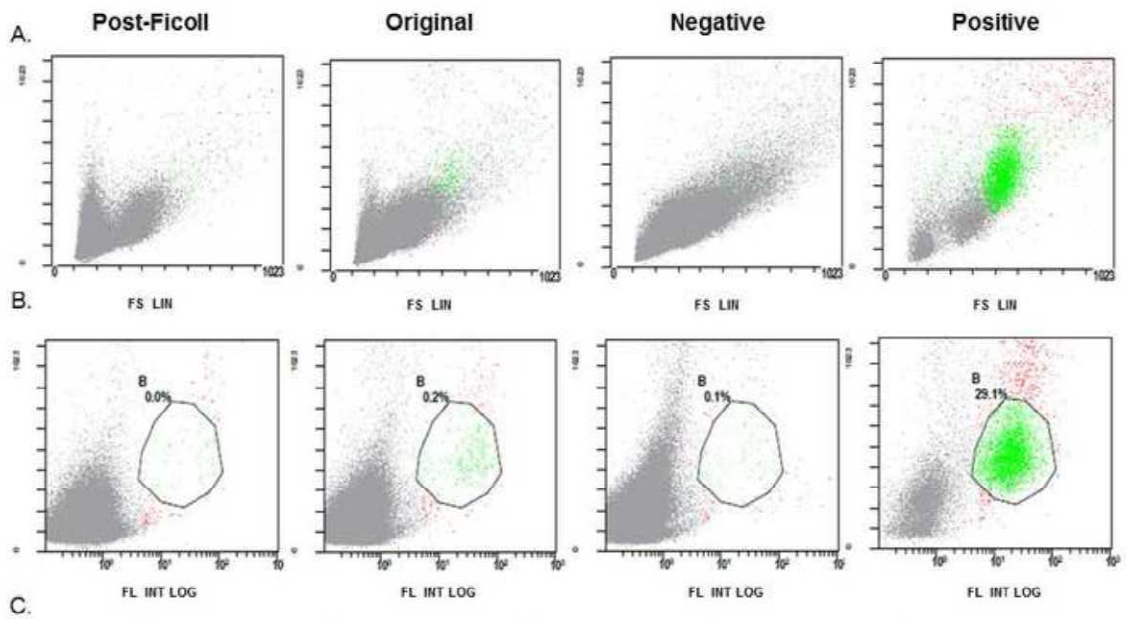


Figure 3
[Click here to download Figure: Figure 3F.jpg](#)



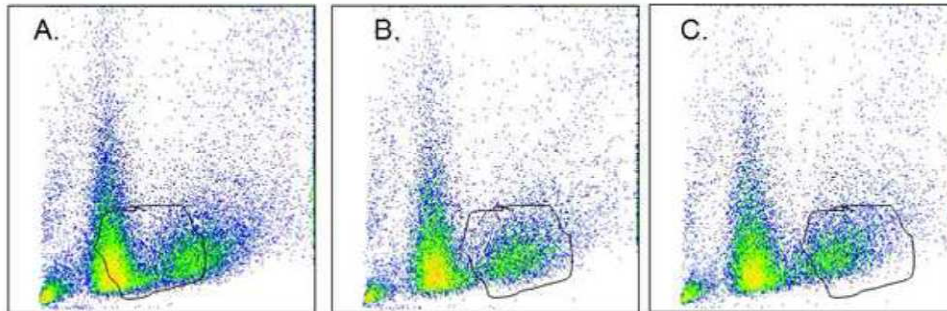
Fraction	Total Cell Number	CD14+ Cells Number	Purity (%)
Post-Ficoll	12293	912	7.4
Original	80435	6470	8.0
Negative	473938	19761	4.2
Positive	61714	46116	74.7

Figure 4
[Click here to download Figure: Figure 4F.jpg](#)



Fraction	Total Cell Number	CD14 + Cells Number	Purity (%)
Post-Ficoll	259524	96	0.0
Original	250000	386	0.2
Negative	250000	149	0.1
Positive	16510	4804	29.1

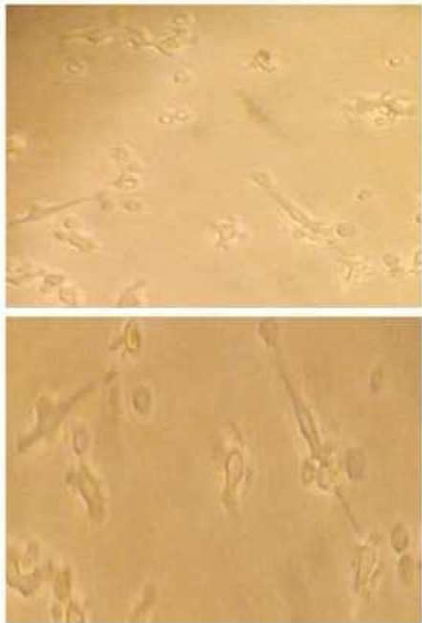
Figure 5
[Click here to download Figure: Figure 5F.jpg](#)



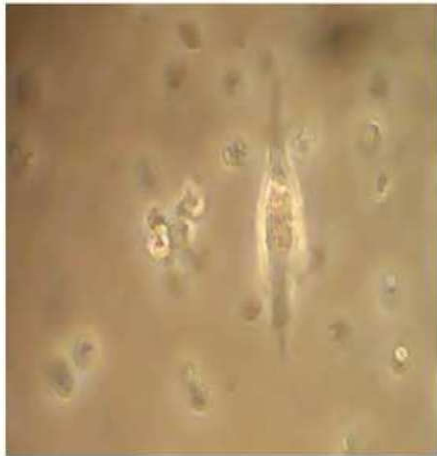
Positive Fraction	Total Cell Number	CD14+ Cells Number	Purity (%)
A	29633	8051	27.17
B	17678	4821	27.27
C	17504	4778	27.30

Figure 6
[Click here to download Figure: Figure 6F.jpg](#)

A.



B.



VII. ANÁLISIS DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN GENERAL

VII. ANÁLISIS DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN GENERAL

La identificación de aislados de *Map* con distinta virulencia puede ayudar a entender mejor la patogénesis de la infección y los factores implicados en ella, y también a desarrollar estrategias más eficaces de control de la enfermedad. La combinación del análisis de las respuestas iniciales de los macrófagos a la infección y de la capacidad de supervivencia intracelular de *Map*, constituyen una estrategia adecuada para caracterizar la virulencia de distintos aislados de *Map*. Desde el punto de vista metodológico, los modelos celulares *in vitro* permiten comparar simultáneamente la virulencia de un gran número de cepas de *Map* y presentan además ciertas ventajas sobre las infecciones experimentales como son la reproducibilidad del ensayo, reducción de costo y tiempo en la realización de los ensayos. En esta tesis doctoral, se han empleado cuatro modelos de infección *in vitro* para estudiar las interacciones *Map*-hospedador en los primeros estadios de la infección: la línea celular de macrófagos bovinos BoMac, la línea celular de macrófagos ovinos MOCL-4 y MDMs bovinos y ovinos.

Primeramente, se analizó la capacidad de aislados de *Map* con distintos genotipos (C, S y B) y aisladas de bovino, ovino, caprino, ciervo, gamo, jabalí y bisonte para entrar, crecer y multiplicarse en la línea celular bovina BoMac y en MDMs bovinos y ovinos. Los aislados seleccionados habían sido previamente clasificados utilizando dos técnicas moleculares: PCR-REA de la secuencia de inserción IS1311 y PFGE. Con el objetivo de confirmar el genotipo de las cepas (C, B y S) de manera rápida, se diseñaron primers para la amplificación por PCR de 4 fragmentos de DNA correspondientes a 4 fases de lectura abierta (MAP1487, MAP1485, MAP1738, MAP2325) localizados en tres delecciones previamente identificadas en las cepas Tipo S (Marsh y col., 2005; Marsh y col., 2006). Los resultados mostraron que las cepas Tipo S aisladas de cabras y ovejas carecían de los fragmentos de DNA MAP1485 y MAP1738, mientras que estas 2 regiones sí se detectaron en todas las cepas de Tipo C. Este resultado confirmó que los fragmentos MAP1485 y MAP1738 podrían utilizarse como marcadores para diferenciar los dos principales genotipos de *Map*. Curiosamente, un fragmento del gen MAP1487 no pudo ser amplificada a partir de DNA genómico de las cepas de Tipo C aisladas de caprino, bisonte, jabalí y ciervo, lo que confirmó que incluso dentro de aislados de *Map* del mismo genotipo existe una variabilidad genómica significativa. Métodos de genotipado

basados en PCR, como el utilizado en esta tesis doctoral, compensan las limitaciones de otros métodos que como el PFGE requieren mucho tiempo y grandes cantidades de DNA de alta calidad.

El análisis de la interacción de *Map* con los macrófagos del hospedador y los factores que afectan a ésta son bastante desconocidos en parte por las dificultades para cuantificar la carga bacteriana de *Map*. *Map* ha sido difícil de cuantificar por métodos bacteriológicos de rutina debido a su lenta velocidad de replicación y a su tendencia a agruparse formando grumos (Elguezabal y col., 2011). La cuantificación de la carga micobacteriana suele realizarse mediante microscopia, PCR o espectrofotometría, pero estos métodos sobre-estiman la carga bacteriana al incluir bacteria viva y muerta. Otra desventaja de la espectrofotometría es que solo es capaz de cuantificar altas concentraciones de *Map*, 1 una unidad de absorbancia a 600 nm corresponde a 10^8 células/ml (Shin y col., 2007). Como alternativa a estos métodos, el cultivo bacteriológico de *Map* en medio sólido sí que proporciona una estimación real del número de células viables. Sin embargo, no todas las cepas de *Map* crecen en los mismos medios sólidos y a veces son necesarios varios meses en cultivo y la realización de varias réplicas de diluciones seriadas para poder detectar y cuantificar el número de colonias presentes en un inóculo. Además, los métodos estándar de recuento en placa para micobacterias de crecimiento lento son laboriosos, costosos y con frecuencia fallan debido a la contaminación o por deshidratación del medio durante el largo período de incubación. Además, debido a la tendencia de esta bacteria a formar grumos, el cultivo de *Map* en medios sólidos subestima el número de UFCs presentes en una muestra. Sin embargo, los sistemas que utilizan un medio líquido para el cultivo de *Map*, tales como el sistema BACTEC MGIT 960, tienen mejor sensibilidad analítica y requieren menos tiempo para la detección del crecimiento bacteriano (Cruciani y col., 2004). El sistema BACTEC MGIT 960 determina el tiempo que se tarda en detectar el crecimiento bacteriano (TTD) que es proporcional al tamaño del inóculo. Este sistema se utiliza habitualmente para la detección de *Map* pero no para su cuantificación, por lo que se tuvo que poner a punto para utilizarlo como método de cuantificación de diversas cepas de *Map* (Publicación I). Para ello, se generaron curvas patrón para cada aislado incluido en el estudio que permitieron relacionar el TTD registrado en el sistema BACTEC MGIT 960 con el logaritmo de las UFCs presentes en las diluciones decimales preparadas a partir de un inóculo de concentración McFarland 1. Las curvas obtenidas se ajustaban a un modelo exponencial con tres parámetros de acuerdo a la siguiente ecuación: \log_{10} tamaño del inóculo = $\text{span} \times e^{(-K \times \text{TTD})} + \text{plateau}$. Todas las curvas patrón se

ajustaron a este modelo con valores de correlación que oscilaron entre 0.97 y 0.99. Dado que estas ecuaciones son específicas de cada aislado, tienen en cuenta la capacidad específica de cada aislado de *Map* para crecer en los tubos MGIT.

Además de generar ecuaciones específicas para la cuantificación de cada aislado de *Map* en el sistema BACTEC MGIT 960, se caracterizó también el crecimiento de cada una de los aislados en este sistema. Para ello, las medias de los valores de TTD obtenidos se compararon empleando un test de ANOVA con un análisis posterior de Duncan. Atendiendo a sus valores medios de TTD, los aislados de *Map* incluidas en el estudio se clasificaron en dos grupos distintos. En el primer grupo se incluyó a todos los aislados ovinos (Tipo S, C y B), la cepa caprina de Tipo S y la cepa de Tipo C aislada de gamo, cuyos valores medios de TTD difirieron significativamente de los de la cepa de referencia K-10. Los aislados de bovino, caprino, bisonte, jabalí y ciervo de Tipo C presentaron valores medios de TTD similares al de cepa de referencia K-10 por lo que se incluyeron en el grupo II. El hecho de que el aislado de bisonte presentara un valor medio de TTD similar al de otros aislados incluidos en el grupo II es consistente con observaciones previas que indicaban que los aislados de Tipo B son más próximos genotípica y fenotípicamente a otros aislados de genotipo C que a los de Tipo S (Sevilla y col., 2007; Stevenson, 2015). También se observó una gran similitud en las curvas patrón de las cepas ovinas, independientemente de su genotipo. Estudios anteriores han demostrado que el entorno al que *Map* se expone puede alterar la regulación transcripcional de ciertos genes, lo que podría afectar a la composición de su envoltura y su capacidad de crecer y sobrevivir en las células del hospedador (Alonso-Hearn y col., 2010; Patel y col., 2006). Datos recientes también sugieren que ciertos epítomos específicos de micobacterias están presentes sólo en un determinado hospedador (Janagama y col., 2010). Por lo tanto, es razonable la hipótesis de que los aislados ovinos de Tipo C y B pudieran haberse adaptado al hospedador por modificaciones en la expresión de algunos genes que podrían, a su vez, afectar la capacidad de estas cepas para crecer en medio líquido ralentizando su crecimiento. Para los aislados bovinos, la similitud de sus valores medios de TTD confirma observaciones previas que demuestran que los aislados bovinos están genéticamente muy conservados. Por el contrario, los aislados de caprino y de animales silvestres, en particular de cérvidos, mostraron una mayor diversidad fenotípica atendiendo a su crecimiento en los tubos MGIT. El hecho de que el aislado de ciervo presentara valores de TTD más bajos que ningún otro aislado de *Map* se puede asociar con la alta infectividad que demuestran tener los aislados con genotipo C en ciervos en cautividad, causando infecciones agudas y mortalidad en ciervos

menores de 1 año (Mackintosh y col., 2004, 2010). Curiosamente, el otro aislado de cérvido analizado en nuestro estudio, el aislado de gamo, presentó el valor medio de TTD más alto de todos los aislados con genotipo C incluidos en el estudio. De hecho, este aislado fue el único que pudo ser aislado de 9 gamos con lesiones histopatológicas multifocales y difusas; lo que indica la dificultad para aislar y cultivar cepas de *Map* de este hospedador (Prieto y col., 2014).

Los datos de TTD obtenidos en el sistema BACTEC MGIT 960 para cada aislado de *Map* se correlacionaron con el número de copias de DNA determinadas por qPCR a tiempo real con valores de R entre el 0.90 y 0.99 para los aislados testados. Esto sugiere que la qPCR del gen de copia única F57 de *Map* es un método rápido y preciso para estimar el número total de células de *Map* en fase exponencial de crecimiento en cultivo en medio líquido. El límite de detección de la qPCR fue de 10 copias por reacción. Sin embargo, el sistema BACTEC MGIT 960 fue capaz de detectar únicamente 10 UFCs del aislado de ciervo. Para el resto de los aislados de *Map*, la precisión del sistema BACTEC MGIT 960 fue menor que la de la qPCR. De hecho, el sistema BACTEC MIGIT 960 fue capaz de detectar $> 10^3$ - 10^4 UFCs/ml de los aislados del grupo I y $> 10^2$ - 10^3 UFCs/ml de los aislados incluidas en el grupo II tras 41 días de incubación. Un posible inconveniente en el uso del sistema BACTEC MGIT 960 es la contaminación de los viales. Sin embargo, la tasa de contaminación en nuestros cultivos fue inferior al 6 %, además de ser fácilmente reconocible.

Una vez que se puso a punto el sistema BACTEC MGIT 960 para la cuantificación de diversas aislados de *Map*, decidimos utilizar este método para comparar la capacidad de los 11 aislados de *Map* incluidas en el estudio para entrar, multiplicarse y persistir en el interior de macrófagos bovinos y ovinos (Publicaciones III y V). Los macrófagos bovinos y ovinos fueron infectados por triplicado con cada uno de las 11 cepas de *Map* a una multiplicidad de infección baja (célula:bacteria=1:10), para minimizar la formación de grumos durante la infección inicial e imitar las condiciones *in vivo*, donde un número pequeño de células de *Map* pueden establecer infección. Empleando un método radiométrico, Woo y col. (2007) demostraron previamente empleando un método radiométrico el número de células viables de *Map* en MDMs bovinos infectados aumentaba durante los primeros 4 días y después disminuía entre los días 4 y 8 p.i.. De acuerdo a estos resultados, las células infectadas con cada uno de los aislados incluidos en nuestro estudio se recogieron a las 2 horas p.i. (para medir la entrada) y a los 7 días p.i. (para medir la supervivencia y multiplicación). El inóculo

y los lisados celulares recogidos a las 2 h y 7 días p.i. se inocularon en los tubos MGIT y se incubaron a 37°C en el sistema BACTEC MGIT 960 para determinar el número de UFC en cada caso.

Comparando el crecimiento intracelular de los 11 aislados en los dos modelos celulares bovinos (BoMac y MDMs), se pudo observar que el log UFCs era menos variable en las células BoMac que en los MDMs. Esto se debe a la variabilidad que existe de un donador de sangre a otro en el caso de los MDMs. Del mismo modo, también se observaron variaciones en el crecimiento intracelular de *M. tuberculosis* en monocitos humanos obtenidos de 11 sujetos diferentes e incluso en monocitos de un mismo donante (Li y col., 2002). Nuestros resultados indicaron que las células BoMac fagocitaron con similar eficiencia a todas los aislados estudiados y no se observaron diferencias significativas en los porcentajes de entrada de los distintos aislados en la línea celular BoMac lo que demuestra que estos porcentajes son independientes del genotipo del aislado o del hospedador de origen del aislado de *Map*. Por otro lado, se observó que los aislados de *Map* diferían en su capacidad para proliferar y sobrevivir en el interior de los macrófagos infectados. De hecho, los aislados bovinos, de jabalí, de gamo y bisonte fueron capaces de crecer significativamente (ratio entre 1.35 y 2.20) y de persistir con mayor log UFCs que los aislados ovinos y caprinos a los 7 días p.i.. De hecho, el aislado ovino de Tipo C y el caprino de Tipo S mostraron incluso reducción en el número de log UFCs a los 7 días p.i., tanto en las células BoMac como en MDMs, lo que indicó que los macrófagos fueron capaces de eliminar en cierta medida a estas cepas. Nuestros resultados demostraron diferencias significativas en la capacidad para sobrevivir en el interior de macrófagos bovinos entre aislados de *Map* con genotipo C, siendo los aislados bovinos y de animales silvestres más virulentos que los de pequeños rumiantes. Como varios estudios demostraron previamente que la virulencia de ciertas bacterias puede regularse dependiendo de las condiciones medioambientales, es posible especular que las condiciones con las que se encuentra *Map* en el interior de los macrófagos ovinos y caprinos podría afectar a la envuelta bacteriana y consiguientemente a la interacción bacteria-macrófono, lo que podría traducirse en una reducción de su capacidad para proliferar y sobrevivir en macrófagos bovinos (Mekalanos, 1992; Cossu y col., 2012). El análisis estadístico de los datos obtenidos confirmó que las diferencias de crecimiento y supervivencia en macrófagos bovinos no dependían del genotipo del aislado, sino del hospedador de origen de los aislados. Previamente también habíamos observado una falta de correlación entre el genotipo de los aislados y su velocidad de crecimiento en tubos MGIT (Abendaño y col., 2012). Del mismo

VII. ANÁLISIS DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN

modo, cepas de micobacterias ambientales aisladas de peces y de humanos, incluyendo cepas de *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium peregrinum*, *Mycobacterium chelonae* y *Mycobacterium salmoniphilum*, demostraron diferentes habilidades para crecer en líneas celulares de macrófagos humanos, de ratón y carpas; agrupándose de acuerdo al hospedador del cual fueron aisladas (Harriff y col., 2008). En las Figuras 26 y 27 se muestra la entrada, crecimiento y supervivencia de las distintas cepas de Map en las células BoMac y en MDMs bovinos, respectivamente.

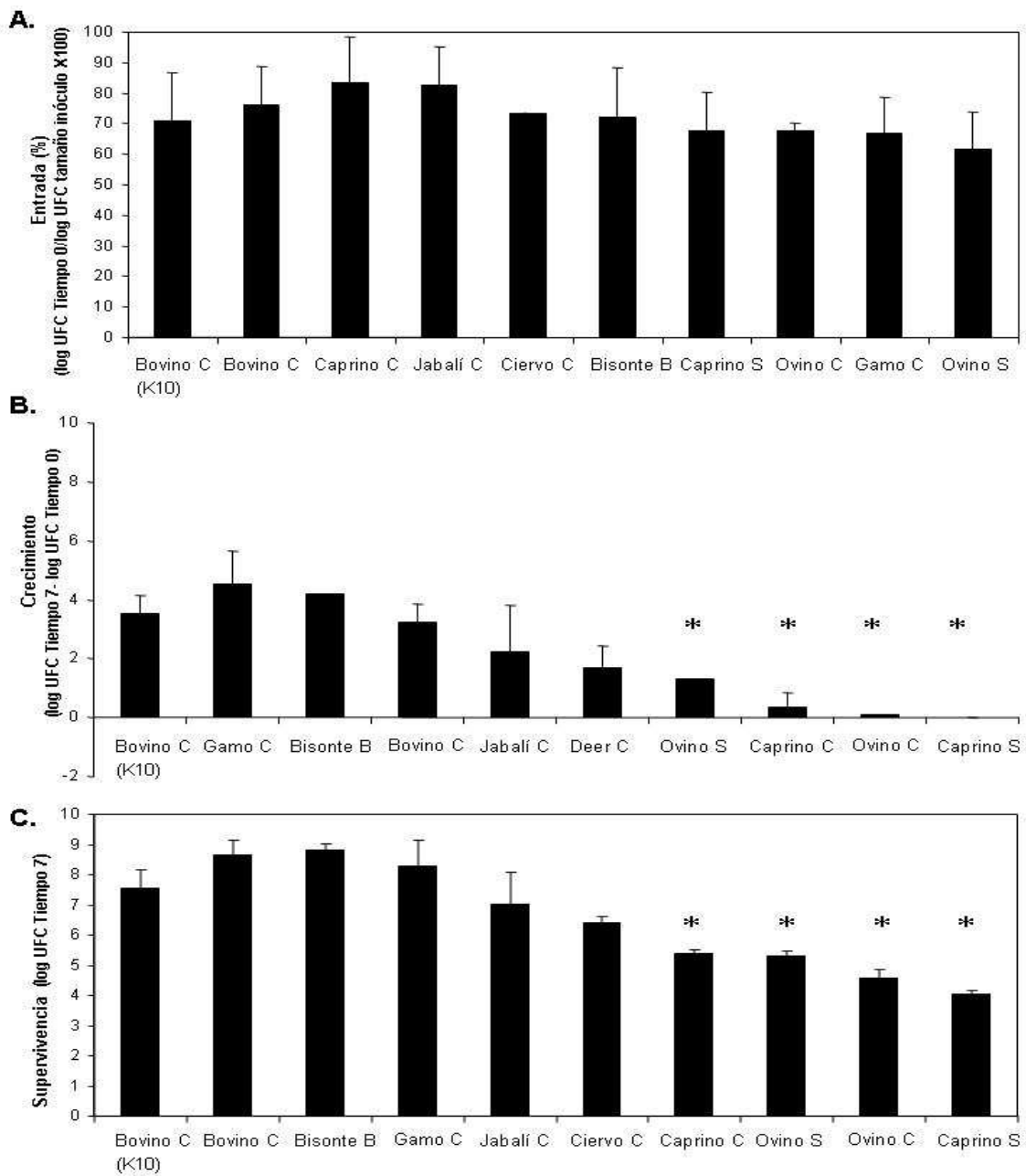


Figura 26. Entrada, crecimiento y supervivencia de los aislados de *Map* seleccionados en BoMac.

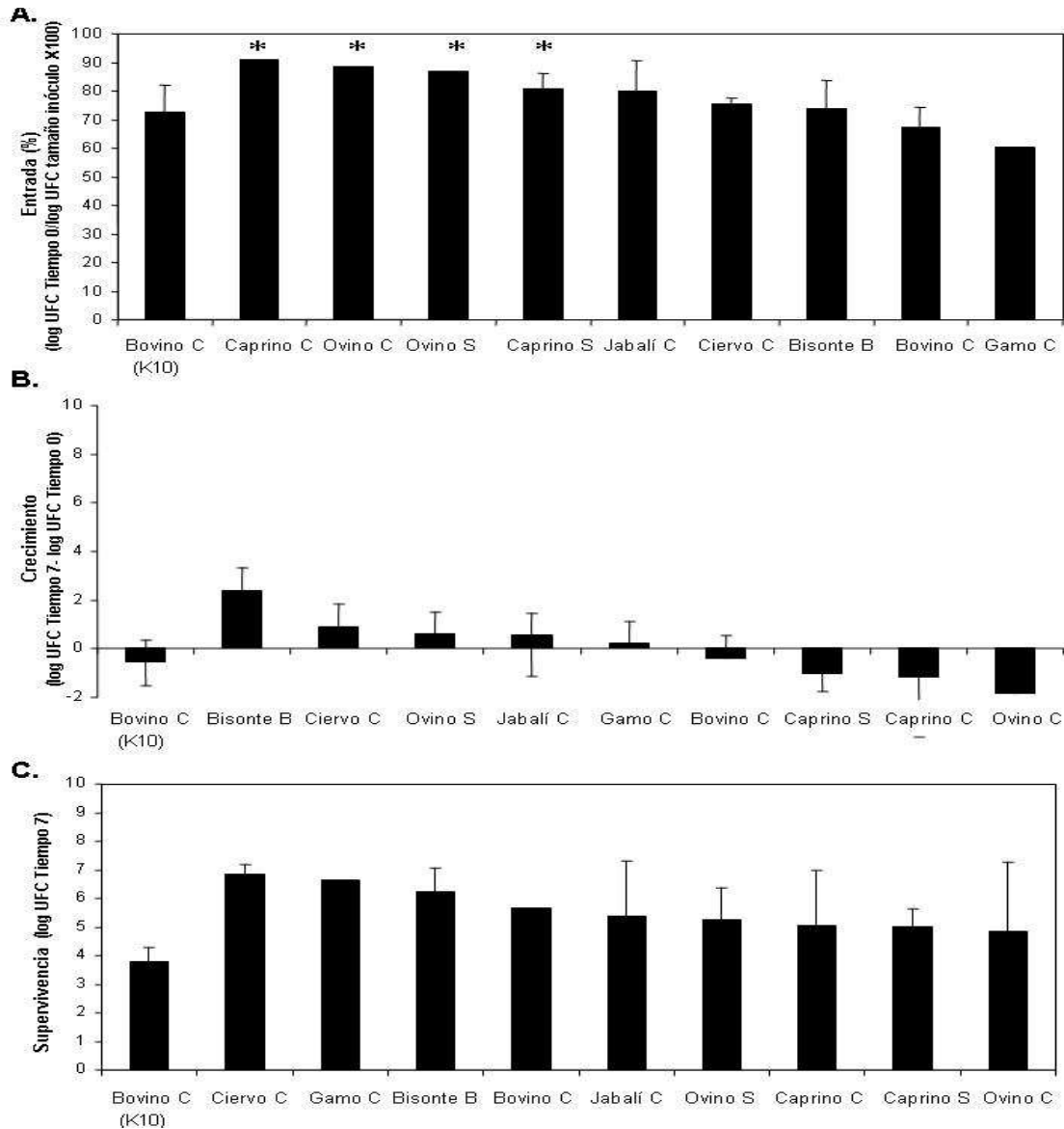


Figura 27. Entrada, crecimiento y supervivencia de los aislados de *Map* seleccionados en MDMs bovinos.

A continuación, procedimos a analizar la respuesta inmune inducida en células BoMac infectadas con dos aislados de *Map* (Bovino-C y Ovino-S) que habían demostrado claras diferencias en cuanto a su capacidad para multiplicarse y sobrevivir en el interior de macrófagos bovinos. Para el análisis de expresión génica, seleccionamos ciertas citoquinas (IL-10, TGF- β , TNF- α) e inhibidores de destrucción tisular (TIMP-1), cuya expresión se había observado previamente que estaba alterada en PBMCs, MDMs y/o en líneas celulares de macrófagos infectados con *Map* (Publicación II). El inhibidor de la apoptosis BCL2-1 se incluyó también en el análisis porque se había observado previamente que estaba sobreexpresado en MDMs infectados con un aislado bovino de *Map* (Kabara y col., 2010). Mientras que en células BoMac infectadas con la cepa bovina observamos niveles de

expresión más altos de citoquinas implicadas en la respuesta inmune anti-inflamatoria como la IL-6, TGF β -1 e IL-10, en células infectadas con la cepa ovina se observó una clara inducción de la respuesta inmune pro-inflamatoria, especialmente a las 24 horas p.i., caracterizada por una clara sobre-expresión de la IL1- α . Aunque las diferencias en la expresión de IL-10 en las células BoMac infectadas con los aislados bovino y ovino no fueron estadísticamente significativas, el aislado bovino indujo mayor producción de IL-10 a las 14 y 24 h p.i. y menor TNF α -2 a las 4 y 14 h p.i. que el aislado ovino. También se observaron diferencias significativas en la respuesta apoptótica y en la expresión de la proteína implicada en la destrucción tisular inducida por ambas cepas, detectándose una inducción significativa del inhibidor de apoptosis BCL2-1 a las 4 y 14 horas p.i., y una menor expresión de la proteína de destrucción tisular MMP3-1 a las 4 y 24 horas p.i. en las células infectadas con la cepa bovina. Por lo tanto, nuestros resultados indican que la infección de células BoMac con una cepa ovina estimula la respuesta pro-inflamatoria, apoptótica y destructiva cuyo resultado es la destrucción del macrófago infectado y la eliminación bacteriana. Por el contrario, en las células infectadas con el aislado bovino la respuesta fue la opuesta, favoreciéndose la supervivencia bacteriana en el interior de los macrófagos infectados. Debido a que se observó una fuerte correlación entre la supervivencia intracelular de los aislados ensayados y los patrones de producción de citoquinas específicas y proteínas relacionadas con la apoptosis o la destrucción tisular (IL-6, TGF β -1, IL1- α , BCL2-1 y MMP3-1), los niveles de expresión de estos biomarcadores de infección pueden ser utilizados para discriminar entre cepas con virulencia diferencial en el modelo BoMac.

Al comparar nuestros resultados con resultados epidemiológicos previos pudimos constatar una correlación entre la capacidad de supervivencia de los aislados bovinos, su perfil transcriptómico y su capacidad para causar numerosas epizootias en ganado vacuno. En contraposición, la menor supervivencia de los aislados de Tipo S, de origen caprino y ovino, en macrófagos bovinos podría explicar el bajo número de aislamientos de Tipo S en vacas naturalmente infectadas con *Map* (Whittington y col., 2001b; de Juan y col., 2005; Moloney y col., 2008). De acuerdo a nuestros resultados y siempre que la dosis infectiva fuera la misma, sería esperable que la transmisión de *Map* de pequeños rumiantes a bovinos no tuviera repercusiones clínicas tan importantes como la transmisión entre aislados de *Map* de otras especies animales incluidas en el estudio y el ganado bovino.

Con objeto de identificar diferencias en virulencia entre los distintos aislados de *Map* en el hospedador ovino procedimos a analizar su capacidad para iniciar una infección productiva en MDMs ovinos (Publicación V). Cuando se determinó la capacidad de entrada, crecimiento y supervivencia de los aislados incluidos en el estudio en MDMs ovinos, no se observaron diferencias significativas en los valores medios de log UFCs en los inóculos y a los días 0 y 7 para los aislados incluidos. Cuando el tiempo se consideró como la variable principal, si se observaron diferencias significativas entre los valores medios de log UFCs de los inóculos y a día 0, lo que indica que no toda la bacteria en los inóculos iniciales había sido fagocitada eficazmente por los MDMs ovinos. De hecho, los porcentajes de entrada se estimaron entre el 52 y el 87 % de los inóculos iniciales dependiendo del aislado. El análisis estadístico global de los valores medios de log UFCs demostró diferencias significativas entre el día 0 y 7 cuando el tiempo p.i. se consideró como la variable principal. Sin embargo, el crecimiento que experimentaron la mayoría de los aislados fue muy pequeño (ratio entre 1.05-1.63). Solamente la cepa de referencia K-10 presentó un aumento significativo en el número estimado de log UFCs a los 7 días de la infección en comparación con el valor a día 0. Esto podría explicarse porque la cepa K-10 es una cepa adaptada al laboratorio mientras que el resto eran aislados recientes con pocos pases de cultivo. Todos los aislados, incluyendo a la cepa K-10, fueron capaces de sobrevivir 7 días en los MDMs ovinos con un número equivalente de UFCs independientemente de su genotipo o hospedador de procedencia.

Con objeto de demostrar que no solo el número estimado de log UFCs de cada aislado a los 7 días p.i. sino que también las respuestas inmunes inducidas en MDMs ovinos eran similares, se analizó la expresión de citoquinas y proteínas implicadas en apoptosis y en destrucción tisular en MDMs ovinos infectados con dos aislados de Tipo C procedentes de distintos hospedadores, bovino y ovino. El mismo experimento se realizó por separado con dos aislados ovinos de distinto genotipo (C y S) con el objetivo de evaluar si el genotipo de la bacteria podría influir significativamente en el tipo de respuesta inmune inducida en MDMs infectados. En ambos casos no se observaron diferencias significativas en los niveles de expresión de IL-10, TGF β -1, IL-2, TNF α -2, BCL2-1 y TIMP-1 en MDMs ovinos infectados. Cuando la expresión de cada gen se analizó de manera individual, se observó aumento de la expresión del inhibidor de apoptosis BCL2-1 y del inhibidor de la destrucción tisular TIMP-1, que podrían estar favoreciendo la persistencia de *Map* en los MDMs ovinos infectados. En general, se observó una sobre-expresión de las citoquinas anti-inflamatorias IL-10 y TGF β -1 y una disminución de la expresión de las citoquinas pro-inflamatorias IL-2 y TNF α -2 en

MDMs ovinos infectados con los aislados seleccionados. En resumen, se observó una estimulación significativa de la respuesta anti-inflamatoria, antiapoptótica y antidestructiva en los macrófagos ovinos infectados con *Map*, independientemente del genotipo y del hospedador de procedencia del aislado, que se correlacionó con la supervivencia de *Map* en los MDMs ovinos.

Aunque los modelos celulares de macrófagos pueden proporcionar información acerca de la interacción *Map*-hospedador en las primeras etapas de la infección (7-10 días p.i.), estos modelos no son capaces de reproducir etapas posteriores de la infección, tales como las primeras etapas en la formación de granulomas. Para abordar esta cuestión, generamos modelos *in vitro* de granulomas bovinos y ovinos incubando PBMCs infectados con *Map* con una matriz extracelular de colágeno y fibronectina, componentes del tejido circundante en el que se ancla el granuloma natural. Para generar estos modelos llevamos a cabo una revisión bibliográfica de las condiciones de cultivo (MOI, tiempo p.i. y composición de la matriz extracelular y del medio de cultivo) requeridas para la generación de granulomas *in vitro* tras la infección de PBMCs humanos con *M. tuberculosis*, *M. bovis* y *M. leprae*, o tras su estimulación con antígenos micobacterianos, como por ejemplo, el lipomanano (Publicación IV). Previamente se había demostrado que el aislado de *M. tuberculosis* H37Rv inactivado por calor generaba granulomas de muy pequeño tamaño e inestables en condiciones *in vitro* (Birkness y col., 2007). De la misma manera, se observó que micobacterias avirulentas, como *M. smegmatis* y *M. avium*, formaban agregados celulares de poca consistencia y rigidez que no eran viables tras los primeros días de cultivo *in vitro*. Como estos resultados sugerían que la capacidad para desarrollar granulomas bien definidos se correlaciona con la severidad de las infecciones micobacterianas, procedimos a comparar la capacidad de distintos aislados de *Map* para formar granulomas viables en condiciones *in vitro* (Publicación V). Para ello, se infectaron PBMCs ovinos con la cepa bovina de referencia K-10 o con el aislado ovino de Tipo S a tres MOIs (bacteria:célula) (1:8, 1:16 y 1:33) y se incubaron a 37 °C durante 10 días. La agregación celular se observó todos los días en un microscopio de contraste de fases y los agregados generados *in vitro* se contaron a los 5 y 10 días p.i.. Nuestros resultados demuestran que ambos aislados de *Map* son capaces de inducir *in vitro* la formación de agregados bien definidos. En contraste, no se observó formación de agregados en PBMCs sin infectar procedentes de sangre del mismo donante lo que demuestra que la agregación se produce únicamente en respuesta a la infección con *Map*. El análisis estadístico mostró variaciones significativas entre el número de agregados generados tras 5 días de infección por

la cepa de referencia K-10 y la cepa ovina a la MOI más alta (1:8), siendo la cepa K-10 la que fue capaz de inducir la formación de un mayor número de agregados. Sin embargo, a los 10 días p.i. las variaciones en el número de agregados formados por ambos aislados de *Map* no fueron estadísticamente significativas a ninguna de las 3 MOIs evaluadas. No se obtuvieron diferencias significativas en el número de agregados inducidos por ambos aislados de *Map* entre los días 5 y 10, lo que sugiere que la mayoría de los agregados se formaron durante los primeros cinco días de la infección. El número de agregados formados a las MOI más alta (1:8) y más baja (1:33) fueron significativamente diferentes a los 10 días p.i., formándose un mayor número de ellos a la MOI mas alta. A los 10 días de cultivo, se recogieron los agregados, se incluyeron en parafina y tiñeron con HE y ZN para su análisis histológico. Los agregados celulares mostraron características morfológicas similares a las que presentan los granulomas naturales, tales como la agregación tridimensional de linfocitos alrededor de los macrófagos infectados. Cuando las secciones de parafina conteniendo a los microgranulomas se tiñeron con ZN, se pudieron observar bacilos en el interior de los granulomas. Los modelos *in vitro* de granulomas, como el desarrollado en esta tesis doctoral, presentan ciertas ventajas sobre los modelos animales incluyendo reducción del coste, mayor control y además pueden ayudar a comprender las interacciones *Map*-hospedador en las etapas iniciales de formación de los granulomas imposibles de abordar con modelos animales. Sin embargo, el granuloma constituye un microambiente muy complejo que se ve afectado por señales fisiológicas adicionales (factores de crecimiento y citoquinas) que se producen exclusivamente en los tejidos infectados y que no son posibles de recrear en modelos *in vitro*. Como consecuencia, ciertos aspectos de los granulomas *in vivo* pueden ser diferentes o pueden estar ausentes en los modelos de granulomas *in vitro*, incluyendo la necrosis intra-granulomatosa, la acumulación de fibrina y colágeno, y la presencia y distribución de los bacilos. A pesar de esta limitación, estos modelos tridimensionales de granulomas *in vitro* pueden ser útiles además de para analizar diferencias de virulencia entre aislados de *Map*, para: i) entender qué factores o moléculas desempeñan un papel importante en la formación de granulomas y en su estabilidad, ii) evaluar la capacidad inductora de granulomas por parte de ciertos antígenos bacterianos o mutantes atenuados y iii) proporcionar una plataforma para probar la efectividad de vacunas y fármacos.

Nuestros resultados permiten concluir que los aislados de *Map* no solo de rumiantes domésticos sino también de cérvidos y jabalí son capaces de iniciar una infección productiva en el hospedador ovino independientemente del genotipo, por lo que no se debe subestimar la

importancia de la transmisión de *Map* entre animales silvestres y la especie ovina. La supervivencia de los aislados ovinos en MDMs ovinos se correlacionó positivamente con datos epidemiológicos y evidencias clínicas previas que señalaban la capacidad de estos aislados de *Map* para causar numerosos epizootias en ovejas (Stevenson y col., 2002). Así mismo, la capacidad de los aislados bovinos para sobrevivir en MDMs ovinos se correlacionó con su capacidad para infectar ovejas en condiciones experimentales (Verna y col., 2007). Sin embargo, conviene recordar que las infecciones experimentales generalmente se llevan a cabo con altas dosis de bacteria por lo que no reflejan de manera exacta la transmisión de *Map* en condiciones naturales.

El análisis estadístico global de la capacidad de supervivencia de distintos aislados de *Map* en modelos celulares bovinos y ovinos confirmó un comportamiento similar de los aislados en BoMac y en MDMs bovinos y diferente al observado en MDMs ovinos. Mientras que en el modelo ovino todos los aislados mostraron una virulencia similar, en los modelos bovinos observamos diferencias significativas entre los aislados de pequeños rumiantes y los de bovinos y de animales silvestres, siendo estos dos últimos los más virulentos. Estas diferencias no se asociaban a un determinado genotipo sino al hospedador de origen de los aislados.

Tabla XXXVII. Modelo GLM para comparación estadística de los valores de UFCs globales estimados en los modelos celulares bovinos y ovinos cuando el tiempo p.i., modelo y tipo celular se consideraron como variables principales. Las variables que presentan una misma letra en el agrupamiento son similares.

Agrupamiento de Duncan	Media	Número de observaciones	Modelo celular
A	7,0153	207	Ovino
B	5,7664	278	Bovino
Agrupamiento de Duncan	Media	Número	Tipo Celular
A	7,0153	207	O-MDM
B	5,8530	135	BOMAC
B	5,6847	143	B-MDM
Agrupamiento de Duncan	Media	Número	Tiempo p.i.
A	6,8659	173	Inóculo
A	6,6054	156	7 días
B	5,3653	156	2 días

En general, se observó una fuerte correlación entre la supervivencia de las cepas de *Map* dentro de los macrófagos bovinos y ovinos y la estimulación de una respuesta anti-

inflamatoria, antiapoptótica y antidestructiva mediada por la producción de BCL2-1, TIMP-1, TGF β -1, TNF α -2 e IL-10. En su conjunto, nuestros resultados soportan la hipótesis de que aislados de *Map* de cérvidos, jabalí y de origen bovino y caprino, podrían tener las mismas consecuencias clínicas en ovinos que los aislados de origen ovino que aparentemente no presentan ninguna ventaja selectiva a la hora de causar la paratuberculosis ovina. En contraste, los aislados bovinos y de animales silvestres sí podrían presentar cierta ventaja sobre los aislados de pequeños rumiantes a la hora de causar la paratuberculosis bovina. Es general, nuestros resultados inciden sobre la necesidad de implementar medidas que eviten el riesgo de transmisión de *Map* interespecie especialmente en granjas con varias especies animales en producción o en granjas donde los pastos se comparten por varias especies animales domésticos y silvestres. De hecho, la existencia de setos naturales para separar campos podría reducir significativamente el riesgo de transmisión de la paratuberculosis al reducir la contaminación de los pastos con heces y/o orina de animales silvestres infectados con *Map*. Así mismo, las granjas que utilicen el saneamiento como medida de control de la paratuberculosis no deberían asumir distinciones basadas en el genotipo de las cepas.

En un intento de explicar las diferencias en virulencia encontradas entre los aislados bovinos y ovinos en macrófagos bovinos, recientemente hemos comparado la composición de ácidos grasos de dos aislados de *Map* de origen bovino (genotipo C) y ovino (genotipo S) que habían demostrado previamente distinta capacidad para sobrevivir en macrófagos bovinos (Publicación VIII). Hay que recordar que *Map* presenta una envuelta rica en lípidos que constituyen hasta el 60 % del peso de la bacteria. Los fosfatidil-1-mio-inositol manosidos (PIMs) de la envuelta, entre los que se incluye el Man-LAM, interactúan con los receptores de los macrófagos (receptor de manosa y TLR-2) y dirigen a la bacteria hasta un compartimento celular o endosomal que no se fusiona con lisosomas (Kolattukudy y col., 1997). El componente manosilado de los PIMs se ancla a la membrana plasmática mediante uno o cuatro ácidos grasos; preferencialmente ácido palmítico, ácido tuberculoesteárico y ácido oleico (Cao y Williams, 2010; Vergne y col., 2015). En concreto, las formas tri y tetra-aciladas de los PIMs (Ac₁PIM₅ y Ac₁PIM₆) son las que preferentemente se unen a los receptores de manosa evitando la fusión del fagosoma que contiene a la bacteria con el lisosoma (Guilleron y col., 2006, Torrelles y col., 2008). Las formas triaciladas de los PIMs están compuestas por dos ácidos palmíticos y un tuberculoesteárico; y las tetra-aciladas por 2 ácidos palmítico, un oleico y un tuberculoesteárico. La hipótesis de trabajo que tratamos de verificar en nuestro estudio era si las diferencias en virulencia entre ambos aislados pudieran

deberse a cambios en los ácidos grasos de la envuelta de *Map* que median en el reconocimiento de los componentes manosilados de los PIMs con los receptores de los macrófagos. Esta hipótesis se sustenta en evidencias previas que demuestran que cambios en la composición de ácidos grasos afecta a la conformación del Man-LAM de la envuelta de *M. tuberculosis* y como consecuencia a la interacción del componente manosilado del Man-LAM con los receptores de manosa del macrófago (Torrelles y col., 2006). Por otro lado, nuestra aproximación resultaba interesante puesto que se desconoce como *Map* modula la composición de su envuelta celular y su metabolismo lipídico en respuesta a las condiciones medioambientales que existen dentro y fuera del macrófago y si esta modulación es específica del genotipo del aislado de *Map* o del tipo de macrófago al que la bacteria tiene que enfrentarse. Para testar nuestra hipótesis, las líneas celulares de macrófagos de origen bovino (BoMac) y ovino (MOCL-4) se infectaron con los dos aislados de *Map*. En ambos casos la bacteria extracelular se recogió a las 4 h p.i. y la intracelular a los 4 días p.i. y los ésteres de metilo de los ácidos grasos (Fatty acid methyl ester; FAMES) de ambas fracciones (intra y extracelular) se extrajeron mediante saponificación en solución diluida de hidróxido sódico y metanol seguida de solución de ácido clorhídrico/metanol (MIDI, 2002). Los FAMES extraídos se analizaron por cromatografía de afinidad y se compararon con los que presentaban los aislados crecidos en Middlebrook 7H9 empleando el software Sherlock Microbial Identification con la librería Myco6 (MIDI, 2008). Utilizando esta aproximación pudimos confirmar que el perfil de ácidos grasos de la bacteria extracelular y de la crecida en medio 7H9 era idéntico y significativamente diferente del de la bacteria intracelular independientemente del tipo de aislado de *Map*.

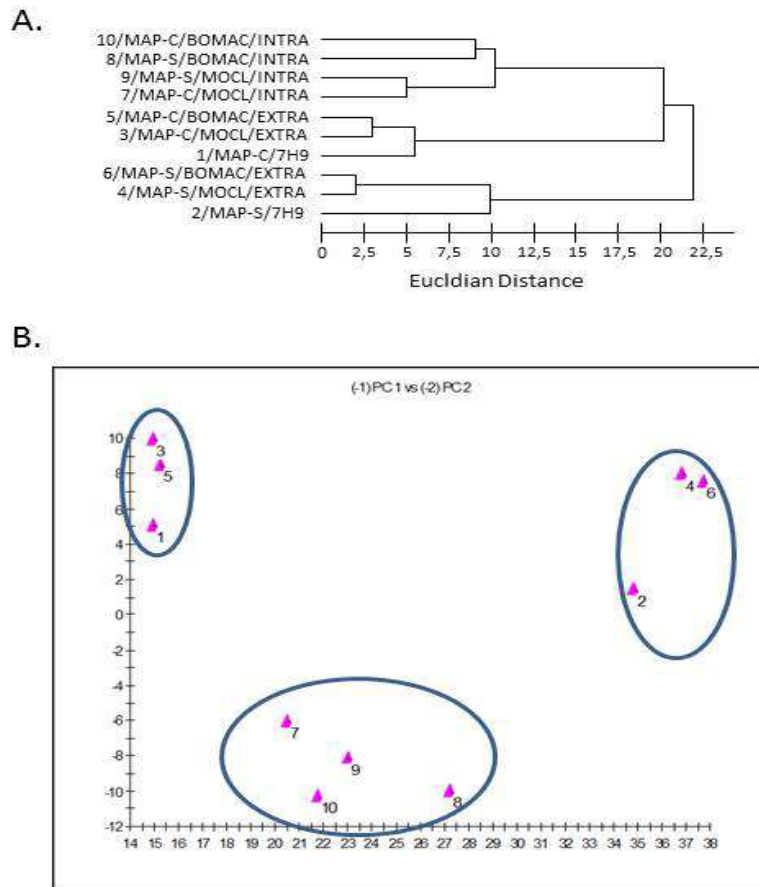


Figura 28. (A) Dendrograma mostrando el agrupamiento de los dos aislados de *Map* de acuerdo a su contenido en ácidos grasos en diferentes condiciones medioambientales. Las uniones más cortas indican una mayor similitud. (B) Análisis de componentes principales de los perfiles de ácidos grasos de la cepa K10 de *Map* y del aislado ovino S2349 en distintas condiciones medioambientales (extracelular, intracelular, 7H9).

Nuestros resultados demuestran que la composición de ácidos grasos de *Map* varía durante la infección. Aunque el contenido de ácidos grasos de ambos aislados en el ambiente intracelular fue idéntico, en condiciones extracelulares sí se observaron diferencias significativas en cuanto al contenido de ácido tuberculoesteárico, ácido oleico y ácido palmítico y sus derivados para ambos aislados de *Map*. En concreto, al aislado ovino carecía de ácido tuberculoesteárico y presentaba mayor contenido de ácido oleico y palmítico que el aislado bovino. Estos tres ácidos grasos son componentes importantes de la envuelta de *Map* y son los encargados de unir el Man-LAM a la membrana plasmática bacteriana. Diferencias en la composición de estos ácidos grasos podrían afectar a la conformación del Man-LAM de la envuelta de cada aislado de *Map* y afectar a su reconocimiento por los receptores de los macrófagos; y podrían explicar las diferencias observadas en cuanto a la capacidad de ambas cepas para sobrevivir en el interior de macrófagos bovinos. De manera similar, se ha

demostrado que el grado de acilación de los PIMs de *M. tuberculosis* afecta a su reconocimiento por los receptores de manosa del macrófago (Torrelles y col., 2006; Guerin y col., 2010). Específicamente, se ha demostrado que la sustitución en las formas tetra-aciladas de los PIMs de un ácido palmítico o un oleico por un ácido tuberculoesteárico puede modificar la confirmación de los PIMS de *M. tuberculosis* y su interacción con los receptores de manosa (Torrelles y col., 2008).

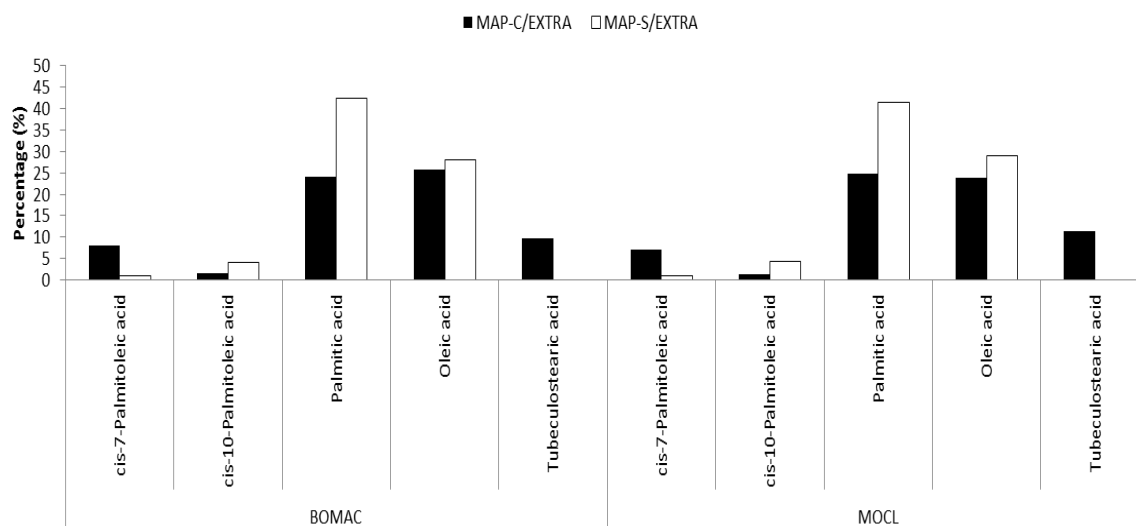


Figura 29. Ácidos grasos con contenido significativamente distinto entre la cepa K-10 de *Map* y el aislado ovino S397 expuestos durante 4 h al ambiente extracelular de células BoMac y MOCL-4.

Por último y con objeto de adaptar los modelos de macrófagos desarrollados en esta tesis a otros objetivos, como por ejemplo para su utilización en la evaluación de actividad fagocítica inducida por prototipos vacunales, se desarrolló un método inmunomagnético de enriquecimiento de monocitos CD14 + de bovino, ovino y caprino utilizando nanopartículas magnéticas funcionalizadas con un anticuerpo monoclonal anti-CD14 humano en combinación con la tecnología MACS (Publicación VI). La proporción de monocitos CD14 + antes y después de la separación magnética se estimó por citometría de flujo. Nuestros resultados mostraron que la tecnología MACS permitió el aislamiento de monocitos CD14 + a partir de PBMCs bovinos, caprinos y ovinos con purzas de hasta el 92, 74 y 30 %, respectivamente. Esto representa un 2.2, 9.3 y un 145.5 de incremento en el ratio de monocitos CD14 +, respectivamente. Tras del enriquecimiento, los monocitos purificados mostraron viabilidades de aproximadamente el 96 %. Además se observó que los monocitos CD14 + aislados de PBMCs bovinos, caprinos y ovinos utilizando la tecnología MACS

presentaron la morfología típica de macrófagos después de 7 días de cultivo y que eran capaces de fagocitar eficientemente y con alta reproducibilidad *Map* y *M. bovis*. Finalmente, hemos demostrado que monocitos CD14 + purificados empleando la tecnología MACS pueden ser utilizadas en experimentos *in vitro* que requieren MDMs con un alto nivel de pureza, como por ejemplo para evaluación de eficacia de prototipos vacunales (Publicación VIII). Así, monocitos purificados de sangre periférica de terneras de entre 3-6 meses de edad sin vacunar y vacunadas por vía intramuscular con una vacuna inactivada frente a *M. bovis* se purificaron con la tecnología MACS, se diferenciaron a macrófagos y se infectaron *ex vivo* con *Map*. Los resultados demostraron diferencias significativas en cuanto a la capacidad de los macrófagos procedentes de animales vacunados y sin vacunar para fagocitar *Map* a los 83 y 163 días post-vacunación y demostraron la utilidad de los modelos *in vitro* de MDMs desarrollados en esta tesis doctoral para evaluar eficacia vacunal.

VIII. CONCLUSIONES

VIII. CONCLUSIONES

1. En los modelos celulares de macrófagos bovinos, los aislados bovinos, de jabalí, de ciervo, de gamo y bisonte fueron capaces de crecer y persistir con mayor eficiencia que los aislados ovinos y caprinos independientemente de su genotipo.
2. La infección de macrófagos bovinos con una cepa ovina estimuló la inducción de una respuesta inmune de tipo pro-inflamatoria, apoptótica y destructiva, mientras que la respuesta inmune inducida por el aislado bovino fue la opuesta, favoreciéndose la supervivencia bacteriana de este aislado de *Map* en el interior de los macrófagos infectados.
3. Debido a que se observó una fuerte correlación entre la supervivencia intracelular de estos aislados y los patrones de producción de IL6, TGF β -1, IL1 α , BCL2-1 y MMP3-1; los niveles de expresión de estos biomarcadores de infección pueden servir para discriminar entre aislados de *Map* con diferente virulencia en el modelo celular BoMac.
4. No se observan variaciones significativas en el comportamiento de los aislados de *Map* incluidas en el estudio en los dos modelos celulares bovinos estudiados (MDMs y BoMac), por lo que se puede concluir que el modelo celular BoMac constituye un excelente modelo *in vitro* en el que realizar estudios de patogénesis de la paratuberculosis.
5. A diferencia de lo que ocurre en los modelos celulares bovinos, todas los aislados de *Map* analizados fueron capaces de persistir en el interior de los macrófagos ovinos con títulos infectivos similares independientemente de su genotipo u hospedador de procedencia. Los macrófagos ovinos indujeron una respuesta anti-inflamatoria, anti-apoptótica y anti-destructiva independientemente del aislado/genotipo utilizado en la infección.
6. En conjunto, nuestros resultados indican que los aislados de *Map* procedentes de la misma especie animal tienen un comportamiento similar en los modelos celulares estudiados, independientemente de su genotipo. Por ello, debe asumirse equivalencia entre genotipos bacterianos a la hora de realizar el saneamiento de las explotaciones ganaderas afectadas por paratuberculosis.

7. Los aislados de *Map* de animales silvestres mostraron una virulencia similar a la de los aislados bovinos en los modelos de infección *in vitro* estudiados, por lo que no se debe desestimar el riesgo que pueden representar para las explotaciones de ganado bovino y ovino. Nuestros resultados recomiendan la necesidad de extremar medidas preventivas que eviten el riesgo de transmisión de *Map* interespecie.
8. Se ha demostrado por primera vez la capacidad de aislados de *Map* (Bovino-C y Ovino-S) de inducir la formación *in vitro* de granulomas ovinos bien definidos, viables tras 10 días de cultivo y similares desde el punto de vista morfológico a los observados en muestras clínicas.
9. La selección positiva de monocitos CD14 + de sangre periférica de bovino, caprino y ovino empleando la tecnología MACS permite la obtención de monocitos con un alto grado de pureza y completamente funcionales en términos de capacidad fagocítica y producción de citoquinas, lo que hace que constituyan una excelente plataforma para la evaluación de la eficacia de prototipos vacunales.

IX. BIBLIOGRAFÍA

IX. BIBLIOGRAFÍA

- Abendaño N, Sevilla I, Prieto JM, Garrido JM, Juste RA, Alonso-Hearn M. 2012. Quantification of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* strains representing distinct genotypes and isolated from domestic and wildlife animal species by use of an automatic liquid culture system. *J Clin Microbiol*, 50(8):2609-2617.
- Abendaño N, Sevilla IA, Prieto JM, Garrido JM, Juste RA, Alonso-Hearn M. 2013a. *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* isolates from sheep and goats show reduced persistence in bovine macrophages than cattle, bison, deer and wild boar strains regardless of genotype. *Vet Microbiol*, 163:325-334.
- Abendaño N, Juste RA, Alonso-Hearn M. 2013b. Anti-inflammatory and antiapoptotic responses to infection: a common denominator of human and bovine macrophages infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Biomed Res Int*, 908348.
- Abendaño N, Tyukalova L, Barandika JF, Balseiro A, Sevilla IA, Garrido JM, Juste RA, Alonso-Hearn M. 2014. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolates induce *in vitro* granuloma formation and show successful survival phenotype, common anti-inflammatory and antiapoptotic responses within ovine macrophages regardless of genotype or host of origin. *Plos One*, 9(8):e104238.
- Adams LB, Fukutomi Y, Krahenbuhl JL. 1993. Regulation of murine macrophage effector functions by lipoarabinomannan from mycobacterial strains with different degrees of virulence. *Infect Immun*, 61:4173-4181.
- Adaska JM, Anderson RJ. 2003. Seroprevalence of Johne's disease infection in dairy cattle in California, USA. *Prev Vet Med*, 60:255-261.
- Aduriz JJ. 1993. Epidemiología, diagnóstico y control de la paratuberculosis ovina en la Comunidad Autónoma del País Vasco. Tesis Doctoral. Universidad de Zaragoza, Aragón, España.
- Aduriz JJ, Juste RA, Cortabarría N. 1995. Lack of mycobactin dependence of mycobacteria isolated on Middlebrook 7H11 from clinical cases of ovine paratuberculosis. *Vet Microbiol*, 45(2-3):211-217.
- Almejan CS. 1958. Johne's disease in yaks. *Monatshefte fuer Veterinaermedizin*, 13:645-649.
- Alexander DC, Turenne CY, Behr MA. 2009. Insertion and deletion events that define the pathogen *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *J Bacteriol*, 191(3):1018-1025.
- Alonso-Hearn M, Patel D, Danelishvili L, Meunier-Goddik L, Bermudez LE. 2008. The *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* MAP3464 gene encodes an oxidoreductase involved in invasion of bovine epithelial cells through the activation of host cell Cdc42. *Infect Immun*, 76(1):170-178.
- Alonso-Hearn M, Molina E, Geijo M, Vázquez P, Sevilla I, Garrido JM, Juste RA. 2009. Isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from muscle tissue of naturally infected cattle. *Foodborne Pathog Dis*, 6:513-518.
- Alonso-Hearn M, Eckstein TM, Sommer S, Bermudez LE. 2010. A *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* LuxR regulates cell envelope and virulence. *Innate Immun*, 16:235-247.

- Alonso-Hearn M, Molina E, Geijo M, Vazquez P, Sevilla IA, Garrido JM, Juste RA. 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(2):618-629.
- Alvarez J, De Juan L, Briones V, Romero B, Aranaz A, Fernández-Garayzábal JF, Mateos A. 2005. *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in fallow deer and wild boar in Spain. *Vet Rec*, 156(7):212-213.
- Alzuherrí HM, Woodall CJ, Clarke CJ. 1996. Increased intestinal TNF-alpha, IL-1 beta and IL6 expression in ovine paratuberculosis. *Vet Immunol Immunopathol*, 49:331-345.
- Amand WB. 1974. Paratuberculosis in a dromedary camel. Ed.: An Proc AAZV, Atlanta, GA. pp.150-153.
- Anderson JL, Meece JK, Koziczkowski JJ. 2007. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in scavenging mammals in Wisconsin. *J Wildlife Dis*, 43:302-305.
- Antognoli MC, Garry FB, Hirst HL, Lombard JE, Dennis MM, Gould DH, Salman MD. 2008. Characterization of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* disseminated infection in dairy cattle and its association with antemortem test results. *Vet Microbiol*, 127(3-4):300-308.
- APHIS. 2007. Johne's Disease on U.S. Dairies, 1991–2007. Veterinary Services Centers for Epidemiology and Animal Health. Accessed Apr. 9, 2015. http://www.aphis.usda.gov/animal_health/nahms/dairy/downloads/dairy07/Dairy07_is_Johnes.
- Appleby EC, Head KD. (1954). A case of suspected Johne's disease in a llama (*L. glama*). *J Comp Pathol*, 4:52-53.
- Arsenault RJ, 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(1):54.
- Atala, Akcay E. 2001. Türkiye genelinde sgr paratuberkulozu prevalansnn ELISA ile arastrlmas. *Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi*, 12:39-48.
- Ayele WY, 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(3-4):209-217.
- Ayele WY, Svastova P, Roubal P, Bartos M, Pavlik I. 2005. *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* cultured from locally and commercially pasteurized cow's milk in the Czech Republic. *Appl Environm Microbiol*, 71:1210-1214.
- Badiola JJ, García de Jalón JA, Cuervo LA. 1980. Paratuberculosis ovina. *An Fac Vet Zaragoza*, XIV-XV:14-15.
- Bakker D. 2010. Paratuberculosis Control Measures in Europe. Paratuberculosis: Organism, Disease, Control. Ed.: Behr MA, Collins DM, CAB International, Reino Unido. pp.306-318.
- Balseiro A, Prieto JM, Espi A, Perez V, Garcia Marin JF. 2003. Presence of focal and multifocal paratuberculosis lesions in mesenteric lymph nodes and the ileocaecal valve of cattle positive to the tuberculin skin test. *Vet J*, 166(2):210-212.
- Balseiro A, García Marín JF, Solano P, Garrido JM, Prieto JM. 2008. Histopathological classification of lesions observed in natural cases of paratuberculosis in free-ranging fallow deer (*Dama dama*). *J Comp Pathol*, 138(4):180-188.

- Bang D, Herlin T, Stegger M, Andersen AB, Torkko P, Tortoli E, Thomsen VO. 2008. *Mycobacterium arosiense* sp. nov., a slowly growing, scotochromogenic species causing osteomyelitis in an immunocompromised child. *Int J Syst Evol Microbiol*, 58(10):2398-2402.
- Bannantine JP, Huntley JF, Miltner E, Stabel JR, Bermudez LE. 2003a. The *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* 35 kDa protein plays a role in invasion of bovine epithelial cells. *Microbiology*, 149:2061-2069.
- Bannantine JP, Wu CW, Hsu C, Zhou S, Schwartz DC, Bayles DO, Paustian ML, Alt DP, Sreevatsan S, Kapur V, Talaat AM. 2012. Genome sequencing of ovine isolates of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* offers insights into host association. *BMC Genomics*, 13:89.
- Bannantine JP, Li L, Mwangi M, Cote R, Raygoza Garay JA, Kapur V. 2014. Complete Genome Sequence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, Isolated from Human Breast Milk. *Genome Announc*, 2(1):e01252-13.
- Barkema HW, Hesselink JW, McKenna SLB. 2010. Global Prevalence and Economics of Infection with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Ruminants. *Paratuberculosis: Organism, Disease, Control*. Ed.: Behr MA, Collins DM, CAB International, Reino Unido. pp.10-21.
- Bastida F, Juste RA. 2011. Paratuberculosis control: a review with a focus on vaccination. *J Immune Based Ther Vaccines*, 9:8.
- Beard PM, Daniels MJ, Henderson D, Pirie A, Rudge K, Buxton D, Rhind S, Greig A, Hutchings MR, McKendrick I, Stevenson K, Sharp JM. 2001a. Paratuberculosis infection of nonruminant wildlife in Scotland. *J Clin Microbiol*, 39(4):1517-1521.
- Beard PM, Rhind SM, Buxton D, Daniels MJ, Henderson D, Pirie A, Rudge K, Greig A, Hutchings MR, Stevenson K, Sharp JM. 2001b. Natural paratuberculosis infection in rabbits in Scotland. *J Comp Pathol*, 124(4):290-299.
- Beard PM, Stevenson K, Pirie A, Rudge K, Buxton D, Rhind SM, Sinclair MC, Wildblood LA, Jones DG, Sharp JM. 2001c. Experimental paratuberculosis in calves following inoculation with a rabbit isolate of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *J Clin Microbiol*, 39:3080-3084.
- Begg DJ, Whittington RJ. 2008. Experimental animal infection models for Johne's disease, an infectious enteropathy caused by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Vet J*, 176:129-145.
- Begg DJ, de Silva K, Carter N, Plain KM, Purdie A, Whittington RJ. 2011. Does a Th1 over Th2 dominance really exist in the early stages of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infections? *Immunobiology*, 216(7):840-846.
- Behr MA, Kapur V. 2008. The evidence for *Mycobacterium paratuberculosis* in Crohn's disease. *Curre Op Gastroenterol*, 24:17-21.
- Ben Salah I, Cayrou C, Raoult D, Drancourt M. 2009. *Mycobacterium marseillense* sp. nov., *Mycobacterium timonense* sp. nov. and *Mycobacterium bouchedurhonense* sp. nov., members of the *Mycobacterium avium* complex. *Int J Syst Evol Microbiol*, 59(11):2803-2808.
- Bendixen PH. 1978. Immunologic reactions caused by infection with *Mycobacterium paratuberculosis*. A review. *Nord Vet Med*, 30(4-5):163-168.

- Bergey DH, Harrison FC, Breed RS, Hammer BW, Huntoon PM. 1923. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, Ed.: 1, The Williams and Wilkins Co., Baltimore, Estados Unidos. p.374.
- Bermudez LE, Petrofsky M, Sommer S, Barletta RG. 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(8):3570-3577.
- Bhide MR, Mucha R, Mikula I Jr, Kisova L, Skrabana R, Novak M, Mikula I Sr. 2009. Novel mutations in TLR genes cause hyporesponsiveness to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection. *BMC Genet*, 10:21.
- Biet F, Boschiroli ML, Thorel MF, Guilloteau LA. 2005. Zoonotic aspects of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium avium-intracellulare* complex (MAC). *Vet Res*, 36(3):411-436.
- Biet F, Sevilla IA, Cochard T, Lefrançois LH, Garrido JM, Heron I, Juste RA, McLuckie J, Thibault VC, Supply P, Collins DM, Behr MA, Stevenson K. 2012. Inter- and intra-subtype genotypic differences that differentiate *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* strains. *BMC Microbiol*, 12:264.
- Birkness KA, Guarner J, Sable SB. 2007. An *in vitro* model of the leukocyte interactions associated with granuloma formation in *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Immun Cell Biology*, 85(2):160-168.
- Blood DC, Radostits OM. 1989. Paratuberculosis (Johne's disease). *Veterinary medicine*. Ed.: 7, Baillière and Tindall, Reino Unido. pp. 722-729.
- Böddinghaus B, Rogall T, Flohr T, Blöcker H, Böttger EC. 1990. Detection and identification of mycobacteria by amplification of rRNA. *J Clin Microbiol*, 28(8):1751-1759.
- Boelaert F, Walravens K, Biront P, Vermeersch JP, Berkvens D, Godfroid J. 2000. Prevalence of paratuberculosis (Johne's disease) in the Belgian cattle population. *Vet Microbiol*, 77:269-281.
- Boever WJ, Peters D. 1974. Paratuberculosis in two herds of exotic sheep. *J Am Vet Med Assoc*, 165:822.
- Borrmann E, Möbius P, Diller R, Köhler H. 2011. Divergent cytokine responses of macrophages to *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* strains of Types II and III in a standardized *in vitro* model. *Vet Microbiol*, 152:101-111.
- Borutaite V, Brown GC. 2003. Nitric oxide induces apoptosis via hydrogen peroxide, but necrosis via energy and thiol depletion. *Free Radic Biol Med*, 35:1457-1468.
- 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 Protect*, 69:1662-1667.
- Bottcher J, Gangl A. 2004. *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* combined serological testing and classification of individual animals and herds. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*, 51:443-448.
- Brennan PJ, Nikaido H. 1995. The envelope of mycobacteria. *Annu Rev Biochem*, 64:29-63.
- Brosch R, Gordon SV, Marmiesse M, Brodin P, Buchrieser C, Eiglmeier K, Garnier T, Gutierrez C, Hewinson G, Kremer K, Parsons LM, Pym AS, Samper S, van Soolingen D, Cole ST. 2002. A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(6):3684-3689.
- Brotherston JG, Gilmour NJL, Samuel JM. 1961. Quantitative studies of *Mycobacterium johnei* in the tissues of sheep. I. Routes of infection and assay of viable *M. johnei*. *J Comp Pathol*, 71:286-299.

- Bruijnesteijn van Copenraet LE, de Haas PE, Lindeboom JA, Kuijper EJ, van Soolingen D. 2008. Lymphadenitis in children is caused by *Mycobacterium avium hominissuis* and not related to 'bird tuberculosis'. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 27(4):293-299.
- Brumell JH, Scidmore MA. 2007. Manipulation of rab GTPase function by intracellular bacterial pathogens. *Microbiol Mol Biol Rev*, 71:636-652.
- Bryant B, Blyde D, Eamens G, Whittington R. 2012. *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* cultured from the feces of a southern black rhinoceros (*dicerus bicornis minor*) with diarrhea and weight loss. *J Zoo Wildlife Med*, 43:391-393.
- Buergelt CD, Hall C, McEntee K, Duncan JR. 1978b. Pathological evaluation of paratuberculosis in naturally infected cattle. *Vet Pathol*, 15:196-206.
- Buergelt CD, Ginn PE. 2000. The histopathologic diagnosis of subclinical Johne's disease in North American bison (*Bison bison*). *Vet Microbiol*, 77(3-4):325-331.
- Bull TJ, McMinn EJ, 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*, 41:2915-2923.
- Burrells C, Clarke CJ, Colston A, Kay JM, Porter J, Little D, Sharp JM. 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(2-4):139-48.
- Cao B, Williams SJ. 2010. Chemical approaches for the study of the mycobacterial glycolipids phosphatidylinositol mannosides, lipomannan and lipoarabinomannan. *Nat Prod Rep*, 27(6):919-947.
- Carta T, Martín-Hernando MP, Boadella M, Fernández de Mera IG, Balseiro A, Sevilla IA. 2012. No evidence that wild red deer (*Cervus elaphus*) on the Iberian Peninsula are a reservoir of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection. *Vet J*, 192:544-546.
- Carta T, Álvarez J, Pérez de la Lastra JM, Gortázar C. 2013. Wildlife and paratuberculosis: a review. *Res Vet Sci*, 94(2):191-197.
- Castellanos E, Álvarez J, Aranaz A, Romero B, de Juan L, Bezos J, Rodríguez S, Stevenson K, Mateos A, Domínguez L. 2007a. Use of single nucleotide polymorphisms in *inh-A* gene to characterize *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* into Types I, II and III. Proceedings of the 8 International Colloquium on Paratuberculosis. International Association for Paratuberculosis, Madison, Wisconsin.
- Castellanos E, Aranaz A, Romero B, de Juan L, Álvarez J, Bezos J, Rodríguez S, Stevenson K, Mateos A, Domínguez L. 2007b. Polymorphisms in *gyrA* and *gyrB* genes among *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* Type I, II, and III isolates. *J Clin Microbiol*, 45:3439-3442.
- Castellanos E, Aranaz A, Gould KA, Linedale R, Stevenson K, Alvarez J, Dominguez L, de Juan L, Hinds J, Bull TJ. 2009a. Discovery of stable and variable differences in the *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* type I, II, and III genomes by pan-genome microarray analysis. *Appl Environ Microbiol*, 75(3):676-686. Erratum in: *Appl Environ Microbiol*, 75(8):2603.

- Castellanos E, Aranaz A, de Juan L, Alvarez J, Rodríguez S, Romero B, Bezos J, Stevenson K, Mateos A, Domínguez L. 2009b. Single nucleotide polymorphisms in the IS900 sequence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* are strain type specific. *J Clin Microbiol*, 47(7):2260-2264.
- Carvalho RV, Kleijn J, Meijer AH, Verbeek FJ. 2012. Modeling innate immune response to early *Mycobacterium* infection. *Comput Math Methods Med*, 2012:790482.
- Cetinkaya B, Egan K, Harbour DA, Morgan KL. 1996. An abattoir-based study of the prevalence of subclinical Johne's disease in adult cattle in south west England. *Epidemiol Infect*, 116:373-379.
- Cetinkaya A, Muz HB, Ertas H, Öngör IY, Sezen, Gülcü HB. 2000. Sut ineklerinde paratuberkuloz prevalansnn polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile saptanmas. *Turk Veterinerlik ve Hayvanclk Dergisi*, 24:371-379.
- Chakravarty SD, Zhu G, Tsai MC. 2008. Tumor necrosis factor blockade in chronic murine tuberculosis enhances granulomatous inflammation and disorganizes granulomas in the lungs. *Infect Immun*, 76(3):916-926.
- Chan J, Xing Y, Magliozzo RS, Bloom BR. 1992. Killing of virulent *Mycobacterium tuberculosis* by reactive nitrogen intermediates produced by activated murine macrophages. *J Exp Med*, 175:1111-1122.
- Chandler RL. 1961. Infection of laboratory animals with *Mycobacterium johnei*. II. Infection in white rats; effect of cortisone treatment. *J Comp Pathol*, 71:131-134.
- Chatterjee D, Lowell K, Rivoire B, McNeil MR, Brennan PJ. 1992. Lipoarabinomannan of *Mycobacterium tuberculosis*. Capping with mannosyl residues in some strains. *J Biol Chem*, 267(9):6234-6239.
- Chen LH, Kathaperumal K, Huang CJ, Mc-Donough SP, Stehman S, Akey B, Huntley JF, Bannantine JP, Chang CF, Chang YF. 2008. Immune responses in mice to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* following vaccination with a novel 74F recombinant polyprotein. *Vaccine*, 26:1253-1262.
- Chiodini RJ, Vankruiningen HJ. 1983. Eastern White-Tailed Deer as a reservoir of ruminant paratuberculosis. *J Am Vet Med Assoc*, 182:168-169.
- Chiodini RJ, Van Kruiningen HJ, Merkal RS. 1984. Ruminant paratuberculosis (Johne's disease): the current status and future prospects. *Cornell Vet*, 74(3):218-262.
- Chiodini RJ, Hermon-Taylor J. 1993. The thermal resistance of *Mycobacterium paratuberculosis* in raw milk under conditions simulating pasteurization. *J Vet Diagn Invest*, 5:629-631.
- Chua CE, Gan BQ, Tang BL. 2011. Involvement of members of the Rab family and related GTPases in autophagosome formation and maturation. *Cell Mol Life Sci*, 68:3349-3458.
- Clark DL, Anderson JL, Koziczkowski JJ, Ellingson JLE. 2006. Detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* genetic components in retail cheese curds purchased in Wisconsin and Minnesota by PCR. *Mol Cell Probes*, 20:197-202.
- Clarke CJ. 1997. The pathology and pathogenesis of paratuberculosis in ruminants and other species. *J Comp Pathol*, 116: 217-261.
- Cleland PC, Lehmann DR, Phillips PH. 2010. A survey to detect the presence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in Kangaroo Island macropods. *Vet Microbiol*, 145:339-346.
- Click RE. 2011a. Successful treatment of asymptomatic or clinically terminal bovine *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection (Johne's disease) with the bacterium *Dietzia* used as a probiotic

- alone or in combination with dexamethasone: Adaption to chronic human diarrheal diseases. *Virulence*, 2(2):131-143.
- Cocito C, Gilot P, Coene M, de Kesel M, Poupart P, Vannuffel P. 1994. Paratuberculosis. *Clin Microbiol Rev*, 7(3):328-345.
- Collins P, Matthews PR, MC Diarmid A, Brown A. 1983. The pathogenicity of *Mycobacterium avium* and related mycobacteria for experimental animals. *J Med Microbiol*. 16:27-35.
- Collins DM, Gabric DM, de Lisle GW. 1990. Identification of two groups of *Mycobacterium paratuberculosis* strains by restriction endonuclease analysis and DNA hybridization. *J Clin Microbiol*, 28:1591-1596.
- Collins DM, De Zoete M, Cavaignac SM. 2002. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* strains from cattle and sheep can be distinguished by a PCR test based on a novel DNA sequence difference. *J Clin Microbiol*, 40:4760-4762.
- Corn JL, Manning EJB, Sreevatsan S, Fischer JR. 2005. Isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from free-ranging birds and mammals on livestock premises. *Appl Environ Microbiol*, 71:6963-6967.
- Corner LA, Pfeiffer DU, Abbott KA. 2004. The respiratory tract as a hypothetical route of infection of cattle with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Aust Vet J*, 82(3):170-173.
- Corti S, Stephan R. 2002. Detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* specific IS900 insertion sequences in bulk-tank milk samples obtained from different regions throughout Switzerland. *BMC Microbiol*, 2:15.
- Cossu A, Sechi LA, Zanetti S, Rosu V. 2012. Gene expression profiling of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in simulated multi-stress conditions and within THP-1 cells reveals a new kind of interactive intramacrophage behaviour. *BMC Microbiol*, 12:87.
- Coussens P, Lamont EA, Kabara E, Sreevatsan S. 2010. Host-Pathogen Interactions and Intracellular Survival of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. Paratuberculosis: Organism, Disease, Control. Ed.: Behr MA, Collins DM, CAB International, Reino Unido. pp.109-225.
- Crandall PG, Ricke SC, O'Bryan CA, Parrish NM. 2012. *In vitro* effects of citrus oils against *Mycobacterium tuberculosis* and non-tuberculous Mycobacteria of clinical importance. *J Environ Sci Health B*, 47(7):736-741.
- Crellin PK, Luo CY, Morita YS. 2013. Metabolism of Plasma Membrane Lipids in Mycobacteria and Corynebacteria. Chapter 6.
- Crick DC, Mahapatra S, Brennan PJ. 2001. Biosynthesis of the arabinogalactan-peptidoglycan complex of *Mycobacterium tuberculosis*. *Glycobiology*, 11(9):107-118.
- Cruciani M. 2004. Meta-analysis of BACTEC MGIT 960 and BACTEC 460 TB, with or without solid media, for detection of mycobacteria. *J Clin Microbiol*, 42:2321-2325.
- Daniels MJ, Hutchings MR, Greig A. 2003. The risk of disease transmission to livestock posed by contamination of farm stored feed by wildlife excreta. *Epidemiol Infect*, 130(3):561-568.
- Dargatz DA, Byrum BA, Hennager SG, Barber LK, Koprak CA, Wagner BA, Wells SJ. 2001. Prevalence of antibodies against *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* among beef cow-calf herds. *J Am Vet Med Assoc*, 219:497-501.

- David J, Barkema HW, Guan le L, De Buck J. 2014. Gene-expression profiling of calves 6 and 9 months after inoculation with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Vet Res*, 45:96.
- Davis JM and Ramakrishnan L. 2009. The role of the granuloma in expansion and dissemination of early tuberculosis infection. *Cell*, 136(1):37-49.
- de Juan L, Mateos A, Domínguez L, Sharp JM, Stevenson K. 2005. Genetic diversity of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* isolates from goats detected by pulsed-field gel electrophoresis. *Vet Microbiol*, 106(3-4):249-257.
- de Juan L, Álvarez J, Aranaz A, Rodríguez A, Romero B, Bezos J, Mateos A, Domínguez L. 2006. Molecular epidemiology of Types I/III strains of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* isolated from goats and cattle. *Vet Microbiol*, 115(1-3):102-110.
- de Lisle GW, Yates GF, Collins DM. 1993. Paratuberculosis in farmed deer: case reports and DNA characterization of isolates of *Mycobacterium paratuberculosis*. *J Vet Diagn Invest*, 5(4):567-571.
- de Lisle G, Yates GF, Cavaignac SM. 2003. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in ferrets – a potential reservoir of Johne’s disease. In: Juste RA, Geijo MV, Garrido JM, eds. Proceedings of the seventh international colloquium on paratuberculosis. International Association for Paratuberculosis Inc., Madison, Wisconsin.
- Delgado L. 2010. Estudio de la patogenia de la paratuberculosis: relación entre la respuesta inmune y el desarrollo de lesiones en ovino jóvenes y adultos. Tesis doctoral. Universidad de León. Castilla y León, España.
- Delgado L, García Marín JF, Pérez V. 2012. Patogenia de la paratuberculosis. Formas inmunopatológicas y consecuencias clínicas y lesionales. PR: pequeños rumiantes, 13(2) (Ejemplar dedicado a: Paratuberculosis en pequeños rumiantes):24-43.
- Denis M, Gregg EO, Ghandirian E. 1990. Cytokine modulation of *Mycobacterium tuberculosis* growth in human macrophages. *Int J Immunopharmacol*, 12:721-727.
- Dieguez FJ, Arnaiz I, Sanjuan ML, Vilar MJ, Lopez M, Yus E. 2007. Prevalence of serum antibodies to *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* in cattle in Galicia (northwest Spain). *Prev Vet Med*, 82:321-326.
- Dimareli-Malli Z, Mazaraki K, Stevenson K, Tsakos P, Zdragas A, Giantzi V, Petridou E, Heron I, Vafeas G. 2013. Culture phenotypes and molecular characterization of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolates from small ruminants. *Res Vet Sci*, 95:49-53.
- Djonne B, Jensen MR, Grant IR, Holstad G. 2003. Detection by immunomagnetic PCR of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk from dairy goats in Norway. *Vet Microbiol*, 92:135-143.
- Djonne B. 2010 Paratuberculosis in Goats. Paratuberculosis: Organism, Disease, Control. Ed.: Behr MA, Collins DM, CAB International, Reino Unido. pp.169-178.
- Dohmann K, Strommenger B, Stevenson K, de Juan L, Stratmann J, Kapur V, Bull TJ, Gerlach GF. 2003. Characterization of genetic differences between *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* type I and type II isolates. *J Clin Microbiol*, 41(11):5215-5223.

- Donat K, Eulenberger K, Kampfer P. 2005. Blutserologische Untersuchungen zur Verbreitung von *Mycobacterium avium* spp. *paratuberculosis* in sächsischen Rinderbeständen. *Tieraerztliche Umschau*, 60:497-501.
- Dow CT, Ellingson JL. 2010. Detection of *Mycobacterium avium* ss. *Paratuberculosis* in Blau Syndrome Tissues. *Autoimmune Dis*, 2010:127692.
- Dreier S, Khol JL, Stein B, Fuchs K, Gutler S, Baumgartner W. 2006. Serological, bacteriological and molecular biological survey of paratuberculosis (Johne's disease) in Austrian cattle. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*, 53:477-481.
- Dukes TW, Glover GJ, Brooks BW, Duncan JR, Swendrowski M. 1992. Paratuberculosis in saiga antelope (*Saiga tatarica*) and experimental transmission to domestic sheep. *J Wildl Dis*, 28:161-170.
- Dunkin GW. 1934. Johne's disease. Its economic significance and early detection. *Vet Rec*, 14(52):1551-1559.
- Eisenberg SW, Nielsen M, Santema W, Houwers DJ, Heederik D, Koets AP. 2010. Detection of spatial and temporal spread of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in the environment of a cattle farm through bio-aerosols. *Vet Microbiol*, 143:284-292.
- Elguezabal N, Bastida F, Sevilla IA, González N, Molina E, Garrido JM, Juste RA. 2011. Estimation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* growth parameters: strain characterization and comparison of methods. *Appl Environ Microbiol*, 77:8615-8624.
- Ellingson JLE, Anderson JL, Koziczkowski JJ, Radcliff RP, Sloan SJ, Allen SE, Sullivan NM. 2005. Detection of viable *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in retail pasteurized whole milk by two culture methods and PCR. *J Food Protect*, 68:966-972.
- Elliott GN, Hough RL, Avery LM, Maltin CA, Campbell CD. 2014. Environmental risk factors in the incidence of Johne's disease. *Crit Rev Microbiol*, 1-20
- Eltholth MM, Marsh VR, Van Winden S, Guitian FJ. 2009. Contamination of food products with *Mycobacterium avium paratuberculosis*: a systematic review. *J Appl Microbiol*, 107(4):1061-1071.
- El-Zaatari FA, Naser SA, Markesich DC, Kalter DC, Engstand L, Graham DY. 1996. Identification of *Mycobacterium avium* complex in sarcoidosis. *J Clin Microbiol*, 34:2240-2245.
- Emery DL, Whittington RJ. 2004. An evaluation of mycophage therapy, chemotherapy and vaccination for control of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection. *Vet Microbiol*, 104(3-4):143-155.
- Eppleston J, Begg DJ, Dhand N, Watt B, Whittington RJ. 2014. Environmental survival of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in different climatic zones of Eastern Australia. *Appl Environ Microbiol*, 80:2337-2342.
- Everman JL, Eckstein TM, Roussey J, Coussens P, Bannantine JP, Bermudez LE. 2015. Characterization of the inflammatory phenotype of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* using a novel cell culture passage model. *Microbiology*, 161(7):1420-1434.
- Facciuolo A, Kelton DF, Mutharia LM. 2013. Novel secreted antigens of *Mycobacterium paratuberculosis* as serodiagnostic biomarkers for Johne's disease in cattle. *Clin Vaccine Immunol*, 20(12):1783-1791.
- Falkinham JO. 2010. Epidemiology and ecology of nontuberculous mycobacteria. *Rev Port Pneumol*, 16:27-30.
- Fecteau ME, Whitlock RH. 2010. Paratuberculosis in Cattle. Paratuberculosis: Organism, Disease, Control. Ed.: Behr MA, Collins DM, CAB International, Reino Unido. pp.144-156.

- Fecteau ME, Whitlock RH. 2011. Treatment and chemoprophylaxis for paratuberculosis. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 27(3):547-557
- Fecteau ME, Whitlock RH, Fyock TL, McAdams SC, Boston RC, Sweeney RW. 2011. Antimicrobial activity of gallium nitrate against *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in neonatal calves. *J Vet Intern Med*, 25(5):1152-1155.
- Fernández M, Benavides J, Sevilla IA, Fuertes M, Castaño P, Delgado L, García Marín JF, Garrido JM, Ferreras MC, Pérez V. 2014. Experimental infection of lambs with C and S-type strains of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*: immunological and pathological findings. *Vet Res*, 45:5.
- Fernandez-Silva JA, Correa-Valencia NM, Ramirez NF. 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.
- Ferrari G, Langen H, Naito M, Pieters J. 1993. A coat protein on phagosomes involved in the intracellular survival of mycobacteria. *Cell*, 97:435-447.
- Ferroglio E, Nebbia P, Robino P. 2000. *Mycobacterium paratuberculosis* infection in two free-ranging Alpine Ibex. *Rev Sci Tech OIE*, 19:859-62.
- Fischer OA, Matlova L, Dvorska L, Svastova P, Pavlik I. 2003b. Nymphs of the Oriental cockroach (*Blatta orientalis*) as passive vectors of causal agents of avian tuberculosis and paratuberculosis. *Med Vet Entomol*, 17(2):145-150.
- Florou M, Leontides L, Kostoulas P, Billinis C, Sofia M, Kyriazakis I, Lykotrafitis F. 2008. Isolation of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* from non-ruminant wildlife living in the sheds and on the pastures of Greek sheep and goats. *Epidemiol Infect*, 136 (5):644-652.
- Francis J. 1943. Infection of laboratory animals with *Mycobacterium johnei*. *J Comp Path*, 53:140-150.
- Fratti RA, Backer JM, Gruenberg J, Corvera S, Deretic V. 2001. Role of phosphatidylinositol 3-kinase and Rab5 effectors in phagosomal biogenesis and mycobacterial phagosome maturation arrest. *J Cell Biol*, 54:631-644.
- Frau J, Cossu D, Coghe G, Loreface L, Fenu G, Porcu G, Sardu C, Murru MR, Tranquilli S, Marrosu MG, Sechi LA, Cocco E. 2015. Role of interferon-beta in *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* antibody response in Sardinian MS patients. *J Neurol Sci*, 349(1-2):249-250.
- Fritsch I, Luyven G, Köhler H, Lutz W, Möbius P. 2012. Suspicion of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* transmission between cattle and wild-living red deer (*Cervus elaphus*) by multitarget genotyping. *Appl Environ Microbiol*, 78(4):1132-1139.
- Fuentes O, Cebrian J. 1988 El conejo de monte ¿reservorio de la paratuberculosis ovina y caprina?. *ITEA*, 8:32.
- Gameel AA, Ali AS, Razig SA, Brown J, Alhendi SA, El-Sanousi SM. 1994. A clinical-pathological study on spontaneous paratuberculosis in camels (*Camelus dromedarius*) in Saudi Arabia. *Pakistan Vet J*, 14:15-19.
- Gao A, Mutharia L, Chen S, Rahn K, Odumeru J. 2002. Effect of pasteurization on survival of *Mycobacterium paratuberculosis* in milk. *J Dairy Sci*, 85:3198-3205.
- Garcia AB, Shalloo L. 2015. Invited review: The economic impact and control of paratuberculosis in cattle. *J Dairy Sci*, 98(8):5019-5039.

- García Marín JF, Pérez V, García de Jalón JA, De las Heras M, Barberá M, Fernández de Luco D y Badiola JJ. 1994. Diagnóstico de casos clínicos de paratuberculosis ovina y caprina. *Med Vet*, 11(9):491-502.
- García-Pariente C, Pérez V, Geijo MV, Moreno O, Muñoz M, Fuertes M, Puentes E, Doce J, Ferreras MC, García Marín JF. 2006. The efficacy of a killed vaccine against paratuberculosis (SILIRUM®) in cattle. A field study. Proceedings of the 8 International Colloquium on Paratuberculosis. International Association for Paratuberculosis, Madison, Wisconsin.
- Garrido JM. 2001. Puesta a punto de las técnicas de PCR en heces y de ELISA para el diagnóstico de la paratuberculosis. Estudio de prevalencia en ganado bovino. Tesis Doctoral. Universidad de Zaragoza, Aragón, España.
- Garrido JM, Plazaola JM, Sevilla I, Geijo MV, Elguezabal N, Aduriz G, Doce J, Puentes E, Juste RA. 2006. Control of paratuberculosis in dairy farms in the Basque Country. Proceedings of the 8 International Colloquium on Paratuberculosis. International Association for Paratuberculosis, Madison, Wisconsin.
- Garrido JM, Vázquez P, Aduriz G, Juste R. 2012. Control de la paratuberculosis caprina. *Tierras-Caprino 2* (Ejemplar dedicado a: Sanidad en el Ganado Caprino), pp.29-31.
- Garrido JM, Vazquez P, Molina E, Plazaola JM, Sevilla IA, Geijo MV, Alonso-Hearn M, Juste RA. 2013. Paratuberculosis vaccination causes only limited cross-reactivity in the skin test for diagnosis of bovine tuberculosis. *PLoS One*, 8(11):e80985.
- Gasteiner J, Wenzl H, Fuchs K, Jark U, Baumgartner W. 1999. Serological cross-sectional study of paratuberculosis in cattle in Austria. *Zentralbl Veterinarmed B*, 46:457-466.
- Ghosh P, Hsu C, Alyamani EJ, Shehata MM, Al-Dubaib MA, Al-Naeem A, Hashad M, Mahmoud OM, Alharbi KBJ, Al-Busadah K, Al-Swailem AM, Talaat AM. 2012. Genome-wide analysis of the emerging infection with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in the Arabian camels (*Camelus dromedarius*). *PLoS One*, 7:e31947.
- Giese SB, Ahrens P. 2000. Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk from clinically affected cows by PCR and culture. *Vet Microbiol*, 77:291-297.
- Gilleron M, Lindner B, Puzo G. 2006. MS/MS approach for characterization of the fatty acid distribution on mycobacterial phosphatidyl-myo-inositol mannosides. *Anal Chem*, 78(24):8543-8548.
- Gilmour NJL, Angus KW, Mitchell B. 1978. Intestinal infection and host response to oral administration of *Mycobacterium johneii* in sheep. *Vet Microbiol*, 2(3):223-235.
- 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 Tierartzl Wochenschr*, 117(3-4):1369.
- Gollnick NS, Mitchell RM, Baumgart M, Janagama HK, Sreevatsan S, Schukken YH. 2007. Survival of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in bovine monocyte-derived macrophages is not affected by host infection status but depends on the infecting bacterial genotype. *Vet Immunol Immunopathol*, 120(3-4):93-105.
- González J, Geijo MV, García-Pariente C, Verna A, Corpa JM, Reyes LE, Ferreras MC, Juste RA, García Marín JF, Pérez V. 2005. Histopathological classification of lesions associated with natural paratuberculosis infection in cattle. *J Comp Pathol*, 133(2-3):184-196.

- Good M, Clegg T, Sheridan H, Yearsely D, O'Brien T, Egan J, Mullaney P. 2009. Prevalence and distribution of paratuberculosis (Johne's disease) in cattle herds in Ireland. *Ir Vet J*, 62:597-606.
- Goren MB, Brennan PJ. 1979. Structural studies on the type-specific antigens and lipids of the *Mycobacterium avium*. *Mycobacterium intracellulare*. *Mycobacterium scrofulaceum* serocomplex. *Mycobacterium intracellulare* serotype 9. *J Biol Chem*, 254(10):4205-4211.
- Grant IR, O'Riordan LM, Ball HJ, Rowe MT. 2001. Incidence of *Mycobacterium paratuberculosis* in raw sheep and goats' milk in England, Wales and Northern Ireland. *Vet Microbiol*, 79:123-131.
- Grant IR, Ball HJ, Rowe MT. 2002. Incidence of *Mycobacterium paratuberculosis* in bulk raw and commercially pasteurized cows' milk from approved dairy processing establishments in the United Kingdom. *Appl Environ Microbiol*, 68:2428-2435.
- Grant IR. 2010. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Animal-derived Foods and the Environment Paratuberculosis: organism, disease, control. Ed.: Behr MA, Collins DM, CAB International, Reino Unido. pp. 29-39
- Grant IR, Foddai A, Kunkel B, Collins M. 2014. Detection of viable *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (*Map*) in infant formula. Proceedings of the 12 International Colloquium on Paratuberculosis. International Association for Paratuberculosis, Parma, Italia.
- Greig A, Stevenson K, Henderson D, Perez V, Hughes V, Pavlik I, Hines ME, McKendrick I, Sharp JM. 1997. Epidemiological study of paratuberculosis in wild rabbits in Scotland. *J Clin Microbiol*, 37(6):1746-1751.
- Greenstein RJ, Su L, Shahidi A, Brown ST. 2007b. On the action of 5-amino-salicylic acid and sulfapyridine on *M. avium* including subspecies *paratuberculosis*. *PLoS ONE*, 2:e516.
- Greenstein RJ, Su L, Whitlock RH, Brown ST. 2009. Monensin causes dose dependent inhibition of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in radiometric culture. *Gut Pathog*, 1(1):4.
- Griffin JFT. 1988. The etiology of tuberculosis and mycobacterial diseases in farmed deer. *Ir Vet J*, 42:23-26.
- Griffiths TA, Rioux K., De Buck J. 2008. Sequence polymorphisms in a surface PPE protein distinguish types I, II, and III of *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis*. *J Clin Microbiol*, 46:1207-1212.
- Grützkau A, Radbruch A. 2010. Small but mighty: how the MACS-technology based on nanosized superparamagnetic particles has helped to analyze the immune system within the last 20 years. *Cytometry*, 77(7):643-647.
- Guerin ME, Korduláková J, Alzari PM, Brennan PJ, Jackson M. 2010. Molecular basis of phosphatidyl-myoinositol mannoside biosynthesis and regulation in mycobacteria. *J Biol Chem*, 285(44):33577-33583.
- Gumber S, Taylor DL, Marsh IB, Whittington RJ. 2009a. Growth pattern and partial proteome of *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* during the stress response to hypoxia and nutrient starvation. *Vet Microbiol*, 133:344-357.
- Gumber S, Whittington RJ. 2009b. Analysis of the growth pattern, survival and proteome of *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* following exposure to heat. *Vet Microbiol*, 136:82-90.
- Haghkhal M, Ansari-Lari M, Novin-Baheran AM, Bahramy A. 2008. Herd-level prevalence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* by bulk-tank milk PCR in Fars province (southern Iran) dairy herds. *Prev Vet Med*, 86:8-13.

- Hamilton HL, Cooley AJ, Adams JL, Czuprynski CJ. 1991. *Mycobacterium paratuberculosis* monoassociated nude mice as a paratuberculosis model. *Vet Pathol*, 28:146-155.
- Hammer P, Walte HG, Matzen S, Hensel J, Kiesner C. 2013. Inactivation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* during cooking of hamburger patties. *J Food Prot*, 76(7):1194-1201.
- Harriff MJ, Wu M, Kent ML, Bermudez LE. 2008. Species of environmental mycobacteria differ in their abilities to grow in human, mouse, and carp macrophages and with regard to the presence of mycobacterial virulence genes, as observed by DNA microarray hybridization. *Appl Environ Microbiol*, 74:275-285.
- Hasanova L, Pavlik I. 2006. Economic impact of paratuberculosis in dairy cattle herds: a review. *Vet Med*, 51(5):193-211.
- Hett EC, Rubin EJ. 2008. Bacterial growth and cell division: a mycobacterial perspective. *Microbiol Mol Biol Rev*, 72(1):126-156.
- Hickey SM, Morris CA, Dobbie JL, Lake DE. 2003. Heritability of Johne's disease and survival data from Romney and Merino sheep. *Proc New Zeal Soc An*, 63:179-182.
- Hines ME, Stabel JR, Sweeney RW, Griffin F, Talaat AM, Bakker D, Benedictus G, Davis WC, de Lisle GW, Gardner IA, Juste RA, Kapur V, Koets A, McNair J, Pruitt G, Whitlock RH. 2007. Experimental challenge models for Johne's disease: a review and proposed international guidelines. *Vet Microbiol*, 122(3-4):197-222.
- Hines ME, Turnquist SE, Ilha MR, Rajeev S, Jones AL, Whittington L, Bannantine JP, Barletta RG, Gröhn YT, Katani R, Talaat AM, 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.
- Horsburgh CR Jr, Havlik JA, Ellis DA, Kennedy E, Fann SA, Dubois RE, Thompson SE. 1991. Survival of patients with acquired immune deficiency syndrome and disseminated *Mycobacterium avium* complex infection with and without antimycobacterial chemotherapy. *Am Rev Respir Dis*, 144(3 Pt 1):557-559.
- Hruska K, Bartos M, Kralik P, Pavlik I. 2005. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in powdered infant milk: paratuberculosis in cattle – the public health problem to be solved. *Vet Med*, 50:8327-8335.
- Huntley JF, Stabel JR, Paustian ML, Reinhardt TA, Bannantine JP. 2005b. Expression library immunization confers protection against *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection. *Infect Immun*, 73:6877-6884.
- Huygen K, Bull T, Collins DM. 2010. Development of New Paratuberculosis Vaccines. Paratuberculosis: Organism, Disease, Control. Ed.: Behr MA, Collins DM, CAB International, Reino Unido. pp.353-368.
- Ikiz S, Bagcigil AF, Ak S, Ozgur NY, Lgaz A. 2005. Paratuberculosis in cattle in Turkey detected by PCR. *Medycyna Weterynaryjna*, 61:881-883.
- Ikonomopoulos J, Pavlik I, Bartos M, Svastova P, Ayele WY, Roubal P, Lukas J, Cook N, Gazouli M. 2005. Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in retail cheeses from Greece and the Czech Republic. *Appl Environ Microbiol*, 71:8934-8936.

- Inderlied CB, Kemper CA, Bermudez LEM. 1993. The *Mycobacterium avium* complex. *Clin Microbiol Rev*, 6(3):266-310.
- Ito S, Anasari P, Sakatsume M, Dickensheets H, Vazquez N, Donnelly RP, Larner AC, Finbloom DS. 1999. Interleukin-10 inhibits expression of both interferon alpha- and interferon gamma- induced genes by suppressing tyrosine phosphorylation of STAT1. *Blood*, 93:1456-1463.
- Ivanov BG, Skalinskii EI. 1957. Pathological changes in paratuberculosis of camels. *Trudy Vsesoyuznogo Instituta Eksperimental'noi Veterinarii* 20:186-206.
- Janagama HK, Jeong K, Kapur V, Coussens P, Sreevatsan S. 2006. Cytokine responses of bovine macrophages to diverse clinical *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* strains. *BMC Microbiol*, 6:10.
- Janagama HK, Lamont EA, George S, Bannantine JP, Xu WW, Tu ZJ, Wells SJ, Scheifers J, Sreevatsan S. 2010a. Primary transcriptomes of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* reveal proprietary pathways in tissue and macrophages. *BMC Genomics*, 11:561.
- Janagama HK, Senthilkumar TMA, Bannantine JP, Kugadas A, Jagtap P, Higgins L, Wuihuhn BA, Sreevatsan S. 2010b. Iron-sparing response of *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* is strain dependent. *BMC Microbiol*, 10:268.
- Jaravata CV, Smith WL, Rensen GJ, Ruzante J, Cullor JS. 2007. Survey of ground beef for the detection of *Mycobacterium avium paratuberculosis*. *Foodb Patho Dis*, 4:103-106.
- Jayarao BM, Pillai SR, Wolfgang DR, Griswold DR, Rossiter CA, Tewari D, Burns CM, Hutchinson LJ. 2004. Evaluation of IS900-PCR assay for detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection in cattle using quarter milk and bulk tank milk samples. *Foodborne Pathol Dis*, 1:17-26.
- Jessup DA, Abbas B, Behymer D. 1981. Paratuberculosis in tule elk in California. *J Am Vet Med Assoc*, 179:1252-1254.
- Johne HA, Frothingham L. 1895. Ein eigenthümlicher Fall von Tuberculose beim Rind. *Deut Zeits Tiermed Vergl Pathol*, 21:438-454.
- Jorgensen JB. 1969. Paratuberculosis in pigs. Experimental infection by oral administration of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Acta Vet Scand*, 10:275-287.
- Jorgensen JB. 1977. Survival of *Mycobacterium paratuberculosis* in slurry. *Nord Vet Med*, 29(6):267-270.
- Józefowski S, Sobota A, Kwiatkowska K. 2008. How *Mycobacterium tuberculosis* subverts host immune responses. *Bioessays*, 30(10):943-954.
- Juste RA, Cuervo LA, Gelabert JL, Sáez de Ocariz C, Marco JC, Camon J. 1983. Paratuberculosis bovina en Vizcaya. *Hyg Pec*, 5(1):57-66.
- Juste RA, García-Marín JF, Peris B, Sáez De Ocariz CS, Badiola JJ. 1994. Experimental infection of vaccinated and non-vaccinated lambs with *Mycobacterium paratuberculosis*. *J Comp Pathol*, 110:185-194.
- Juste RA, Elguezabal N, Garrido JM, Pavon A, Geijo MV, Sevilla I, Cabriada JL, Tejada A, García-Campos F, Casado R, Ochotorena I, Izeta A, Greenstein RJ. 2008. On the prevalence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* DNA in blood of healthy individuals and patients with inflammatory bowel disease. *Plos One*, 3(7):e2537.
- Juste RA, Elguezabal N, Garrido JM, Pavón A, Geijo MV, Sevilla I, Cabriada JL, Tejada A, García-Campos F, Casado R, Ochotorena I, Izeta A. 2009a. Association between *Mycobacterium avium* subspecies

- paratuberculosis* DNA in blood and cellular and humoral immune response in Inflammatory Bowel Disease patients and controls. *Int J Infect Dis*, 13(2):247-254.
- Juste RA, Alonso-Hearn M, Molina E, Geijo M, Vazquez P, Sevilla IA, Garrido JM. 2009b. 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*, 2:233.
- Kabara E, Kloss CC, Wilson M, Tempelman RJ, Sreevatsan S, Janagama H, Coussens PM. 2010. A large-scale study of differential gene expression in monocyte-derived macrophages infected with several strains of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Brief Funct Genomics*, 9(3):220-237.
- Kabara E, Coussens PM. 2012. Infection of Primary Bovine Macrophages with *Mycobacterium avium* Subspecies *paratuberculosis* Suppresses Host Cell Apoptosis. *Front Microbiol*, 3:215.
- Kalis CH, Collins MT, Barkema HW, Hesselink JW. 2004. Certification of herds as free of *Mycobacterium paratuberculosis* infection: actual pooled faecal results versus certification model predictions. *Prev Vet Med*, 65(3-4):189-204.
- Kapoor N, Pawar S, Sirakova TD, Deb C, Warren WL. 2013. Human granuloma *in vitro* model for TB dormancy and resuscitation. *PLOS One*, 8:1e35657.
- Karakousis PC, Bishai WR, Dorman SE. 2004. *Mycobacterium tuberculosis* cell envelope lipids and the host immune response. *Cell Microbiol*, 6:105-116.
- Kasnitz N, Köhler H, Weigoldt M, Gerlach GF, Möbius P. 2013. Stability of genotyping target sequences of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* upon cultivation on different media, *in vitro*- and *in vivo* passage, and natural infection. *Vet Microbiol*, 167(3-4):573-583.
- Kathaperumal K, Park SU, McDonough S, Stehman S, Akey B, Huntley J, Wong S, Chang CF, Chang YF. 2008. Vaccination with recombinant *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* proteins induces differential immune responses and protects calves against infection by oral challenge. *Vaccine*, 26:1652-1663.
- Katic I. 1961. Paratuberculosis (Johne's disease) with special reference to captive wild animals. *Nord Vet Med*, 13:205-214.
- Kawaji S, Zhong L, Whittington RJ. 2010. Partial proteome of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* under oxidative and nitrosative stress. *Vet Microbiol*, 145:252-264
- Keller SM, Stephan R, Kuenzler R, Meylan M, Wittenbrink MM. 2014. Comparison of fecal culture and F57 real-time polymerase chain reaction for the detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in Swiss cattle herds with a history of paratuberculosis. *Acta Vet Scand*, 56:68.
- Kennedy DJ, Benedictus G. 2001. Control of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in agricultural species. *Rev Sci Tech*, 20(1):151-179.
- Kennedy D, Citer L. 2010. Paratuberculosis Control Measures in Australia. Paratuberculosis: Organism, Disease, Control. Ed.: Behr MA, Collins DM, CAB International, Reino Unido. pp.330-343.
- Khalifeh MS, Stabel JR. 2004a. Upregulation of transforming growth factor-beta and interleukin-10 in cows with clinical Johne's disease. *Vet Immunol Immunopathol*, 99: 39-46. Khan FA, Chaudhry ZI, Ali MI, 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, Lawhon SD, Drake KL, Nunes JE, Figueiredo JF, Rossetti CA, Gull T, Everts RE, Lewin HA, Galindo CL, Garner HR, Adams LG. 2012. Systems biology analysis of gene expression during in vivo *Mycobacterium avium paratuberculosis* enteric colonization reveals role for immune tolerance. *PLoS One*, 7(8):e42127.
- Khol JL, Kralik P, Slana I, Beran V, Aurich C, Baumgartner W, Pavlik I. 2010. Consecutive excretion of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in semen of a breeding bull compared to the distribution in feces, tissue and blood by IS900 and F57 quantitative real-time PCR and culture examinations. *J Vet Med Sci*, 72(10):1283-1288.
- Khol JL, Baumgartner W. 2012. Examples and suggestions for the control of paratuberculosis in European cattle. *Jpn J Vet Res*, 60 Suppl:S1-7.
- Klawonn W, Cussler K, Dräger KG, Gyra H, Köhler H, Zimmer K, Hess RG. 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. Tierärztl Wochenschr*, 109:510-516.
- Koets AP, Rutten VP, Bakker D, van der Hage MH, van Eden W. 2000. Lewis rats are not susceptible to oral infection with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Vet Microbiol*, 77(3-4):487-495.
- 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*, 24:2550-2559.
- Koets A, Santema W, Mertens H, Oostenrijk D, Kestra M, Overdijk M, Labouriau R, Franken P, Frijters A, Nielen M, Rutten V. 2010. Susceptibility to paratuberculosis infection in cattle is associated with single nucleotide polymorphisms in Toll-like receptor 2 which modulate immune responses against *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Prev Vet Med*, 93(4):305-315.
- Koets AP, Gröhn YT. 2015. Within- and between-host mathematical modeling of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (MAP) infections as a tool to study the dynamics of host-pathogen interactions in bovine paratuberculosis. *Vet Res*, 46:60.
- Köhler H, Gyra H, Zimmer K, Dräger KG, Burkert B, Lemser B, Hausleithner D, Cubler K, Klawonn W, Hess RG. 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(3):185-195.
- Kolattukudy PE, Fernandes ND, Azad AK, Fitzmaurice AM, Sirakova TD. 1997. Biochemistry and molecular genetics of cell-wall lipid biosynthesis in mycobacteria. *Mol Microbiol*, 24(2):263-270.
- Kopecky KE, Booth GD, Merkai RS, Larsen AB. 1971. Hematologic changes associated with intravenous johnin testing in cattle. *Am J Vet Res*, 32(9):1343-1347.
- Kopečna 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: 691-695.
- Koul A, Herget T, Klebl B, Ullrich A. 2004. Interplay between mycobacteria and host signaling pathways. *Nat Rev Microbiol*, 2:189-202.

- Krasilnikov NA. 1941. Guide to bacteria and actinomycetes. Ed.: Akad Nauk SSSR, pp.1-830.
- Krishnan, MY, Manning EJB, Collins MT.2009. Comparison of three methods for susceptibility testing of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* to 11 antimicrobial drugs. *J Antimicrob Chemoth*, 64,310-316.
- Kudahl AB, Nielsen SS, Østergaard S. 2008. Economy, efficiency, and feasibility of a riskbased control program against paratuberculosis. *J Dairy Sci*, 91:4599-4609.
- Kudahl AB, Nielsen SS, Ostergaard S. 2011. Strategies for time of culling in control of paratuberculosis in dairy herds. *J Dairy Sci*, 94(8):3824-3834.
- Kuehnel MP, Goethe R, Habermann A, Mueller E, Rohde M, Griffiths G, Valentin-Weigand. 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.
- Kumar S, Singh SV, Singh AV, Singh PK, Sohal JS. 2008. Inter-species transmission of 'Bison type' genotype of MAP between *Boselaphus tragocamelus*(blue bulls) and small ruminant population in India *Ind J Anim Sci*, 78:1186-1191.
- Lamont EA, Bannantine JP, Armien A, Ariyakumar DS, Sreevatsan S. 2012. Identification and characterization of a spore-like morphotype in chronically starved *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* cultures. *PLoS One*, 7:e30648.
- Lamont EA, Xu WW, Sreevatsan S. 2013. Host-*Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* interactome reveals a novel iron assimilation mechanism linked to nitric oxide stress during early infection. *BMC Genomics*, 14:694.
- Larsen AB, Moon HW, Merkal RS. 1971. Susceptibility of swine to *Mycobacterium paratuberculosis*. *Am J Vet Res*, 32:589-595.
- Larsen AB, Moon HW. 1972. Experimental *Mycobacterium paratuberculosis* infection in chickens. *Am J Vet Res*, 33:1231-1235.
- Larsen AB, Moon HW, Merkal RS. 1972. Susceptibility of horses to *Mycobacterium paratuberculosis*. *Am J Vet Res*, 33:2185-2189.
- Larsen AB, Merkal RS, Cutlip RC. 1975. Age of cattle as related to resistance to infection with *Mycobacterium paratuberculosis*. *Am J Vet Res*, 36(3):255-257.
- Larsen AB, Miller JM, Kopecky KE. 1976. Susceptibility of the Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*) to *Mycobacterium paratuberculosis*. *Am J Vet Res*, 37(9):1113-1114.
- Larsen AB, Miller JM. 1978. Effect of dexamethasone on *Mycobacterium paratuberculosis* infection in hamsters. *Am J Vet Res*, 39(11):1866-1867.
- Lehmann KB, Neumann R. 1896. Atlas und Grundriss der Bakteriologie und Lehrbuch der speziellen bakteriologischen Diagnostik. Ed.: 1, JF Lehmann. Munich, Alemania.
- Lévy-Frébault VV, Portaels F. 1992. Proposed minimal standards for the genus *Mycobacterium* and for description of new slowly growing *Mycobacterium* species. *Int J Syst Bacteriol*, 42(2):315-323.

- Li Q, Whalen CC, Albert JM, Larkin R, Zukowski L, Donald Cave M, Silver RF, 2002. Differences in rate and variability of intracellular growth of a panel of *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates within a human monocyte model. *Infect Immun*, 70:6489-6493.
- Li L, Bannantine JP, Zhang Q, Amonsin A, May BJ, Alt D, Banerji N, Kanjilal S, Kapur V. 2005. The complete genome sequence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(35):12344-12349.
- Lillini E, Bitoni G, Gamberale F, Cersini A. 2005. Prevalence of bovine paratuberculosis in the Latium region (Italy). Proceedings of the 8 International Colloquium on Paratuberculosis. International Association for Paratuberculosis, Madison, Wisconsin.
- Lillini E, De Grossi L, Bitonti G, Cersini A. 2007. MAP in retail pasteurised cows' milk: first report in Italy. Proceedings of the 9 International Colloquium on Paratuberculosis. International Association for Paratuberculosis, Madison, Wisconsin.
- Lloyd JB, Whittington RJ, Fitzgibbon C, Dobson R. 2001. Presence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in suspensions of ovine trichostrongylid larvae produced in faecal cultures artificially contaminated with the bacterium. *Vet Rec*, 148(9):261-263.
- Lombard JE, Gardner IA, Jafarzadeh SR, Fossler CP, Harris B, Capsel RT, Wagner BA, Johnson WO. 2013. Herd-level prevalence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in United States dairy herds in 2007. *Prev Vet Med*, 108(2-3):234-238.
- Losinger WC. 2006. Economic impacts of reduced milk production associated with epidemiological risk factors for Johne's disease on dairy operations in the USA. *J Dairy Res*, 73(1):33-43.
- Lovell R, Levi ML, Francis J. 1944. Studies on the survival of Johne's bacilli. *J Comp Pathol*, 34:120-129.
- Lozano De Arcenegui E, Marcos Sainero FJ, Selas Turrillo F, Palomar Muñoz V. 2012. Estudio sobre la interferencia a largo plazo en el diagnóstico de tuberculosis de la vacunación con gudair frente a la paratuberculosis en cabras. XXXVII Congreso Nacional de la Sociedad Española de Ovinotecnia y Caprinotecnia (SEOC).
- Machackova M, Svastova P, Lamka J, Parmova I, Liska V, Smolik J, Fischer OA, Pavlik I. 2004. Paratuberculosis in farmed and free-living wild ruminants in the Czech Republic (1999-2001). *Vet Microbiol*, 101(4):225-234.
- Mackintosh CG, de Lisle GW, Collins DM, Griffin JF. 2004. Mycobacterial diseases of deer. *N Z Vet J*, 52(4):163-174.
- Mackintosh CG, Labes RE, Clark RG, de Lisle GW, Griffin JF. 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*, 55:23-29.
- Mackintosh CG, Griffin JF. 2010. Paratuberculosis in Deer, Camelids and Other Ruminants. Paratuberculosis: Organism, Disease, Control. Ed.: Behr MA, Collins DM, CAB International, Reino Unido. pp.179-187.
- Maeda H, Kuwahara H, Ichimura Y, Ohtsuki M, Kurakata S, Shiraishi A. 1995. TGF-beta enhances macrophage ability to produce IL-10 in normal and tumor-bearing mice. *J Immunol*, 155:4926-4932.

- Maher M, Rowe M, Egan J, Hill C, Murphy P. 2004. MAP did not survive pasteurisation and was not found in meat. Final Update on FIRM Project FS005 Detection and Survival of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP). www.relayresearch.ie.
- Mainar-Jaime RC, Vázquez-Boland JA. 1998. Factors associated with seroprevalence to *Mycobacterium paratuberculosis* in small ruminants farms in the Madrid region (Spain). *Prev Vet Med*, 34:317-327.
- Maio E, Carta T, Balseiro A, Sevilla IA, Romano A, Ortiz JA, Vieira-Pinto M, Garrido JM, de la Lastra JM, Gortázar C. 2011 Paratuberculosis in European wild rabbits from the Iberian Peninsula. *Res Vet Sci*, 91(2):212-218.
- Manning EJ, Collins MT. 2010. Epidemiology of paratuberculosis. Paratuberculosis: organism, disease, control. Ed.: Behr MA, Collins DM, CAB International, Reino Unido. pp.22-28.
- Manning EJ. 2011. Paratuberculosis in captive and free-ranging wildlife. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 27(3):621-630.
- Marco I, Ruiz M, Juste R, Garrido JM, Lavin S. 2002. Paratuberculosis in free-ranging fallow deer in Spain. *J Wildl Dis*, 38:629-632.
- Marino S, Sud D and Plessner H. 2007. Differences in reactivation of tuberculosis induced from anti-TNF treatments are based on bioavailability in granulomatous tissue. *PLoS Computational Biology*, 3(10):1909-1924.
- Marsh I, Whittington R, Cousins D. 1999. 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.
- Marsh IB, Whittington RJ. 2005. Deletion of an *mmpL* gene and multiple associated genes from the genome of the S strain of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* identified by representational difference analysis and *in silico* analysis. *Mol Cell Probes*, 19:371-384.
- Marsh IB, Bannantine JP, Paustian ML, Tizard ML, Kapur V, Whittington RJ. 2006. Genomic comparison of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in sheep and cattle strains by microarray hybridization. *J Bacteriol*, 188(6):2290-2293.
- Matos AC, Figueira L, Martins MH, Loureiro F, Pinto ML, Matos M, Coelho AC. 2014. Survey of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in road-killed wild carnivores in Portugal. *J Zoo Wildl Med*, 45(4):775-781.
- McClure HM, Chiodini RJ, Anderson DC. 1987. *Mycobacterium paratuberculosis* infection in a colony of stump-tail macaques (*Macaca arctoides*). *J Infect Dis*, 155:1011-1019.
- McNeil M, Daffe M, Brennan PJ. 1990. Evidence for the nature of the link between the arabinogalactan and peptidoglycan of mycobacterial cell walls. *J Biol Chem*, 265(30):18200-18206.
- Meadus WJ, Gill CO, Duff P, Badoni M, Saucier L. 2008. Prevalence on beef carcasses of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* DNA. *International J Food Microbiol*, 124:291-294.
- Mee JF, Richardson E. 2008. Epidemiology and economic impact of Johne's disease in Irish dairy herds. Final Report. Teagasc Moorepark Dairy Production Research Centre, Ireland. <http://www.teagasc.ie/research/reports/dairyproduction/5405/eopr-5405.pdf>.

- Mekalanos JJ. 1992. Environmental signals controlling expression of virulence determinants in bacteria. *J Bacteriol*, 174(1):1-7.
- 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.
- Menozi FD, Rouse JH, Alavi M, Laude-Sharp M, Muller J, Bischoff R, Brennan MJ, Loch C. 1996. Identification of a heparin-binding hemagglutinin present in mycobacteria. *J Exp Med*, 184:993-1001.
- Merkal RS, Curran BJ. 1974. Growth and metabolic characteristics of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Appl Microbiol*, 28:2769.
- Merkal RS, Larsen AB y Booth GD. 1975. Analysis of the effects of inapparent bovine paratuberculosis. *Am J Vet Res*, 36(6):8378.
- Merkal RS, Miller JM, Hintz AM, Bryner JH. 1982. Intrauterine inoculation of *Mycobacterium paratuberculosis* into guinea pigs and cattle. *Am J Vet Res*, 43(4):676-678.
- Mijs W, de Haas P, Rossau R, Van der Laan T, Rigouts L, Portaels F, van Soolingen D. 2002. Molecular evidence to support a proposal to reserve the designation *Mycobacterium avium* subsp. *avium* for bird-type isolates and *M. avium* subsp. *hominissuis* for the human/porcine type of *M. avium*. *Int J Syst Evol Microbiol*, 52(5):1505-1518.
- Millar D, Ford J, Sanderson J, Withey S, Tizard M, Doran T, Hermon-Taylor J. 1996. IS900 PCR to detect *Mycobacterium paratuberculosis* in retail supplies of whole pasteurized cows' milk in England and Wales. *Appl Environ Microbiol*, 62:3446-3452.
- Miller H, Zhang J, Kuolee R, Patel GB, Chen W. 2007. Intestinal M cells: the fallible sentinels?. *World J Gastroenterol*, 13(10):1477-1486.
- Minas E, Koutsouko-Hartona M, Papisawas, Tsantas H. 1994. Epidimiologiki erevna sta poimnia provaton kai aigon stis Voreies Sporades gia parafymatiosi kai proiousa pnevmonia. *Deltion tis EllinikisKtiniatrikis Etaireias*, 45:25-30.
- Miranda C, Matos M, Pires I. 2011. *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* infection in slaughtered domestic pigs for consumption detected by molecular methods. *Food Res Int*, 44:3276-3277.
- Mokresh AH, Butler DG. 1990. Granulomatous enteritis following oral inoculation of newborn rabbits with *Mycobacterium paratuberculosis* of bovine origin. *Can J Vet Res*, 54:313-319.
- 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(6):863-868.
- Moloney BJ, Whittington RJ. 2008. Cross species transmission of ovine Johne's disease from sheep to cattle: an estimate of prevalence in exposed susceptible cattle. *Aust Vet J*, 86(4):117-123.
- Momotani E, Whipple DL, Thiermann AB, Chevillie NF. 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(2):131-137.
- Mork T, Heier BT, Alvseike KR, Lund A. 2003. Overvakings- og kontrollprogrammer for landdyr, fiskog skjell i Norge medvekt pa BSE-, salmonella- og paratuberkulose programmene. *Norsk Veterinaertidsskrift*, 115:707-717.

- Motiwala AS, Janagama HK, Paustian ML. 2006. Comparative transcriptional analysis of human macrophages exposed to animal and human isolates of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* with diverse genotypes. *Infect Immun*, 74(11):6046-6056.
- Mucha R, Bhide MR, Chakurkar EB, Novak M, Mikula I Sr. 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(4):381-388.
- Muehlherr JE, Zweifel C, Corti S, Blanco JE, Stephan R. 2003. Microbiological quality of raw goat's and ewe's bulk-tank milk in Switzerland. *J Dairy Sci*, 86:3849-3856.
- Münster P, Völkel I, Wemheuer W, Schwarz D, Döring S, Czerny CP. 2013. A longitudinal study to characterize the distribution patterns of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* in semen, blood and faeces of a naturally infected bull by IS 900 semi-nested and quantitative real-time PCR. *Transbound Emerg Dis*, 60(2):175-187.
- Muñoz M, García Marín JF, García-Pariente C, Reyes LE, Verna A, Moreno O, Fuertes M, Doce J, Puentes E, Garrido JM, Pérez V. 2006. Efficacy of a killed vaccine (SILIRUM®) in calves challenged with MAP. Proceedings of the 8 International Colloquium on Paratuberculosis. International Association for Paratuberculosis, Madison, Wisconsin.
- Muñoz M, Delgado L, Verna A, Benavides J, García-Pariente C, Fuertes M, Ferreras Mc, Carcía-Marín JF, Pérez V. 2008. 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*, 32:239-252.
- Mura M, Bull TJ, Evans H, Sidi-Boumedine K, McMinn L, Rhodes G, Pickup R y Hermon-Taylor J. 2006. Replication and longterm persistence of bovine and human strains of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* within *Acanthamoeba polyphaga*. *Appl Environ Microbiol*, 72(1):854-859.
- Murcia MI, Tortoli E, Menendez MC, Palenque E, Garcia MJ. 2006. *Mycobacterium colombiense* sp. nov., a novel member of the *Mycobacterium avium* complex and description of MAC-X as a new ITS genetic variant. *Int J Syst Evol Microbiol*, 56(9):2049-2054.
- Murphy JT, Sommer S, Kabara EA, Verman N, Kuelbs MA, Saama P, Halgren R, Coussens PM. 2006. Gene expression profiling of monocyte-derived macrophages following infection with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and *Mycobacterium avium* subsp. *avium*. *Physiol Genomics*, 28:67-75.
- Muskens J, Barkema HW, Russchen E, Van Maanen K, Schukken YH, Bakker D. 2000. Prevalence and regional distribution of paratuberculosis in dairy herds in the Netherlands. *Vet Microbiol*, 77:253-261.
- 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(3):269-278.
- Muskens J, Elbers AR, van Weering HJ, Noordhuizen JP. 2003. Herd management practices associated with paratuberculosis seroprevalence in Dutch dairy herds. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*, 50(8):372-377.
- Mutwiri GK, Kosecka U, Benjamin M, Rosendal S, Perdue M, Butler DG. 2001. *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* triggers intestinal pathophysiologic changes in beige/scid mice. *Comp Med*, 51:538-544.

- Naser SA, 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.
- Naser SA, Thanigachalam S, Dow CT, Collins MT. 2013. Exploring the role of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in the pathogenesis of type 1 diabetes mellitus: a pilot study. *Gut Pathog*, 5:14.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2003. Susceptibility Testing of Mycobacteria, Nocardiae, and Other Aerobic Actinomycetes; Approved Standard. *M24-A*. NCCLS, Wayne, Pennsylvania.
- Nielsen SS, Toft N. 2008. Ante mortem diagnosis of paratuberculosis: a review of accuracies of ELISA, interferon-gamma assay and faecal culture techniques. *Vet Microbiol*, 129(3-4):217-235.
- Nielsen SS, Toft N. 2009. A review of prevalences of paratuberculosis in farmed animals in Europe. *Pre Vet Med*, 88:1-14.
- Nightingale SD, Byrd LT, Southern PM, Jockusch JD, Cal SX, Wynne BA. 1992. *Incidence of Mycobacterium avium-intracellulare* complex bacteremia in human immunodeficiency virus-positive patients. *J Infect Dis*, 165(6):1082-1085.
- Nigou J, Gilleron M, Puzo G. 2003. Lipoarabinomannans: from structure to biosynthesis. *Biochimie*, 85(1-2):153-166.
- Notario A, Moro J, Fuentes O. 2010. Comparative bacteriological study of two wild boar populations in Sierra Morena (Jaén, Spain). *Not Sci Biol*, 2:18-23.
- Nugent G, Whitford EJ, Hunnam JC. 2011. *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* infection in wildlife on three deer farms with a history of Johne's disease. *New Zeal Vet J*, 59:293-298.
- O'Brien R, Mackintosh CG, Bakker D, Kopečna M, Pavlik I, Griffin JF. 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(6):3530-3537.
- Ocepek M, Posedi J, Pislak M. 1999. Prevalence of bovine paratuberculosis in Slovenia in 1997 and 1998. *Zbornik Veterinarske Fakultete Univerza Ljubljana*, 36:111-119.
- Ocepek M, Krt B, Pate, M, Pogacnik M. 2002. Seroprevalence of paratuberculosis in Slovenia between 1999 and 2001. *Slov Vet Res*, 39:179-185.
- O'Doherty A, O'Grady D, Smith T, Egan J. 2002. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in pasteurized and unpasteurized milk in the Republic of Ireland. *Irish J Agricultural Food Research*, 4:117-121.
- OIE. 2014. Terrestrial Manual. Chapter 2.1.11.
- Olsen JE, Jorgensen JB, Nansen P. 1985. On the reduction of *Mycobacterium paratuberculosis* in bovine slurry subjected to batch mesophilic or thermophilic anaerobic-digestion. *Agricultural Wastes*, 13(4):273-280.
- O'Reilly CE, O'Connor L, Anderson W, Harvey P, Grant IR, 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 Environm Microbiol*, 70:5138-5144.

- Orme IM, Roberts AD, Griffin JP, Abrams JS. 1993. Cytokine secretion by CD4 T lymphocytes acquired in response to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J. Immunol.*, 151:518-525.
- Ott SL, Wells SJ, Wagner BA. 1999. Herd-level economic losses associated with Johne's disease on US dairy operations. *Prev Vet Med*, 40(3-4):179-192.
- Paolicchi FA, Cirone K, Morsella C, Gioffré A, Cataldi A, Romano M. 2005. Isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (Map) from commercial pasteurized milk. Proceedings of the 8 International Colloquium on Paratuberculosis. International Association for Paratuberculosis, Madison, Wisconsin.
- Park SU, Kathaperumal K, McDonough S, Akey B, Huntley J, Bannantine JP, Chang YF. 2008. Immunization with a DNA vaccine cocktail induces a Th1 response and protects mice against *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* challenge. *Vaccine*, 26:4329-4337.
- Patel D, Danelishvili L, Yamazaki Y, Alonso M, Paustian ML, Bannantine JP, Meunier-Goddik L, Bermudez LE. 2006. The ability of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* to enter bovine epithelial cells is influenced by preexposure to a hyperosmolar environment and intracellular passage in bovine mammary epithelial cells. *Infect Immun*, 74:2849-2855.
- Paustian ML, Amonsin A, Kapur V, Bannantine JP. 2004. Characterization of novel coding sequences specific to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: implications for diagnosis of Johne's disease. *J Clin Microbiol*, 42:2675-2681.
- Paustian ML, Zhu X, Sreevatsan S, Robbe-Austerman S, Kapur V, Bannantine JP. 2008. Comparative genomic analysis of *Mycobacterium avium* subspecies obtained from multiple host species. *BMC Genomics*, 9:135.
- Pavlik I, Horvathova A, Dvorska L, Bartl J, Svastova P, du Maine R, Rychlik I. 1999. Standardisation of restriction fragment length polymorphism analysis for *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *J Microbiol Methods*, 38(1-2):155-167.
- Pavlik I, Bartl J, Dvorska L, Svastova P, du MR, Machackova M, Yayo AW, Horvathova A. 2000a. Epidemiology of paratuberculosis in wild ruminants studied by restriction fragment length polymorphism in the Czech Republic during the period 1995-1998. *Vet Microbiol*, 77(3-4):231-251.
- Pavlik I, Horvathova A, Bartosova L. 2010. IS900 RFLP types of *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* in faeces and environmental samples on four dairy cattle farms. *Vet Med-Czech*, 55:1-9.
- Pearce LE, Shepherd, JM, Wiles PG, Luo D, de Lisle GW. 2005. Quantifying the risk of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* surviving pasteurisation. Proceedings of the 8 International Colloquium on Paratuberculosis. International Association for Paratuberculosis, Madison, Wisconsin.
- 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*, 170:1751-1756.
- Pence M, Baldwin C, Black CC. 2003. The seroprevalence of Johne's disease in Georgia beef and dairy cull cattle. *J Vet Diagn Invest*, 15(5):475-477.
- Petit E. 2001. Enquete serologique sur la paratuberculose bovine menee dans l'Yonne lors de la campagne 98-99. *Epidemiol Sante Anim*, 40:23-29.
- Pérez V, García Marín JF, Badiola JJ. 1996. Description and classification of different types of lesion associated with natural paratuberculosis infection in sheep. *J Comp Pathol*, 114(2):107-122.

- Pérez V, Corpa JM y García Marín JF. 2000. El cuadro clínico y lesional de la paratuberculosis bovina. En: Juste editor. Paratuberculosis. *Bovis*, Aula Veterinaria, Madrid, España. vol. 93, pp. 39-47.
- Pérez V, Moreno O, Muñoz M, Garcia-Pariente C, Benavides J, Delgado L, Gonzalez J, Luis M, Fuertes M, Garcia-Marin JF, Ferreras MC. 2009. Diagnosis of paratuberculosis in slaughtered calves in the Northwest of Castilla y Leon (Spain) by pathological methods. Proceedings of the 10 International Colloquium on Paratuberculosis. Minneapolis.
- Pérez V, Vázquez P, Fernández M, Ferreras MC. 2012. Control de la paratuberculosis. *PR: pequeños rumiantes*, 13(2) (Ejemplar dedicado a: Paratuberculosis en pequeños rumiantes):52-59.
- Pillai SR, Jayarao BM. 2002. Application of IS900PCR for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* directly from raw milk. *J Dairy Science*, 85:1052-1057.
- Pfyffer GE., Brown Elliott BA, Wallace RJ. 2007. Mycobacterium: general characteristics, laboratory detection, and staining procedures. Manual of Clinical Microbiology. Ed.: American Society of Microbiology. Washington DC. pp.543-572.
- Pickup RW, Rhodes G, Arnott S, Sidi-Boumedine K, Bull TJ, Weightman A, Hurley M, Hermon-Taylor J. 2005. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in the catchment area and water of the River Taff in South Wales, United Kingdom, and its potential relationship to clustering of Crohn's disease cases in the city of Cardiff. *Appl Environ Microbiol*, 71:2130-2139.
- Pinedo PJ, Buergelt CD, Donovan GA, Melendez P, Morel L, Wu R, Langae TY, Rae DO. 2009. Association between CARD15/NOD2 gene polymorphisms and paratuberculosis infection in cattle. *Vet Microbiol*, 134(3-4):346-52.
- Ponnusamy D, Periasamy S, Tripathi BN, Pal A. 2013. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* invades through M cells and enterocytes across ileal and jejunal mucosa of lambs. *Res Vet Sci*, 94(2):306-312.
- Pott J, Basler T, Duerr CU, Rohde M, Goethe R, Hornell MW. 2009. Internalization-dependent recognition of *Mycobacterium avium* ssp. *Paratuberculosis* by intestinal epithelial cells. *Cell Microbiol*, 11:1802-1815.
- Prieto JM, Balseiro A, Casais R, Abendaño N, Fitzgerald LE, Garrido JM, Juste RA, Alonso-Hearn M. 2014. Sensitive and specific enzyme-linked immunosorbent assay for detecting serum antibodies against *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in fallow deer. *Clin Vaccine Immunol*, 21(8):1077-1085.
- Prinzis S, Chatterjee D, Brennan PJ. 1993. Structure and antigenicity of lipoarabinomannan from *Mycobacterium bovis* BCG. *J Gen Microbiol*, 139(11):2649-2658.
- Pruvot M, Kutz S, Barkema HW, De Buck J, Orsel K. 2014. Occurrence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* and *Neospora caninum* in Alberta cow-calf operations. *Prev Vet Med*, 117:95-102.
- Puissegur MP, Botanch C, Duteyrat JL, Delsol G, Caratero C. 2004. An *in vitro* dual model of mycobacterial granulomas to investigate the molecular interactions between mycobacteria and human host cells. *Cell Microbiol*, 6:423-433.
- Purdie AC, Plain KM, Begg DJ, de Silva K, Whittington RJ. 2011. Candidate gene and genome-wide association studies of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in cattle and sheep: a review. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 34(3):197-208.

- Quist CF, Nettles VF, Manning EJB. 2002. Paratuberculosis in key deer (*Odocoileus virginianus clavium*). *J Wildlife Dis*, 38:729-737.
- Rademaker JL, Vissers MM, Giffel MC. 2007. Effective heat inactivation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in raw milk contaminated with naturally infected feces. *Appl Environ Microbiol*, 73:4185-4190.
- Raizman EA, Wells SJ, Jordan PA, DelGiudice GD, Bey RR. 2005. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from freeranging deer and rabbits surrounding Minnesota dairy herds. *Can J Vet Res*, 69(1):32-38.
- Ramakrishnan L. 2012. Revisiting the role of the granuloma in tuberculosis. *Nature Reviews Immunology*, 12(5):352-366.
- Rankin JD. 1958. The present knowledge of Johne's disease. *Vet Rec*, 70:693-697.
- Reddacliff LA, Beh K, McGregor H, Whittington RJ. 2005. A preliminary study of possible genetic influences on the susceptibility of sheep to Johne's disease. *Aust Vet J*, 83(7):435-441.
- Reviriego FJ, Moreno MA, 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-García R, Pérez de la Lastra JM, Vicente J, Ruiz-Fons F, Garrido JM, Gortázar C. 2008. Large-scale ELISA testing of Spanish red deer for paratuberculosis. *Vet Immunol Immunopathol*, 124(1-2):75-81.
- Ridge SE, Harkin JT, Badman RT. 1995. Johnes-disease in alpacas (lama-pacos) in Australia. *Aust Vet J*, 72:150-153.
- Ridley DS. 1983. The histopathological spectrum of the mycobacterioses. *The Biology of Mycobacteria. Immunological and environmental aspects*. Ed.: Ratledge C, Stanford JL, London:Academic Press, Reino Unido. Vol 2. pp.129-171.
- Riemann H, Zaman MR, Ruppner R, Aalund O, Jorgensen JB, Worsaae H, Behymer D. 1979. Paratuberculosis in cattle and free-living exotic deer. *J Am Vet Med Assoc*, 174(8):841-843.
- Rindi L, Garzelli C. 2014. Genetic diversity and phylogeny of *Mycobacterium avium*. *Infect Genet Evol*, 21:375-383.
- Ringdal G. 1963. Johne's disease in pigs. *Nord. Vet. Med.*, 15: 217-238.
- Roach DR, Bean AG, Demangel C, France MP, Briscoe H and Britton WJ. 2002. TNF regulates chemokine induction essential for cell recruitment, granuloma formation, and clearance of mycobacterial infection. *Journal Immunol*, 168(9):4620-4627.
- Robbi C, Rossi I, Nardelli S, Rossi E, Toson M, Marangon S. 2002. Prevalenza di Paratubercolosi (Johne's disease) nella popolazione di bovine da latte della Regione Veneto. *Atti della Societa Italiana di Buiatria*, 34:283-288.
- Roupie V, Romano M, Zhang L, Korf H, Lin MY, Franken KL, Ottenhoff TH, Klein MR, Huygen K. 2007. Immunogenicity of eight dormancy (DosR) regulon encoded proteins of *Mycobacterium tuberculosis* in DNA vaccinated and tuberculosis-infected mice. *Infect Immun*, 75:941-949.
- Rowan NJ, MacGregor SJ, Anderson JG, Cameron D, Farish O. 2001. Inactivation of *Mycobacterium paratuberculosis* by pulsed electric fields. *Appl Environ Microbiol*, 67(6):2833-2836.

- Rowe MT, Johnston M, Hitchings E, Johnston J, Donaghy J. 2007. Lethality of the milk spray-drying process for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* using a model system. Proceedings of the 9 International Colloquium on Paratuberculosis. International Association for Paratuberculosis, Madison, Wisconsin.
- Rue-Albrecht K, Magee DA, Killick KE, Nalpas NC, Gordon SV, MacHugh DE. 2014. Comparative functional genomics and the bovine macrophage response to strains of the *Mycobacterium* genus. *Front Immunol*, 5(536):1-14.
- Ruiz-Larrañaga O, Garrido JM, Iriando M, Manzano C, Molina E, Koets AP, Rutten VP, Juste RA, Estonba A. 2010. Genetic association between bovine NOD2 polymorphisms and infection by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Holstein-Friesian cattle. *Anim Genet*, 41(6):652-655.
- Runyon EH. 1959. Anonymous mycobacteria in pulmonary disease. *Med Clin North Am*, 43:273-290.
- Salgado M, Herthnek D, Bolske G. 2009. First isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from Wild Guanacos (*Lama guanicoe*) on Tierra Del Fuego island. *J Wildlife Dis*, 45:295-301.
- Salgado M, Alfaro M, Salazar F, Badilla X, Troncoso E, Zambrano A, González M, Mitchell RM, Collins MT. 2015. Application of cattle slurry containing *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) to grassland soil and its effect on the relationship between MAP and free-living amoeba. *Vet Microbiol*, 175(1):26-34.
- Sandor M, Weinstock JV, Wynn TA. 2003. Granulomas in schistosome and mycobacterial infections: a model of local immune responses. *Trends in Immunology*, 24(1):44-52.
- Saseendranath MR, Sulficar S, Nimisha KN, Nair AS, Kumanan K. 2011. Paratuberculosis in a cow: a case study. *J Vet Anim Sci*, 42:71-72.
- Saunders BM, Cooper AM. 2000. Restraining mycobacteria: role of granulomas in mycobacterial infections. *Immunol Cell Biology*, 78(4):334-341.
- Saxegaard F, Baess I. 1988. Relationship between *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium paratuberculosis* and "wood pigeon mycobacteria". *APMIS*, 96:37-42.
- Saxegaard F. 1990. Experimental infection of calves with an apparently specific goat-pathogenic strain of *Mycobacterium paratuberculosis*. *J Comp Pathology*, 102:149-156.
- Scandurra GM, De Lisle GW, Cavaignac SM, Young M, Kawakami RP, Collins GM. 2010. Assessment of live candidate vaccines for paratuberculosis in animal models and macrophages. *Infect Immun*, 78:1383-1389.
- Sechi L, Mara AL, Cappai P, Frothingham R, Ortu S, Leoni A, Ahmed N, Zanetti S. 2006. Immunization with DNA vaccines encoding different mycobacterial antigens elicits a Th1 type immune response in lambs and protects against *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection. *Vaccine*, 24:229-235.
- Secott TE, Lin TL, Wu CC. 2001. Fibronectin attachment protein homologue mediates fibronectin binding by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Infect Immun*, 69(4):2075-2082.
- Secott TE, Lin TL, Wu CC. 2002. Fibronectin attachment protein is necessary for efficient attachment and invasion of epithelial cells by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Infect Immun*, 70:2670-2675.

- Secott TE, Lin TL, Wu CC. 2004. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* fibronectin attachment protein facilitates M-cell targeting and invasion through a fibronectin bridge with host integrins. *Infect Immun*, 72(7):3724-3732.
- Semret M, Turenne CY, de Haas P, Collins DM, Behr MA. 2006. Differentiating host-associated variants of *Mycobacterium avium* by PCR for detection of large sequence polymorphisms. *J Clin Microbiol*, 44(3):881-887.
- Sevilla I, Aduriz G, Garrido JM, Geijo MV, Juste RA. 2002. A preliminary survey on the prevalence of paratuberculosis in dairy cattle in Spain by bulk milk PCR. Proceedings of the 7 International Colloquium on Paratuberculosis. International Association for Paratuberculosis. Bilbao, España.
- Sevilla I, Singh SV, Garrido JM, Aduriz G, Rodríguez S, Geijo MV, Whittington RJ, Saunders V, Whitlock RH, Juste RA. 2005. Molecular typing of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* strains from different hosts and regions. *Rev Sci Tech*, 24(3):1061-1066.
- Sevilla I, Garrido JM, Geijo M, Juste RA. 2007. Pulsed-field electrophoresis profile homogeneity of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolates from cattle and heterogeneity of those from sheep and goats. *BMC Microbiology*, 7:18.
- Sevilla I, Li L, Amonsin A, Garrido JM, Geijo MV, Kapur V, Juste RA. 2008. Comparative analysis of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolates from cattle, sheep and goats by short sequence repeat and pulsed-field gel electrophoresis typing. *BMC Microbiol*, 8:204.
- Sherman DM. 1985. Current concepts in Johne's disease. *Vet. Med*, 80:77-84.
- Shin SJ, Wu CW, Steinberg H, Talaat AM. 2006. Identification of novel virulence determinants in *Mycobacterium paratuberculosis* by screening a library of insertional mutants. *Infect Immun*, 74:3825-3833.
- Shin SJ, Han JH, Manning EJ, Collins MT. 2007. Rapid and reliable method for quantification of *Mycobacterium paratuberculosis* by use of the BACTEC MGIT 960 system. *J Clin Microbiol*, 45(6):1941-1948.
- Shin SJ, Collins MT. 2008. Thiopurine drugs azathioprine and 6-mercaptopurine inhibit *Mycobacterium paratuberculosis* growth *in vitro*. *Antimicrob Agents Chemoth*, 52:418-426.
- Shinnick TM, Good RC. 1994. Mycobacterial taxonomy. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 13(11):884-901.
- Shook GE, Chaffer M, Wu XL, Ezra E. 2012. Genetic parameters for paratuberculosis infection and effect of infection on production traits in Israeli Holsteins. *Anim Genet*, 43 Suppl 1:56-64.
- Sigurðardóttir OG, Press CM, Evensen O. 2001. Uptake of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* through the distal small intestinal mucosa in goats: an ultrastructural study. *Vet Pathol*, 38(2):184-189.
- Singh SV, Vihan VS. 2004. Detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in goat milk. *Small Ruminant Research*, 54:3231-3235.
- Singh SV, Sohal JS, Singh PK, Singh AV. 2009. Genotype profiles of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* isolates recovered from animals, commercial milk, and human beings in North India. *Int J Infect Dis*, 13(5):e221-7.

- Singh SV, Kumar N, Singh SN, Bhattacharya T, Sohal JS, Singh PK, Singh AV, Singh B, Chaubey KK, Gupta S, Sharma N, Kumar S, Raghava GP. 2013. Genome Sequence of the "Indian Bison Type" Biotype of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* Strain S5. *Genome Announc*, e00005-13.
- Sisto M, Cucci L, D'Amore M, Dow TC, Mitolo V, Lisi S. 2010. Proposing a relationship between *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection and Hashimoto's thyroiditis. *Scand J Infect Dis*, 42(10):787-790.
- Sivakumar P, Tripathi BN, Singh N. 2005. Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in intestinal and lymph node tissues of water buffaloes (*Bubalus bubalis*) by PCR and bacterial culture. *Vet Microbiol*, 108(3-4):263-270.
- Slana I, Kralik P, Kralova A, Pavlik I. 2008. On-farm spread of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in raw milk studied by IS900 and F57 competitive real time quantitative PCR and culture examination. *Inter J Food Microbiol*, 128:250-257.
- Smole SC, McAleese F, Ngampasutadol J, Von Reyn CF, Arbeit RD. 2002. Clinical and epidemiological correlates of genotypes within the *Mycobacterium avium* complex defined by restriction and sequence analysis of hsp65. *J Clin Microbiol*, 40(9):3374-3380.
- Snow GA. 1970. Mycobactins: iron chelating growth factors from mycobacteria. *Bacteriol Rev*, 34(2):99-125.
- Soltys MA, Andress CE, Fletch AL. 1967. Johne's disease in a moose (*Alces alces*). *Bull Wild Dis Assoc*, 3:183-184.
- Sommer S, Pudrith CB, Colvin CJ, Coussens PM. 2009. *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* suppresses expression of IL-12p40 and iNOS genes induced by signalling through CD40 in bovine monocyte-derived macrophages. *Vet Immunol Immunopathol*, 128(1-3):44-52.
- Sorensen O, Rawluk S, Wu J, Manninen K, Ollis G. 2003. *Mycobacterium paratuberculosis* in dairy herds in Alberta. *Can Vet J*, 44:221-226.
- Sorge US, Kurnick S, Sreevatsan S. 2013a. Detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in the saliva of dairy cows: a pilot study. *Vet Microbiol*, 164(3-4):383-386.
- Souza CD, Evanson OA, Weiss DJ. 2008. Role of cell membrane receptors in the suppression of monocyte anti-microbial activity against *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Microb Pathog*, 44:215-223.
- St Jean G. 1996. Treatment of clinical paratuberculosis in cattle. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 12(2):417-430.
- Stabel JR. 2000. Transitions in immune responses to *Mycobacterium paratuberculosis*. *Vet Microbiol*, 77:465-473.
- Stabel JR, Waldren CA, Garry F. 2001. Gamma-radiation effectively destroys *Mycobacterium paratuberculosis* in milk. *J Dairy Sci*, 84(1):27.
- Stabel JR, Wells SJ, Wagner BA. 2002. Relationships between fecal culture, ELISA, and bulk tank milk test results for Johne's disease in US dairy herds. *J Dairy Science*, 85:525-531.
- Stabel JR, Palmer, MV, Whittlock RH. 2003. Immune responses after oral inoculation of weanling bison or beef calves with a bison or cattle isolate of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *J Wildl Dis*, 39:545-555.

- Stabel JR. 2006. Host responses to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: a complex arsenal. *Anim Health Res Rev*, 7(1-2):61-70.
- Stabel JR. 2010. Immunology of Paratuberculosis Infection and Disease. Paratuberculosis: Organism, Disease, Control. Ed.: Behr MA, Collins DM, CAB International, Reino Unido. pp.230-243.
- Stamp JT, Watt JA. 1954. Johne's disease in sheep. *J Comp Pathol*, 64(1):26-40.
- Stephan R, Buhler K, Corti S. 2002. Incidence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in bulk-tank milk samples from different regions in Switzerland. *Vet Record*, 150:214-215.
- Stephan R, Schumacher S, Tasara T, Grant IR. 2007. Prevalence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in Swiss raw milk cheeses collected at the retail level. *J Dairy Sci*, 90:3590-3595.
- Sternberg S, Viske D. 2003. Control strategies for paratuberculosis in Sweden. *Acta Vet Scand*, 44:247-249.
- Stehman SM. 1996. Paratuberculosis in small ruminants, deer, and South American camelids. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 12(2):441-455.
- Stevenson K, Hughes VM, de Juan L, Inglis NF, Wright F, Sharp JM. 2002. Molecular characterization of pigmented and nonpigmented isolates of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Clin Microbiol*, 40(5):1798-1804.
- Stevenson K, Alvarez J, Bakker D, Biet F, de Juan L, Denham S, Dimareli Z, Dohmann K, Gerlach GF, Heron I, Kopečna M, May L, Pavlik I, Sharp JM, Thibault VC, Willemsen P, Zadoks RN, 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*, 9:212.
- Stevenson K. 2010. Comparative Differences between Strains of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. Paratuberculosis: Organism, Disease, Control. Ed.: Behr MA, Collins DM, CAB International, Reino Unido. pp.129-137.
- 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.
- Stewart DJ, Vaughan JA, Stiles PL, Noske PJ, Tizard ML, Prowsw SJ, Michalski WP, Butler KL, Jones SL. 2004. A long-term study in Merino sheep experimentally infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: clinical disease, faecal culture and immunological studies. *Vet Microbiol*, 104:165-178.
- Stewart DJ, Vaughan JA, Stiles PL, Noske PJ, Tizard ML, Prowsw SJ, Michalski WP, Butler KL, Jones SL. 2006. A long-term study in Angora goats experimentally infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: clinical disease, faecal culture and immunological studies. *Vet Microbiol*, 113:13-24.
- Stewart DJ, Vaughan JA, Stiles PL, Noske PJ, Tizard ML, Prowsw SJ, Michalski WP, Butler KL, Jones SL. 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(1-2):83-96.

- Streeter RN, Hoffsis GF, Bech-Nielsen S, Shulaw WP, Rings M. 1995. Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from colostrum and milk of subclinically infected cows. *Am J Vet Res*, 56:1322-1324.
- Sturgill-Koszycki S, Schlesinger PH, Chakraborty P, Haddix PL, Collins HL, Fok AK, Allen RD, Gluck SL, Heuser J, Russell DG. 1994. Lack of acidification in *Mycobacterium* phagosomes produced by exclusion of the vesicular proton-ATPase. *Science*, 263:678-681.
- Sweeney RW, Whitlock RH, Rosenberger AE. 1992. *Mycobacterium paratuberculosis* cultured from milk and supramammary lymphnodes of infected asymptomatic cows. *J Clin Microbiol*, 30:166-171.
- Sweeney RW. 1996. Transmission of paratuberculosis. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 12(2):305-312.
- Sweeney RW. 2011. Pathogenesis of paratuberculosis. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 27(3):537-546.
- Talaat AM. 2010. Experimental Small Animal Models of Paratuberculosis. Paratuberculosis: Organism, Disease, Control. Ed.: Behr MA, Collins DM, CAB International, Reino Unido. pp.223-229.
- 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.
- Taylor AW. 1945. Ovine paratuberculosis (Johne's disease of sheep). *J Comp Pathol*, 55:41-44.
- Taylor AW. 1951. Varieties of *Mycobacterium johnei* from sheep. *J Pathol Bacteriol*, 63:333-336.
- Taylor AW. 1953. The experimental infection of cattle with varieties of *Mycobacterium johnei* isolated from sheep. *J Comp Pathol*, 63:368-373.
- Taylor TK, Wilks CR, McQueen DS. 1981. Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from the milk of a cow with Johne's disease. *Vet Record*, 109:532-533.
- 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.
- Tharaldsen J, Djonne B, Fredriksen B, Nyberg O, Siguroardottir O. 2003. The National Paratuberculosis Program in Norway. *Acta Vet Scand*, 44:243-246.
- Thegerström J, Marklund BI, Hoffner S, Axelsson-Olsson D, Kauppinen J, Olsen B. 2005. *Mycobacterium avium* with the bird type IS1245 RFLP profile is commonly found in wild and domestic animals, but rarely in humans. *Scand J Infect Dis*, 37(1):15-20.
- Thibault VC, Grayon M, Boschirolu ML, Hubbans C, Overduin P, Stevenson K, Gutierrez MC, Supply P, Biet F. 2007. New variable-number tandem-repeat markers for typing *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and *M. avium* strains: comparison with IS900 and IS1245 restriction fragment length polymorphism typing. *J Clin Microbiol*, 45(8):2404-2410.
- Thibault VC, Grayon M, Boschirolu ML, Willery E, Allix-Béguec C, Stevenson K, Biet F, Supply P. 2008. Combined multilocus short-sequence-repeat and mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem-repeat typing of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolates. *J Clin Microbiol*, 46(12):4091-4094.

- Tohen CO, Richards WD, Jarnagin JL. 1977. Mycobacteria isolated from exotic animals. *J Am Vet Med Assoc*, 170:987-990.
- Thomsen BV, Steadham EM, Gallup JM, Ackermann MR, Brees DJ, Cheville NF. 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*, 125:137-144.
- Thorel MF, Krichevsky M, Lévy-Frébault VV. 1990. Numerical taxonomy of mycobactin-dependent mycobacteria, emended description of *Mycobacterium avium*, and description of *Mycobacterium avium* subsp. *avium* subsp. *nov.*, *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* subsp. *nov.*, and *Mycobacterium avium* subsp. *silvaticum* subsp. *nov.* *Int J Syst Bacteriol*, 40(3):254-260.
- Thorel MF, Vialard J, Manfroni F, Bernardot J, Ostyn A, Vandeveld J. 1992. Experimental paratuberculosis in sheep after intravenous or oral inoculation: pathogenicity and biologic diagnosis *Ann Rech Vet*, 23(2):105-115.
- Thorel MF, Huchzermeyer HF, Michel AL. 2001. *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium intracellulare* infection in mammals. *Rev Sci Tech*, 20(1):204-218.
- Tiwari A, VanLeeuwen JA, McKenna SL, Keefe GP, Barkema HW. 2006. Johne's disease in Canada Part I: clinical symptoms, pathophysiology, diagnosis, and prevalence in dairy herds. *Can Vet J*, 47(9):874-882.
- Torrelles JB, Azad AK, Schlesinger LS. 2006. Fine discrimination in the recognition of individual species of phosphatidyl-myo-inositol mannosides from *Mycobacterium tuberculosis* by C-type lectin pattern recognition receptors. *J Immunol*, 177(3):1805-1816.
- Torrelles JB, Knaup R, Kolareth A, Slepishkina T, Kaufman TM, Kang P, Hill PJ, Brennan PJ, Chatterjee D, Belisle JT, Musser JM, Schlesinger LS. 2008. Identification of *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates with altered phagocytosis by human macrophages due to a truncated lipoarabinomannan. *J Biol Chem*, 283(46):31417-31428.
- Tortoli E, Rindi L, Garcia MJ, Chiaradonna P, Dei R, Garzelli C, Kroppenstedt RM, Lari N, Mattei R, Mariottini A, Mazzarelli G, Murcia MI, Nanetti A, Piccoli P, Scarparo C. 2004. Proposal to elevate the genetic variant MAC-A, included in the *Mycobacterium avium* complex, to species rank as *Mycobacterium chimaera* sp. *nov.* *Int J Syst Evol Microbiol*, 54(Pt 4):1277-1285.
- Toth JD, Aceto HW, Rankin SC, Dou Z. 2013. Short communication: Survey of animal-borne pathogens in the farm environment of 13 dairy operations. *J Dairy Sci*, 96:5756-5761.
- Trefz P, Koehler H, Klepik K, Moebius P, Reinhold P, Schubert JK, Miekisch W. 2013. Volatile emissions from *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* mirror bacterial growth and enable distinction of different strains. *PLoS One*, 8(10):e76868.
- Tsukano H, Kura F, Inoue S, Sato S, Izumiya H, Yasuda T, Watanabe H. 1999. *Yersinia pseudotuberculosis* blocks the phagosomal acidification of B10. A mouse macrophages through the inhibition of vacuolar H (+)-ATPase activity. *Microb Pathog*, 27:253-263.
- Twort FW, Ingram GLY. 1912. A method for isolating and cultivating the *Mycobacterium enteriditis chronicae pseudotuberculosis bovis*, Johne, and some experiments on the preparation of a diagnostic vaccine for pseudo-tuberculous enteritis of bovines. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, 84:517-42.

- Vaerewijck MJ, Huys G, Palomino JC, Swings J, Portaels F. 2005. Mycobacteria in drinking water distribution systems: ecology and significance for human health. *FEMS Microbiol Rev*, 29:911-934.
- Valente C, Cuteri V, Quondam R, Gialetti L, Franciosini MP. 1997. Use of an experimental chicks model for paratuberculosis enteritis (Johne's disease). *Vet Res*, 28:239-246.
- Vallée H, Rinjard P. 1926. Etudes sur l'entérite paratuberculeuse des bovines. *Rev Gén Méd Vét*, 409:1-9.
- Van Hulzen KJ, Schopen GC, van Arendonk JA, Nielen M, Koets AP, Schrooten C, Heuven HC. 2012a. Genome-wide association study to identify chromosomal regions associated with antibody response to *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in milk of Dutch Holstein-Friesians. *J Dairy Sci*, 95(5):2740-2748.
- Van Hulzen KJ, Koets AP, Nielen M, Hoebler J, van Arendonk JA, Heuven HC. 2012b. Genetic variation for infection status as determined by a specific antibody response against *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in milk of Dutch dairy goats. *J Dairy Sci*, 95(10):6145-6151.
- Van Ingen J, Boeree MJ, Kösters K, Wieland A, Tortoli E, Dekhuijzen PN, van Soolingen D. 2009. Proposal to elevate *Mycobacterium avium* complex ITS sequevar MAC-Q to *Mycobacterium vulneris* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*, 59(9):2277-2282.
- Van Kruiningen HJ, Ruiz B, Gumprecht L. 1991. Experimental disease in young chickens induced by a *Mycobacterium paratuberculosis* isolate from a patient with Crohn's disease. *Can J Vet Res*, 55:199-202.
- Van Soolingen D, Hoogenboezem T, de Haas PE, Hermans PW, Koedam MA, Teppema KS, Brennan PJ, Besra GS, Portaels F, Top J, Schouls LM, van Embden JD. 1997. A novel pathogenic taxon of the *Mycobacterium tuberculosis* complex, Canetti: characterization of an exceptional isolate from Africa. *Int J Syst Bacteriol*, 47(4):1236-1245.
- Van Ulsen FW. 1970. Paratuberculosis in a pygmy ass, *Equus asinus*. *Tijdschr Diergen Eesk*, 95:446-448.
- Vaughan JA, Lenghaus C, Stewart DJ, Tizard ML, Michalski WP. 2005. Development of a Johne's disease infection model in laboratory rabbits following oral administration of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Vet Microbiol*, 105:207-213.
- Vázquez P, Garrido JM, Juste RA. 2013. Specific antibody and interferon-gamma responses associated with immunopathological forms of bovine paratuberculosis in slaughtered Friesian cattle. *PLoS One*, 8(5):e64568.
- Vázquez P. 2014. Latencia y patencia en la paratuberculosis bovina, relación con marcadores genéticos y aspectos de salud pública y control. Tesis Doctoral. Universidad de Zaragoza. Aragón. España.
- Verdugo C, Jones G, Johnson W, Wilson P, Stringer L, Heuer C. 2014. Estimation of flock/herd-level true *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* prevalence on sheep, beef cattle and deer farms in New Zealand using a novel Bayesian model. *Prev Vet Med*, 117:447-455.
- 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*, 117:436-446.
- Vergne I, Chua J, Lee HH, Lucas M, Belisle J, Deretic V. 2005. Mechanism of phagolysosome biogenesis block by viable *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102:4033-4038.

- Vergne I, Gilleron M, Nigou J. 2015. Manipulation of the endocytic pathway and phagocyte functions by *Mycobacterium tuberculosis* lipoarabinomannan. *Front Cell Infect Microbiol*, 4:187.
- Verna AE, Garcia-Pariente C, Muñoz M, Moreno O, García-Marin JF, Romano MI, Paolicchi F, Pérez V. 2007. Variation in the immuno-pathological responses of lambs after experimental infection with different strains of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Zoo Publ Health*, 54(6-7):243-252.
- Verschoor CP, Pant SD, You Q, Schenkel FS, Kelton DF, Karrow NA. 2010. Polymorphisms in the gene encoding bovine interleukin-10 receptor alpha are associated with *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* infection status. *BMC Genet*, 11:23.
- Vicenzoni G, Filippi L, Dolci P, Corro M, Job L, Robbi C. 1999. Prevalenza de *Mycobacterium paratuberculosis* in bovine macellate in provincia di Verona. *Atti della Societa Italiana diBuiatria*, 31:277-281.
- Vishnevskii PP, Mamatsev EG, Chernyshev VV, Chernyshev NS. 1940. The viability of the bacillus of Johne's disease. *Sov Vet*, 11-12:89-93.
- Waldner CL, Cunningham GL, Janzen ED, Campbell. 2002 JR. Survey of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* serological status in beef herds on community pastures in Saskatchewan. *Can Vet J*, 43:542-546.
- Wang H, Maeda Y, Fukutomi Y, Makino M. 2013. An *in vitro* model of *Mycobacterium leprae* induced granuloma formation. *BMC Infect Dis*, 13:279.
- Wayne L, Kubica GP. 1986. The mycobacteria. En: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol 2.Ed.: Sneath PHA, Mair NS, Sharpe ME, Holt JG. The Williams & Wilkins Co., Baltimore, Estados Unidos. pp.1435-1457.
- Weiss DJ, Evanson OA, Deng M, Abrahamsen MS. 2004. Sequential patterns of gene expression by bovine monocyte-derived macrophages associated with ingestion of mycobacterial organisms. *Microb Pathog*, 37:215-224.
- Weiss DJ, Souza CD. 2008. Review paper: modulation of mononuclear phagocyte function by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Vet Pathol*, 45(6):829-841.
- Weiss CH, Glassroth J. 2012. Pulmonary disease caused by nontuberculous mycobacteria. *Expert Rev Respir Med*, 6(6):597-612.
- Wernery U, Kinne J. 2007. An approach to the diagnosis of camel diseases: clinical pathology and post-mortem criteria. Proceedings of the International Camel Conference 'Recent Trends in Camelid Research and Future Strategies for Saving Camels'. Rajasthan, India.
- Wernery U, Kinne J, Jahans KL, Vordermeier HM, Esfandiari J, Greenwald R, Johnson B, Ul-Haq A, Lyashchenko KP. 2007. Tuberculosis outbreak in a dromedary racing herd and rapid serological detection of infected camels. *Vet Microbiol*, 122:108-115.
- Whan LB, Grant IR, Ball HJ, Scott R, Rowe MT. 2001. Bactericidal effect of chlorine on *Mycobacterium paratuberculosis* in drinking water. *Lett Appl Microbiol*, 33(3):227-231.
- Whitlock RH, Buergelt C. 1996. Preclinical and clinical manifestations of paratuberculosis (including pathology). *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 12(2):345-356.

- Whittington RJ, Marsh I, McAllister S, Turner MJ, Marshall DJ, Fraser CA. 1999. Evaluation of modified BACTEC 12B radiometric medium and solid media for culture of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from sheep. *J Clin Microbiol*, 37(4):1077-1083.
- Whittington RJ, Hope AF, Marshall DJ, Taragel CA, Marsh I. 2000a. 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(9):3240-3248.
- Whittington RJ, Reddacliff LA, Marsh I, McAllister S, Saunders V. 2000c. Temporal patterns and quantification of excretion of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in sheep with Johne's disease. *Aust Vet J*, 78(1):34-37.
- Whittington RJ, Marsh IB, Whitlock RH. 2001a. 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(3):139-145.
- Whittington RJ, Taragel CA, Ottaway S, Marsh I, Seaman J, Fridriksdottir V. 2001b. Molecular epidemiological confirmation and circumstances of occurrence of sheep (S) strains of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in cases of paratuberculosis in cattle in Australia and sheep and cattle in Iceland. *Vet Microbiol*, 79:311-322.
- Whittington RJ, Marshall DJ, Nicholls PJ, Marsh IB, Reddacliff LA. 2004. Survival and dormancy of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in the environment. *Appl Environ Microbiol*, 70(5):2989-3004.
- Whittington RJ, Marsh IB, Reddacliff LA. 2005. Survival of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in dam water and sediment. *Appl Environ Microbiol*, 71(9):5304-5308.
- Whittington RJ, Windsor PA. 2009. In utero infection of cattle with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: a critical review and meta-analysis. *Vet J*, 179(1):60-69.
- Whittington R. 2010. Cultivation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. Paratuberculosis: Organism, Disease, Control. Ed.: Behr MA, Collins DM, CAB International, Reino Unido. pp.244-266.
- Whittington RJ, Marsh IB, Saunders V, Grant IR, Juste R, Sevilla IA, Manning EJ, Whitlock RH. 2011. Culture phenotypes of genomically and geographically diverse *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolates from different hosts. *J Clin Microbiol*, 49(5):1822-1830.
- Whittington RJ, Whittington AM, Waldron A, Begg DJ, de Silva K, Purdie AC, Plain KM. 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(12):3993-4000.
- Williams AG, Withers SE. 2008. Microbiology of some artisanal 'farmhouse' cheeses manufactured in Scotland from unpasteurized milk. Programme and Abstracts of the 21 International ICFMH Symposium (Food Micro 2008), Aberdeen, UK.
- Williams ES, Spraker TR, Schoonveld GG. 1979. Paratuberculosis (Johne's Disease) in bighorn sheep and a rocky-mountain goat in Colorado. *J Wildlife Dis*, 15:221-227.

- Windsor PA, Whittington RJ. 2010. Evidence for age susceptibility of cattle to Johne's disease. *Vet J*, 184(1):37-44.
- Windsor PA, Eppleston J, Dhand NK, Whittington RJ. 2014. Effectiveness of Gudair™ vaccine for the control of ovine Johne's disease in flocks vaccinating for at least 5 years. *Aust Vet. J*, 92:263-268.
- Wong SY, Grant IR, Friedman M, Elliott CT, Situ C. 2008. Antibacterial activities of naturally occurring compounds against *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Appl Environ Microbiol*, 74(19):5986-90.
- Woo SR, Heintz JA, Albrecht R, Barletta RG, Czuprynski CJ. 2007. Life and death in bovine monocytes: the fate of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Microb Pathog*, 43:106-113.
- Wu CW, Glasner J, Collins M, Naser S, Talaat AM. 2006. Whole-genome plasticity among *Mycobacterium avium* subspecies: insights from comparative genomic hybridizations. *J Bacteriol*, 188(2):711-723.
- Wynne JW, Bull TJ, Seemann T, Bulach DM, Wagner J, Kirkwood CD, Michalski WP. 2011. Exploring the zoonotic potential of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* through comparative genomics. *PLoS One*, 6(7):e22171.
- Yadav D, Singh SV, Singh AV, Sevilla I, Juste RA, Singh PK, Sohal JS. 2008. Pathogenic 'Bison-type' *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* genotype characterized from riverine buffalo (*Bubalus bubalis*) in North India". *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 31(4):373-387.
- Yamamura M, Uvemura K, Deans RJ, Weinberg K, Rea TH, Bloom BR, Modlin RL. 1991. Defining protective responses to pathogens: cytokine profiles in leprosy lesions. *Science*, 254:277-279.
- Zare Y, Shook GE, Collins MT, Kirkpatrick BW. 2014a. Short communication: Heritability estimates for susceptibility to *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection defined by ELISA and fecal culture test results in Jersey cattle. *J Dairy Sci*, 97(7):4562-4567.
- Zhao B, Collins MT, Czuprynski CJ. 1997. Effects of gamma interferon and nitric oxide on the interaction of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* with bovine monocytes. *Infect Immun*, 65:1761-1766.
- Zhu X, Tu ZJ, Coussens PM, Kapur V, Janagama H, Naser S, Sreevatsan S. 2008. Transcriptional analysis of diverse strains *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in primary bovine monocyte derived macrophages. *Microbes Infect*, 10(12-13):1274-82.
- Zwick LS, Walsh TF, Barbiers R, Collins MT, Kinsel MJ, Murname RD. 2002. Paratuberculosis in a mandrill (*Papio sphinx*). *J Vet Diagn Invest*, 14:326-328.

X. ANEXOS

X. ANEXOS

X.1. ABREVIATURAS

aa: Aminoácidos

ACP: Acyl carrier protein / proteína portadora de acilo

AG: Arabinogalactano

AGID: Agarose gel immunodiffusion / inmunodifusión en gel de agarosa

AM: Ácidos micólicos

ANOVA: Analysis of variance / análisis de la varianza

ASA: Aminosalicylic acid / ácido aminosalicílico

ATCC: American type culture collection / colección de cultivos tipo americano

ATP: Adenosine triphosphate / trifosfato de adenosina

BAAR: Bacteria acido-alcohol resistente

Bad: Bcl-2-associated death

BCL: B-cell lymphoma / linfoma de células B

BOMAC: Bovine macrophage cell line / línea celular de macrófagos bovinos

CARD: Caspase recruitment domain / dominio de reclutamiento de caspasa

CD: Cluster of differentiation / cumulos de diferenciación

CF: Complement fixation / fijación del complemento

CoA: Coenzima A.

CPA: Células presentadoras de antígenos

CR: Complement receptor / receptor de complemento

DC-SIGN: Dendritic cell-Specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin

DDA: Dimethyl dioctadecyl ammonium / Dimetil dioctadecil de amonio

DIVA: Difference infected from *vaccinated* animals / diferencia infectados de animales vacunados

DNA: Deoxyribonucleic acid / ácido desoxirribonucleico

DPBS: Dulbecco's phosphate-buffered saline / solución salina tamponada con Dulbecco

DTH: Delayed type hypersensitivity / hipersensibilidad de tipo retardado.

EEA1: Early endosome antigen 1 / autoantígeno endosomal primario

EEUU: Estados Unidos

ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay / ensayo de inmunoabsorbancia enzimática

F:Forward / hacia adelante

FAME: Fatty acid methyl ester / éster de metilo de los ácidos grasos

FAP: Fibronectin-attachment protein / proteínas de unión a la fibronectina

FCS: Fetal bovine serum / suero fetal bovino

FN: Fibronectina

g: Gramo

GAPDH: Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase / gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa

GC: Guanina, citosina

GM-CSF: Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor / factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos

GLM: General linear model / modelo lineal general

HBH: Heparin-binding hemagglutinin / hemaglutinina de unión a heparina

HBSS: Hank's balanced salt solution / solución salina de Hank

HE: Hemotoxilina-eosina

HEY: Herrold's egg yolk

HS-GAG: Heparan sulfate glycosaminoglycan / glicosaminoglicanos heparán sulfato

Hsp: Heat shock protein / proteína de choque térmico

IACUC: Institutional animal care and use committee / Comité institucional para el cuidado y uso de animales

ICAM-1: Intercellular adhesion molecule 1

IDR: Intradermal reaction / reacción intradérmica

IFN: Interferon

Ig: Inmunoglobulina

IHQ= Inmunohistoquímica

IL: Interleuquina

IS: Insertion sequence / secuencia de inserción

Kb: Kilobases

kDa: Kilodalton

kg: Kilogramo

LAM: Lipoarabinomanano

LJ: Lowenstein-Jensen

LN: Lymph node / nódulo linfático

LRR: Leucine-rich repeat / repeticiones ricas en leucina

LSP: Long sequence polymorphisms / polimorfismos de secuencia larga

M: Molar

M.: Mycobacterium

mAb: Monoclonal antibodies / anticuerpos monoclonales

MAC: *Mycobacterium avium* complex / complejo *Mycobacterium avium*

MACS: Magnetic-activated cell sorting / selección celular magnética

MAC-T: Bovine mammary epithelial cells

Mah: *M. avium hominissuis*

Man-LAM: Mannosylated lipoarabinomannan / lipoarabinomanano revestido de manosa

Map: *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis*

MAPK-38: P38 mitogen-activated protein kinase

Mb: Megabases

MDBK: Madin-Darby bovine kidney

MDM: Monocyte derived macrophages / macrófagos derivados de monocitos

mg: miligramo

MGIT: Mycobacterial growth indicator tube / tubo indicador de crecimiento de micobacterias

MHC: Major histocompatibility complex / complejo mayor de histocompatibilidad
MIC: Minimum inhibitory concentration / concentración mínima inhibitoria
min: Minutos
ml: Mililitro
mM: Millimolar
MMP: Matrix metalloproteinase / metaloproteinasas de la matriz
MOI: Multiplicity of infection / multiplicidad de infección
MP: Mercaptopurina
MPL: Monophosphoryl lipid / monofosforil lípido
MR: mannose receptor / receptor de manosa
Mtb: *Mycobacterium tuberculosis*
MTC: *Mycobacterium tuberculosis* complex / complejo *Mycobacterium tuberculosis*
NaOH: Hidróxido sódico
NCBI: National center for biotechnology information / centro nacional para la información biotecnológica
NCCLS: National committee for clinical laboratory standards / Comité Nacional de estándares de Laboratorio Clínico
ND: No determine / no determinado
ng: Nanogramos
NK: Natural killer / asesina natural
NO: Nitric oxide / óxido nítrico
Nr: No reportado.
NTM: Non tuberculous mycobacteria / micobacterias no tuberculosas
OADC: Oleic acid-albumin-dextrose-catalase / oleico-albúmina-dextrosa-catalasa
OIE: World organisation for animal health / organización mundial de sanidad animal
ORF: Open reading frame / fases de lectura abierta
Par: Parcial
pb: Base pair / par de bases
PBMC: Peripheral blood mononuclear cells / células mononucleares de sangre periférica
PBS: Phosphate-buffered saline / tampón fosfato salino
PCR: Polymerase chain reaction / reacción en cadena de la polimerasa
PCR-REA: Polymerase chain reaction and restriction endonuclease analysis / reacción en cadena de la polimerasa y análisis con endonucleasas de restricción
PFGE: Pulsed field gel electrophoresis / electroforesis en gel de campo pulsado
PG: Peptidoglycan / peptidoglicano
p.i.: post-infección
PILAM: Fosfatidil inositol y liporarabinomanano
PIM: fosfatidil-1-myo-inositol manosidos
PI3P: Fosfatidilinositol 3-fosfato
Ptp: Protein tyrosine phosphatase / *fosfatasas* de proteínas en tirosina

q-RT-PCR: Reverse transcription quantitative polymerase chain reaction / Transcripción inversa seguida de Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa

R: Reverse / inverso

REA: Restriction endonuclease analysis / análisis con endonucleasas de restricción

RFLP: Restriction fragment length polymorphism / polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción

RNI: Reactive nitrogen intermediates / reactivos intermediarios de nitrógeno

ROI: Reactive oxygen intermediates / reactivos de intermediarios de oxígeno

RPMI: Roswell park memorial institute

RQ: Relative quantification / cuantificación relativa

rRNA: Ribosómic RNA / RNA ribosómico

SCID: Revere combined immunodeficiency

SIDA: Human immunodeficiency virus infection / síndrome de inmunodeficiencia adquirida

SLC: Solute Carrier Family

SNP: Single nucleotide polymorphism / polimorfismos de nucleótido simple

SOD: Superóxido dismutasa

spp: Species / especies

Syn: Synonymous / sinónimo

TACO: Tryptophan aspartate containing coat protein / proteína envuelta de triptófano aspartato

TE: Tris-EDTA

TGF: Transforming growth factor / factor de crecimiento transformante

Th: T helper cell / células T colaboradores

THP-1: Human monocytic cell line / línea celular de monocitos humanos

TIMP: Metalloproteinase inhibitor / Inhibidor de la metaloproteínasa celular

TLR: Toll-like receptor / receptores tipo toll

Tm: Melting temperature / temperatura de fusión

TNF: Tumor necrosis factor / factor de necrosis tumoral

tRNA: Transfer RNA / ARN de transferencia

TTD: Time to detection / tiempo de detección

UFC: Unidades formadoras de colonias

µg: Microgramo

µl: Microlitro

µm: Micrómetro

µM: Micromolar

USDA: *United states department of agriculture*

UTR: Untranslated region / región no traducida

VIC: Válvula Ileocecal

VOCs: Volatile organic compounds / componentes volátiles orgánicos

Vol: Volumen

ZN: Ziehl-Neelsen

X.2. TRABAJOS PENDIENTES DE PUBLICACIÓN

Publicación VI: "Improved ruminants' monocyte-derived macrophages infection models to study Mycobacteria-host interactions and for vaccine candidates evaluation". *BMC Microbiology*. **Abendaño N**, Boveda E, Ledo B, Juste RA, Alonso-Hearn M.

PUBLICACION VII: "Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis fatty acid composition might determine its interaction with bovine macrophages and influence the intracellular survival of the bacillus". Alonso-Hearn M, **Abendaño N**, Rubirar A, Aznar R, Juste RA.

PUBLICACION VIII: "Enhanced *in vitro* phagocytic efficiency of macrophages against *M. bovis* from EMDIAR sensitized young cattle". Juste RA, Alonso-Hearn M, Garrido JM, **Abendaño N**, Sevilla IA, Gortazar C, de la Fuente J, Dominguez L.

X.3. FACTOR DE IMPACTO Y ÁREA TEMÁTICA

A continuación se presentan el factor de impacto de las revistas y las áreas temáticas de cada una de las publicaciones científicas incluidas en esta Tesis Doctoral. Esta información ha sido obtenida del Journal Citation Reports® (JCR) (Insitute of Scientific Information (ISI), Thomson Scientific), a través de la plataforma ISI Web of Knowledge (Thomson Scientific). Los datos se muestran referidos al año de publicación de cada artículo.

- **Publicación I:** Quantification of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* Strains Representing Distinct Genotypes and Isolated from Domestic and Wildlife Animal Species by Use of an Automatic Liquid Culture System. DOI: 10.1128/JCM.00441-12. **Abendaño N**, Sevilla IA, Prieto JM, Garrido JM, Juste RA, Alonso-Hearn M.

<i>Journal of Clinical Microbiology</i>
<ul style="list-style-type: none"> • Año: 2012 • Índice de impacto: 4.068 • Área: Microbiología • Cuartil: Q1 • Ranking: 27/116

- **Publicación II:** Anti-Inflammatory and Antiapoptotic Responses to Infection: A Common Denominator of Human and Bovine Macrophages Infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. Review Article. DOI: 10.1155/2013/908348. **Abendaño N**, Juste RA, Alonso-Hearn M.

<i>Journal of Biomedicine and Biotechnology</i>
<ul style="list-style-type: none">• Año: 2013• Índice de impacto: 2.706• Área: Medicina, Investigación y Experimentación• Cuartil: Q2• Ranking: 50/124

- **Publicación III:** *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* Isolates from Sheep and Goats Show Reduced Persistence in Bovine Macrophages than Cattle, Bison, Deer and Wild Boar Strains Regardless of Genotype. DOI: 10.1016/j.vetmic.2012.12.042. **Abendaño N**, Sevilla IA, Prieto JM, Garrido JM, Juste RA, Alonso-Hearn M.

<i>Veterinary Microbiology</i>
<ul style="list-style-type: none">• Año: 2013• Índice de impacto: 2.726• Área: Ciencias Veterinarias• Cuartil: Q1• Ranking: 4/132

- **Publicación IV:** Three-Dimensional *In Vitro* Models of Granuloma to Study Bacteria-Host Interactions, Drug-Susceptibility, and Resuscitation of Dormant Mycobacteria. Review Article. Fitzgerald LE, **Abendaño N**, Juste RA, Alonso-Hearn M.

<i>Biomed Research International</i>
<ul style="list-style-type: none">• Año: 2014• Índice de impacto: 3.169• Área: Medicina, Investigación y Experimentación• Cuartil: Q2• Ranking: 50/124

- **Publicación V:** *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* Isolates Induce *In Vitro* Granuloma Formation and Show Successful Survival Phenotype, Common AntiInflammatory and Antiapoptotic Responses within Ovine Macrophages Regardless of Genotype or Host of Origin. DOI: 10.1371/journal.pone.0104238. **Abendaño N**, Tyukalova L, Barandika JF, Balseiro A, Sevilla IA, Garrido JM, Juste RA, Alonso-Hearn M.

<i>Plos One</i>
<ul style="list-style-type: none"> • Año: 2014 • Índice de impacto: 3.234 • Área: Ciencias Multidisciplinarias • Cuartil: Q1 • Ranking: 8/56

X.4. OTRAS CONTRIBUCIONES DEL DOCTORANDO

OTRAS PUBLICACIONES

- Prieto JM, Balseiro A, Casais R, **Abendaño N**, Fitzgerald LE, Garrido JM, Juste RA, Alonso-Hearn M. 2014. A Sensitive and Specific Enzyme-linked Immunosorbent Assay for Detecting Serum Antibodies against *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Fallow Deer (Dama dama). *Clinical and Vaccine Immunology*, 21(8):1077.

<i>Clinical and Vaccine Immunology</i>
<ul style="list-style-type: none"> • Año: 2014 • Índice de impacto: 2.470 • Área: Ciencias veterinarias • Cuartil: Q2 • Ranking: 43/78

CONTRIBUCIONES A CONGRESOS

- **Congresos internacionales**
 - *12th International Colloquium on Paratuberculosis (ICP). Parma. Junio 2014.*
 - AUTORES: **Abendaño N**, Tyukalova L, Barandika J, Balseiro A, Sevilla IA, Garrido JM, Juste RA, Alonso-Hearn M.

TÍTULO: *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* Isolates Induce *in Vitro* Granuloma Formation and Show Successful Survival Phenotype, Common Anti-inflammatory and Antiapoptotic Responses within Ovine Macrophages regardless of Genotype or Host of Origin.

TIPO DE COMUNICACIÓN: Comunicación oral

- AUTORES: Prieto JM, Balseiro A, Casais R, **Abendaño N**, Fitzgerald LE, Garrido JM, Juste RA, Alonso-Hearn M.

TÍTULO: Sensitive and Specific Enzyme-linked Immunosorbent Assay for Detecting Serum Antibodies against *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* in Fallow Deer.

TIPO DE COMUNICACIÓN: Poster

- AUTORES: **Abendaño N**, Fitzgerald LE, Garrido JM, Barandika JF, Balseiro A, Juste RA, Alonso-Hearn M.

TÍTULO: *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolates trigger the formation of granulomas *in vitro*.

TIPO DE COMUNICACIÓN: Poster

▪ **10th International Veterinary Immunology Symposium (IVIS). Milán. Agosto 2013**

- AUTORES: **Abendaño N**, Tyukalova L, Barandika JF, Sevilla IA, Garrido JM, Juste RA, Alonso-Hearn M.

TÍTULO: *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolates from domestic and wild animals showed successful survival phenotype and induced common immune responses within ovine macrophages.

TIPO DE COMUNICACIÓN: Comunicación oral

- AUTORES: **Abendaño N**, Juste RA, Alonso-Hearn M.

TÍTULO: *In Vitro* Infection Models to Study *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*-Host interactions.

TIPO DE COMUNICACIÓN: Poster

▪ **11th International Colloquium on Paratuberculosis (ICP). Sydney. Febrero 2012**

- AUTORES: **Abendaño N**, Sevilla IA, Garrido JM, Prieto JM, Juste RA, Alonso-Hearn M.

TÍTULO: A large-scale study of differential virulence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* strains with distinct genotypes and isolated from diverse hosts in bovine macrophages.

TIPO DE COMUNICACIÓN: Comunicación oral

- AUTORES: **Abendaño N**, Sevilla IA, Geijo M, Garrido JM, Prieto JM, Juste RA, Alonso-Hearn M.

TÍTULO: Quantification of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* strains with distinct genotypes and isolated from diverse hosts using a liquid culture system.

TIPO DE COMUNICACIÓN: Comunicación oral

- **8th International Conference on the Pathogenesis of Mycobacterial Infections (ICPMI). Estocolmo. Julio 2011**
 - AUTORES: Alonso-Hearn M, **Abendaño N**, Sevilla IA, Garrido JM, Juste RA.
TÍTULO: A large-scale study of differential virulence of genomically diverse strains of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* isolated from diverse hosts in bovine macrophages.
TIPO DE COMUNICACIÓN: Poster
- **Congresos nacionales**
 - **XVIII Simposio Anual de la Asociación de Veterinarios Especialistas en Diagnóstico Laboratorial (AVEDILA). Madrid. 14-15 Noviembre 2013.**
 - AUTORES: **Abendaño N**, Ledo B, Boveda E, Barandika JF, Juste RA, Alonso-Hearn M.
TÍTULO: Utilización de nanopartículas magnéticas funcionalizadas para la purificación de monocitos CD14+ de rumiantes para la posible detección de patógenos intracelulares
TIPO DE COMUNICACIÓN: Poster

PREMIOS

- 🏆 **Richard Merkal Award.** Premio a la mejor comunicación oral del 12th International Colloquium on Paratuberculosis (ICP), Parma (2014).
- 🏆 **Poster mejor valorado** del XVIII Simposio Anual de la Asociación de Veterinarios Especialistas en Diagnóstico Laboratorial (AVEDILA), Madrid (2013).

