

DEPARTAMENTO DE SANIDAD ANIMAL



Tesis Doctoral

Efecto de la vacunación sobre la protección y la respuesta inmunitaria frente a la paratuberculosis en modelos experimentales *in vitro* e *in vivo* de pequeños rumiantes

PhD Thesis

Effect of vaccination on protection and immune response against paratuberculosis using small ruminant *in vitro* and *in vivo* experimental models

Noive Arteché Villasol

Programa oficial de doctorado en
Ciencias Veterinarias y de los Alimentos

Directores:

Valentín Pérez Pérez

Julio Benavides Silván

Daniel Gutiérrez Expósito

León, 2021

El desarrollo de esta tesis doctoral se ha llevado a cabo en el Departamento de Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de León (ULE) y en el Instituto de Ganadería de Montaña en Grulleros, León (IGM), centro mixto del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) y la ULE. Su realización ha sido posible gracias a la financiación del Ministerio de Ciencia e Innovación (Agencia Estatal de Investigación) a través del proyecto con referencia AGL2015-66540-C2-1-R y con título: “Respuesta inmune y marcadores de protección asociados a la vacunación en paratuberculosis”. Durante la realización de esta Tesis Doctoral la autora disfrutó de un contrato predoctoral (BES-2016-076513) para la formación de doctores otorgado por el Ministerio de Ciencia e Innovación.



No mido el éxito con victorias, sino con las veces que he conseguido levantarme de las derrotas.

Anónimo

*A mis padres,
A mis amigos,
A toda mi familia*

Agradecimientos

Un trabajo como este no se compone solo de pipetas, publicaciones o largos y agotadores días de recogida de muestras; también es producto de la dedicación de un gran número de personas a las cuales quiero agradecer su apoyo en esta Tesis Doctoral.

En primer lugar, me gustaría agradecer a mis directores, Valentín, Julio y Dani. Valentín, muchas gracias por tu dedicación, tu tiempo y por darme la oportunidad de desarrollarme no solo como profesional, sino como persona. Sin tu entusiasmo y tus enseñanzas (ya desde la carrera), no habría llegado hasta aquí. Julio, gracias por tu paciencia, tus ideas y por enseñarme, entre otras cosas, que se me dan mal las apuestas. Dani ¿qué te voy a decir a ti? Esta ha sido una segunda tesis para ti. Aunque no lo creas, tus “A ver Noive” y otras frases míticas han quedado en un bonito recuerdo, capaz de hacernos reír en cualquier momento y lugar. Gracias por tu esfuerzo y tu amistad.

También me gustaría agradecer a los demás miembros del grupo. Maica, gracias por tu calidez y por estar siempre preocupándote por nosotros. A José, por el apoyo estadístico y tu visión “vintage” sobre electrónica y la vida en general. Maikel, gracias por tus consejos sobre como sobrevivir en una tesis. Muchas gracias Raquel, por compartir tu visión filosófica de la vida. Tu frase: “es un problema de la Raquel de mañana” se ha convertido en mi mantra. Gracias también a los nuevos becarios: Miguel, Sergio y Zapico (que la fuerza os acompañe) y a Marta, Mari Tere y Maria M por compartir conmigo tanto los éxitos como los fracasos.

Por supuesto, no me iba a olvidar del personal del IGM, dado el riesgo a ser severamente linchada. A Carmen Espiniella y María Jesús, muchas gracias por vuestra ayuda, sobre todo los primeros días en los que parecía recién salida del huevo. A Carmen Agudín, aunque sea una rancia, no me he olvidado de ti. Se echa en falta tu presencia y maestría. Gracias a Fernando, mi técnico de apoyo social y emocional. Me gustaría agradecer también a

Mariví, Nuria, Camino, Sonia, Giráldez, Miguel, Pilar, Gonzalo, Pablo, Maria, Cristina, Alex y Alba (y no se si me dejo a alguien más), por todo su apoyo y consejos. Espero que algún día vuelvan los intensos debates durante el café. A los técnicos y ex-técnicos de fincas del IGM, Lucio, César, Fernándo, Guillermo, Iván y Mario; muchas gracias por evitarme traumatismos craenoencefálicos.

A mis amigos y compañeros de travesía. Marcos y Vero, me llevo vuestra amistad y la promesa de que sigamos con nuestras aventuras. Aunque nos llamen dramáticos, nosotros nos entendemos y, al final, sabemos que todos esos dramas se acabarán convirtiendo en una anécdota. A los integrantes de “Españoles por el mundo”, Elora, la arandina; Maria C, la catalana; Antonella, la italiana; Saúl, el leonés y a Victor, el salmantino; muchas gracias por vuestro apoyo y los buenos momentos. Ya sabéis, de la variedad nace la fuerza.

También me gustaría agradecer al personal de Neiker por la elaboración del inóculo, la vacuna inactivada de *M. bovis*, las bacterias para las infecciones *in vitro* y por el apoyo en el análisis microbiológico de las muestras. En especial, muchas gracias a Natalia, Iraia, Elena y Ainara por vuestros consejos y vuestra ayuda durante mi estacia allí.

Gracias a CZ Veterinaria, por cedernos la vacuna de Silirum® y preparar las cepas vacunales y los adyuvantes. También agradecer a la veterinaria Idoia Pernía, por la selección del rebaño y la obtención de los animales de experimentación.

Obviously, I would like to thank the Moredum staff, especially Sean and Gary, for their time and lessons on cell culture. Also, thanks to Mark, for his kind welcome and to Elissa, for her company during my stay.

Tampoco me olvido de vosotros, Oscar y Vicky, mis compas de la carrera. Que la distancia nunca sea la excusa que nos separe.

Por último, agradecer a mis dos Little Families: los Cantabruco (mejor llamados Cantabrones), por los buenos momentos vividos y por vivir. Por otro lado, a mi familia leonesa, por adoptarme y aguantarme. A Adri, gracias por estar siempre cerca y acompañarme durante estos años tanto en los buenos como en los malos momentos. A Cris, mi hermana adoptiva, simplemente no se que haría sin ti. Gracias por ser como eres.

Finalmente, a mis padres, gracias por todo vuestro esfuerzo, por aguantarme y acompañarme en todas las dificultades que se me han podido presentar. Sin vosotros no lo habría conseguido. A mis tias, por vuestras bromas y risas, que siempre son capaces de arrancarme una sonrisa en los momentos de mayor estrés. A mi abuelo; quién diría que hace tantos años una frase tan simple como “yo se que tu puedes” me habría ayudado tanto. Para mí, sigues estando presente.

.....

A todos vosotros,
Gracias

“La vida no es fácil para ninguno de nosotros. Debemos tener perseverancia y, sobre todo, confianza en nosotros mismos. Debemos creer que estamos dotados para algo y que esto debe ser alcanzado”

Marie Curie

Esta Tesis Doctoral ha sido redactada en formato de **compendio de publicaciones** y siguiendo la normativa para la obtención de la **Mención Internacional del título de Doctor**. A continuación, se detallan las referencias bibliográficas de las 4 publicaciones que se integran en la presente Tesis Doctoral:

Publicación I: Arteche-Villasol, N., Benavides, J., Espinosa, J., Vallejo, R., Royo, M., Ferreras, M.C., Pérez, V., Gutiérrez-Expósito, D., 2020. Optimized *in vitro* isolation of different subpopulation of immune cells from peripheral blood and comparative techniques for generation of monocyte-derived macrophages in small ruminants. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 230, 110131.

- Índice de impacto: 2,046
- Cuartil: Q2
- Ranking: 46/146 (Veterinary Sciences)
- Open Access: No
- DOI: 10.1016/j.vetimm.2020.110131

Publicación II: Arteche-Villasol, N., Gutiérrez-Expósito, D., Vallejo, R., Espinosa, J., Elguezabal, N., Ladero-Auñon, I., Royo, M., Ferreras, MC., Benavides, J., Pérez, V., 2021. Early response of monocyte-derived macrophages from vaccinated and non-vaccinated goats against *in vitro* infection with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Vet. Res.* 52, 69.

- Índice de impacto: 3,699
- Cuartil: Q1
- Ranking: 7/146 (Veterinary Sciences)
- Open Access: Si
- DOI: 10.1186/s13567-021-00940-y

Publicación III: Arteche-Villasol, N., Gutiérrez-Expósito, D., Criado, M., Benavides, J., Pérez, V. Effect of paratuberculosis vaccination on the *in vitro* release of neutrophils extracellular traps in a sheep model.

- Enviado para su publicación.

Publicación IV: Arteche-Villasol, N., Gutiérrez-Expósito, D., Elguezabal, N., Sevilla, I.A., Vallejo, R., Espinosa, J., Ferreras, M.C., Benavides, J., Pérez, V., 2021. Influence of heterologous and homologous vaccines, and their components, on the host immune response and protection against experimental caprine paratuberculosis. *Front. Vet. Sci.* 8, 744568.

- Índice de impacto: 3,412
- Cuartil: Q1
- Ranking: 9/146 (Veterinary Sciences)
- Open Access: Si
- DOI: 10.3389/fvets.2021.744568

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE ABREVIACIONES	iv
ÍNDICE DE FIGURAS.....	x
ÍNDICE DE TABLAS	xi
Capítulo I: Resumen/ <i>Summary</i>	1
Capítulo II: Introducción Paratuberculosis	13
1. Etiología.....	15
1.1. Características generales.....	15
1.2. Cepas de <i>Map</i>	16
1.3. Persistencia en el medio	17
2. Epidemiología	17
3. Patogenia	20
3.1. Entrada de <i>Map</i> en el hospedador.....	21
3.2. Entrada de <i>Map</i> en los macrófagos.....	22
3.3. Establecimiento de la infección y progresión lesional	23
4. Respuesta inmunitaria	27
4.1. Células de la respuesta inmunitaria: interacción <i>Map</i> -hospedador...	29
4.1.1. Macrófagos	29
4.1.2. Neutrófilos	35
4.1.3. Linfocitos T $\gamma\delta$	38
4.2. Respuesta inmunitaria innata.....	39

4.3. Respuesta inmunitaria adaptativa	40
4.3.1. Respuesta inmunitaria celular	42
4.3.2. Respuesta inmunitaria humoral.....	48
4.4. Respuesta inmunitaria entrenada	49
5. Cuadro clínico y lesional.....	52
5.1. Signos clínicos	52
5.2. Lesiones	53
5.2.1. Lesiones macroscópicas.....	53
5.2.2. Lesiones microscópicas	54
6. Diagnóstico.....	58
7. Importancia económica y salud pública.....	59
8. Tratamiento y medidas de control.....	60
9. Vacunación.....	61
9.1. Tipos de vacunas frente a micobacterias	62
9.1.1. Vacunas vivas atenuadas.....	63
9.1.2. Vacunas inactivadas.....	65
9.1.3. Vacunas de subunidades	66
9.1.4. Vacunas de ADN	67
9.2. Adyuvantes	67
9.3. Eficacia y efectos de la vacunación.....	70
9.4. Respuesta inmunitaria asociada a la vacunación.....	71

9.4.1. Estudios <i>in vivo</i>	72
9.4.2. Estudios <i>in vitro</i>	75
Capítulo III: Justificación y objetivos.....	81
Capítulo IV: Resultados (Publicaciones)/ <i>Results (Publications)</i>.....	91
Estudio 1.....	93
Estudio 2.....	97
Estudio 3.....	101
Estudio 4.....	105
Capítulo V: Discusión general	109
Capítulo VI: Conclusiones/ <i>Conclusions</i>	127
Capítulo VII: Bibliografía.....	133

ÍNDICE DE ABREVIACIONES

ACF/CFA	adyuvante completo de Freund/ complete Freund's adjuvant
AdjHI	animales inmunizados con el adyuvante Montanide™ de HIMB e infectados/ Montanide™ HIMB adjuvant immunized and infected animals
AdjSI	animales inmunizados con el adyuvante Montanide™ de Silirum® e infectados/ Montanide™ Silirum® adjuvant immunized and infected animals
ADN/DNA	ácido desoxirribonucleico/ desoxyribonucleic acid
AIC	criterio de información de Akaike/ Akaike information criterion
AM	método de adherencia/ adherence method
ARN/RNA	ácido ribonucleico/ ribonucleic acid
AS	especie animal/ animal species
ASA/SAA	amiloide sérico A/ serum amyloid A
AUS	suero autólogo/ autologous serum
BAAR/AFB	bacterias ácido-alcohol resistentes/ acid-fast bacilli
BCG	bacilo Calmette et Guérin/ bacillus Calmette et Guérin
BCR	receptor de células B/ B cell receptor
BHI	caldo infusión cerebro corazón/ brain heart infusion broth
BSA	albúmina de suero bovino/ bovine serum albumin
C	concentración/ concentration
C-	CaMØs no infectados/ non-infected CaMØs
CaMØs	macrófagos caprinos derivados de la maduración de monocitos sanguíneos/ caprine monocyte-derived macrophages
CD	grupo de diferenciación/ cluster of differentiation
cDNA	ADN complementario/ complementary DNA
CE	estimulación de células/ cell stimulation
CF	fenotipo celular/ cell phenotype

CMH/MHC	complejo mayor de histocompatibilidad/ major histocompatibility complex
CO₂	dióxido de carbono/ carbon dioxide
CPAs/APCs	células presentadoras de antígeno/ antigen presenting cells
CR	receptores del complemento/ complement receptors
CT	tipo celular/ cell type
Ct	ciclos de umbral/ threshold cycles
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol / 4',6-diamidino-2-phenylindole
DIVA	diferenciación entre animales infectados y animales vacunados/ differentiation between infected and vaccinated animals
dpv	días post-vacunación/ days post-vaccination
EC	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	ácido etilendiaminetetraacético/ ethylenediaminetetraacetic acid
ELISA	ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas/ enzyme-linked immunosorbent assay
FAP	proteínas de acoplamiento a la fibronectina/ fibronectin attachment proteins
FITC	isotiocianato de fluoresceína/ fluorescein isothiocyanate
FN	fibronectina/ fibronectin
FoxP3	forkhead box P3
FSC	detector frontal/ forward scatter
g	fuerza g/ g-force
GLMs	modelos lineales generalizados/ generalized linear models
GM-CSF	factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos/ granulocyte macrophages colony-stimulating factor
h	horas/ hours
H₂O₂	peróxido de hidrógeno/ hydrogen peroxide
HIMB	vacuna inactivada de <i>Mycobacterium bovis</i> / heat-inactivated <i>Mycobacterium bovis</i> vaccine

Hp	haptoglobina/ haptoglobin
Hsp	proteínas de choque térmico/ heat-shock proteins
IC	columnas inmunomagnéticas/ immunomagnetic columns
ICLN	nódulo linfático ileocecal/ ileocecal lymph node
ICV	válvula ileocecal/ ileocecal valve
IFN-γ	interferón gamma/ interferon gamma
Ig	inmunoglobulina/ immunoglobulin
IGRA	prueba de la liberación de IFN- γ / interferon-gamma release assay
IL	íleon/ ileum
IL-	interleuquina/ interleukin
iNOS	enzima óxido nítrico sintasa inducible/ inducible nitric oxide synthase
IT	método de aislamiento/ isolation technique
JJ	yeyuno/ jejunum
JLN	nódulo linfático yeyunal/ jejunal lymph node
JPP	placas de Peyer yeyunales/ jejunal Peyer's patches
LAM	lipoarabinomanan/ lipoarabinomannan
Lamp	proteína de membrana asociada al lisosoma/ lysosome-associated membrane protein
LM	modelo lineal/ linear model
LPS	lipopolisacárido/ lipopolysaccharide
M1	macrófagos clásicamente activados/ classically activated macrophages
M2	macrófagos alternativamente activados/ alternatively activated macrophages
Maa	<i>Mycobacterium avium</i> subespecies <i>avium</i>
Mah	<i>Mycobacterium avium</i> subespecies <i>hominissuis</i>
Man	manosa/ mannose

Map	<i>Mycobacterium avium</i> subespecies <i>paratuberculosis</i>
MAPK-p38	proteína kinasa activada por mitógeno p38/ mitogen-activated protein kinase p38
Mas	<i>Mycobacterium avium</i> subespecies <i>silvaticum</i>
Mbv	<i>Mycobacterium bovis</i>
MDMs	macrófagos derivados de la maduración de monocitos sanguíneos/ monocyte-derived macrophages
MGIAs	ensayos de inhibición del crecimiento micobacteriano/ mycobacterial growth inhibition assays
min	minutos/minutes
MIP	proteína inflamatoria de macrófagos/ macrophage inflammatory protein
MJ	micobactina J/ mycobactin J
MLN	nódulo linfático mesentérico/ mesenteric lymph node
MOI	dosis de infección/ multiplicity of infection
MPO	mieloperoxidasa/ myeloperoxidase
NE	elastasa de neutrófilos/ neutrophils elastase
NETs	trampas extracelulares de neutrófilos/ neutrophil extracellular traps
NK	natural killer
NLRs	receptores NOD-like/ NOD-like receptors
NO	óxido nítrico/ nitric oxide
NOD	dominio de oligomerización de nucleótidos/ nucleotide oligomerization domain
NV	animales no vacunados y no infectados/ nonvaccinated and noninfected animals
NVI	animales no vacunados e infectados/ nonvaccinated and infected animals
OADC	oleico-albúmina-dextrosa-catalasa/ oleic-albumin-dextrose-catalase
O.D.	valores de densidad óptica/ optical density values
OMS/WHO	organización mundial de la salud/ world health organization

PAMPs	patrones moleculares asociados a patógenos/ pathogen-associated molecular patterns
PBMCs	células mononucleares aisladas a partir de sangre periférica/ peripheral blood mononuclear cells
PBS	solución salina tamponada con fosfato/ phosphate-buffered saline
PCR	reacción en cadena de la polimerasa/ polymerase chain reaction
PPDa	proteína derivada del antígeno aviar/ protein derivative of avian antigen
PPDb	proteína derivada del antígeno bovino/ protein derivative of bovine antigen
PPE	prolina-prolina-glutamato/ proline-proline-glutamate
PRRs	receptores de reconocimiento de patrones/ pattern recognition receptors
PT	técnica de purificación/ purification technique
qPCR	PCR cuantitativa/ quantitative PCR
RBC	células de la fracción roja/ red blood cells
RNI	especies reactivas del nitrógeno/ reactive nitrogen intermediates
ROS	especies reactivas del oxígeno/ reactive oxygen species
RT-PCR	reacción en cadena de la polimerasa con reverso transcripción/ reverse transcriptase polymerase chain reaction
s	segundos/ seconds
SA	<i>Staphylococcus aureus</i>
SFB/FBS	suero fetal bovino/ fetal bovine serum
SLC11A1	solute carrier family 11 member A1
SOD	superóxido dismutasa/ superoxide dismutase
SSC	detector lateral/ side scatter
StrHI	animales inmunizados con la cepa 1403 de <i>Mbv</i> (HIMB) e infectados/ <i>Mbv</i> 1403 HIMB strain immunized and infected animals
StrSI	animales inmunizados con la cepa 316F de <i>Map</i> (Silirum [®]) e infectados/ <i>Map</i> 316F Silirum [®] strain immunized and infected animals

Tc	linfocitos T citotóxicos/ cytotoxic T lymphocytes
Th	linfocitos T colaboradores/ helper T lymphocytes
TGF-β	factor de crecimiento tumoral beta/ transforming growth factor beta
TLR	receptores Toll-Like/ Toll-Like receptors
<i>Tm</i>	pico de disociación/ dissociation peak
TNF-α	factor de necrosis tumoral alfa/ tumor necrosis factor alpha
T-regs	linfocitos T reguladores/ regulatory T cells
TRITC	tetrametilrodamina/ tetramethylrhodamine
UFCs/CFUs	unidades formadoras de colonias/ colony forming units
VH	animales vacunados con HIMB y no infectados/ HIMB vaccinated and noninfected animals
VHI	animales vacunados con HIMB e infectados/ HIMB vaccinated and infected animals
VS	animales vacunados con Silirum [®] y no infectados/ Silirum [®] vaccinated and noninfected animals
VSI	animales vacunados con Silirum [®] e infectados/ Silirum [®] vaccinated and infected animals
WCI	workshop cluster 1
WDG	sin gradientes de densidad/ without density gradients
YMa	rendimiento de MDMs/ yield of MDMs
YMat	rendimiento de la maduración de MDMs/ yield of MDMs maturation
YMo	rendimiento de monocitos/ yield of monocytes

ÍNDICE DE FIGURAS

Capítulo II: Introducción

Figura 1. Transmisión, establecimiento y progresión de la infección por <i>Map</i>	26
Figura 2. Activación y regulación de las respuestas inmunitarias innata y adaptativa.....	28
Figura 3. Representación de la heterogeneidad fenotípica y funcional de los macrófagos.....	31

ÍNDICE DE TABLAS

Capítulo II: Introducción

Tabla 1. Detección de <i>Map</i> en rumiantes silvestres.....	19
Tabla 2. Detección de <i>Map</i> en especies monogástricas.....	20
Tabla 3. Clasificación lesional en ganado ovino según Pérez et al. (1996).....	55
Tabla 4. Clasificación lesional en ganado caprino según Corpa et al. (2000b).....	56
Tabla 5. Clasificación lesional en ganado bovino según González et al. (2005).....	57

Capítulo I: Resumen/ *Summary*



RESUMEN

La paratuberculosis es una enfermedad crónica de los rumiantes causada por la bacteria intracelular *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* (*Map*). Hasta el momento, la vacunación ha sido considerada el método de control con una mejor relación coste-beneficio, al reducir la aparición de nuevos casos clínicos y la excreción fecal de bacilos. No obstante, su efecto protector es incompleto y aún no se conoce en profundidad cómo influye sobre la patogenia de la enfermedad y la respuesta inmunitaria del hospedador. Además, la vacunación frente a paratuberculosis se ha asociado con un efecto protector inespecífico frente a otras infecciones, relacionadas o no con micobacterias, un fenómeno que podría ser causado por el establecimiento de lo que se conoce como respuesta inmunitaria entrenada. Esta respuesta está mediada por células de la respuesta inmunitaria innata, como los macrófagos, células dianas de *Map*, o los neutrófilos. Teniendo en cuenta el número limitado de trabajos destinados a estudiar las características de la respuesta protectora tras la vacunación, el objetivo general de esta Tesis Doctoral consiste en investigar su influencia en la respuesta inmunitaria del hospedador, tratando de esclarecer aquellos factores relacionados con la protección.

Para poder realizar posteriormente estudios *in vitro* sobre el efecto de la vacunación en la actividad de neutrófilos y macrófagos, el primer estudio de esta Tesis consistió en establecer un protocolo estandarizado y efectivo para el aislamiento simultáneo de células mononucleares a partir de sangre periférica (PBMCs) y neutrófilos, así como la purificación de monocitos y la obtención de macrófagos derivados de monocitos (MDMs), a partir de sangre periférica de ovejas y de cabras. Para ello, se compararon distintas técnicas de aislamiento o purificación, así como diversas condiciones de cultivo para la maduración de monocitos. La estimación del rendimiento de cada protocolo,

la pureza y las características fenotípicas de las poblaciones celulares obtenidas se determinaron mediante recuento celular en cámara de Neubauer, microscopía y citometría de flujo. La mezcla de las capas de leucocitos y de células rojas durante la separación con Lymphoprep™ permitió aislar un gran número de PBMCs y neutrófilos con una elevada pureza a partir de la misma muestra de sangre. Por otro lado, se observó que las columnas inmunomagnéticas proporcionan un buen rendimiento (nº monocitos/nº inicial de PBMCs) en la obtención de monocitos con una elevada pureza, determinado también mediante el porcentaje de células CD14⁺, CMH-II⁺ y CD11b⁺. Estos valores fueron superiores a los encontrados en los monocitos purificados mediante adherencia, debido a la presencia de un mayor número de linfocitos contaminantes empleando esta última técnica que, sin embargo, no interfirió en la maduración de monocitos a macrófagos, ya que el número final de MDMs fue superior en los monocitos aislados mediante adherencia. Posteriormente, la suplementación de los cultivos de monocitos con concentraciones crecientes de GM-CSF incrementó de manera proporcional el número de MDMs en comparación con el suero autólogo. Por lo tanto, siguiendo el protocolo establecido en este estudio es posible realizar el aislamiento simultáneo de PBMCs y neutrófilos con una elevada eficiencia y pureza. Así mismo, estos PBMCs son aptos para la purificación de monocitos y la obtención de MDMs con cualquiera de las técnicas analizadas, según las necesidades del experimento y siguiendo las condiciones de maduración establecidas. En este caso, se eligió la técnica de adherencia para la purificación de monocitos por ser la que proporcionó un mayor número de MDMs.

El segundo estudio de la Tesis se centró en estudiar el efecto de la vacuna inactivada Silirum® sobre la respuesta inmunitaria generada en los macrófagos un mes después de la vacunación. Se emplearon CaMØs (MDMs caprinos) procedentes de cabras vacunadas con Silirum® y sin vacunar, e infectadas *in*

vitro con *Map*, tras lo cual se determinó la viabilidad de *Map* y su cuantificación mediante cultivo bacteriológico y reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR), respectivamente. Además, también se analizaron los niveles de expresión de distintas citoquinas pro y antiinflamatorias e iNOS mediante PCR con transcripción inversa (RT-qPCR) y se estimó el número de CaMØs infectados, así como el grado de infección, mediante inmunofluorescencia. Estas pruebas reflejaron una reducción significativa de la viabilidad de *Map* en los sobrenadantes y los CaMØs procedentes de las cabras vacunadas, que se acompañaba de un mayor porcentaje de infección y un mayor número de bacterias internalizadas en los CaMØs de este mismo grupo en comparación con los no vacunados. Además, los CaMØs procedentes de animales vacunados mostraban una mayor expresión de iNOS (acción proinflamatoria) e IL-10 (antiinflamatoria), mientras que solo la expresión MIP- β (proinflamatoria) se encontraba elevada en los animales no vacunados. Estos resultados sugieren que la vacunación frente a paratuberculosis modifica la respuesta de los CaMØs, de forma que aumentan su capacidad fagocítica y antimicrobiana frente a *Map*, lo que aparece asociado a una mayor producción de citoquinas con acción tanto pro como antiinflamatoria.

El tercer estudio de la Tesis tuvo como fin valorar el efecto de la administración de Silirum[®] sobre la generación de trampas extracelulares de neutrófilos (NETs) en respuesta a la infección *in vitro* con *Map* y otros patógenos no relacionados con micobacterias. Para ello, se utilizaron ovejas vacunadas y sin vacunar, a partir de las cuales se aislaron neutrófilos sanguíneos que fueron infectados *in vitro* con *Map*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. Se analizó la formación de NETs por medio de la visualización mediante inmunofluorescencia del ADN, la mieloperoxidasa y la elastasa, y se llevó a cabo una cuantificación del ADN extracelular (PicoGreen[™]) mediante fluorimetría. Estas pruebas demostraron que la

infección con *Map* es capaz de estimular la liberación de NETs, aunque en menor medida que *S. aureus* y *E. coli*. No obstante, no se detectaron diferencias entre las ovejas vacunadas y las no vacunadas, independientemente de la infección y del tiempo post-vacunación. Estos resultados sugieren que la liberación de NETs no jugaría un papel importante en la respuesta inmune protectora tras la vacunación frente a paratuberculosis, al menos durante el primer mes post-vacunación. No obstante, es posible que otros mecanismos antimicrobianos desarrollados por estas células y no analizados en este estudio, puedan estar implicados en esta respuesta.

El cuarto y último estudio consistió en valorar el efecto que tiene la vacunación homóloga (frente a paratuberculosis) o heteróloga (frente a tuberculosis) sobre la respuesta inmunitaria y la protección en cabritos infectados de forma experimental con *Map*, y conocer el papel que puede jugar cada uno de los componentes de estas vacunas. Con este fin, se emplearon cabritos de un mes de edad divididos en varios grupos en función de la vacunación (Silirum[®], HIMB-vacuna inactivada frente a *Mbv* o no vacunados), inmunización (bacterias inactivadas o adyuvantes) y/o infección. A los 45 días post-vacunación, los animales fueron infectados oralmente con *Map* y, posteriormente, sacrificados a los 190 días post-vacunación. Mensualmente, se recogieron muestras de sangre para la determinación de la respuesta inmunitaria periférica y la proporción de subpoblaciones linfocitarias mediante la prueba de liberación de IFN- γ (IGRA) o la detección de anticuerpos (ELISA), y citometría de flujo, respectivamente. Además, tras el sacrificio, se recogieron muestras de heces (cultivo bacteriológico) y de intestino y nódulos linfáticos asociados para la valoración de la producción local de IFN- γ (IGRA), la detección de *Map* (qPCR y cultivo bacteriológico), el estudio de las subpoblaciones linfocitarias (citometría de flujo) y el examen histológico. En todos los grupos de animales infectados se observaron lesiones granulomatosas, independientemente de la vacunación o la inmunización. Sin

embargo, los grupos vacunados con Silirum[®] (frente a *Map*) o HIMB (frente a *Mbv*) mostraron una considerable reducción del número y la gravedad de dichas lesiones, que se acompañaba de una elevada respuesta celular y humoral periféricas. También se observó una disminución del número de granulomas en los animales inmunizados con las cepas vacunales y los adyuvantes en comparación con el grupo no vacunado e infectado. Cabe destacar que esta reducción fue incluso mayor en las cabras a las que se les administró el adyuvante, en comparación con aquellas que fueron inmunizadas con cepas vacunales. Por otro lado, no se observaron diferencias en la proporción periférica o local de las diferentes subpoblaciones de linfocitos, ni en la respuesta inmunitaria local, entre los grupos establecidos.

A la luz de estos resultados, tanto la vacunación frente a paratuberculosis como a tuberculosis ofreció una protección homóloga y heteróloga, respectivamente, contra la infección por *Map*. Además, los animales inmunizados con el adyuvante experimentaron una reducción del número de lesiones, no asociada a la presencia de una respuesta inmunitaria específica frente a *Map* detectable, que podría estar mediada por un mecanismo de inmunidad inespecífica que necesita ser esclarecido.

SUMMARY

Paratuberculosis is a chronic disease of ruminants caused by the intracellular bacteria *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (*Map*). Currently, vaccination has been considered the most cost-effective control method that achieves a reduction on the onset of new clinical cases and the fecal shedding of bacilli. However, its protective effect is incomplete and how it influences the pathogenesis of the disease and the immune response of the host is still not fully understood. Furthermore, vaccination against paratuberculosis has been associated with a nonspecific protective effect against other infections, related or not to mycobacteria, a phenomenon that could be caused by the establishment of what is known as a trained immune response. This response is mediated by cells of the innate immune response, such as macrophages, the target cells of *Map*, or neutrophils. Bearing in mind the reduced number of works aimed at studying the characteristics of the protective response induced by paratuberculosis vaccination, the general objective of this Doctoral Thesis is to investigate its influence on the immune response of the host, attempting to clarify those factors related to protection.

Subsequently, in order to carry out *in vitro* studies on the effect of vaccination on the activity of neutrophils and macrophages, the first study of this Thesis was aimed to the establishment of a standardized and effective protocol for the simultaneous isolation of mononuclear cells from peripheral blood (PBMCs) and neutrophils, as well as the purification of monocytes and the obtaining of monocyte-derived macrophages (MDMs) from peripheral blood of sheep and goats. For that purpose, different isolation or purification methods were compared, as well as culture conditions for the maturation of monocytes. The estimation of the yield of each protocol, the purity and the phenotypic characteristics of the cell populations obtained were determined by

cell counting in a Neubauer chamber, microscopy and flow cytometry. The mixture of the buffy coat and red cell layers during the Lymphoprep™ separation allowed the isolation of a large number of PBMCs and neutrophils with a high purity from the same blood sample. Besides, it was observed that the immunomagnetic columns provide a high monocyte yield (number of monocytes/initial number of PBMCs) with high purity, also determined by the percentage of CD14⁺, MHC-II⁺ and CD11b⁺ cells. These values were higher than those found in adherence-purified monocytes, due to the presence of a greater number of contaminating lymphocytes using the latter, which, however, did not interfere in the maturation of monocytes to macrophages, since the final number of MDMs was higher in monocytes isolated by adherence. Subsequently, the supplementation of monocyte cultures with increasing concentrations of GM-CSF, proportionally increased the number of MDMs compared to the incubation with autologous serum. Therefore, following the protocol established in this study, it is possible to perform the simultaneous isolation of PBMCs and neutrophils with high efficiency and purity. Likewise, these PBMCs are suitable for the purification of monocytes and the obtaining of MDMs with any of the purification techniques analyzed, according to the needs of the experiment, and following the established maturation conditions. In this case, the adherence technique was chosen for the purification of monocytes as it was the one that provided a greater number of MDMs.

The second study of the Thesis was focused on the assessment of the effect of the inactivated Silirum® vaccine on the immune response generated in macrophages one month after vaccination. CaMØs (goat MDMs) from goats vaccinated and non-vaccinated with Silirum® and infected *in vitro* with *Map* were used, whereupon the viability of *Map* and its quantification by bacteriological culture and quantitative polymerase chain reaction (qPCR) were determined, respectively. In addition, the expression levels of different

pro and anti-inflammatory cytokines and iNOS were also analyzed by reverse transcription (RT-qPCR), and the number of infected CaMØs, as well as the degree of infection, were estimated by immunofluorescence. These assays reflected a significant reduction in the viability of *Map* in the supernatants and CaMØs from vaccinated goats, which was accompanied by the presence of a higher percentage of infection and a higher number of internalized bacteria in the CaMØs of this same group in comparison with the non-vaccinated ones. In addition, CaMØs from vaccinated animals showed higher expression of iNOS (pro-inflammatory action) and IL-10 (anti-inflammatory), while only MIP- β (pro-inflammatory) expression was increased in non-vaccinated animals. These results suggest that vaccination against paratuberculosis modifies the response of CaMØs, so they increase their phagocytic and antimicrobial capacity against *Map*, which is associated with a greater production of cytokines with both pro and anti-inflammatory action.

The purpose of the third study of the Thesis was to assess the effect of the administration of Silirum[®] on the generation of extracellular neutrophil traps (NETs) in response to *in vitro* infection with *Map* and other non-mycobacterial pathogens. For this reason, blood neutrophils from vaccinated and non-vaccinated sheep were isolated and infected *in vitro* with *Map*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. The formation of NETs was analyzed by visualization of DNA, myeloperoxidase and elastase by immunofluorescence microscopy and a quantification of extracellular DNA (PicoGreen[™]) was carried out by fluorimetry. These assays demonstrated that *Map* infection is able to stimulate the release of NETs, although to a lesser extent than *S. aureus* and *E. coli*. However, no differences were detected between vaccinated and non-vaccinated sheep, regardless of infection and post-vaccination days. These results suggest that the release of NETs would not play an important role in the protective immune response after vaccination against paratuberculosis, at least during the first month after vaccination.

However, it is possible that other antimicrobial mechanisms developed by these cells and not analyzed in this study may be involved in this response.

The objective of the fourth and last study was the evaluation of the effect of homologous (against paratuberculosis) or heterologous (against tuberculosis) vaccination on the immune response and protection in goat kids experimentally infected with *Map*, discerning the effect of each of the components of these vaccines. For this purpose, one-month-old kids were divided into several groups according to vaccination (Silirum[®], HIMB-inactivated vaccine against *Mbv* or non-vaccinated), immunization (inactivated bacteria or adjuvants) and/or infection. At 45 days post-vaccination, animals were orally infected with *Map* and, subsequently, sacrificed at 190 days post-vaccination. Monthly, blood samples were collected for determination of peripheral immune response and the proportion of lymphocyte subpopulations by IFN- γ release test (IGRA), antibody detection (ELISA), and flow cytometry, respectively. In addition, after sacrifice, fecal samples (bacteriological culture) and intestinal tissue and associated lymph nodes were collected for the assessment of the local production of IFN- γ (IGRA), the detection of *Map* (qPCR and bacteriological culture), the study of lymphocyte subpopulations (flow cytometry) and histological examination. Granulomatous lesions were detected in all the infected groups, regardless of vaccination or immunization. However, in those vaccinated with Silirum[®] (against *Map*) or HIMB (against *Mbv*), a considerable reduction in the number and severity of these lesions was recorded, which was accompanied by a heightened cellular and peripheral humoral responses. There was also a decrease in the number of granulomas in the animals immunized with the vaccine strains and adjuvants compared to the non-vaccinated and infected group. It should be noted that this reduction was even greater in goats in which only the adjuvant was administered, compared to those that were immunized with vaccine strains. Besides, no differences

were observed in the peripheral or local proportion of the different subpopulations of lymphocytes, nor in the local immune response, between the established groups.

In the light of these results, both vaccination against paratuberculosis and tuberculosis induced homologous and heterologous protection, respectively, against *Map* infection. Furthermore, the animals immunized with the adjuvants experienced a reduction in the number of lesions, not associated with the presence of a specific immune response against *Map*, which could be mediated by a nonspecific immunity mechanism that needs to be elucidated.

Capítulo II: Introducción Paratuberculosis



1. Etiología

La primera descripción del agente causal de la paratuberculosis se realizó a finales del siglo XIX tras el aislamiento e identificación de bacilos ácido-alcohol resistentes (BAAR) en el intestino de una vaca negativa al test de la tuberculina, pero con signos clínicos y lesiones microscópicas compatibles con una tuberculosis intestinal (John e y Frothingham, 1895). El agente responsable de la enfermedad se denomina actualmente *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* (*Map*) (Thorel et al., 1990) y se clasifica taxonómicamente dentro del Reino *Bacteria* que engloba a la división *Firmicutes*, clase *Actinobacteria*, subclase *Actinobacteridae*, orden *Actinomycetales*, suborden *Corynebacterinae*, familia *Mycobacteriaceae* y género *Mycobacterium* (Stackebrandt et al., 1997).

Map tiene una elevada homología con otras especies de micobacterias, por lo que fue incluida dentro del complejo *Mycobacterium avium* (Thorel et al., 1990), que engloba un total de 4 subespecies: *Map*, *Mycobacterium avium* subespecie *avium* (*Maa*), *Mycobacterium avium* subespecie *silvaticum* (*Mas*) y *Mycobacterium avium* subespecie *hominissuis* (*Mah*) (Saxegaard et al., 1988; Thorel et al., 1990; Kunze et al., 2000; Rindi y Garzelli, 2014).

1.1. Características generales

Map es una bacteria intracelular de pequeño tamaño (0,5-1,5 μm), Gram positiva y ácido-alcohol resistente. Presenta un metabolismo aerobio facultativo y un crecimiento *in vitro* lento que varía entre las 3 y las 14 semanas, para lo que es necesaria la suplementación del medio de cultivo con micobactina J (MJ), un sideróforo presente en el interior de las bacterias que tiene como función el secuestro de hierro, necesario para su crecimiento, y que permite su diferenciación de otras micobacterias como *Maa* (Francis et

al., 1953; Merkal y Curran, 1974; Barclay y Ratledge, 1983). Morfológicamente, las unidades formadoras de colonias (UFCs) son pequeñas (0,5 mm), lisas y translúcidas (Merkal y Curran, 1974; Whittington et al., 2011).

1.2. Cepas de *Map*

El reconocimiento de las diversas cepas de *Map* se estableció inicialmente con base a las diferencias fenotípicas asociadas a (i) la velocidad de crecimiento en el cultivo, (ii) características morfológicas de las UFCs (pigmentadas o no) y (iii) la dependencia de la micobactina (Chiodini et al., 1984). Posteriormente, se emplearon estudios genéticos (Collins et al., 1990; Pavlik et al., 1999; Whittington et al., 2000b; Stevenson et al., 2002) basados en el análisis de la secuencia de inserción *IS900*, de 1451 pares de bases, específica de *Map* (Green et al., 1989), lo que permitió diferenciar dos grupos principales de cepas que estaban estrechamente relacionadas con la especie animal infectada, conocidas como tipo S “Sheep” o I (ovino) y tipo C “Cattle” o II (bovino) (Collins et al., 1990). Las cepas tipo C abarcan un mayor rango de hospedadores, incluyendo, además del ganado bovino, el caprino y los ruminantes silvestres (Whittington et al., 2000b; Motiwala et al., 2004). En cambio, las cepas tipo S afectan principalmente a las ovejas, aunque en ambos casos es posible la transmisión cruzada (Whittington et al., 2001; Verna et al., 2007). Sin embargo, se ha comprobado que, además de existir diferencias de virulencia entre cepas, la patogenia de la infección varía en función de la especie animal que se infecta (Verna et al., 2007; Fernández et al., 2014; Stevenson, 2015), de forma que corderos infectados con cepas de tipo S mostraron lesiones granulomatosas en el tejido linfoide, sin diferencias en la gravedad a lo largo del tiempo, mientras que los infectados con cepas de tipo C desarrollaron lesiones más graves, pero de carácter regresivo, con fibrosis,

cuya intensidad disminuía a medida que avanzaba la infección (Fernández et al., 2014).

Más tarde, se describió una cepa intermedia o tipo III con características tanto del tipo C como del tipo S (de Juan et al., 2005, 2006a). Esta cepa tiene una velocidad crecimiento y características similares a las de las cepas tipo S, pero presenta un rango más amplio de hospedadores (de Juan et al., 2006a, 2006b; Biet et al., 2012).

1.3. Persistencia en el medio

Una de las principales características de *Map* es su elevada resistencia en el medio, lo cual dificulta los programas de control y erradicación (Whittington et al., 2004; Eppleston et al., 2014). Se ha estimado que es capaz de sobrevivir hasta 246 días en las heces (Lovell et al., 1944), de 2-55 semanas en el suelo (Whittington et al., 2004; Eppleston et al., 2014) y de 1 a 9 meses en el agua (Lovell et al., 1944; Whittington et al., 2005). Además, esta micobacteria es muy resistente a condiciones climáticas adversas (p.ej. lluvia, desecación y congelación), a la radiación ultravioleta y al cloro (Whan et al., 2001; Whittington et al., 2004; Shin et al., 2008; Donaghy et al., 2009). Asimismo, su capacidad para formar biofilms en superficies húmedas también parece favorecer su supervivencia en el medio (Bolster et al., 2009; Beumer et al., 2010; Cook et al., 2010).

2. Epidemiología

La paratuberculosis en rumiantes domésticos es una enfermedad cosmopolita que puede llegar a alcanzar prevalencias en rebaños de entre el 30 % y el 50 % (Reviriego et al., 2000; Diéguez et al., 2007; Velasova et al., 2017) y que se asocia a importantes pérdidas económicas debidas

principalmente al sacrificio prematuro de los animales y el descenso en su productividad (Rasmussen et al., 2021). No obstante, la prevalencia varía enormemente en función del país, la especie animal, la aptitud del rebaño, la edad de los animales, las medidas de manejo y los métodos de diagnóstico empleados (Nielsen y Toft, 2009; Bauman et al., 2016; Camanes et al., 2018; Rasmussen et al., 2021).

Los estudios sobre esta enfermedad se han centrado principalmente en el ganado bovino, ovino y caprino (Windsor, 2015; Fecteau, 2018). Sin embargo, numerosas especies de rumiantes silvestres (Tabla 1) y de animales monogástricos (domésticos y silvestres) (Tabla 2) también son susceptibles a la infección y pueden actuar como reservorios, favoreciendo su diseminación y transmisión a los rumiantes domésticos (Pavlik et al., 2000; Machackova et al., 2004; Robino et al., 2008). En este sentido, el conejo se ha sugerido que podría jugar un papel relevante en la epidemiología de la paratuberculosis dado el elevado número de animales infectados que se han encontrado en algunos lugares como Escocia (67 %) (Greig et al., 1997; Shaughnessy et al., 2013). De hecho, se ha observado una estrecha relación entre la presencia de *Map* en rebaños de ganadería extensiva y la aparición de conejos que cohabitaban en los mismos pastos, infectados por esta micobacteria y con lesiones intestinales graves (Greig et al., 1997, 1999; Beard et al., 2001b), llegándose incluso a demostrar la transmisión e infección entre conejos y ganado bovino (Beard et al., 2001c; Daniels et al., 2001; Judge et al., 2005).

Dado que la principal vía de eliminación de *Map* son las heces, la vía de transmisión más relevante es la fecal-oral que se produce a través de la ingestión de alimentos o agua contaminados (Figura 1) (Clarke, 1997; Fecteau et al., 2013; Corbett et al., 2017). Además, los animales jóvenes (< 6 meses de edad) son los más susceptibles, pudiendo infectarse durante el amamantamiento por contacto directo con las ubres u otros materiales manchados con heces (Payne y Rankin, 1961; Larsen et al., 1975; Windsor y

Whittington, 2010). Otras vías de transmisión, como la intrauterina o la venérea, han sido poco estudiadas y se les concede poca relevancia (Ayele et al., 2004; Lambeth et al., 2004).

Debido al curso lento de la enfermedad y a que muchos animales desarrollan formas de latencia, en un rebaño donde la infección esté presente, el número de individuos en fase subclínica suele ser muy elevado en comparación con el número de animales con infección clínica, lo que se ha denominado presentación en “iceberg”. Este efecto se manifiesta en que un número reducido de animales de la granja presentan signos clínicos, mientras que el resto de animales infectados permanecen casi indetectables, si bien pueden ser excretores de *Map*. De hecho, se ha estimado que por cada animal con enfermedad clínica existen 25 animales infectados sin signos clínicos (Whitlock y Buergelt, 1996; Pérez et al., 2000).

Tabla 1. Detección de *Map* en rumiantes silvestres.

Animal	Diagnóstico				Referencia
	Serología	Cultivo	PCR	Histología	
Ciervos (<i>Cervus elaphus</i>)	Si (30,16 %)*	No	No	No	Reyes-García et al., 2008
Corzos (<i>Capreolus capreolus</i>)	No	Si (11,59 %)*	Si (28,98 %)*	Si (37,68 %)*	Robino et al., 2008
Gamos (<i>Dama dama</i>)	Si (0 %)*	Si (25 %)*	Si (25 %)*	Si (62 %)*	Marco et al., 2002
Bisontes (<i>Bison bison</i>)	No	No	Si	No	Sibley et al., 2007
Búfalos (<i>Bubalus bubalis</i>)	No	Si (4,3 %)*	Si (13 %)*	Si (27- 30 %)*	de Moraes Pereira et al., 2020
Muflones (<i>Ovis musimon</i>)	Si (1 %)*	No	No	No	López-Olvera et al., 2009
Íbices (<i>Capra ibex</i>)	No	No	Si	Si	Ferroglio et al., 2000
Camellos (<i>Camelus bactrianus</i>)	Si	No	No	No	Kramsky et al., 2000
Llamas (<i>Lama lama</i>)	Si	Si	No	No	Miller et al., 2000
Alpacas (<i>Lama pacos</i>)	Si	Si	Si	Si	Ridge et al., 1995

* Porcentaje de animales positivos respecto al total de animales analizados.

Tabla 2. Detección de *Map* en especies monogástricas.

Animal	Diagnóstico				Referencia
	Serología	Cultivo	PCR	Histología	
Cerdos (<i>Sus domesticus</i>)	No	No	Si	Si	Miranda et al., 2011
Jabalíes (<i>Sus scrofa</i>)	No	Si	No	No	Notario et al., 2010
Gatos salvajes (<i>Felis catus</i>)	No	Si	Si	No	Palmer et al., 2005
Perros (<i>Canis familiaris</i>)	No	No	Si (18 %)*	No	Glanemann et al., 2008
Zorros (<i>Vulpes vulpes</i>)	No	Si	No	Si	Beard et al., 1999
Osos pardos (<i>Ursus arctus</i>)	No	Si	Si	Si	Kopecna et al., 2006
Asnos (<i>Equus asinus</i>)	No	Si	No	Si	Dierckins et al., 1990
Conejos (<i>Oryctolagus cuniculus</i>)	No	Si (24,28 %)*	Si (24,28 %)*	Si (30 %)	Shaughnessy et al., 2013
Liebres (<i>Lepus europaeus</i>)	No	Si	No	No	Salgado et al., 2014
Armiños (<i>Mustela erminea</i>)	No	Si	No	Si	Beard et al., 1999
Cuervos (<i>Corvus corone</i>)	No	Si	No	Si	Beard et al., 2001a
Grajos (<i>Corvus frugilegus</i>)	No	Si	No	No	Beard et al., 2001a
Gorriones (<i>Passer domesticus</i>)	No	Si	No	No	Corn et al., 2005

* Porcentaje de animales positivos respecto al total de animales analizados.

3. Patogenia

A pesar de que el estudio de la patogenia de la paratuberculosis comenzó en el siglo XIX, todavía existen numerosas incógnitas relacionadas con la interacción patógeno-hospedador (Koets et al., 2015; Balseiro et al., 2019; Mallikarjunappa et al., 2021). Se incluyen los mecanismos empleados por *Map* para infectar y sobrevivir en el hospedador y la respuesta de este último para lograr su eliminación, así como la influencia del medio ambiente en ambos. Sin embargo, a la hora de estudiar la interacción entre el hospedador y el patógeno, cobran especial relevancia aquellos factores dependientes del individuo (p.ej. factores genéticos) o de la micobacteria (p.ej. mecanismos empleados por *Map* para evadir la respuesta inmunitaria), lo que aumenta la complejidad de esta interacción (Reddacliff et al., 2005; Arsenault et al., 2014).

3.1. Entrada de *Map* en el hospedador

Dado que la principal vía de entrada de *Map* es la oral, este microorganismo viaja por el tracto gastrointestinal hasta el íleon y el yeyuno donde aparecen las primeras lesiones. En estas zonas, *Map* es captado mediante endocitosis por las células M que revisten el tejido linfoide intestinal (placas de Peyer) y están especializadas en la captación de antígenos y en su transporte hacia las células presentadoras de antígeno (CPAs) subepiteliales presentes en el tejido linfoide subyacente (Figura 1) (Momotani et al., 1988; Plattner et al., 2011). Sin embargo, las células M no son su única vía de entrada, ya que en ratones y rumiantes se ha demostrado la capacidad de *Map* de invadir la mucosa a través de los enterocitos, aunque en menor medida que a través de las células M (Sangari et al., 2001; Pott et al., 2009; Ponnusamy et al., 2013).

Por otro lado, aunque no se conocen con exactitud los mecanismos implicados en la adhesión de *Map* al epitelio intestinal, se ha comprobado que está mediada por la unión entre la glicoproteína fibronectina (FN) y las proteínas de acoplamiento a la fibronectina (FAP) presentes en *Map* dando lugar al complejo FN/FAP (Valentin-Weigand y Moriarty, 1992; Secott et al., 2001, 2002, 2004). Además, las células M del hospedador, a diferencia del resto de enterocitos, presentan una gran densidad de receptores transmembrana denominados $\beta 1$ integrinas (Figura 1) que actúan como receptores de la fibronectina (Secott et al., 2004).

La mayor susceptibilidad a la infección observada en animales jóvenes se ha relacionado con la presencia en estos de una mayor superficie de placas de Peyer (células M) o “vías de entrada”, cuyo número tiende a reducirse con la edad, sobre todo en el tramo ileal (Payne y Rankin, 1961; Reynolds y Morris, 1983; McGregor et al., 2012). Además, la mayor permeabilidad del intestino en las primeras etapas de vida podría facilitar el paso de *Map* durante la

ingestión del calostro (Momotani et al., 1988; Patel et al., 2006). Sin embargo, se ha demostrado que los animales adultos también se pueden infectar (Delgado et al., 2013), aunque en ellos la infección tiende a ser limitada, por lo que es posible que otras circunstancias aún sin determinar, como factores genéticos o ambientales, puedan provocar una mayor susceptibilidad de los individuos jóvenes (Reddacliff et al., 2005; Delgado et al., 2013).

3.2. Entrada de *Map* en los macrófagos

Tras atravesar la barrera intestinal, *Map* es transportado transcelularmente hacia los macrófagos subepiteliales (Figura 1), células que se han señalado como principales responsables de su eliminación, tras su captación por fagocitosis y la posterior producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) y del nitrógeno (RNI) (Momotani et al., 1988; Valentin-Weigand y Goethe, 1999; Arsenault et al., 2014). En este sentido, existen diversos receptores involucrados en la fagocitosis de *Map*, siendo quizás los más importantes los del complemento (CR) CR1, CR3 y CR4, receptores de inmunoglobulinas Fc, el receptor de la manosa (Man) y los receptores de cluster de diferenciación (CD) CD14 de lipopolisacárido (LPS) entre otros (Figura 2) (Sigurardóttir et al., 2004). La eliminación o supervivencia de *Map* dependerá, además de otros factores, de cuáles de estos receptores interactúan con la micobacteria, ya que esto determinará las vías moleculares que se desencadenen en el macrófago. Por ejemplo, la opsonización de micobacterias por el complemento y su posterior unión a los receptores CR1, CR3 y CR4 es uno de los más importantes ya que, a diferencia del acoplamiento a los receptores FcR, la vía del complemento no desencadena la activación del “estallido respiratorio” en el macrófago y, por tanto, la interacción con estos receptores evitaría la degradación de la micobacteria (Sangari et al., 1999; El-Etr y Cirillo, 2001). De la misma manera, la fagocitosis a través de receptores Man

mediante la unión con el glucolípido lipoarabinomanan (LAM) impide la generación de radicales libres y la fusión y maduración de los fagosomas por lo que también constituye una ventaja para la supervivencia de la micobacteria (Astarie-Dequeker et al., 1999; Souza et al., 2013). Además, la unión Man-LAM da lugar a la activación de la proteína kinasa activada por mitógeno p38 (MAPK-p38) que favorece la expresión de citoquinas antiinflamatorias, la inhibición de la respuesta proinflamatoria y la eliminación de *Map* (Fratti et al., 2003; Souza et al., 2013).

3.3. Establecimiento de la infección y progresión lesional

Tras la entrada y procesamiento de *Map* en los macrófagos, estos actúan como CPAs exhibiendo en su superficie los antígenos de la bacteria fagocitada a los linfocitos T por medio del complejo mayor de histocompatibilidad tipo 2 (CMH-II) (Figura 2) (Wu et al., 2007; Rossjohn et al., 2015).

La activación de los linfocitos T y la liberación de citoquinas y quimiocinas por los macrófagos provoca la activación de otros macrófagos y el reclutamiento de células inflamatorias, principalmente mononucleares, que se acumulan alrededor de los macrófagos infectados formando un granuloma, de forma que se consigue limitar, tanto el daño causado por la inflamación y la actividad microbicida de las células, como la diseminación de la bacteria (Clarke, 1997; Saunders y Cooper, 2000; Wangoo et al., 2005; Koets et al., 2015; Krüger et al., 2015a). Posteriormente, si las micobacterias no son eliminadas del granuloma, su presencia provoca la continua estimulación de las células inflamatorias presentes en el mismo y la liberación de citoquinas que favorecen el reclutamiento de más leucocitos y el crecimiento o la formación de nuevos granulomas (Kaneko et al., 1999; Saunders y Cooper, 2000; Krüger et al., 2015b).

Tomando como modelo lo que sucede en la lepra humana, se han diferenciado dos tipos de formas lesionales en la paratuberculosis, relacionadas con la respuesta inmunitaria del animal: el extremo tuberculoide o el lepromatoso (Figura 1) (Begara-Mcgorum et al., 1998; Rossi et al., 2009; Krüger et al., 2015a). El tuberculoide se caracteriza por la presencia de granulomas bien definidos, con un reducido número de células epitelioides, rodeados por linfocitos y con escasa o nula presencia de BAAR. Dentro de este tipo se encuentran las lesiones consideradas como “latentes”, de tipo *focal* (granulomas en el área interfolicular de las placas de Peyer) o *multifocal* (granulomas en el área interfolicular de las placas de Peyer y en la lámina propia asociada) y aparecen generalmente durante las etapas iniciales de la infección, o en animales que muestran formas de latencia o resistencia, situaciones en las que los signos clínicos son inexistentes o muy inespecíficos (infección silente o subclínica). Estas lesiones están asociadas a una respuesta inmunitaria potente de tipo celular mediada por la activación de linfocitos T colaboradores CD4⁺ (Th) con actividad proinflamatoria (Th1) (Figura 1) (Burrells et al., 1999; Pérez et al., 1999; Valheim et al., 2004; Rossi et al., 2009; Balseiro et al., 2019).

Por otro lado, el extremo lepromatoso se caracteriza por la presencia de un gran número de células epitelioides y una mayor cantidad de BAAR (Burrells et al., 1998). Entre ambos extremos, se localizan las lesiones denominadas de tipo *difuso*, con presencia de intensos infiltrados granulomatosos y signos clínicos en los animales, generalmente asociadas a un debilitamiento de la respuesta inmunitaria Th1 y una mayor proliferación de linfocitos CD4⁺ de tipo antiinflamatorio (Th2) favoreciendo el inicio de una respuesta inmunitaria humoral (Figura 1) (Burrells et al., 1998; Pérez et al., 1997, 1999; Manning y Collins, 2001). Dentro de este grupo y en función de la respuesta inmunitaria y la presencia de *Map* se distinguen lesiones *difusas multibacilares* (elevada respuesta humoral y carga bacteriana) y lesiones *difusas paucibacilares*

(elevada respuesta celular y escasa carga bacteriana) (Pérez et al., 1996; Corpa et al., 2000b; González et al., 2005; Fernández et al., 2017b).

La inestabilidad en el balance Th1/Th2 de la respuesta inmunitaria favorecería la multiplicación de *Map*, o bien la infiltración descontrolada de células inflamatorias, y el avance de las lesiones hacia zonas más amplias, provocando cambios macroscópicos en el intestino y la aparición de signos clínicos (Hines et al., 1987; Clarke y Little, 1996; Pérez et al., 1997; Corpa et al., 2000b; Bower et al., 2011).

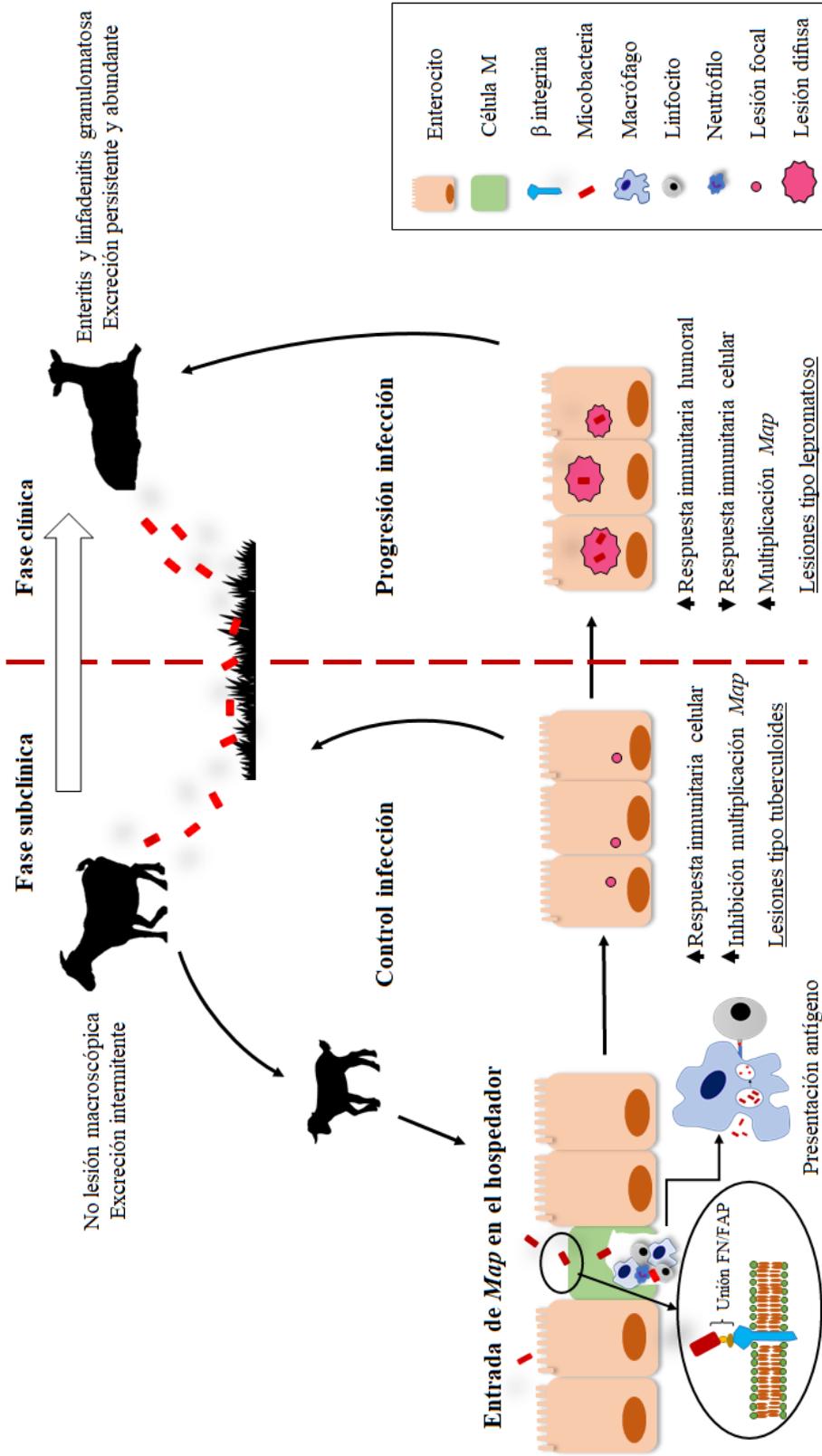


Figura 1. Transmisión, establecimiento y progresión de la infección por *Map*.

4. Respuesta inmunitaria

Clásicamente, se ha considerado que la defensa del hospedador frente a los patógenos esta mediada por la estrecha coordinación entre las respuestas inmunitarias innata y adaptativa (Figura 2) (Kennedy, 2010). La respuesta inmunitaria innata actúa de manera rápida e inespecífica, mientras que la respuesta adaptativa es más lenta, pero desarrolla memoria inmunológica, reconociendo al agente tras la reinfección (Kennedy, 2010). Sin embargo, con el fin de abarcar los complejos mecanismos que participan durante la respuesta inmunitaria, esta teoría dicotómica ha sido matizada con la introducción del término “inmunidad entrenada”, una respuesta mediada por las células de la respuesta inmunitaria innata, pero con la capacidad de exhibir memoria inmunológica (Netea et al., 2011).

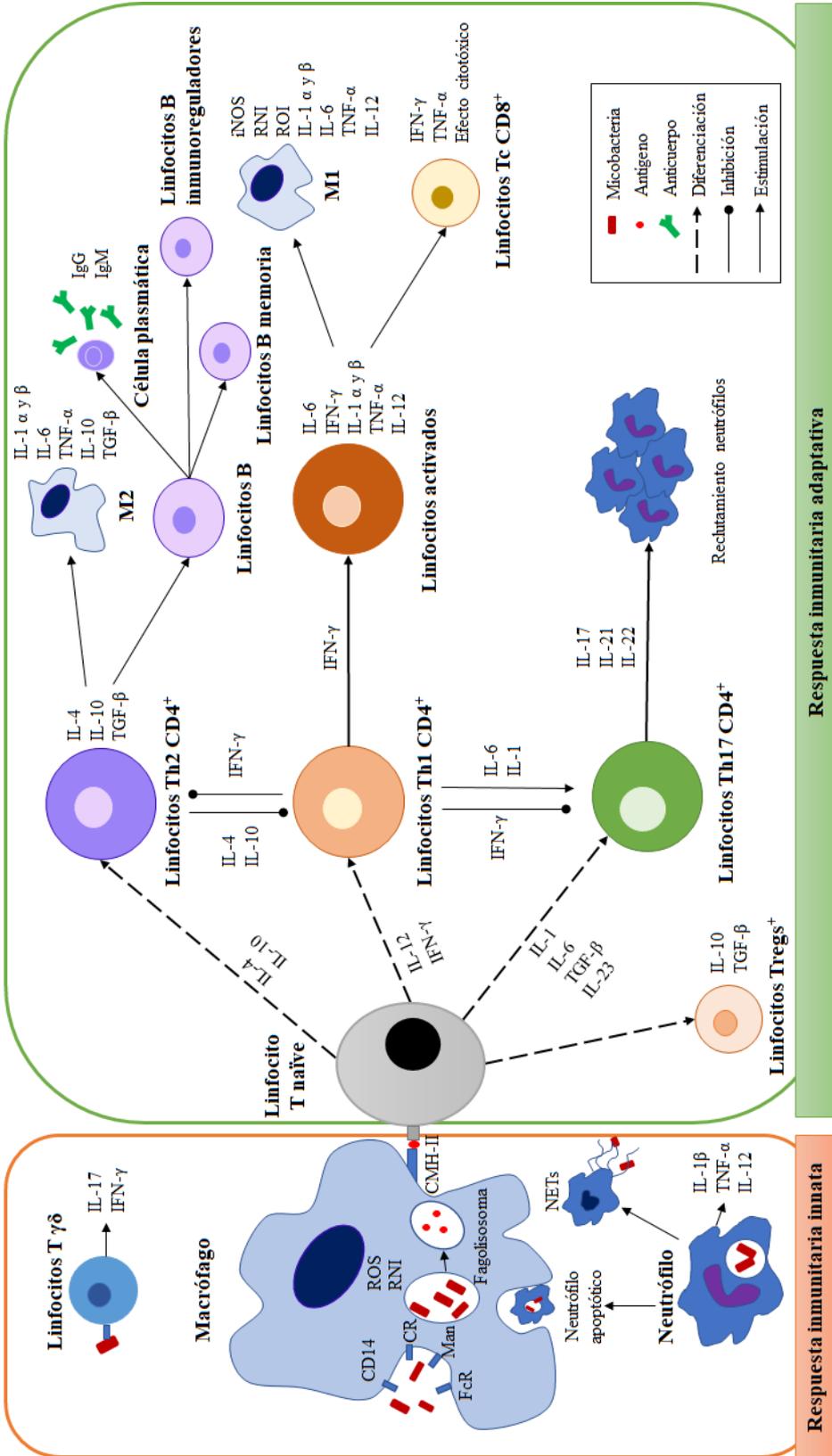


Figura 2. Activación y regulación de las respuestas inmunitarias innata y adaptativa.

4.1. Células de la respuesta inmunitaria: interacción *Map*-hospedador

El componente celular de las respuestas inmunitarias innata (macrófagos y neutrófilos) y adaptativa (linfocitos) interviene en el reconocimiento y la eliminación de la infección por *Map*. Aunque los macrófagos son las células diana que intervienen en la patogenia de esta enfermedad, otras células, como los neutrófilos y los linfocitos $\gamma\delta$, también juegan un papel importante actuando, al igual que los macrófagos, como nexo de unión entre la respuesta inmunitaria innata y adaptativa. Por ello, en este apartado se repasarán los aspectos más relevantes de estas células, mientras que el apartado 4.3. se centrará la respuesta inmunitaria generada tras la activación de los linfocitos T y B.

4.1.1. Macrófagos

Los macrófagos, que actúan como CPAs, son células derivadas de los monocitos que, tras su salida del torrente sanguíneo, maduran en los tejidos. Su principal función es la destrucción de los patógenos mediante diferentes mecanismos como la fagocitosis y la producción de ROS y RNI (Aderem y Underhill, 1999; Ginhoux y Jung, 2014).

Tras la interacción de los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) presentes en *Map* con los receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) del macrófago, la bacteria es internalizada en los fagosomas que maduran tras la unión con los lisosomas (fagolisosoma) favoreciendo su eliminación (Kumar et al., 2011). Posteriormente, los macrófagos presentan los antígenos a los linfocitos T mediante el CMH-II, dando lugar a la liberación de citoquinas y quimiocinas que provocan la activación de la respuesta inmunitaria adquirida (Figura 2) (Kumar et al., 2011; Wynn et al., 2013). Sin embargo, la heterogeneidad en el fenotipo de los macrófagos puede

verse influenciada durante la infección micobacteriana determinando el tipo de respuesta inmunitaria desarrollada por los linfocitos (Mills et al., 2000; Thirunavukkarasu et al., 2015; McClean y Tobin, 2016).

Polarización de los macrófagos

Fenotípicamente, se han distinguido dos subpoblaciones de macrófagos según la vía de activación: los macrófagos clásicamente activados o M1 y los macrófagos alternativamente activados o M2 (Figura 3) (Barros et al., 2013; Crespo et al., 2013; Kapellos et al., 2016). La polarización hacia el fenotipo de tipo M1 está mediada por la presencia de moléculas relacionadas con el microorganismo, como el LPS, y citoquinas proinflamatorias, como el interferón-gamma (IFN- γ) o el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α). Por otro lado, la polarización hacia un fenotipo de tipo M2 esta mediada por citoquinas antiinflamatorias como la interleuquina (IL) IL-10, IL-4 o el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) (Barros et al., 2013; Italiani y Boraschi, 2014; Thirunavukkarasu et al., 2015) (Figura 3).

En la etapa subclínica de la paratuberculosis, se ha demostrado la presencia de ambos subtipos de macrófagos (M1 y M2), diferenciados a partir de monocitos de sangre periférica, mediante el marcaje específico de los receptores de membrana CD80 y CD86, indicadores de un fenotipo M1, y el receptor CD163, indicador de un fenotipo M2 (Thirunavukkarasu et al., 2015). El predominio de uno de los dos subtipos, estrechamente relacionado con el ambiente de citoquinas previamente descrito, parece guardar relación con el tipo y la gravedad de las lesiones en el intestino. De esta manera, se ha demostrado que en vacas infectadas con *Map*, los macrófagos presentes en los granulomas de tipo tuberculoide son mayoritariamente M1, mientras que, en las lesiones más graves de tipo lepromatoso, son mayoritariamente M2 (Fernández et al., 2017a; Jenvey et al., 2019). La diferente función de cada

subpoblación se relaciona con un tipo u otro de lesión, ya que los macrófagos M1 se caracterizan por una elevada producción de citoquinas proinflamatorias (p. ej. IL-1, TNF- α , etc) y de ROS/RNI, favoreciendo un tipo de respuesta Th1 y el aumento de la actividad antimicrobiana (Figura 3) (Mantovani et al., 2004; Italiani y Boraschi, 2014; Rice et al., 2019), mientras que los macrófagos M2 ejercen un efecto inhibitorio sobre la inflamación, liberando citoquinas antiinflamatorias (p. ej. IL-4, IL-10, etc) que promueven un tipo de respuesta Th2, la inhibición de las citoquinas proinflamatorias y la reparación tisular (Figura 3) (Mantovani et al., 2004; Rice et al., 2019).

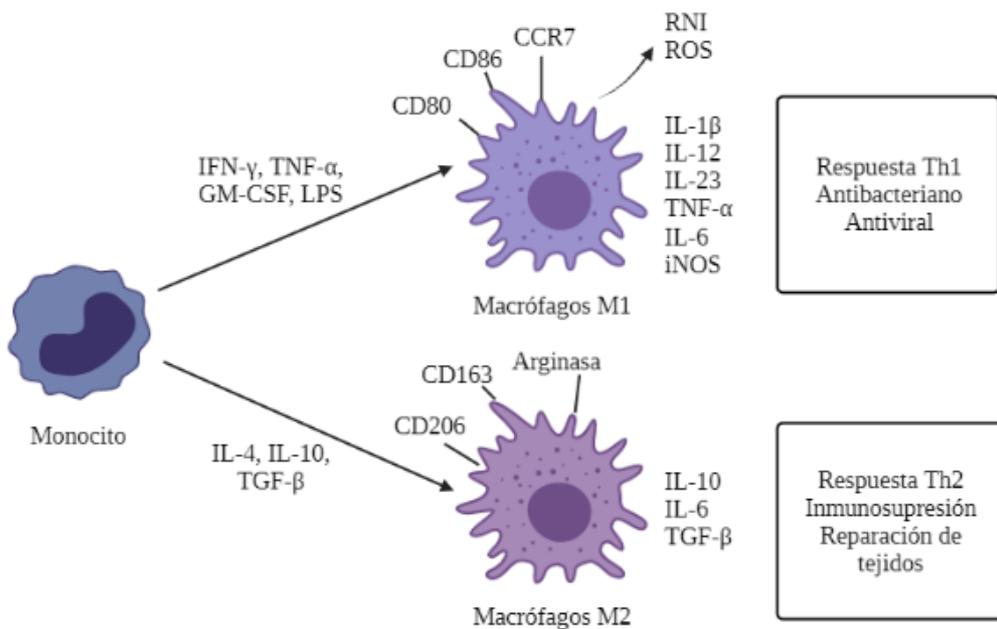


Figura 3. Representación de la heterogeneidad fenotípica y funcional de los macrófagos. Polarización hacia un perfil M1 (clásicamente activado) o M2 (alternativamente activado).

Mecanismos de evasión de *Map* de la acción de los macrófagos

- ✓ Inhibición de la maduración del fagosoma y la fusión del fagosoma-lisosoma.

El bloqueo de la formación del fagolisosoma, y su maduración, es crucial para la supervivencia de *Map*. Este mecanismo de acción se ha estudiado en la línea celular J774 de ratón (macrófagos derivados de un sarcoma de células reticulares), donde bacterias viables de *Map* son capaces de persistir en el interior de los fagosomas hasta 15 días, reduciendo la captación de la proteína de membrana asociada a lisosomas 2 (Lamp-2) (Kuehn et al., 2001). Se ha detectado, además, una mayor cantidad de receptores de la transferrina, un marcador típico de los fagosomas tempranos, y una menor cantidad del marcador de maduración Lamp-1 tras la infección con *Map* de esta misma línea celular (Hostetter et al., 2003).

Por otro lado, la formación de los fagolisosomas tras la infección de micobacterias también es dependiente de las RabGTPasas (p. ej. Rab5, Rab7, etc), pequeñas proteínas de unión implicadas en la fusión de membranas y el transporte vesicular (Feng et al., 1995; Jahraus et al., 1998; Simonsen et al., 1998; Brumell y Scidmore, 2007). De hecho, se ha demostrado que las alteraciones en los puntos de anclaje de estas proteínas tras la infección con *Mycobacterium bovis* (*Mbv*) inhibe la maduración de los fagosomas (Via et al., 1997; Fratti et al., 2001). Del mismo modo, ciertos componentes lipídicos de la pared microbiana, como los sulfolípidos, son capaces de alterar la fusión de los fagosomas mediante alteraciones en su membrana (Sut et al., 1990; Karakousis et al., 2004).

- ✓ La disminución de la acidificación del fagosoma y de la producción de especies reactivas.

Las enzimas hidrolíticas presentes en el interior de los fagosomas requieren un pH ácido para su funcionamiento, alcanzado mediante la acción de la H⁺ATPasa, principal proteína transportadora de la bomba de protones. Sin embargo, *Map* es capaz de inhibir la acidificación del fagosoma por medio de la secreción de una tirosina fosfatasa que se une a la H⁺ATPasa suprimiendo su acción (Wong et al., 2011; Gurung et al., 2014). De hecho, se ha comprobado que en macrófagos bovinos derivados de la maduración de monocitos sanguíneos (MDMs), la inhibición *in vitro* de IL-10, citoquina que en exceso favorece la multiplicación de *Map*, está asociada a una mayor expresión de H⁺ATPasa, dando lugar a una mayor destrucción de la micobacteria (Weiss et al., 2005). La actividad antimicrobiana de los macrófagos también depende de la producción de ROS y RNI durante el estrés oxidativo, moléculas que, además de ser tóxicas para el patógeno, actúan como vías de señalización de la respuesta inflamatoria (Chan et al., 1992; West et al., 2011; Gibson et al., 2016). A pesar de ello, se ha determinado que la producción de ROS es insuficiente para eliminar completamente *Map* (Zurbrick et al., 1988), dado que esta secreta superóxido dismutasa (SOD), una enzima antioxidante que impide la formación de radicales libres (Liu et al., 2001). Asimismo, se ha observado que las células mononucleares extraídas a partir de sangre periférica (PBMCs) procedentes de animales con enfermedad subclínica presentan una mayor producción de óxido nítrico (NO), la cual se reduce en los PBMCs de animales con enfermedad clínica (Khalifeh et al., 2009), seguramente debido al efecto inhibitorio de la respuesta antiinflamatoria sobre la producción de esta molécula. Sin embargo, la producción de NO, por sí sola, también es insuficiente para eliminar a *Map*, tal y como se ha comprobado en monocitos bovinos infectados *in vitro* (Zhao et al., 1997). Esto podría estar relacionado con la capacidad de *Map* para

inhibir la liberación de la enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), responsable de la formación de NO, por medio de la activación de la vía de señalización MAPK-p38, aunque se desconoce el mecanismo responsable de este efecto (Sommer et al., 2009; Souza, 2015).

✓ Alteración de la apoptosis

La apoptosis de los macrófagos infectados por patógenos es un mecanismo empleado por el hospedador para facilitar su eliminación y la fagocitosis por otros macrófagos. Sin embargo, *Map* podría aprovecharse de este mecanismo, tanto mediante su inhibición, permitiendo seguir multiplicándose en su interior, como con su estimulación, favoreciendo su diseminación y replicación en otros macrófagos (Allen et al., 2001; Kabara y Coussens, 2012; Wang et al., 2019). En este sentido, durante la infección *in vitro* de MDMs bovinos con una dosis de *Map* de 1 macrófago por cada 10 bacterias (MOI= 1:10) se detectó un porcentaje bajo de apoptosis (Weiss et al., 2004). Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Kabara y Coussens, (2012) donde se observó una reducción de la sensibilidad de los macrófagos infectados con *Map* (MOI= 1:20) al agente pro-apoptótico peróxido de hidrógeno (H₂O₂), posiblemente asociado a una disminución de la actividad de las caspasas 3, 7 y 8 (enzimas mediadoras de la apoptosis). Sin embargo, no está claro que este sea el único modo que tiene *Map* para interactuar con la apoptosis celular, ya que en otro estudio realizado con MDMs bovinos se observó el efecto contrario. La infección *in vitro* con *Map* provocó daños en las mitocondrias de estas células induciendo la apoptosis de una manera dependiente de las caspasas, cuando las dosis de infección eran bajas (MOI= 1:10), o independiente de las caspasas con dosis elevadas (MOI= 1:50) (Periasamy et al., 2013).

- ✓ La modulación de la respuesta inmunitaria innata y adaptativa.

Además de todo lo expuesto anteriormente, *Map* también es capaz de interferir en la presentación de antígenos a los linfocitos T por medio de la disminución de la expresión de las moléculas CMH-I y CMH-II en la superficie de los macrófagos (Weiss et al., 2001), retrasando o atenuando la respuesta inmunitaria, aunque no se conocen los mecanismos responsables de esta supresión.

4.1.2. Neutrófilos

Los neutrófilos participan en la respuesta inmunitaria innata como primera línea de defensa. Dado su corto tiempo de vida (desde 5 horas hasta 5 días), se liberan continuamente desde la médula ósea y se dirigen específicamente hacia localizaciones que emitan señales de daño tisular (Segal, 2005; Borregaard, 2010; Tak et al., 2013). Estas células son capaces de fagocitar de manera eficiente e inespecífica a los patógenos, permitiendo su eliminación, gracias a su elevada capacidad microbicida mediada por el contenido de los gránulos presentes en su interior (Lehrer y Ganz, 1999; Borregaard et al., 2007; Borregaard, 2010) y la liberación ROS y RNI (Elsbach y Weiss, 1985; Segal, 2005). Además, los neutrófilos también son capaces de liberar un amplio espectro de citoquinas (p. ej. IL-1 α , IL-1 β , etc) y quimiocinas (p.ej. CXCL1, 2, 3, etc) (Figura 2) (Mantovani et al., 2011; Jaillon et al., 2013).

El papel que juegan los neutrófilos durante las infecciones micobacterianas se ha puesto en entredicho por su corto tiempo de vida y la localización de la micobacteria en el interior de los macrófagos, lo que impediría la acción de los neutrófilos sobre la misma (Edwards y Kikpatrick, 1986; Pedrosa et al., 2000). No obstante, diversos estudios han resaltado la importancia de estas células durante la infección por patógenos intracelulares,

participando activamente en el reclutamiento de linfocitos T, la aparición de granulomas, la formación de trampas extracelulares o su fagocitosis por los macrófagos tras sufrir apoptosis (eferocitosis) (Tan et al., 2006; Appelberg, 2007; von Köckritz-Blickwede y Nizet, 2009).

En este sentido, aunque existen muy pocos estudios sobre el papel de los neutrófilos en la patogenia de la paratuberculosis, se ha señalado que podrían jugar algún papel en las fases iniciales de la infección, ya que se ha observado la presencia de neutrófilos en el intestino, en los puntos de entrada de *Map*, si bien posteriormente desaparecerían siendo reemplazados por macrófagos (Khare et al., 2009). Por otro lado, algunos estudios han señalado una reducción significativa de la respuesta migratoria *in vitro* de los neutrófilos sanguíneos obtenidos de vacas con paratuberculosis subclínica (Dotta et al., 1999), que podría ser responsable de la escasez de estas células observada en el íleon de vacas con paratuberculosis clínica (Lee et al., 2001). De hecho, mediante estudios transcriptómicos de sangre periférica y tejidos de animales infectados, se ha demostrado que la infección por *Map* provoca alteraciones en el reclutamiento de los neutrófilos (Park et al., 2018; Alonso-Hearn et al., 2019). Tanto es así que Park et al. (2018) observaron una menor expresión de IL-17 en sangre periférica de animales con paratuberculosis subclínica a medida que la enfermedad avanza, citoquina relacionada con el reclutamiento de los neutrófilos y la formación de los granulomas (Cruz et al., 2006; Dudemaine et al., 2014; DeKuiper y Coussens, 2019). También se ha detectado una reducción de la expresión de la quimiocina CXCL8/IL8, implicada en el reclutamiento de neutrófilos, en sangre periférica y en la válvula ileocecal de animales infectados con paratuberculosis, independientemente del tipo de lesión (Alonso-Hearn et al., 2019).

Además de la fagocitosis y la liberación de sustancias antimicrobianas al medio extracelular, se ha descrito otro mecanismo antimicrobiano especializado en la captura, inmovilización y destrucción de agentes

patógenos tanto Gram positivos (p. ej. *Staphylococcus aureus*) como negativos (p. ej. *Salmonella typhimurium*) por medio de la liberación al medio externo de fibras de cromatina y sustancias antimicrobianas (Brinkmann et al., 2004). Estas redes se denominan trampas extracelulares de neutrófilos (NETs) y están compuestas de ácido desoxiribonucleico (ADN), histonas, distintos péptidos antimicrobianos y enzimas como elastasa, catepsina G o mieloperoxidasa (Yousefi et al., 2009; Metzler et al., 2011; Yang et al., 2016). Aunque se trata de un mecanismo puramente extracelular, se ha observado que la estimulación *in vitro* de neutrófilos humanos con patógenos intracelulares como *Candida albicans* (Urban et al., 2006), así como neutrófilos ovinos y bovinos con *Toxoplasma gondii* (Yildiz et al., 2017) da lugar a la formación de NETs y la eliminación de estos patógenos. En el caso de las micobacterias, se ha evidenciado la formación de NETs tras la infección de neutrófilos humanos cultivados *in vitro* con *Mycobacterium tuberculosis* (Ramos-kichik et al., 2009; Braian et al., 2013), si bien este mecanismo no fue capaz de eliminar por completo a la bacteria, sugiriendo que el papel de las NETs estaría ligado a la retención de la micobacteria, lo que evitaría su diseminación (Ramos-Kichik et al., 2009). En relación con la paratuberculosis, un estudio reciente no solo demostró la capacidad de neutrófilos bovinos de generar NETs en respuesta a la infección *in vitro* con *Map*, sino que también observó una relación positiva entre este mecanismo y la eliminación de esta bacteria (Ladero-Auñon et al., 2021a). Además, este mismo estudio reveló que el cultivo conjunto de macrófagos y neutrófilos bovinos provoca una reducción de la producción de NETs, posiblemente debido a la captación de las moléculas que las componen por los macrófagos o a la amortiguación de la respuesta de los neutrófilos (Ladero-Auñon et al., 2021a) en la que podrían intervenir alguno de los mecanismos señalados anteriormente. La cooperación entre los neutrófilos y los macrófagos durante las infecciones micobacterianas (p. ej. *M. tuberculosis*, *Mbv*, etc) por medio de

la fagocitosis de neutrófilos apoptóticos, lo que podría ser una fuente de moléculas antimicrobianas aprovechadas por los macrófagos que los fagocitan, ya se ha descrito con anterioridad, por lo no se puede descartar que este mecanismo interviniera también en la patogenia de la paratuberculosis (Silva et al., 1989; Tan et al., 2006).

4.1.3. Linfocitos T $\gamma\delta$

Los linfocitos T $\gamma\delta$ constituyen una de las subpoblaciones linfocitarias más abundantes en rumiantes, particularmente en animales jóvenes, estando presentes tanto en sangre periférica como en tejidos (Hein y Mackay, 1991; Guerra-Maupome et al., 2019b). Dentro de esta subpoblación y según la expresión de la molécula “workshop cluster 1” (WC1), una glicoproteína transmembrana perteneciente a la familia de receptores “scavenger” y expresada únicamente en estas células, se han encontrado dos subtipos principales clasificados como WC1⁺ y WC1⁻ (Machugh et al., 1997; Blumerman et al., 2006). A pesar de ser una población conocida desde hace tiempo, aún se desconoce gran parte de su función, aunque se ha comprobado que podrían ser responsables de la producción de algunas citoquinas proinflamatorias como IFN- γ o IL-17 durante la infección por *Map* o *Mbv* (Figura 2) (Baquero y Plattner, 2016; Steinbach et al., 2016). Además, se ha podido comprobar que la subpoblación WC1⁺, presente principalmente en la lámina propia del intestino, juega un papel fundamental en la respuesta del hospedador frente a *Map*, ya que son los linfocitos $\gamma\delta$ WC1⁺ los primeros en acudir al lugar de infección, mientras que los WC1⁻ tardarían más en llegar y lo harían menor número, lo que sugiere que estos linfocitos podrían desempeñar un papel importante en la respuesta inmunitaria innata durante la infección con *Map* (Hedges et al., 2005; Lubick y Jutila, 2006).

Asímismo, los linfocitos T $\gamma\delta$ podrían favorecer la formación de granulomas en el intestino, siendo reclutados desde la sangre en respuesta a la infección por *Map* (Tanaka et al., 2000; Ludwig et al., 2019). De hecho, mediante técnicas inmunohistoquímicas, se ha encontrado un incremento del número de estas células en la lámina propia y en la periferia de los granulomas de vacas con lesiones *focales*, a diferencia de aquellas con lesiones *difusas*. Por ello, se ha propuesto que este tipo de linfocitos podría desempeñar una función de contención de la infección durante la fase subclínica de la paratuberculosis (Criado et al., 2020).

Por el contrario, estas células también han demostrado poder ejercer un efecto inmunorregulador y citotóxico sobre la población de linfocitos T CD4⁺, posiblemente afectando de modo selectivo a los CD4⁺ Th1, en la lámina propia ileal de animales con sintomatología clínica, provocando de este modo la caída de la respuesta inmunitaria celular adaptativa proinflamatoria, favoreciendo la progresión de la enfermedad (Chiodini y Davis, 1992; Koets et al., 2002).

4.2. Respuesta inmunitaria innata

La respuesta inmunitaria innata es la primera línea de defensa contra cualquier patógeno. Comienza con el reconocimiento de los PAMPs por los PRRs presentes en las principales células efectoras de esta respuesta, como los neutrófilos o los macrófagos. Este reconocimiento de antígenos ajenos desencadena el inicio de la respuesta inflamatoria y la liberación de diferentes citoquinas y quimiocinas, como el IFN- γ o la proteína inflamatoria de macrófagos (MIP), que actúan como mediadores de la inflamación favoreciendo el reclutamiento de más células inflamatorias (p. ej. linfocitos, neutrófilos, macrófagos, etc.) o la fagocitosis y la liberación de sustancias tóxicas para la micobacteria (Medzhitov y Janeway, 1997; Dalpke y Heeg,

2002; Kennedy, 2010). Las CPAs, como los macrófagos o las células dendríticas, expresan una gran variedad de PRRs, tales como los receptores Toll-Like (TLRs) o los del dominio de oligomerización de nucleótidos o NOD-like (NLRs) (Kawai y Akira, 2005; Akira et al., 2006; Kumar et al., 2011).

Los TLRs participan en la respuesta inflamatoria frente a micobacterias como *Map* (Ryffel et al., 2005; Chang et al., 2006; Jo et al., 2007; Mucha et al., 2009), de forma que se han detectado determinados patrones de expresión de estos PRRs según las diferentes formas patológicas halladas en ganado vacuno y ovino (Bhide et al., 2009; Mucha et al., 2009). En este sentido, se han relacionado niveles elevados en la expresión de TLR2 con el desarrollo de lesiones de tipo multibacilar en ovejas con formas clínicas de paratuberculosis (Nalubamba et al., 2008; Smeed et al., 2010). Además, se ha determinado que el bloqueo de este receptor con anticuerpos anti-TLR2 en monocitos bovinos favorece la acidificación y maduración de los fagolisosomas y la eliminación de *Map* (Souza et al., 2008; Weiss et al., 2008). De manera similar, se ha hallado una mayor expresión de otros TLRs, como TLR4 y 8, en el yeyuno, íleon y nódulos linfáticos de ovejas con lesiones multibacilares en comparación con los animales con lesiones paucibacilares o sin infectar (Taylor et al., 2008), lo que sugiere que jugarían un papel favoreciendo la multiplicación de *Map*. Por el contrario, el TLR9 se ha vinculado con un efecto protector al encontrarse sobreexpresado en ovejas sin lesiones en comparación con ovejas con lesiones multi y paucibacilares (Nalubamba et al., 2008).

4.3. Respuesta inmunitaria adaptativa

Tras el reconocimiento inmunológico se produce una respuesta inmunitaria adaptativa mediada por los linfocitos T y B, capaz de reconocer

específicamente al agente patógeno y de generar una memoria inmunológica. Dentro de los linfocitos T pueden diferenciarse los linfocitos T citotóxicos (Tc), caracterizados por el reconocimiento del CMH de tipo I y la expresión de CD8 en su superficie, y los linfocitos Th que reconocen al CMH de tipo II y expresan en su superficie el marcador CD4 (Kennedy, 2010). Estos últimos, a su vez, pueden distinguirse en diferentes subpoblaciones en función del patrón de secreción de citoquinas, de las que las tres más importantes son: los subtipos Th1 y Th17, responsables de la respuesta proinflamatoria, y el subtipo Th2, inductor de una respuesta antiinflamatoria (Figura 2) (Kaiko et al., 2008).

Por otro lado, los linfocitos B se transforman en células plasmáticas, responsables de la producción de anticuerpos tras el reconocimiento de antígenos por los receptores de los linfocitos B (BCR) (Figura 2). Estos linfocitos pueden diferenciarse hacia células B de memoria, que producen anticuerpos de alta afinidad capaces de reconocer rápidamente a los antígenos que provocaron el estímulo inicial (Figura 2) (LeBien y Tedder, 2008). No obstante, los linfocitos B pueden desempeñar otras funciones, como la presentación del antígeno a linfocitos T o actuar como células inmunorreguladoras (células B reguladoras) (Figura 2) mediante la secreción de citoquinas que influyen en la diferenciación de los linfocitos T y limitan la respuesta inflamatoria manteniendo la homeostasis (Eibel et al., 2014).

En la paratuberculosis, la presentación de los antígenos de *Map* por las CPAs provoca la activación de los linfocitos T y su diferenciación a CD4⁺ (Figura 2) (Stabel, 2000b; Coussens, 2001; Serbina et al., 2001). Durante las etapas iniciales de la enfermedad, los linfocitos T proliferan y se polarizan hacia un perfil Th1, de manera que durante la infección subclínica existe un predominio de la respuesta mediada por células (Bendixen, 1978; Burrells et al., 1998; Stabel, 2000b). Sin embargo, la progresión de la paratuberculosis se asocia con la polarización hacia un tipo de respuesta Th2 que estimula el

inicio de la respuesta inmune humoral (Stabel, 2000b; Koets et al., 2002; Sweeney, 2011) y que ejerce un efecto inhibitorio sobre la respuesta Th1 (Figura 2), favoreciendo la replicación de *Map* y la progresión hacia las formas clínicas (Stabel, 1995; Stabel, 2000b).

No obstante, varios estudios han señalado que ambos tipos de respuesta están presentes durante las etapas iniciales de la paratuberculosis, observándose que hay producción de anticuerpos a la vez que de citoquinas proinflamatorias en animales asintomáticos (Waters et al., 2003; Begg et al., 2011; Fernández et al., 2014). Debido a esto, se ha sugerido que la progresión hacia formas más graves de esta enfermedad podría ser debida a la interferencia de *Map* en la acción coordinada de ambas respuestas, mediante la alteración inicial y el declive de la respuesta Th1 (Coussens et al., 2004).

4.3.1. Respuesta inmunitaria celular

Los linfocitos T Th CD4⁺ se diferencian en subpoblaciones diferentes en función de las citoquinas excretadas. La diferenciación hacia un perfil Th1 promueve la liberación de citoquinas proinflamatorias como IFN- γ , IL-12, IL-1 α , IL-1 β , IL-6 o TNF- α (Figura 2). En cambio, su polarización hacia un perfil Th2 promueve la liberación de citoquinas antiinflamatorias como IL-4, IL-10 y TGF- β , que favorecen el inicio de la respuesta humoral y ejercen un efecto inhibitorio sobre la respuesta proinflamatoria (Figura 2) (Mosmann y Coffman, 1989; O'Garra y Murphy, 1994; Aho et al., 2003). Aunque las citoquinas proinflamatorias limitan el crecimiento micobacteriano, su liberación sostenida junto con las sustancias bactericidas inducidas por ellas, tiene un efecto negativo sobre los tejidos a nivel local, provocando daño tisular y alterando la funcionalidad de la barrera mucosa del intestino (Rossi et al., 2009; Guirado et al., 2013). En respuesta a este daño tisular, los linfocitos CD4⁺ se diferencian hacia un subtipo Th2 cuya función es inhibir la acción de

la respuesta Th1 y favorecer la reparación del tejido, estableciéndose de este modo un equilibrio entre ambos tipos de respuesta (Kaiko et al., 2008; Begg et al., 2011).

Citoquinas de la respuesta inmunitaria Th1

La citoquina IFN- γ , producida principalmente por los linfocitos CD4⁺ y en menor medida por los linfocitos CD8⁺ y $\delta\gamma$ (Figura 2), es la principal citoquina efectora de la respuesta Th1 y es fundamental en la defensa antimicrobiana (Bassey y Collins, 1997; Hughes et al., 2017). De hecho, durante las primeras fases de la infección, la producción de IFN- γ aumenta considerablemente en sangre periférica, pero desciende a medida que la enfermedad progresa, tal y como se ha observado en ganado ovino, caprino y bovino, en casos naturales y experimentales (Stabel, 2000a; Storset et al., 2001; Delgado et al., 2012; Koets et al., 2015). Esta liberación también depende de la edad y de la dosis infectiva, de forma que hay una mayor secreción de esta citoquina en animales adultos (1 año de edad) infectados con dosis elevadas de *Map* (5×10^9 UFCs) en comparación con animales infectados con menor dosis (5×10^7 UFCs) o más jóvenes (2 semanas) (Mortier et al., 2014b). Esta diferencia entre individuos jóvenes y adultos podría estar relacionada con la exposición previa de los animales de más edad a micobacterias ambientales, o al mayor grado de madurez de su sistema inmunitario (Sweeney, 1996; Corpa et al., 2000c; Delgado et al., 2012). Sin embargo, en un estudio llevado a cabo en cabritos previamente sensibilizados con *Mah* y *Corynebacterium pseudotuberculosis*, ambos poseedores de antígenos comunes con *Map*, e infectados oralmente con esta micobacteria, no se observó una mayor producción de IFN- γ respecto a los no sensibilizados (Royo et al., 2018). Además, el IFN- γ interviene en la señalización y activación de los monocitos y los macrófagos y, por lo tanto, en la

supervivencia intracelular de *Map* (Italiani y Boraschi, 2014; Refai et al., 2018). De esta manera, se ha comprobado en estudios *in vitro* que la suplementación con IFN- γ favorece la fagocitosis y disminuye el crecimiento de *Map* en monocitos bovinos (Zurbrick et al., 1988; Zhao et al., 1997). Sin embargo, estos resultados no se confirmaron al emplear MDMs (Weiss et al., 2002; Khalifeh y Stabel, 2004a). Estas discrepancias pueden deberse a las diferencias en la actividad antimicrobiana entre monocitos y macrófagos (Woo et al., 2006).

Así mismo, la citoquina IL-12, producida por monocitos, macrófagos y linfocitos T, también estimula la respuesta Th1 (Coccia et al., 1999; Xing et al., 2000; Trinchieri, 2003), detectándose un incremento de su expresión en MDMs bovinos durante las primeras 24 horas desde la infección con *Map* (Weiss et al., 2002). Sin embargo, sus niveles de expresión comienzan a descender a las 72 horas, por lo que *Map* parece ejercer un efecto supresor sobre su producción, que podría estar ligado a la capacidad de *Map* de interferir en la unión de CD40 de las CPAs con el ligando CD40L de los linfocitos T, cuya interacción es necesaria para la producción de IL-12. Esto tendría como resultado una mayor supervivencia de *Map* gracias al descenso de la liberación de citoquinas proinflamatorias (Xing et al., 2000; Sommer et al., 2009; Machugh et al., 2012).

Así mismo, otras citoquinas proinflamatorias como TNF- α , IL-1 α , IL-1 β e IL-6 también participan en la respuesta inmunitaria del hospedador durante la infección por *Map* (Adams y Czuprynski, 1994; Alzuherri et al., 1996; Aho et al., 2003). De hecho, se ha comprobado que los componentes de la pared celular de *Map* (lipoarabinomano y el muramil dipéptido) inducen la liberación de estas citoquinas en MDMs bovinos infectados *in vitro* (Adams y Czuprynski, 1994). También, se ha encontrado un aumento de la expresión de IL-1 α e IL-6 en PBMCs de vacas con paratuberculosis subclínica y clínica (Coussens et al., 2004) y una mayor expresión de TNF- α en los macrófagos

presentes en lesiones de tipo *focal* y *multifocal* en terneros en comparación con las formas *difusas* (Fernández et al., 2017a). Las citoquinas IL-1 α , IL-1 β y TNF- α tienen un efecto sinérgico sobre la respuesta inflamatoria, estimulando la expansión clonal de linfocitos T y participando en la formación de granulomas (Flynn et al., 1995; Stabel, 1995; Roach et al., 2002; Aho et al., 2003), mientras que la expresión de IL-6 se ha asociado a la producción de proteínas de fase aguda (p.ej. haptoglobina (Hp) y el amiloide sérico A (ASA)) (Alzuherri et al., 1996), así como con la estimulación de la producción de anticuerpos por los linfocitos B (Tanaka et al., 2014). Las proteínas de fase aguda son proteínas plasmáticas producidas por los hepatocitos durante los procesos inflamatorios y cuyos niveles sanguíneos se ha observado que aumentan, en el caso de la paratuberculosis, en animales con lesiones de tipo *focal*, *multifocal* y *difuso paucibacilar* más asociadas a una respuesta inmunitaria celular y menor carga bacteriana (Espinosa et al., 2020). También pueden encontrarse niveles elevados de expresión de IL-1, IL-6 e TNF- α en tejidos procedentes de ovejas infectadas con lesiones de tipo *difuso multibacilar* y *paucibacilar*, ligados a una elevada respuesta humoral, posiblemente debido a la presencia de una inflamación persistente, que conduce a una exacerbación de la respuesta proinflamatoria (Alzuherri et al., 1996; Smeed et al., 2007).

Citoquinas de la respuesta inmunitaria Th2

La polarización hacia un perfil Th2, con la liberación de citoquinas antiinflamatorias como IL-10, IL-4 y TGF- β , previene el establecimiento de una respuesta inmunitaria proinflamatoria exacerbada, controlando los niveles de producción de las citoquinas proinflamatorias de los linfocitos Th1 (Figura 2). De hecho, se ha sugerido que la mayor expresión de IL-10 en los nódulos linfáticos mesentéricos de vacas con paratuberculosis, independientemente del

estado de infección, es un medio para controlar la respuesta inflamatoria local (Coussens et al., 2004). Sin embargo, el predominio de este tipo de citoquinas resulta perjudicial para el hospedador, ya que la inhibición de la actividad antimicrobiana permite la multiplicación intracelular de *Map* (Mosmann y Coffman, 1989; Weiss et al., 2005). Como prueba de ello, se ha detectado un aumento significativo de la expresión de IL-10 e IL4 en el íleon y nódulos linfáticos regionales de ovejas con lesiones de tipo lepromatoso, lo que podría relacionarse con el avance de la infección (Tanaka et al., 2005; Smeed et al., 2007). Además, se han encontrado también niveles elevados de expresión de TGF- β en el intestino de animales con enfermedad clínica (Khalifeh y Stabel, 2004b; Albarrak et al., 2018) y asociados con un mayor número de macrófagos, células gigantes y BAAR en lesiones de tipo *difuso multibacilar* (Muñoz et al., 2009; Fernández et al., 2017a).

Por el contrario, en estudios *in vitro* realizados con PBMCs no se han encontrado diferencias en los niveles de expresión de IL-10 y TGF- β , entre vacas con paratuberculosis (independientemente del estado clínico) y sanas (Coussens et al., 2004; Khalifeh y Stabel, 2004a). Sin embargo, se ha comprobado que la estimulación *in vitro* de estas células con *Map* favorece la transcripción de estas citoquinas (Coussens et al., 2004; Khalifeh y Stabel, 2004a). Además, la aportación exógena de IL-10 y TGF- β en cultivos de PBMCs favorece la supervivencia de *Map*, detectándose un mayor número de bacterias viables en comparación con PBMCs sin suplementar (Khalifeh y Stabel, 2004a). Este efecto es una prueba de la actividad inmunosupresora de estas citoquinas sobre la respuesta proinflamatoria y la actividad antimicrobiana (Buza et al., 2004; Khalifeh et al., 2009; Lybeck et al., 2009), que se ha observado también en MDMs bovinos, donde la neutralización de IL-10 favorece el incremento de las citoquinas proinflamatorias TNF- α , IL-12 y la eliminación de *Map* por medio de la acidificación de los fagosomas y la producción de NO (Weiss et al., 2005).

No obstante, los linfocitos T CD4⁺ Th2 no son los únicos capaces de producir IL-10 y TGF- β , ya que los linfocitos T reguladores (T-regs), caracterizados por la expresión en su superficie de CD4⁺, CD25⁺ y forkhead box P3⁺ (FoxP3⁺), también ejercen un efecto inmunomodulatorio sobre la producción de IL-10 y TGF- β (Figura 2) (Chen et al., 2003; Chang, 2008). En este sentido, se han encontrado niveles elevados de FoxP3⁺ en el íleon de vacas con paratuberculosis subclínica (de Almeida et al., 2008; Coussens et al., 2012). No obstante, se desconoce si el papel que juegan en la patogenia de la enfermedad está relacionado con la tolerancia y supervivencia de *Map* o con la pérdida de la homeostasis, ya que se ha comprobado que los linfocitos T-regs disminuyen en aquellas lesiones de mayor gravedad (Roussey et al., 2014, 2016).

Citoquinas de la respuesta inmunitaria Th17

La respuesta Th17 está producida principalmente por un subtipo de linfocitos T CD4⁺ que participa en la defensa frente a infecciones por patógenos extracelulares (Ye et al., 2001), dando lugar a una intensa inflamación local por el reclutamiento, la activación de neutrófilos y la liberación de las citoquinas IL-17, IL-21 e IL-22 (Figura 2) (Kaiko et al., 2008; Wattedgedera et al., 2017). Sin embargo, numerosos estudios han sugerido que las células Th17 podrían desempeñar un papel importante en la protección frente a patógenos intracelulares como *Salmonella enterica*, *M. tuberculosis* o *Mbv* (Schulz et al., 2008; Blanco et al., 2011; Shen y Chen, 2018), y más recientemente en la protección frente a *Map* (Roussey et al., 2014, 2016; Dekuiper y Coussens, 2019).

Esta respuesta requiere de la acción de IL-1 β , IL-6 e TGF- β para su activación, y de la citoquina IL-23 para la diferenciación de los linfocitos y su expansión clonal (Bettelli et al., 2006; Mangan et al., 2006), mientras que la

liberación de IFN- γ ejerce un efecto inhibitorio sobre esta subpoblación de linfocitos (Figura 2) (Cruz et al., 2006). La IL-23 es una citoquina proinflamatoria perteneciente a la familia de la IL-12 y producida por macrófagos activados, cuya secreción parece ser necesaria para la contención a largo plazo de la multiplicación de *M. tuberculosis* (Khader et al., 2011). En animales con paratuberculosis subclínica se han encontrado niveles elevados de IL-23 e IL-17 en plasma (Dudemaine et al., 2014; DeKuiper et al., 2020), de forma similar al aumento de la expresión de IL-17 e IL-22 observado en terneros infectados con *Mbv* (Blanco et al., 2011; Steinbach et al., 2016). Debido a esto, se ha señalado que el papel de estas citoquinas está relacionado con el control de las infecciones micobacterianas, de forma que su respuesta disminuye en vacas en las cuales la infección progresa hacia formas clínicas, que serían incapaces de mantener la expresión de IL-17, provocando la pérdida de la integridad de los granulomas y la excreción de *Map* en las heces (Park et al., 2018). Por ello, se ha sugerido que su presencia estaría restringida a las etapas iniciales de la infección, disminuyendo a medida que esta avanza (Roussey et al., 2016; Park et al., 2018).

4.3.2. Respuesta inmunitaria humoral

Esta respuesta se inicia gracias a la liberación de citoquinas Th2 que estimulan la proliferación y expansión clonal de los linfocitos B, encargados de la producción de inmunoglobulinas IgG e IgM específicas frente a *Map* (Figura 2) (Stabel, 2000b). Sin embargo, el papel que juega este tipo de respuesta en la patogenia de la paratuberculosis es controvertido, puesto que, tradicionalmente, se ha considerado como inefectiva en la protección frente a las formas graves de la paratuberculosis (Stabel, 2000b), de forma que numerosos estudios han relacionado la presencia de linfocitos B y la producción de anticuerpos con la manifestación clínica de la enfermedad

(Pérez et al., 1997; Burrells et al., 1998; Waters et al., 1999; Stabel y Khalifeh, 2008; Lybeck et al., 2011; Frie et al., 2017). Sin embargo, también existen evidencias sobre su papel en el control de la infección por *Map*, observándose una elevada producción de anticuerpos durante la etapa subclínica de la infección en ausencia de manifestaciones clínicas (Coussens et al., 2002; Waters et al., 2003).

4.4. Respuesta inmunitaria entrenada

Recientemente, numerosos estudios han evidenciado la existencia de un nuevo tipo de respuesta inmunitaria, eficaz no solo frente a los patógenos que provocan la infección inicial, sino también frente a agentes no relacionados. Esta respuesta se ha denominado “inmunidad entrenada” y se ha definido como un aumento inespecífico de la respuesta mediada por células de la respuesta inmunitaria innata (p. ej. monocitos/macrófagos, neutrófilos, etc), consecuencia de una sensibilización previa frente a un antígeno determinado y que se desencadenaría en respuesta a un agente infeccioso no relacionado necesariamente con dicho antígeno. Dicha respuesta sería independiente de las células de la respuesta inmunitaria adaptativa (linfocitos T y B) (Netea et al., 2011; Netea, 2013) y fue sugerida en mamíferos en relación con la vacunación frente a *Mbv* en humanos, tras observarse que niños vacunados con el bacilo Calmette et Guérin (BCG) mostraban una disminución de la morbilidad frente a enfermedades no relacionadas con la tuberculosis (Garly et al., 2003).

La inmunidad entrenada se aleja del concepto de preparación o “priming” de las células de la respuesta inmunitaria innata, en las que, tras el estímulo con un patógeno, se produce un aumento inespecífico de la respuesta frente a estimulaciones secundarias que se mantiene durante poco tiempo (Netea, 2013; Rusek et al., 2018). En cambio, en la respuesta inmunitaria entrenada, tras la resolución de la infección o sensibilización inicial, las células de la

respuesta innata no vuelven al nivel de actividad basal, sino que permanecen en un estado de mayor actividad, “entrenadas”, durante más tiempo debido a los cambios epigenéticos producidos sobre ellas (Netea, 2013; Rusek et al., 2018). Algunos estudios han señalado que la inmunidad entrenada se mantiene durante los primeros 3 meses tras la vacunación; sin embargo, otros han sugerido que esta inmunidad puede persistir durante 12 meses o incluso 2 años, por lo que todavía no se conoce con exactitud el periodo en el que esta inmunidad está presente (Kleinnijenhuis et al., 2012, 2014; Joosten et al., 2018).

Se ha sugerido también que las células con un mayor tiempo de vida, como los monocitos/macrófagos o las células “natural killer” (NK), son las principales responsables de la inmunidad entrenada (Netea, 2013). En este sentido, se ha establecido la hipótesis de que, tras la infección con un patógeno o la vacunación, la reprogramación epigenética de estas células puede tener lugar a nivel de la médula ósea, en los tejidos y en sangre periférica (Netea, 2013; Quintin et al., 2014; Adams et al., 2020). Esta reprogramación se ha asociado a factores como la modificación de los patrones de metilación de histonas, la modulación de PRRs, cambios en el número de subpoblaciones celulares o la modificación del metabolismo celular (Rusek et al., 2018; Covián et al., 2019; Adams et al., 2020).

En medicina humana, se han desarrollado numerosos modelos para el estudio de esta inmunidad, basados en la estimulación de monocitos procedentes de personas vacunadas con BCG (Bekkering et al., 2016; Joosten et al., 2018), donde se ha observado un incremento de la producción de algunas citoquinas (IFN- γ , TNF- α e IL-1 β) y de la actividad antimicrobiana frente a patógenos relacionados o no con micobacterias (*S. aureus* y *C. albicans*) tras los primeros meses post-vacunación (Joosten et al., 2018).

De la misma manera, en medicina veterinaria se ha comenzado a asociar los efectos no específicos de la vacunación frente a micobacterias con el papel de la inmunidad entrenada (Guerra-Maupome et al., 2019a; Juste et al., 2021). De hecho, la vacunación frente a paratuberculosis ha dado lugar a una reducción del número de animales sacrificados por infecciones digestivas o respiratorias tanto en el ganado bovino como caprino (Royo et al., 2016; Juste et al., 2021). Estos resultados han sido corroborados recientemente durante el seguimiento de 30 granjas de vacuno durante 3 años, al observarse una reducción de al menos el 33,9 % de la mortalidad en terneros vacunados frente a paratuberculosis. El 24,5 % de las muertes en terneros no vacunados se debió a causas no relacionadas con la paratuberculosis, algo que no se observó entre los animales vacunados, indicando un efecto protector de carácter inespecífico (Juste et al., 2021). Este efecto también se ha visto en modelos *in vitro* de neutrófilos de conejos vacunados frente a paratuberculosis, donde se apreció una elevada actividad antimicrobiana frente a patógenos no relacionados con micobacterias (p. ej. *S. aureus*, *Escherichia coli*, etc) (Ladero-Auñon et al., 2021b).

Por otro lado, la vacunación con Silirum[®] frente a la paratuberculosis se ha asociado con una reducción de las lesiones tuberculosas en cabras infectadas experimentalmente con *M. caprae*, quedando estas limitadas al sitio de infección (pulmones y nódulos linfáticos asociados), a diferencia de los animales no vacunados pero infectados, en los que se observó una mayor diseminación de las lesiones (Pérez de Val et al., 2012b). Este efecto fue similar en terneros vacunados con Silirum[®] e infectados con *Mbv*, en los que también se produjo una reducción de la intensidad de las lesiones y la carga bacteriana con respecto a los no vacunados (Serrano et al., 2017b). Sin embargo, se desconoce si este efecto en concreto, observado en animales vacunados frente a paratuberculosis, pero infectados con bacilos del complejo *M. tuberculosis*, ha sido debido al establecimiento de una protección cruzada,

por la similitud entre las micobacterias, o a la respuesta mejorada resultado del desarrollo de la respuesta inmunitaria entrenada.

5. Cuadro clínico y lesional

5.1. Signos clínicos

La paratuberculosis se engloba dentro del grupo de las denominadas como “enfermedades lentas” debido a su largo periodo de incubación, lo que provoca un retraso notable entre el momento de la infección y la aparición de los signos clínicos, coincidiendo generalmente con los partos, el inicio de la lactación u otras situaciones estresantes (p. ej. procesos parasitarios o deficiencias nutricionales) (Chiodini et al., 1984; Valentin-Weigand y Goethe, 1999). No obstante, es posible que algunos animales permanezcan subclínicamente infectados durante toda su vida sin manifestar signos evidentes (Pérez et al., 2000). Por ello, en función de la presencia o no de síntomas, se diferencian tres tipos de infección:

Infección silente. Ausencia de signos clínicos observada en animales jóvenes infectados recientemente o en situaciones de latencia (Whitlock y Buergelt, 1996; Balseiro et al., 2019).

Infección subclínica. Los animales presentan signos clínicos inespecíficos como disminución de la producción láctea, infertilidad o mamitis (Merkal et al., 1975; Stabel, 1998).

Infección clínica. Se caracteriza por la pérdida aparente de peso y la aparición intermitente de diarrea no sanguinolenta ni mucosa, con heces de menor consistencia, sobre todo en el ganado bovino (Chiodini et al., 1984; Pérez et al., 2000). Curiosamente, aunque es frecuente el adelgazamiento en el ganado ovino y caprino, la presencia de diarreas no es tan constante, si bien si que pueden observarse heces reblandecidas cuando la lesión del intestino es

más grave (Clarke y Little, 1996). En fases más avanzadas se puede observar una diarrea profusa con emaciación, debilidad y letargo. Finalmente, los animales pueden llegar a morir a causa de la deshidratación y la caquexia (Pérez et al., 2000).

5.2. Lesiones

Las lesiones varían dependiendo de su gravedad, el tipo celular que predomina, la extensión y la especie animal. Por ello, se han propuesto numerosas clasificaciones para las distintas especies animales siendo la más detallada y empleada la que inicialmente se describió, con criterios histológicos, en la especie ovina (Tabla 3) (Pérez et al., 1996; Delgado et al., 2013) y posteriormente en ganado caprino caprino (Tabla 4) (Paliwal et al., 1986; Corpa et al., 2000b), y bovino (Tabla 5) (Burgelt et al., 1978; González et al., 2005).

5.2.1. Lesiones macroscópicas

Las lesiones características de la paratuberculosis están asociadas al intestino y más específicamente a los tramos distales del intestino delgado, la válvula ileocecal y a los nódulos linfáticos mesentéricos, pudiendo extenderse al yeyuno, el ciego y el colon (Burgelt et al., 1978; Clarke, 1997). La progresión de la infección conduce al engrosamiento y tumefacción de la mucosa intestinal dando lugar a la formación de pliegues, si bien esta lesión es menos evidente en pequeños rumiantes (Stamp y Watt, 1954; Pérez et al., 2000). En algunos casos, puede ir acompañada de la dilatación e inflamación de los vasos linfáticos, que se observan como cordones blanquecinos en la serosa intestinal, mucho más marcados en pequeños rumiantes (Pérez et al., 1996; Corpa et al., 2000b; Kurade et al., 2004). Los nódulos linfáticos

asociados también pueden verse afectados, presentando principalmente tumefacción, aumento de tamaño e incluso focos de necrosis y calcificación en el ganado caprino (Corpa et al., 2000b; Tafti y Rashidi, 2000).

5.2.2. Lesiones microscópicas

La paratuberculosis se caracteriza por la aparición de una enteritis y linfadenitis granulomatosas, en las que se observa un infiltrado inflamatorio formado principalmente por células epitelioides, junto con linfocitos, células plasmáticas y células gigantes multinucleadas de Langhans que conforman los granulomas (Chiodini et al., 1984; Clarke y Little, 1996). En animales con infección leve estos granulomas se encuentran principalmente en la zona interfolicular de las placas de Peyer del intestino y en las zonas cortical y paracortical de los nódulos linfáticos (Clarke y Little, 1996; Sigurdardóttir et al., 1999; González et al., 2005). En animales en los que la infección progresa, la inflamación se extiende hacia la lámina propia y otras áreas del intestino, donde puede afectar, en los casos graves, a la submucosa o la capa muscular, de manera que la infiltración difusa de células inflamatorias provoca el engrosamiento, fusión y la atrofia de las vellosidades intestinales, llegando incluso a causar la oclusión de las criptas o, cuando afecta a los nódulos linfáticos, la pérdida de su estructura (Hines et al., 1987; Clarke, 1997; Pérez et al., 2000).

Tabla 3. Clasificación lesional en ganado ovino según Pérez et al. (1996).

Tipo	Localización y lesiones microscópicas	Presencia de BAAR	Lesiones macroscópicas
Tipo 1 (<i>focal</i>)*	Granulomas formados por macrófagos (6-50) y algunos linfocitos en la zona basal del espacio interfolicular del tejido linfóide de las placas de Peyer. También se pueden encontrar en la paracorteza y en el área interfolicular de los nódulos linfáticos regionales.	Ausente/Escasa	No
Tipo 2 (<i>multifocal a</i>)*	Granulomas similares al Tipo 1 que van desde la zona basal del área interfolicular hasta la zona apical, pudiendo afectar a la lámina propia y las vellosidades suprayacentes. Las lesiones en los nódulos linfáticos también son similares al Tipo 1.	Escasa	No
Tipo 3a (<i>multifocal b</i>)*	Distribución multifocal de granulomas afectando a las placas de Peyer y la mucosa adyacente. Los granulomas se parecen al Tipo 2 pero son de mayor tamaño en la lámina propia. Se pueden observar granulomas en la mucosa intestinal de zonas sin placas de Peyer, ya sean en la lámina propia, en las vellosidades o en la zona basal. Ocasionalmente, se identifican macrófagos y linfocitos, en bajo número, en la submucosa y vasos linfáticos y granulomas en nódulos linfáticos.	Frecuente	Engrosamiento de los vasos linfáticos (león)
Tipo 3b (<i>difusas</i>)*	Se caracteriza por una enteritis granulomatosa difusa que otorga una apariencia en mosaico a la mucosa, debido a la infiltración de un gran número de células epiteloides, tanto en el área interfolicular, como en los folículos, las cúpulas de las placas de Peyer y en la lámina propia sin tejido linfóide, que aparece marcadamente engrosada. También se puede observar un infiltrado de linfocitos y células plasmáticas en la submucosa y vasos linfáticos de la serosa. Los nódulos linfáticos muestran una linfadenitis granulomatosa multifocal o difusa con pérdida de la estructura.	Frecuente	Engrosamiento de la pared intestinal y vasos linfáticos. Nódulos linfáticos edematosos y aumentados de tamaño
Tipo 3c (<i>difusas</i>)*	Al igual que el Tipo 3b se observa una enteritis granulomatosa difusa con presencia de macrófagos y células gigantes de Langhans. Sin embargo, en este tipo aparece una mayor cantidad de linfocitos, visibles también en la lámina propia y las vellosidades. Es frecuente observar edema en la submucosa y granulomas multifocales en la zona paracortical e interfolicular de los nódulos linfáticos, a veces con necrosis y/o calcificaciones.	Escasa	Engrosamiento de la pared intestinal y vasos linfáticos. Nódulos linfáticos edematosos y aumentados de tamaño

*Modificación en la clasificación realizada por Delgado et al. (2013) en ovino

Tabla 4. Clasificación lesional en ganado caprino según Corpa et al. (2000b).

Tipo	Localización y lesiones microscópicas	Presencia de BAAR	Lesiones macroscópicas
<i>Focales</i>	Granulomas pequeños y bien delimitados formados por macrófagos (5-30) en el área interfolicular del tejido linfoide o en la lámina propia adyacente al mismo. También en la corteza y paracorteza de nódulos linfáticos.	Escasa	No
<i>Difusas multibacilares</i>	Enteritis granulomatosa difusa con un elevado número de macrófagos (y esporádicamente linfocitos y células gigantes). Los granulomas pueden estar bien delimitados y/o difusos en el área interfolicular de las placas de Peyer, y se observan también en gran número en la lámina propia y las vellosidades, en zonas sin tejido linfoide. En nódulos linfáticos se puede observar una linfadenitis granulomatosa multifocal o difusa con focos de necrosis y calcificación.	Frecuente	Engrosamiento de la pared intestinal y de los vasos linfáticos
<i>Difusas linfocíticas</i>	Enteritis granulomatosa difusa formada principalmente por linfocitos entre los que se observan algunos macrófagos y células gigantes afectando a la lámina propia. Puede haber focos de necrosis en la submucosa, la serosa y los nódulos linfáticos.	Escasa	Engrosamiento de la pared intestinal y de los vasos linfáticos
<i>Difusas intermedias</i>	Enteritis granulomatosa difusa afectando a las placas de Peyer y en zonas no adyacentes. El infiltrado inflamatorio esta compuesto de un gran número de linfocitos y macrófagos, sin un predominio evidente de un tipo celular concreto.	Escasa (pero siempre presentes) o moderada	Engrosamiento de la pared intestinal y de los vasos linfáticos

Tabla 5. Clasificación lesional en ganado bovino según González et al. (2005).

Tipo	Localización y lesiones microscópicas	Presencia de BAAR	Lesiones macroscópicas
<i>Focales</i>	Granulomas bien delimitados formados de macrófagos, algunos linfocitos y células gigantes de Langhans localizados en el área interfolicular de las placas de Peyer. También se observan granulomas en la corteza y la zona interfolicular de los nódulos linfáticos.	Escasa	No
<i>Multifocales</i>	Granulomas similares a las lesiones focales pero más numerosas en el área interfolicular del tejido linfático y en la lámina propia con un ligero engrosamiento en el ápice de las vellosidades.	Moderada	No
<i>Difusas</i>	Enteritis granulomatosa grave provocada por un infiltrado granulomatoso en numerosas áreas del intestino que desemboca en el engrosamiento de la pared. Se diferencia en varios tipos según la cantidad de BAAR y el tipo de infiltrado.		
<i>Difusas multibacilares</i>	Infiltrado difuso de macrófagos y células epiteloides en la pared intestinal, en la lámina propia y en las vellosidades causando su engrosamiento. En el infiltrado también aparecen ocasionalmente linfocitos y células gigantes de Langhans. Los nódulos linfáticos pueden presentar linfadenitis granulomatosa grave, con macrófagos y células gigantes en la corteza y paracorteza.	Frecuente	Engrosamiento de la pared intestinal y de los vasos linfáticos
<i>Difusas paucibacilares</i>	Enteritis granulomatosa difusa formada principalmente por linfocitos, entre los que se identifican pequeños granulomas formados por células epiteloides y gigantes de Langhans. Esta lesión provoca una alteración de la estructura de la mucosa, con engrosamiento de las vellosidades y la lámina propia, así como una linfadenitis granulomatosa.	Variable (menos que en multibacilares)	Engrosamiento de la pared intestinal y de los vasos linfáticos
<i>Difusas intermedias</i>	Infiltrado difuso formado por macrófagos, linfocitos, células plasmáticas y células gigantes de Langhans, sin especial predominio de un tipo celular. Las lesiones también causan engrosamiento de las vellosidades y la submucosa.	Frecuente	Engrosamiento de la pared intestinal y de los vasos linfáticos

6. Diagnóstico

El diagnóstico de la paratuberculosis se basa en dos pilares fundamentales: detectar la presencia del agente etiológico y de la respuesta inducida por él en el hospedador, principalmente la inmunitaria específica (Gilardoni et al., 2012; Whittington et al., 2017). De esta manera, los principales métodos diagnósticos *ante mortem* consisten en (i) la valoración de los signos clínicos, (ii) la detección de *Map* en heces mediante la tinción de Ziehl-Neelsen, la inmunohistoquímica, el cultivo bacteriológico y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), (iii) la detección de anticuerpos específicos mediante pruebas serológicas, especialmente el ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) y (iv) la valoración de la respuesta inmunitaria de tipo celular mediante la prueba de la liberación de IFN- γ (IGRA). Por otro lado, el diagnóstico *post mortem* se basa en (i) el análisis microscópico de las lesiones y (ii) la detección de *Map* en tejidos mediante los mismos métodos mencionados. Sin embargo, para llegar a un diagnóstico certero, es imprescindible la combinación de diferentes métodos para poder aumentar su especificidad y sensibilidad (Nielsen y Toft, 2008; Maroudam et al., 2015; Chaubey et al., 2016).

Dentro de las pruebas diagnósticas utilizadas de forma convencional, la detección directa de *Map* en heces o tejidos mediante cultivo bacteriológico es considerada como la técnica definitiva (“gold standard”) debido a su alta especificidad para el diagnóstico de la paratuberculosis (Whittington et al., 1999, 2000a). Sin embargo, las principales desventajas de esta prueba son su elevado coste y el lento crecimiento de *Map* en medios de cultivo (hasta 16 semanas en algunos casos), lo cual supone una demora en la detección y eliminación de animales que continúan excretando la bacteria en el ambiente (Fang et al., 2002; Olsen et al., 2002). Por el contrario, el análisis de la secuencia de inserción IS900 mediante PCR presenta una mayor rapidez en

comparación con el cultivo (Garrido et al., 2000; Tripathi et al., 2006; Eamens et al., 2007), aunque la presencia de inhibidores de la polimerasa en las heces o la existencia de micobacterias con secuencias de inserción similares puede disminuir su sensibilidad y especificidad, respectivamente (Englund et al., 2002; Butot et al., 2019).

En cuanto a la detección indirecta de la infección con *Map*, los test más empleados para la evaluación de la respuesta inmunitaria celular y humoral son la prueba IGRA y el ELISA indirecto, respectivamente. Estas pruebas se utilizan principalmente en el diagnóstico de animales durante la etapa subclínica (IGRA) y clínica de la enfermedad (ELISA). La sensibilidad diagnóstica del ELISA aumenta en individuos con lesiones más graves o que excretan grandes cantidades de *Map* en heces, lo que suele estar asociado a un aumento de los anticuerpos séricos (Garrido et al., 2000; Stabel, 2000b; Eda et al., 2006; Nielsen y Toft, 2008; Vazquez et al., 2013).

7. Importancia económica y salud pública

La paratuberculosis está asociada a importantes pérdidas económicas en explotaciones de ganado bovino, ovino y caprino de todo el mundo (García y Shalloo, 2015; Garvey, 2020; Patterson et al., 2020; Rasmussen et al., 2021). De hecho, se ha estimado que cada caso nuevo de paratuberculosis supone un coste de unos 1500 euros (Dufour et al., 2014). Estas pérdidas están ligadas principalmente a un menor índice de conversión del alimento, a una menor producción láctea, al sacrificio temprano de los animales infectados, al aumento de la infertilidad, a una mayor susceptibilidad a otras enfermedades y a los costes derivados del control (p. ej. establecimiento de medidas higiénico-sanitarias y/o vacunación) (Hendrick et al., 2005; Diéguez et al., 2008; Rossi et al., 2017).

Por otro lado, también se ha sugerido que la paratuberculosis podría ser una zoonosis, ya que el tipo de lesiones y el cuadro clínico presentan similitudes con la “enfermedad de Crohn” en humanos (Grant, 2005; Feller et al., 2007). Esta posibilidad ha cobrado fuerza al llegarse a aislar *Map* viables en sangre y muestras de tejidos de pacientes enfermos (Sanderson et al., 1992; Naser et al., 2004). No obstante, existen resultados contradictorios que ponen en duda esta asociación (Parrish et al., 2009). En cuanto a la vía de transmisión en el contagio a humanos, la principal sería la ingestión de *Map*, presente en leche, carne o agua destinadas al consumo humano (Meadus et al., 2008; Eltholth et al., 2009; Gill et al., 2011).

8. Tratamiento y medidas de control

Actualmente no existe un tratamiento eficaz para la cura de la paratuberculosis, por lo que el tratamiento farmacológico es sintomático y consiste principalmente en la administración de antibióticos (p. ej. gentamicina, capreomicina, isocianida, rifampicina). Sin embargo, su elevado coste económico y duración, así como los tiempos de retirada asociados y el riesgo de crear nuevas resistencias microbianas hacen sea raramente empleado, con la excepción de animales con un alto valor genético (St-Jean, 1996; Fecteau y Whitlock, 2011).

En la actualidad, el control de la paratuberculosis se basa en la aplicación de medidas higiénico-sanitarias, la eliminación de animales infectados y la vacunación. La aplicación de los dos primeros procedimientos como únicos métodos de control se ha demostrado insuficiente para reducir exitosamente la prevalencia de paratuberculosis en los rebaños (Jubb y Galvin, 2000; Dorshorst et al., 2006; Bastida y Juste, 2011; Windsor, 2015). Además, su aplicación en granjas con un número reducido de animales puede resultar costoso y difícil de implementar (Rossiter y Burhans, 1996; Muskens et al.,

2003; Ritter et al., 2016). Sin embargo, el uso de la vacunación junto con las medidas anteriores, no solo reduce el impacto económico provocado por esta enfermedad, sino que también consigue disminuir la prevalencia de la infección en aquellos rebaños donde la enfermedad es endémica, si bien no la termina de eliminar completamente incluso tras años de vacunación (Bastida y Juste, 2011).

Las medidas higiénico-sanitarias dan lugar a la reducción de la carga micobacteriana en la explotación. Entre ellas, las principales serían: (i) la separación de los animales sospechosos de los animales sanos, (ii) la separación de los animales recién nacidos de las madres, (iii) evitar la contaminación de los alimentos, agua y pastos con las heces de animales infectados y (iv) la desinfección frecuente de las instalaciones y de los utensilios (Goodger et al., 1996; Rossiter y Burhans, 1996; Bastida y Juste, 2011). De la misma manera, la cuarentena y la introducción de animales nuevos procedentes de rebaños libres de paratuberculosis o con resultados negativos en las pruebas diagnósticas (IGRA, ELISA y cultivo bacteriológico) también es de gran importancia. Las medidas de saneamiento se basan en la detección y eliminación de animales infectados, con o sin signos clínicos (Lu et al., 2008) mediante técnicas ELISA, IGRA, cultivo bacteriológico o PCR (Garrido et al., 2000; Kennedy y Benedictus, 2001; Windsor y Whittington, 2010).

9. Vacunación

La vacunación como medida de control frente a la paratuberculosis se ha considerado como el método económicamente más rentable (van Schaik et al., 1996; Rosseels y Huygen, 2008; Bastida y Juste, 2011; Groenendaal et al., 2015), aunque puede causar interferencias en el diagnóstico tanto de la paratuberculosis como de la tuberculosis (Serrano et al., 2017a; Roy et al.,

2018a; Espinosa et al., 2021). Por ello, y debido a la vigencia del plan de erradicación de la tuberculosis, que emplea métodos de diagnóstico inmunológicos, la Unión Europea prohíbe expresamente la vacunación frente a paratuberculosis en bovinos (Directiva 78/52/EC), salvo su empleo en investigación bajo condiciones experimentales y controladas (Garrido et al., 2012, 2013). Sin embargo, su uso sí está permitido en pequeños rumiantes.

El alto grado de interferencia en el diagnóstico inmunológico de la paratuberculosis y la tuberculosis se debe a la elevada similitud antigénica entre los agentes etiológicos de ambas enfermedades (Rogall et al., 1990; Serrano et al., 2017a). La tuberculosis, al igual que la paratuberculosis, es una enfermedad infecciosa de curso crónico, provocada por micobacterias del complejo *M. tuberculosis* como *Mbv* o *M. caprae*, que afecta tanto a rumiantes como a animales monogástricos (p.ej. cerdos, jabalíes, etc) (Pesciaroli et al., 2014) y que da lugar a lesiones granulomatosas, principalmente en tráquea, pulmones y nódulos linfáticos respiratorios (LoBue et al., 2010; Domingo et al., 2014).

9.1. Tipos de vacunas frente a micobacterias

La vacuna ideal frente a la paratuberculosis y la tuberculosis sería aquella que (i) evite la infección de los animales vacunados (inmunidad esterilizante), (ii) sea segura y estable en el ambiente, minimizando las lesiones en el punto de inyección y facilitando su conservación, (iii) permita distinguir entre animales vacunados de infectados y (iv) que no interfiera en el diagnóstico de otras micobacteriosis (Rosseels y Huygen, 2008; Griffin et al., 2009; Gupta et al., 2019; Balseiro et al., 2020b). Además, al igual que en la paratuberculosis, la vacunación frente a tuberculosis está enfocada en la generación de una respuesta inmunitaria celular potente que limite la progresión de la infección (Rosseels y Huygen, 2008; Windsor et al., 2014; Parlane y Buddle, 2015;

Balseiro et al., 2020b). Sin embargo, aunque actualmente existen varios tipos de vacunas (vivas atenuadas, inactivadas, de subunidades y de ADN) capaces de generar una respuesta inmunitaria celular y humoral potentes, ninguna de ellas ha sido capaz de prevenir completamente la infección por *Map* o *Mbv* (Sweeney et al., 2009; Mercier et al., 2014; Arrieta-Villegas et al., 2018; Roy et al., 2018b).

9.1.1. Vacunas vivas atenuadas

Durante los años 80 y 90 del siglo pasado se elaboró un gran número de vacunas vivas atenuadas frente a paratuberculosis, como la denominada Weybridge (Reino Unido y Australia), Lio-Johne (España), Paratuberkulose vaksine (Noruega) y Neoparasec™ (Nueva Zelanda, Alemania, Francia y España) (Cranwell, 1993; Juste et al., 1994; Gwozdz et al., 2000; Hasvold et al., 2002; Bastida y Juste 2011). De entre todas ellas, la de uso más extendido fue la vacuna Neoparasec™ (Rhone-Merieux, Lyon, Francia) basada en la cepa vacunal atenuada 316F de *Map* (Tipo C) y un adyuvante oleoso cuya eficacia fue demostrada en bovino, ovino y caprino (Molina et al., 1996; Gwozdz et al., 2000; Köhler et al., 2001). Sin embargo, ninguna de estas vacunas está comercialmente disponible en la actualidad.

Tradicionalmente, las vacunas vivas atenuadas se han obtenido mediante pases sucesivos del microorganismo en medios de cultivo para reducir su virulencia, pero no su inmunogenicidad (Griffin et al., 2009; Minor, 2015). Posteriormente, la secuenciación completa del genoma de la cepa tipo C K10 de *Map* y las técnicas de mutagénesis han permitido el diseño de nuevas vacunas atenuadas mediante la inclusión de alteraciones en los genes de virulencia $\Delta sigL$, $\Delta sigH$, $\Delta leuD$ o mutaciones en transposones, cuya efectividad ha sido probada en ratones y cabras, con resultados variables

(Chen et al., 2012; Faisal et al., 2013; Bannantine et al., 2014a; Shippy et al., 2017).

Por otra parte, la vacuna viva atenuada BCG frente a la tuberculosis, basada en la atenuación de una cepa de *Mbv* en pasajes sucesivos en medio de cultivo, hoy en día incluye diferentes subcepas (p. ej. BCG Pasteur 1173P2, BCG Danish 1331). Esta vacuna ha sido ampliamente administrada en humanos desde 1974 y actualmente está incluida en el programa de inmunización de la Organización Mundial de la Salud (OMS), sobre todo en aquellas zonas con una elevada incidencia clínica de tuberculosis (Sudáfrica, India, China, etc) (Calmette et al., 1928; Luca y Mihaescu, 2013; Martin et al., 2018). En medicina veterinaria, la vacuna BCG ha sido evaluada en numerosos estudios experimentales y de campo realizados en ganado vacuno (Buddle et al., 2003a; Wedlock et al., 2007; Hope et al., 2011), ovino (Balseiro et al., 2017), caprino (Pérez de Val et al., 2012a, 2013, 2016; Vidal et al., 2017) y animales silvestres (Ballesteros et al., 2009; Chambers et al., 2014), donde ha demostrado ser capaz de reducir la gravedad de las lesiones tuberculosas y la transmisión de la infección.

En la actualidad, no existe ninguna vacuna atenuada frente a paratuberculosis y tuberculosis disponible comercialmente en animales, dada la fase experimental en la que se encuentran (Rosseels y Huygen, 2008; Balseiro et al., 2020b). Además, estas vacunas son difíciles de conservar y suponen ciertos riesgos medioambientales asociados a la excreción de bacilos atenuados por heces u otras vías, que podría suponer un foco de contaminación para otros animales, y a la reactivación de la virulencia de la cepa vacunal por la posible inestabilidad de las mutaciones (Detmer y Glenting, 2006; Frey, 2007).

9.1.2. Vacunas inactivadas

Coetáneamente a las vacunas atenuadas, surgieron numerosas vacunas inactivadas frente a la paratuberculosis como las denominadas Lelystad en Países Bajos o Fromm en Estados Unidos (Hurley y Ewing, 1983; Wentink et al., 1994; van Schaik et al., 1996; Kalis et al., 2001). No obstante, estas vacunas fueron retiradas debido a la elevada interferencia diagnóstica con la tuberculosis durante largos periodos de tiempo tras la vacunación, y por la variabilidad en su eficacia (Hurley y Ewing, 1983; Chiodini et al., 1984; Muskens et al., 2002). La vacuna Mycopar[®] (Boehringer Ingelheim Vetmedica), desarrollada a partir de *Maa*, era la única vacuna autorizada para su uso en el ganado vacuno en Estados Unidos (Patton, 2011) y su efecto también había sido estudiado en ovejas y cabras (Nedrow et al., 2007; Faisal et al., 2013). Hoy en día existen solo unas pocas vacunas inactivadas disponibles en el mercado frente a la infección con *Map*: Paratuberculosis Autovaxine[®] (Vetal, Adiyaman, Turquía), Gudair[®] (CZ Veterinaria, Porriño, España) y Silirum[®] (CZ Veterinaria, Porriño, España).

Gudair[®] es una vacuna elaborada con la cepa vacunal 316F de *Map* (Tipo C), inactivada mediante calor y suplementada con un adyuvante de aceite mineral, indicada para pequeños rumiantes (Eppleston et al., 2005; Reddacliff et al., 2006; Mercier et al., 2014; Dhand et al., 2016). Por otro lado, la vacuna Silirum[®] está compuesta por la misma cepa que Gudair[®] pero formulada con un aceite mineral altamente refinado como adyuvante, que reduce significativamente la lesión provocada en el punto de inoculación (Hines et al., 2014; Begg et al., 2019). Su empleo está indicado para el ganado bovino, ya que, a pesar de la prohibición de su uso en esta especie, esta vacuna se ha aplicado tanto en ensayos clínicos bajo condiciones controladas de campo (Juste et al., 2009; Alonso-Hearn et al., 2012; Garrido et al., 2012, 2013), como en ensayos experimentales (Muñoz et al., 2005; Sweeney et al., 2009; Facciuolo et al., 2020).

De igual forma, se ha desarrollado una vacuna inactivada (HIMB por sus siglas en inglés, heat-inactivated *Mbv* vaccine) frente a la tuberculosis elaborada con una cepa de *Mbv* obtenida a partir de un jabalí infectado de forma natural, inactivada por calor (Garrido et al., 2011) y cuyos efectos han sido estudiados en cabras (Arrieta-Villegas et al., 2018; Roy et al., 2018b), ovejas (Balseiro et al., 2017), vacas (van der Heijden et al., 2017), cerdos (Beltrán-Beck et al., 2014), jabalíes (Garrido et al., 2011; Beltrán-Beck et al., 2014; Díez-Delgado et al., 2017), tejones (Balseiro et al., 2020a) y ciervos (López et al., 2016; Thomas et al., 2017), con resultados satisfactorios, aunque todavía se está investigando tanto la dosis como la vía de administración más adecuadas (Jones et al., 2016; Arrieta-Villegas et al., 2018; Balseiro et al., 2020b).

9.1.3. Vacunas de subunidades

Las vacunas de subunidades, creadas a partir de componentes proteicos purificados de *Map* o *Mbv*, tendrían la ventaja de emplear antígenos altamente específicos, capaces de generar una elevada respuesta Th1, reduciendo las interferencias diagnósticas y la formación de granulomas en el lugar de inoculación (Koets et al., 2006; Thakur et al., 2013; Chaubey et al., 2016). Algunas están basadas en proteínas del complejo antígeno 85 (Ag85A, B y C) (Shin et al., 2005), en la enzima SOD (Shin et al., 2005), en las proteínas de choque térmico (Hsp) 65 y 70 (Koets et al., 1999, 2006) y proteínas de la familia prolina-prolina-glutamato (PPE) (MAP1518 y 3184) (Nagata et al., 2005). Concretamente, la vacuna basada en la proteína Hsp70 o la vacuna de multicomponentes (85A, 85B, SOD y *Map*74F) han demostrado un efecto protector sobre la infección por *Map* en modelos experimentales caprinos y bovinos (Koets et al., 2006; Kathaperumal et al., 2008, 2009), pero que no han sido empleadas, hasta el momento, a gran escala.

En cuanto a las vacunas de subunidades frente a la tuberculosis, se han estudiado numerosos conjuntos de proteínas de forma individual o combinada con BCG en ratones (p. ej. Ag85B-ESAT-6, H6 o Rv3109c) (Hogarth et al., 2005; Badell et al., 2009; Blanco et al., 2021). Incluso, se han empleado vacunas vectorizadas con el adenovirus humano tipo 5 (Ad-Ag85A) en modelos bovinos y caprinos combinados con la vacunación con BCG (Vordermeier et al., 2009a; Pérez de Val et al., 2012a), mostrando una reducción significativa de las lesiones tuberculosas y de la carga micobacteriana en pulmones y nódulos linfáticos.

9.1.4. Vacunas de ADN

Las vacunas de ADN (plásmidos) consisten en la administración de genes que codifican proteínas inmunizantes, estimulando su expresión y síntesis. Estas vacunas han demostrado resultados prometedores en el control de patógenos intracelulares, al inducir una respuesta inmunitaria celular elevada sin necesidad de adyuvantes (Orme et al., 2001; Rosseels y Huygen, 2008). Sin embargo, los estudios enfocados en la valoración de la eficacia de este tipo de vacunas frente a *Map* o *M. tuberculosis* se han llevado a cabo principalmente en roedores (Derrick et al., 2004; Skeiky et al., 2005; Park et al., 2008; Roupie et al., 2008), siendo muy limitados en rumiantes (Sechi et al., 2006).

9.2. Adyuvantes

Los adyuvantes son sustancias de diversa naturaleza (p. ej. sales minerales, componentes bacterianos, partículas lipídicas, etc) que son añadidas a la vacuna con el fin de reforzar y potenciar la respuesta inmunitaria

frente al antígeno, al que complementan, y que han sido utilizados tanto en medicina humana como en veterinaria (Aucouturier et al., 2001).

Aunque no se conoce con detalle el mecanismo de acción de los adyuvantes sobre la respuesta inmunitaria, dado que estos se suelen administrar en compañía de antígenos, si se sabe que ejercen efectos tanto sobre el hospedador como sobre los antígenos mediante el reclutamiento de CPAs o el efecto de depósito (Singh y O'Hagan, 2003; Coffman et al., 2010; Awate et al., 2013). Entre los distintos tipos de adyuvantes, las emulsiones oleosas, compuestas por una fase acuosa (medio en el que se encuentra el antígeno), una fase de aceite y un surfactante (compuesto tensoactivo estabilizador), ejercen principalmente un efecto de depósito al permitir una liberación sostenida del antígeno durante un tiempo prolongado, lo que se asocia a una mayor inmunogenicidad (Coffman et al., 2010; Awate et al., 2013; Klimka et al., 2015). Este tipo de adyuvantes es el más empleado en veterinaria y su acción es la presentación del antígeno en gotas de pequeño tamaño atrapadas en una fase continua de aceite que se mantiene en el sitio de inyección, donde provoca la formación de granulomas (Aucouturier et al., 2001). Sin embargo, según la composición o el tipo de ácidos grasos o del emulsionante, existe una gran variedad de emulsiones oleosas con diferentes propiedades inmunológicas (Vordermeier et al., 2009b; Fox et al., 2012; Klimka et al., 2015; Begg et al., 2019).

El adyuvante de Freund, y más específicamente el adyuvante completo de Freund (ACF), es uno de los adyuvantes oleosos más conocidos, compuesto por aceite mineral, surfactante y micobacterias muertas (generalmente *M. tuberculosis*). Sin embargo, este adyuvante provoca graves lesiones locales como granulomas o abscesos en el sitio de inoculación debido a la incapacidad del individuo de degradar los aceites que lo componen (Singh y O'Hagan, 2003). Esto ha provocado que su uso no esté permitido para la

vacunación en humanos y animales, sustituyéndose muchos de sus componentes por aceites más biodegradables (Klimka et al., 2015).

Actualmente, Montanide™ ISA (Seppic, France) es uno de los grupos de adyuvantes más empleados en veterinaria debido a sus mínimos efectos adversos (Singh y O'Hagan, 2003). De hecho, tanto Gudair® (Montanide™ 103 y 80) como Silirum® (Montanide™ 266) están formuladas con este tipo de adyuvante. Sin embargo, el adyuvante de Gudair® genera una respuesta en el lugar de infección similar a los ACF, asociada a la aparición de lesiones granulomatosas y necrosis, tanto en animales como tras la inoculación accidental en humanos (Windsor et al., 2005; Windsor y Eppleston, 2006). El adyuvante de Silirum® se compone de un aceite mineral, un aceite metabolizable y un surfactante altamente refinado que produce una menor lesión local, si bien, por razones comerciales, se desconoce su composición exacta (Reyes, 2007). Todos estos adyuvantes, en combinación con la cepa vacunal 316F de *Map*, han demostrado ser capaces de inducir el establecimiento de una respuesta celular y humoral en ganado vacuno, ovino y en conejos (Sweeney et al., 2009; de Silva et al., 2015; Arrazuria et al., 2016). En ese sentido, en un trabajo realizado por Reyes (2007) se comparó el efecto de una formulación con Montanide™ ISA 266 (adyuvante de Silirum®) con la vacuna Gudair® en ovejas, observándose que Montanide™ ISA 266 provocaba una reacción local menor, con una mayor proporción de linfocitos, células gigantes y menor grado de necrosis en el punto de inoculación que la vacuna Gudair®.

Además, también se han detectado variaciones en el perfil inmunológico originadas por la combinación con distintos tipos de adyuvante Montanide™ ISA (Fox et al., 2012; Klimka et al., 2015; Begg et al., 2019). En un estudio realizado por Begg et al. (2019) se llevó a cabo una caracterización de la respuesta inmunitaria (mediante la técnica IGRA y la detección de anticuerpos) generada por la inoculación de la cepa de *Map* 316F sola o

combinada con varios tipos de adyuvantes Montanide™ ISA, comparándola con el efecto de Gudair®. No se observaron diferencias en la producción periférica de IFN- γ entre Gudair® y la suplementación con Montanide™ 50 V, 50 V2 y 71 VG, aunque si se detectó una mayor producción de anticuerpos en los animales vacunados con la vacuna comercial que con el resto de formulaciones (Begg et al., 2019). Estudios similares se han realizado con una vacuna basada en la suplementación de un antígeno recombinante frente a tuberculosis (Rv3019c) con distintos adyuvantes (Montanide™ ISA 50, 70 y 206) en terneros, donde el adyuvante ISA 70 generó una mayor respuesta celular y humoral que el resto (Vordermeier et al., 2019b).

9.3. Eficacia y efectos de la vacunación

La eficacia de una vacuna se basa en el establecimiento de una adecuada respuesta inmunitaria celular y humoral, la reducción de la presencia de micobacterias en los tejidos y heces, y la disminución de la gravedad de las lesiones (Rosseels y Huygen, 2008; Balseiro et al., 2020b).

La vacunación frente a la paratuberculosis con vacunas inactivadas ha demostrado una elevada eficacia (> 90 %) en la disminución de los casos clínicos, la mortalidad y la frecuencia de eliminación de *Map* en las heces, llegando incluso a observarse una reducción de la excreción fecal del 47 % (Reddacliff et al., 2006; Alonso-Hearn et al., 2012; Mercier et al., 2014; Dhand et al., 2016). También se ha descrito una considerable disminución de la colonización de *Map* en el intestino (de 15 UFCs/g a 2 UFCs/g) limitando, además, el número y la gravedad de las lesiones (Sweeney et al., 2009; Arrazuria et al., 2016; Facciuolo et al., 2020). Incluso, la vacunación se ha asociado con un aumento de la producción láctea (4 %) y de la vida productiva (de 3,7 a 4,7 años de edad) (Alonso-Hearn et al., 2012). Estos efectos en la reducción de las lesiones y la presencia de *Map* en tejidos y

heces también se han observado con vacunas atenuadas o de subunidades (Koets et al., 2006; Faisal et al., 2013).

En lo relativo a la vacunación frente a la tuberculosis, el empleo de la vacuna BCG ha demostrado una eficacia del 56-68 % en vacas y terneros, determinada en función del número de animales positivos en las pruebas diagnósticas, la presencia de lesiones y la detección de *Mbv* en los tejidos (Nugent et al., 2017; Ameni et al., 2018). En este sentido, la vacunación frente a tuberculosis, ya sea con la vacuna atenuada (BCG) o inactivada (HIMB), es capaz de generar una respuesta inmunitaria potente y prolongada en el tiempo (Wedlock et al., 2007; van der Heijden et al., 2017), así como una considerable reducción de la excreción nasal de *Mbv* (Lopez-Valencia et al., 2010), de la carga micobacteriana en los pulmones y del número y la gravedad de las lesiones pulmonares (Buddle et al., 2013; Beltrán-Beck et al., 2014; Vidal et al., 2017; Ameni et al., 2018; Arrieta-Villegas et al., 2018).

9.4. Respuesta inmunitaria asociada a la vacunación

La vacunación tiene como objetivo la estimulación de una respuesta inmunitaria específica y de memoria tras el contacto con el antígeno vacunal. De esta manera, la reexposición al antígeno provocará una respuesta secundaria rápida, efectiva y de mayor duración gracias a la presencia de células del sistema inmunitario previamente sensibilizadas y con memoria inmunológica (Pulendran y Ahmed, 2011). Con el fin de valorar el efecto de la vacunación sobre la respuesta inmunitaria del hospedador se han llevado a cabo numerosos estudios *in vivo* e *in vitro* que, bajo condiciones experimentales, permiten controlar un amplio número de parámetros (edad, exposición previa, dosis de infección, etc). No obstante, la gran variedad de estos estudios en diferentes especies y en distintas condiciones dificulta la extrapolación y la interpretación de los resultados.

9.4.1. Estudios *in vivo*

Los estudios *in vivo* se centran mayoritariamente en la valoración de la producción de IFN- γ y anticuerpos (Sweeney et al., 2009; de Silva et al., 2015; Arrieta-Villegas et al., 2018). Debe tenerse en cuenta que existe una gran variedad de factores que influyen y pueden modificar la respuesta inmunitaria generada tras la vacunación (especie animal, tipo de vacuna, edad, exposición previa, vía de administración, etc) (Corpa et al., 2000c; Arrazuria et al., 2016; Shippy et al., 2017).

En este sentido, el momento de inicio de una respuesta inmunitaria celular periférica detectable difiere entre el ganado vacuno (16 semanas post-vacunación) y los pequeños rumiantes (2-4 semanas post-vacunación) (Corpa et al., 2000c; Köhler et al., 2001; Begg y Griffin, 2005) e incluso entre los animales pertenecientes al mismo rebaño, debido a la elevada variabilidad individual (Thomsen et al., 2012). Estas variaciones también se han observado en la respuesta humoral, ya que no todos los animales generan niveles de anticuerpos detectables tras la vacunación (Juste et al., 1994; Mercier et al., 2014; Vidal et al., 2017; Arrieta-Villegas et al., 2018; Pooley et al., 2019). Tanto es así que un estudio estimó que del 88 % de las vacas que generaron una respuesta inmunitaria mediada por células, al menos el 67 % no produjeron posteriormente anticuerpos específicos frente a *Map* tras la administración de la vacuna (Thomsen et al., 2012).

También existen diferencias en el establecimiento de la respuesta inmunitaria celular y humoral en función de la vacuna administrada. En un estudio llevado a cabo por Shippy et al. (2017) la vacunación de cabras con una vacuna viva atenuada (pgsN) dio lugar a una mayor liberación de IFN- γ en sangre, que se observó de forma más temprana que cuando se empleó la vacuna inactivada Mycopar[®]. Por el contrario, en varios estudios en los que se administraron vacunas atenuadas, no se detectaron anticuerpos específicos de

Map, mientras que estos sí estaban presentes en animales vacunados con vacunas inactivadas (Hines et al., 2014; Shippy et al., 2017). Estos hallazgos se repiten al estudiar vacunas frente a la tuberculosis, ya que se ha comprobado que la vacuna inactivada HIMB induce mayores niveles de IFN- γ en sangre que la vacuna atenuada BCG en terneros (van der Heijden et al., 2017). Además, a diferencia de la BCG, la vacuna HIMB genera anticuerpos específicos frente a *Mbv*, tal y como se ha observado en cabras y en terneros (van der Heijden et al., 2017; Arrieta-Villegas et al., 2018).

La edad también es un factor relevante en la respuesta inmunitaria asociada a la vacunación. De hecho, se ha observado que la producción periférica de IFN- γ disminuye más rápidamente en cabras y ovejas vacunadas a los 15 días de edad que a los 5 meses, posiblemente debido a la falta de madurez de su sistema inmunitario (Corpa et al., 2000c). Por otro lado, se ha comprobado que la respuesta inmunitaria, tanto celular como humoral, es mucho más intensa y duradera en cabras vacunadas a los 5 meses que en cabras mayores de 1 año (Royo, 2018), lo que sugiere que podría existir una ventana de tiempo en la que habría una mayor intensidad de la respuesta a la vacunación, aunque las variables que determinan este periodo sean aún desconocidas en su mayor parte. Además, los niveles de anticuerpos también disminuyen con la edad, por lo que el efecto de la vacunación sobre ellos desaparece con el tiempo (Muskens et al., 2002; Thomsen et al., 2012). Este efecto de la edad también se ha encontrado en la vacunación frente a la tuberculosis, donde en terneros infectados experimentalmente con *Mbv* la administración de BCG a las 8 horas tras el nacimiento presentó una eficacia del 100 % (ningún animal con lesiones tuberculosas), frente al 90 % en los vacunados a las 6 semanas (1 animal con lesiones tuberculosas) (Buddle et al., 2003b).

Por otro lado, la exposición previa con *Map* antes de la vacunación provoca una reducción de la intensidad y la duración de la respuesta

inmunitaria en cabras (Royo, 2018). Esto se ha confirmado en un estudio experimental llevado a cabo en conejos donde se observó que la infección previa con *Map* en conejos y su posterior vacunación da lugar a una menor producción periférica de IFN- γ en comparación con aquellos vacunados e infectados con posterioridad (Arrazuria et al., 2016).

En cuanto a la vía de administración, existen pocos estudios que hayan evaluado otras vías además de la subcutánea. En un estudio realizado por Arrazuria et al. (2020) en conejos infectados oralmente con *Map* se comparó la administración de varias vacunas inactivadas empleando distintas vías: Silirum[®] por la vía subcutánea y una cepa de *Map* químicamente inactivada y sin adyuvantes administrada tanto por la vía oral como intradérmica. Se comprobó que la administración subcutánea de Silirum[®] daba lugar a interferencias con la prueba de intradermoreaccion frente a los antígenos aviar y bovino y a un aumento de anticuerpos específicos frente a *Map*, mientras que la vacuna experimental, basada en *Map* inactivada en ausencia de adyuvante y administrada oralmente, no produjo ninguna reacción. Por otro lado, esta misma vacuna experimental inoculada por la vía intradérmica también ocasionó interferencias, aunque estas fueron menores que las detectadas con Silirum[®] observándose, además, una menor proporción de animales en los que se identificó *Map* mediante PCR (Arrazuria et al., 2020). Por otra parte, la administración subcutánea de HIMB en cabras produce un incremento significativo de las respuestas celular y humoral (Arrieta-Villegas et al., 2018), mientras que los niveles de IFN- γ en corderos vacunados oralmente con esta misma vacuna no llegan a ser detectables (Balseiro et al., 2017).

La detección de niveles elevados de IFN- γ durante las pruebas IGRA en PBMCs o sangre estimuladas con antígenos de micobacterias no siempre se relaciona con un efecto protector de la vacuna, puesto que se han detectado lesiones intestinales graves con una elevada presencia de micobacterias en

animales vacunados frente a la paratuberculosis independientemente de los niveles de IFN- γ detectados tras la estimulación *in vitro* con antígenos de *Map* (Gwozdz et al., 2000; Muñoz, 2014; Arrazuria et al., 2016). Incluso, estudios sobre la vacunación frente a la tuberculosis han observado una elevada carga micobacteriana en los tejidos junto con niveles elevados de IFN- γ en la prueba de IGRA (Majlessi et al., 2006; Mittrücker et al., 2007; Lambert et al., 2009; Kagina et al., 2010). Por ello, se ha sugerido que existe una alta posibilidad de que la respuesta inmunitaria determinada por la producción de IFN- γ tras la estimulación con antígeno de micobacterias, esté mayormente relacionada con la presencia de bacterias en la sangre, más que con la protección (Thakur et al., 2012; Arrazuria et al., 2016).

En cuanto a la respuesta humoral, catalogada como ineficaz, se ha sugerido que la vacuna ideal podría ser aquella capaz de estimular la respuesta inmunitaria celular en ausencia de anticuerpos (Griffin et al., 2009). Sin embargo, otros autores discrepan, ya que han observado una mayor proporción de linfocitos B en el intestino de aquellos animales vacunados que son capaces de controlar la infección por *Map* (Begg y Griffin, 2005). Incluso, varios trabajos afirman que la generación de una respuesta humoral robusta al inicio de la vacunación es crucial para evitar la progresión de la infección por *Map* (de Silva et al., 2015; Pooley et al., 2019).

9.4.2. Estudios *in vitro*

El largo periodo de incubación de la paratuberculosis y la tuberculosis y la lenta progresión de la infección provoca que los experimentos llevados a cabo *in vivo* requieran de largos periodos de tiempo (Corpa et al., 2000a; Mercier et al., 2014; Balseiro et al., 2017). Además, el empleo de un gran número de animales, su manejo y el elevado coste derivado de su mantenimiento aumentan la complejidad de este tipo de estudios. Es por ello que los ensayos

in vitro ofrecen una buena alternativa para evaluar la eficacia y la respuesta inmunitaria derivada de la vacunación, reduciendo no solo el tiempo necesario para la evaluación de la respuesta inmunitaria celular, sino también el número de animales empleados (Tanner et al., 2021). Sin embargo, aunque estos ensayos están altamente estandarizados en humanos y roedores, en medicina veterinaria no existe un consenso sobre los métodos más adecuados que aseguren su reproducibilidad, siendo necesario mejorar la optimización y caracterización de estos modelos en rumiantes.

La estimulación *in vitro* de PMBCs con antígenos relacionados con micobacterias permite valorar los cambios en los niveles de expresión de diversos marcadores celulares (p. ej. CD4, CD8, etc) y citoquinas, ya sea mediante citometría de flujo o mediante PCR cuantitativa (qPCR) (Platt et al., 2006; Faisal et al., 2013). De esta manera, se ha estimado que la vacunación frente a la paratuberculosis con vacunas inactivadas en el ganado bovino, y la posterior re-estimulación *in vitro* de PBMCs, provoca un incremento de la expresión de CD25 y CD26, dos marcadores de activación de linfocitos T y B, y una mayor proliferación de linfocitos CD4⁺, CD8⁺ y $\gamma\delta$ detectable hasta los 12 meses post-vacunación (Platt et al., 2006; Stabel et al., 2011).

En cabras, la administración de vacunas frente a la paratuberculosis también produce un aumento de la capacidad de proliferación de los linfocitos CD4⁺, CD8⁺ y $\gamma\delta$ (Faisal et al., 2013; de Silva et al., 2015), además de un incremento en los niveles de expresión de citoquinas proinflamatorias (p. ej. IL-6 y IL-1 β) y una menor expresión de citoquinas antiinflamatorias (IL-4, IL-10 y TGF- β) (Faisal et al., 2013). Este efecto es mayor cuando se utiliza una vacuna atenuada que cuando se utiliza una inactivada (Faisal et al., 2013). Incluso, en un estudio realizado por Sechi et al. (2006) se detectaron mayores niveles de expresión de IFN- γ en PBMCs procedentes de corderos vacunados con vacunas de ADN (p-85A-BCG y p-Hsp65) que con vacunas inactivadas.

La vacunación frente a la tuberculosis en rumiantes ejerce un efecto similar. Se ha encontrado un aumento en el porcentaje de células CD25⁺/CD4⁺, CD25⁺/CD8⁺ y CD25⁺/WC1⁺ en PBMCs de terneros vacunados con BCG tras su estimulación antigénica (Buddle et al., 2003b). No obstante, estas alteraciones podrían ser dinámicas y estar asociadas al reconocimiento de los antígenos micobacterianos y la consiguiente expansión clonal de los linfocitos (Buza et al., 2009). Además, se ha observado un aumento de la expresión de IFN- γ , IL-6 e IL-1 β , pero también de IL-4, lo que indicaría que la vacunación con BCG estimularía tanto la respuesta Th1 como Th2 (Buddle et al., 2003b; Guerra-Maupome et al., 2019a).

Los ensayos de inhibición del crecimiento micobacteriano (MGIAs), que consisten en evaluar la capacidad de las células del hospedador de inhibir el crecimiento de las micobacterias tras la infección *in vitro*, también suponen una alternativa a los estudios *in vivo* (Bannantine et al., 2014a; Pooley et al., 2018; Tanner et al., 2016, 2020, 2021). Se han desarrollado un gran número de MGIAs, sobre todo en humanos y ratones, basados en el uso de PBMCs, sangre completa, esplenocitos, macrófagos alveolares o macrófagos derivados de la médula ósea para la valoración de la eficacia de la vacunación con BCG, observándose un incremento de la capacidad de estas células, en animales vacunados, para inhibir el crecimiento de las micobacterias alterando, además, los patrones de expresión y secreción de citoquinas proinflamatorias e incluso relacionando esta mayor respuesta con el desarrollo de la inmunidad entrenada (Cowley y Elkins, 2003; Parra et al., 2009; Marsay et al., 2013; Joosten et al., 2018; Radloff et al., 2018).

Estos mismos ensayos realizados en rumiantes también han aportado resultados reveladores (Denis et al., 2004; Pepponi et al., 2017). Por ejemplo, la infección con *Map* de monocitos ovinos co-cultivados con linfocitos autólogos procedentes de ovejas vacunadas con Gudair[®] y no vacunadas, no mostró diferencias en cuanto a la capacidad de eliminación de *Map* entre

animales vacunados y no vacunados, posiblemente por el debilitamiento de la respuesta inmunitaria de memoria inducida por la vacunación, que se había realizado 13 meses antes (Pooley et al., 2018). Este resultado es similar al observado en un MGIA de PBMCs+MDMs bovinos en el cual no se observaron diferencias significativas en la inhibición del crecimiento intracelular de *Mbv* entre MDMs co-cultivados con PBMCs procedentes de animales vacunados y no vacunados a los 12 meses post-vacunación (Carpenter et al., 1997). En otro estudio, sin embargo, sí se detectó una mayor actividad antimicrobiana en MDMs bovinos, co-cultivados con linfocitos T CD4⁺ y procedentes de animales vacunados con BCG (Endsley et al., 2007). Estas diferencias podrían deberse a la caracterización previa y el empleo de una subpoblación específica de linfocitos en lugar de toda la fracción de PBMCs, lo que resalta la necesidad de realizar una valoración de las poblaciones celulares empleadas en este tipo de ensayos con el fin de identificar las características fenotípicas que podrían condicionar la naturaleza de la respuesta inmunitaria. Por otro lado, en un MGIA desarrollado únicamente con cultivos puros de MDMs se determinó una menor supervivencia de *Mbv* en los macrófagos procedentes de vacas vacunadas con HIMB, independientemente de la respuesta inmunitaria celular o humoral, de manera que este proceso podría estar mediado por mecanismos de la respuesta inmunitaria entrenada (Juste et al., 2016).

Los cultivos de MDMs también han sido empleados durante el diseño de vacunas vivas atenuadas modificadas genéticamente frente a paratuberculosis debido a la necesidad de acelerar el proceso de evaluación de candidatos vacunales (Bannantine et al., 2014b). La selección de mutantes atenuados de *Map* comienza con la evaluación de la supervivencia de estos en MDMs bovinos, dado que son las células diana donde *Map* es capaz de multiplicarse, lo que permite determinar el grado de atenuación de los mutantes (Scandurra et al., 2010; Bannantine et al., 2014a). La realización de ensayos de invasión

con MDMs permitió evaluar el grado de supervivencia de distintos mutantes de *Map* por medio de la estimación del número de UFCs mediante PCR de la secuencia IS900 tomando como referencia la cepa Tipo C K10 de *Map* (Lamont et al., 2014). Aquellos mutantes cuyo número de UFCs disminuyó con el tiempo, fueron considerados candidatos para la siguiente fase en el diseño de estas vacunas (Lamont et al., 2014).

Finalmente, a pesar del creciente protagonismo de los neutrófilos en la protección frente a la paratuberculosis y la tuberculosis (Abadie et al., 2005; Trentini et al., 2016; Bickett et al., 2020), existen muy pocos estudios que evalúen la respuesta de estas células *in vitro* en relación con la vacunación (Moorlag et al., 2020; Ladero-Auñon et al., 2021b). Sin embargo, recientemente se ha demostrado que los neutrófilos procedentes de conejos vacunados con vacunas inactivadas, ya sea por vía oral (con la cepa vacunal 316F de *Map*, *C. pseudotuberculosis* o la cepa 1403 de *Mbv*) o subcutánea (Silirum®), son capaces de inducir una respuesta inmunitaria entrenada (Ladero-Auñon et al., 2021b). Esto se comprobó al detectar un incremento en la funcionalidad de los neutrófilos durante los 3 primeros meses tras la vacunación, traducido como una mayor capacidad fagocítica y de liberación de NETs, no solo frente a la infección *in vitro* con *Map* y *Mbv*, si no también frente a patógenos no relacionados (p. ej. *S. aureus* o *E. coli*). Este hecho estaría en consonancia con los resultados obtenidos por Moorlag et al. (2020) en neutrófilos procedentes de personas vacunadas con BCG en los cuales también se detectó un aumento de su acción microbicida frente a *C. albicans*, que podría estar asociado con diversos cambios epigenéticos (p. ej. metilación de histonas), el incremento de la expresión de numerosos marcadores de activación (CD11b y CD66b, responsables del reclutamiento de células inflamatorias y el “estallido respiratorio”), la disminución de marcadores inmunosupresores (PD-L1, responsable de la muerte celular) o el incremento de la actividad antimicrobiana.

Capítulo III: Justificación y objetivos



Se ha demostrado que la vacunación frente a la paratuberculosis mejora notablemente la sanidad, la producción y el bienestar de los animales gracias al descenso de la morbilidad de la infección (Dhand et al., 2013, 2016), la gravedad de los signos clínicos y las lesiones (Begg y Griffin, 2005), y la excreción de *Map* en las heces (Mercier et al., 2014). Sin embargo, este procedimiento dista de ser perfecto. Se ha demostrado que (i) la inmunidad que produce no es esterilizante, ya que la vacunación no previene la infección (Reddacliff et al., 2006; Muñoz, 2014), (ii) que el grado de protección que induce no es similar en todos los animales, ya que se ha observado, en estudios naturales y experimentales, que, mientras hay animales vacunados que si desarrollan protección frente a la aparición de formas clínicas graves, hay otros donde la enfermedad progresa hasta mostrar signos clínicos evidentes y una abundante excreción fecal de *Map* (Eppleston et al., 2005; Reddacliff et al., 2006; Windsor, 2006; Hines et al., 2014; Mercier et al., 2014; Muñoz, 2014; de Silva et al., 2015) y que, (iii) en muchas explotaciones, a pesar de llevar muchos años practicando la vacunación y disminuir los casos clínicos, no se ha conseguido una reducción marcada de la prevalencia de la infección (Kalis et al., 2001; Bastida y Juste, 2011; Juste y Perez, 2011).

Hasta el momento, no se ha conseguido elaborar una explicación satisfactoria al porqué tienen lugar estas situaciones. Entre otros motivos, esto se debe a que todavía existen numerosas incógnitas sobre la compleja interacción entre *Map* y la respuesta del hospedador, relacionadas, por ejemplo, con los mecanismos de supervivencia de *Map* o la polarización de la respuesta inmunitaria (Hostetter et al., 2003; Gollnick et al., 2007; Begg et al., 2011), que comprometen el conocimiento sobre los mecanismos de eficacia de la vacuna. Estas incógnitas necesitan esclarecerse para comprender mejor la forma de actuación y los efectos específicos de la vacunación sobre la respuesta inmunitaria del hospedador frente a la infección por *Map* para que

se desarrolle la protección. El estudio de cómo la vacuna influye en dicha respuesta inmunitaria ayudaría a entender también cómo la vacunación frente a la paratuberculosis es capaz de mostrar protección frente a la tuberculosis, al reducir la gravedad de las lesiones, o frente a otras enfermedades no relacionadas con micobacterias (p. ej. otras infecciones digestivas o respiratorias) y qué componentes de la vacuna podrían jugar un papel en estos efectos (Pérez de Val et al., 2012b; Royo et al., 2016; Serrano et al., 2017b; Juste et al., 2021).

En términos generales, la eficacia y la seguridad de una vacuna frente a paratuberculosis se puede evaluar en modelos experimentales *in vivo* mediante el análisis de la respuesta inmunitaria periférica y local y la valoración del número y tipo de lesiones halladas tras el desafío de los animales vacunados (Rosseels y Huygen, 2008). Este tipo de estudios ha demostrado que la administración de vacunas inactivadas frente a la paratuberculosis genera un incremento rápido, intenso y duradero de la respuesta inmunitaria celular y humoral periféricas en cabras, ovejas y vacas (Corpa et al., 2000c; Reddacliff et al., 2006; Sweeney et al., 2009; Koets et al., 2019). No obstante, una respuesta inmunitaria intensa no siempre se corresponde con una reducción de las lesiones y, por lo tanto, no ha de correlacionarse directamente con una buena protección (Mercier et al., 2014; Muñoz, 2014; Fernández et al., 2017b). La principal ventaja de los modelos experimentales *in vivo* es que sirven para estudiar la acción coordinada de los numerosos mecanismos que componen la respuesta inmunitaria del hospedador frente a la paratuberculosis. En este sentido, se han empleado roedores y lagomorfos como modelos experimentales, que son más manejables y baratos que los rumiantes. Sin embargo, en estas especies no se ha logrado reproducir con exactitud las características clínicas y lesionales de la paratuberculosis en rumiantes, siendo quizás los conejos los que más se aproximan al tipo de respuesta inmunitaria descrita en esta especie (Hines et al., 2007; Arrazuria et

al., 2016). Por ello, los modelos *in vivo* en rumiantes parecen necesarios por el momento. Entre ellos, el bovino ha sido el más empleado para el estudio de la patogenia y de la eficacia vacunal (Muñoz et al., 2005; Sweeney et al., 2009; Stabel et al., 2011), si bien los modelos *in vivo* caprinos se han convertido en una alternativa muy extendida, debido a que el manejo de los animales es mejor y el coste económico es más reducido, además de que el tipo de cepa de *Map* a emplear y la respuesta inmunitaria y lesional son muy similares a lo que sucede en la especie bovina (más que el modelo de conejo) (Corpa et al., 2000c; Kathaperumal et al., 2009; Hines et al., 2014; Mercier et al., 2014). Aun así, los modelos *in vivo* en rumiantes presentan tres grandes inconvenientes: (i) el gran número de animales necesario para realizar los ensayos, (ii) los largos periodos de experimentación (de meses o incluso años) y (iii) la gran variabilidad individual al tratarse de especies ganaderas.

De forma complementaria a los modelos *in vivo*, durante los últimos 20 años, se han desarrollado modelos *in vitro* frente a la paratuberculosis utilizando el cultivo celular de MDMs o neutrófilos, que han demostrado tener gran utilidad al ser capaces de simular, hasta cierto punto, los efectos que la infección por *Map* provocaría directamente sobre las células del hospedador, consiguiendo de este modo reducir la duración y el coste de los estudios, así como evitar, en cierta medida, el sacrificio de animales (Mitchell et al., 2011; Pooley et al., 2018; Ladero-Auñon et al., 2021a). En medicina veterinaria, y concretamente en lo relativo a los rumiantes domésticos, existe una gran variedad de protocolos destinados a la obtención y purificación de células sanguíneas para el posterior desarrollo de ensayos *in vitro*, procedentes de la adaptación de técnicas empleadas en medicina humana (Berger y Griffin, 2006; Siemsen et al., 2014). Dentro de los protocolos más empleados para la separación de PBMCs y neutrófilos de rumiantes, así como para la purificación de monocitos y obtención de MDMs, se han empleado distintas técnicas basadas en la separación por gradientes de diferente densidad, así

como métodos funcionales (adhesión) o inmunológicos (unión a receptores de superficie) (Budhia et al., 2006; Elmowalid, 2012; Hellenbrand et al., 2013; Siemsen et al., 2014). Esta elevada heterogeneidad metodológica hace necesario el establecimiento de un protocolo específico de aislamiento estandarizado, adecuado a los pequeños rumiantes, que incluya la caracterización fenotípica de las células, previa a la realización de los estudios funcionales, con el fin de favorecer la reproducibilidad y la comparación de los resultados con estudios similares.

La mayor parte de estos estudios *in vitro* han estado enfocados en estudiar la interacción entre *Map* y las células del hospedador. Algunos han permitido esclarecer los mecanismos de evasión utilizados por *Map* para su supervivencia en el entorno adverso del interior de los macrófagos, como, por ejemplo, la inhibición de la maduración de los fagolisosomas y su acidificación, o la alteración del patrón de liberación de citoquinas hacia un perfil Th2 (Hostetter et al., 2003; Berger y Griffin, 2006; Kugadas et al., 2016). También se ha demostrado que *Map* es capaz de influenciar otras células fagocíticas, como los neutrófilos, influyendo sobre su reclutamiento al lugar de infección (Dotta et al., 1999). Sin embargo, los estudios *in vitro* realizados hasta el momento para evaluar el efecto de la vacunación sobre las distintas poblaciones celulares que intervienen en la respuesta inmunitaria son escasos y la información obtenida, por lo tanto, aún es muy reducida y en ocasiones contradictoria. En este sentido, se ha demostrado que la vacunación de terneros con HIMB produce un incremento de la actividad antimicrobiana de MDMs frente a *Mbv* (Juste et al., 2016) o que la vacunación de conejos con vacunas inactivadas frente a la paratuberculosis desencadena también un incremento de la destrucción *Map*, *Mbv* o *S. aureus* en neutrófilos (Ladero-Auñón et al., 2021b). Sin embargo, en MDMs ovinos la vacunación frente a la paratuberculosis no se ha relacionado con un aumento de la respuesta antimicrobiana frente a *Map* (Pooley et al., 2018). Estos resultados resaltan la

importancia de evaluar el efecto de la vacunación sobre la respuesta de los macrófagos y los neutrófilos a la infección por *Map*, que podría ser el responsable del efecto protector de la vacuna.

El trabajo desarrollado en esta Tesis Doctoral se enmarca dentro de la línea de investigación ya establecida en el grupo de investigación en “Sanidad y Patología de Rumiantes” de la Universidad de León, centrada en el estudio de la patogenia de la paratuberculosis, principalmente en las especies ovina y caprina, y cómo la vacunación influye sobre ella. Por lo tanto, esta Tesis Doctoral tiene como **objetivo general** estudiar la respuesta inmunitaria asociada a la vacunación frente a la paratuberculosis en pequeños rumiantes, en concreto para tratar de conocer los mecanismos que podrían estar relacionados con la protección, utilizando tanto modelos experimentales *in vitro* como *in vivo*.

De forma más específica, se han planteado los siguientes cuatro objetivos concretos:

Objetivo 1: Estandarización de un protocolo eficiente para el aislamiento conjunto de PBMCs y neutrófilos a partir de sangre periférica de ovejas y cabras, y la posterior purificación de monocitos y generación de MDMs.

Para su cumplimiento, se ha desarrollado el primer estudio de esta Tesis Doctoral, titulado “Establecimiento de un protocolo optimizado para el aislamiento *in vitro* de distintas células inmunitarias a partir de sangre periférica y la evaluación comparativa de técnicas para la obtención de MDMs en pequeños rumiantes” y que ha dado lugar a la siguiente publicación científica:

“Arteche-Villasol, N., Benavides, J., Vallejo, R., Royo, M., Ferreras, M.C., Pérez, V., Gutiérrez-Expósito, D. 2020. *Optimized in vitro isolation of different subpopulation of immune cells from peripheral blood and*

comparative techniques for generation of monocyte-derived macrophages in small ruminants. Vet. Immunol. Immunopathol. 230, 110131”

Para ello, se extrajeron muestras de sangre periférica de ovejas y cabras a partir de las cuales se aislaron PBMCs y neutrófilos comparando distintas condiciones de centrifugación y gradientes de densidad. Además, una vez aislados los PBMCs, se emplearon dos técnicas de purificación de monocitos y diversas condiciones de cultivo celular para su maduración *in vitro* a macrófagos. Finalmente, se llevó a cabo una caracterización fenotípica de todas las fracciones celulares obtenidas mediante microscopía y citometría de flujo.

Objetivo 2: Evaluar el efecto de la vacunación frente a la paratuberculosis sobre la respuesta inmunitaria y capacidad fagocítica de macrófagos caprinos infectados *in vitro* con *Map*.

Este objetivo se ha desarrollado mediante el segundo estudio de esta tesis, que lleva por título “Valoración de la respuesta temprana frente a la infección *in vitro* de MDMs con *Map* de cabras vacunadas y no vacunadas frente a paratuberculosis”, del que se ha elaborado la publicación científica que se menciona a continuación:

“Arteche-Villasol, N., Gutiérrez-Expósito, D., Vallejo, R., Espinosa, J., Elguezabal, N., Ladero-Auñon, I., Royo, M., Ferreras, M.C., Benavides, J., Pérez, V. 2021. Early response of monocyte-derived macrophages from vaccinated and non-vaccinated goats against in vitro infection with Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis. Vet. Res. 52, 69”

Pasados treinta días desde la administración de la vacuna Silirum[®], se obtuvieron MDMs caprinos (CaMØs) procedentes de cabritos vacunados y sin vacunar, que se infectaron *in vitro* con *Map*. Tras 24 horas de incubación, se

llevó a cabo una estimación de la fagocitosis (imunofluorescencia y qPCR) y la viabilidad de *Map* (cultivo bacteriológico), así como de los niveles de expresión de citoquinas y de la enzima iNOS (RT-qPCR) en los CaMØs.

Objetivo 3: Investigar el efecto de la vacunación frente a la paratuberculosis sobre la respuesta de los neutrófilos obtenidos de sangre periférica frente a la infección *in vitro* con diferentes bacterias, incluida *Map*.

Para su consecución, se ha elaborado el tercer estudio de esta tesis, que lleva por título “Valoración de la formación de trampas extracelulares generadas por neutrófilos (NETs) procedentes de ovejas vacunadas frente a la paratuberculosis, tras su incubación *in vitro* con diferentes bacterias”. Aunque el resto de estudios de la Tesis se han desarrollado en modelos caprinos, este se ha realizado en la especie ovina, debido a una mejor accesibilidad a estos animales en el momento de su realización. Los resultados se han recogido en la publicación titulada:

“In vitro effect of paratuberculosis vaccination on the release of neutrophil extracellular traps in a sheep model” que se encuentra actualmente bajo revisión para su publicación.

En este estudio, se aislaron neutrófilos de ovejas vacunadas con Silirum® y sin vacunar, antes y después de la vacunación. Pasados 15 y 30 días post-vacunación se analizó la liberación de NETs tras la infección *in vitro* de neutrófilos con *Map*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* mediante la visualización de sus componentes y la cuantificación del ADN extracelular por inmunofluorescencia y fluorimetría, respectivamente.

Objetivo 4: Analizar el efecto que tiene la vacunación homóloga y heteróloga, así como cada uno de sus componentes vacunales (cepas y

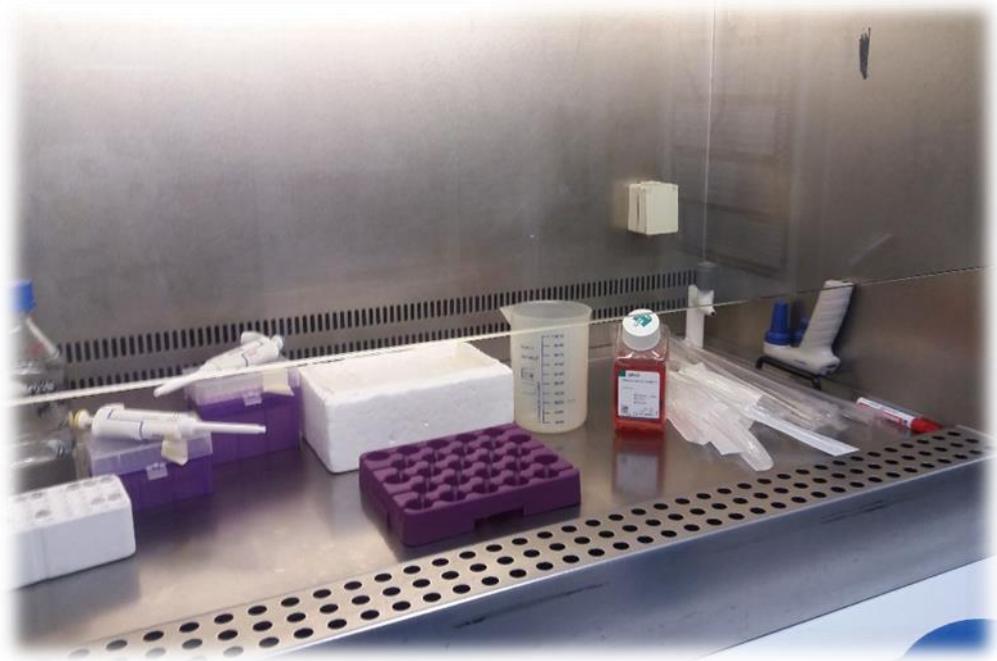
adyuvantes) sobre la respuesta inmunitaria y la protección frente a la infección por *Map*.

Para el cumplimiento de este objetivo se ha desarrollado el cuarto estudio de esta tesis, que lleva por título “Valoración del efecto de la vacunación homóloga y heteróloga, así como de cada uno de sus componentes (cepas y adyuvantes) sobre la respuesta inmunitaria y la protección conferida tras una infección experimental con *Map* en un modelo caprino”, que se ha recogido en la siguiente publicación:

“Arteche Villasol, N., Gutiérrez Expósito, D., Elguezabal, N., Sevilla, I.A., Vallejo, R., Espinosa Cerrato, J., Ferreras Estrada, M.C., Benavides, J., Pérez Pérez, V. 2020. Influence of heterologous and homologous vaccines, and their components, on the host immune response and protection against experimental caprine paratuberculosis. Front. Vet. Sci. 8, 744568.

Se emplearon 10 grupos de cabritos divididos según el tipo de vacuna administrada (Silirum[®] o HIMB) o su inmunización con otros componentes (bacterias inactivadas o adyuvantes) y la infección con *Map*. A los 45 días post-vacunación o post-inmunización los animales fueron infectados oralmente con *Map* y eutanasiados 190 días después. Durante todo el experimento, se realizaron análisis mensuales de la respuesta inmunitaria periférica (IGRA y ELISA) y de las subpoblaciones linfocitarias presentes en sangre (citometría de flujo). Finalmente, tras el sacrificio, se valoró la respuesta inmunitaria local (IGRA), las subpoblaciones linfocitarias en tejidos (citometría de flujo), la presencia de *Map* en tejidos y heces (qPCR y cultivo bacteriológico) y se realizó el estudio anatomopatológico del intestino (incluyendo el tejido linfoide) y nódulos linfáticos asociados.

Capítulo IV: Resultados (Publicaciones)/ *Results* (*Publications*)



Estudio 1

“Establecimiento de un protocolo optimizado para el aislamiento in vitro de distintas células inmunitarias a partir de sangre periférica y la evaluación comparativa de técnicas para la obtención de MDMs en pequeños rumiantes”

Publicación I: Arteche-Villasol, N., Benavides, J., Espinosa, J., Vallejo, R., Royo, M., Ferreras, M.C., Pérez, V., Gutiérrez-Expósito, D., 2020. Optimized *in vitro* isolation of different subpopulation of immune cells from peripheral blood and comparative techniques for generation of monocyte-derived macrophages in small ruminants. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 230, 110131.

- Índice de impacto: 2,046
- Cuartil: Q2
- Ranking: 46/146 (Veterinary Sciences)
- Open Access: No
- DOI: 10.1016/j.vetimm.2020.110131

Estudio 2

“Valoración de la respuesta temprana frente a la infección in vitro de MDMs con Map de cabras vacunadas y no vacunadas frente a paratuberculosis”

Publicación II: Arteche-Villasol, N., Gutiérrez-Expósito, D., Vallejo, R., Espinosa, J., Elguezabal, N., Ladero-Auñon, I., Royo, M., Ferreras, MC., Benavides, J., Pérez, V., 2021. Early response of monocyte-derived macrophages from vaccinated and non-vaccinated goats against *in vitro* infection with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. Vet. Res. 52, 69.

- Índice de impacto: 3,699
- Cuartil: Q1
- Ranking: 7/146 (Veterinary Sciences)
- Open Access: Si
- DOI: 10.1186/s13567-021-00940-y

Estudio 3

“Valoración de la formación de trampas extracelulares generadas por neutrófilos (NETs) procedentes de ovejas vacunadas frente a la paratuberculosis, tras su incubación in vitro con diferentes bacterias”

Publicación III: Arteché-Villasol, N., Gutiérrez-Expósito, D., Criado, M., Benavides, J., Pérez, V. Effect of paratuberculosis vaccination on the *in vitro* release of neutrophils extracellular traps in a sheep model.

- Enviado para su publicación.

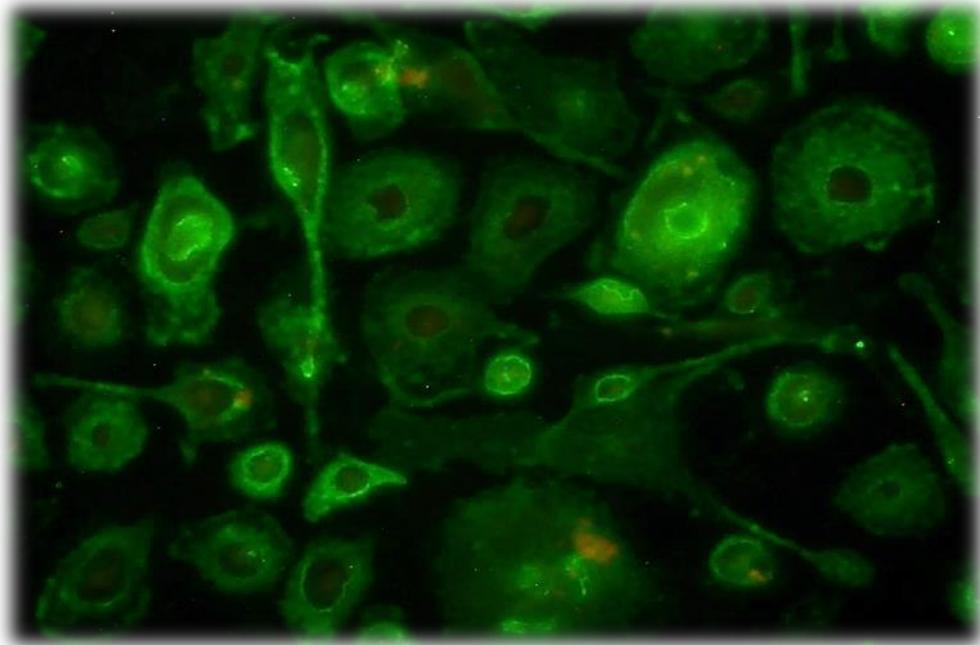
Estudio 4

“Valoración del efecto de la vacunación homóloga y heteróloga, así como de cada uno de sus componentes (cepas y adyuvantes) sobre la respuesta inmunitaria y la protección conferida tras una infección experimental con Map en un modelo caprino”

Publicación IV: Arteché-Villasol, N., Gutiérrez-Expósito, D., Elguezabal, N., Sevilla, I.A., Vallejo, R., Espinosa, J., Ferreras, M.C., Benavides, J., Pérez, V., 2021. Influence of heterologous and homologous vaccines, and their components, on the host immune response and protection against experimental caprine paratuberculosis. *Front. Vet. Sci.* 8, 744568.

- Índice de impacto: 3,412
- Cuartil: Q1
- Ranking: 9/146 (Veterinary Sciences)
- Open Access: Si
- DOI: 10.3389/fvets.2021.744568

Capítulo V: Discusión general



Teniendo en cuenta la falta de conocimientos que existe sobre los mecanismos que operan en la vacunación frente a paratuberculosis, el objetivo general de esta Tesis Doctoral fue estudiar la respuesta inmunitaria generada tras la vacunación frente a paratuberculosis utilizando tanto modelos experimentales *in vitro* como *in vivo*. En un primer momento, y ante la diversidad de protocolos laboratoriales para la purificación de leucocitos, se desarrolló un estudio con el objetivo de establecer un protocolo estandarizado y eficiente para la obtención de macrófagos y neutrófilos ovinos y caprinos, que fueron usados con éxito en los posteriores estudios funcionales, basados en el empleo de modelos de infección *in vitro*. En ellos, se emplearon estos modelos para estudiar cómo la vacunación puede influir sobre la respuesta de estas células. De esta forma, el segundo estudio se centró en analizar el efecto de la vacunación con Silirum[®] sobre la respuesta inmunitaria de MDMs caprinos frente a la infección por *Map*, mientras que el tercer estudio valoró el efecto de esa misma vacuna sobre la respuesta inmunitaria de neutrófilos ovinos también frente a la infección por *Map*, y frente a otras bacterias no relacionadas. Posteriormente, en el cuarto y último estudio de esta Tesis Doctoral tuvo como objetivo conocer el efecto sobre la respuesta inmunitaria local y periférica, y la protección, mediante la valoración del desarrollo de lesiones y estudios microbiológicos en un modelo experimental caprino de paratuberculosis tras la inoculación de las vacunas completas Silirum[®] y HIMB, así como cada uno de sus componentes (cepas vacunales y adyuvantes).

Existe una amplia variedad de trabajos en la bibliografía científica donde se llevan a cabo ensayos *in vitro* para el estudio de la respuesta inmunitaria de los rumiantes (mayoritariamente en la especie bovina) frente a diversos patógenos, entre ellos *Map*, utilizando monocitos, neutrófilos y macrófagos (Janagama et al., 2006; Woo et al., 2006; Chiang et al., 2007; Aulik et al., 2010; Taka et al., 2013; Silva et al., 2014; Pooley et al., 2018). Estas

poblaciones celulares, caracterizadas por su actividad microbiciada, representan la primera línea de defensa leucocitaria, como parte de la respuesta inmunitaria innata del hospedador, y, al mismo tiempo, procesan al patógeno para dar comienzo a la respuesta inmunitaria adquirida (Kobayashi et al., 2005; Auffray et al., 2009). Por ello, su correcto aislamiento, caracterización y manipulación es esencial para el estudio de la interacción patógeno-hospedador que tiene lugar en estos tipos celulares. Sin embargo, no hay un consenso en cuanto a su aislamiento o cultivo *in vitro* en pequeños rumiantes, ya que las técnicas varían enormemente entre los diferentes estudios.

En primer lugar, el aislamiento de PBMCs a partir de muestras de sangre y su posterior cultivo en el laboratorio se emplea frecuentemente para la valoración de la respuesta inmunitaria periférica tras su estimulación *in vitro* con diversos antígenos (Budhia et al., 2006; Frie et al., 2017). Además, la separación óptima de esta fracción celular es indispensable para la posterior purificación de monocitos. En el primer estudio, se demostró que la dilución de la sangre con PBS, previamente a su centrifugación, mejora notablemente el aislamiento de PBMCs, al permitir obtener un gran número de células mononucleares con una elevada pureza. No obstante, la población de monocitos en sangre periférica es baja, ya que representan aproximadamente el 17 % del total de PBMCs en pequeños rumiantes (Peterson et al., 2006). Para aislarlos, existen principalmente dos métodos ampliamente utilizados en humanos (Braian et al., 2013; Huang et al., 2015), pero que también han sido empleados en rumiantes (Olivier et al., 2001; Machugh et al., 2012). Por un lado, el método de adherencia, basado en la capacidad adherente de los monocitos que no poseen los linfocitos (Elmowalid, 2012; Crespo et al., 2013), y por otro, el aislamiento basado en la selección positiva inmunomagnética empleando anticuerpos frente a receptores superficiales presentes en los monocitos, como el receptor CD14 (Pomeroy et al., 2016).

Los resultados demostraron que la purificación de monocitos mediante adherencia tiene un rendimiento relativamente bajo (4 % del total de células sembradas inicialmente), teniendo en cuenta el elevado número de PBMCs de partida. Esto podría deberse a la eliminación de monocitos que no fueron capaces de adherirse a la placa después de las tres horas incubación. En cambio, la selección inmunomagnética permitió la obtención de una muestra inicial de monocitos con un elevado rendimiento (18 %) tras una reducción significativa de la contaminación con linfocitos, similar a los resultados obtenidos con esta misma técnica en muestras de sangre humana (Nielsen et al., 2020), y a pesar de que el anticuerpo empleado no era específico de pequeños rumiantes. No obstante, al igual que el método anterior, esta técnica presenta algunas limitaciones, ya que el receptor CD14 no está presente en algunas subpoblaciones de monocitos (Corripio-Miyar et al., 2015; Elnaggar et al., 2016), lo que supondría la pérdida de esa subpoblación en las células aisladas. Incluso, la menor especificidad del anticuerpo CD14 de humanos frente a monocitos de pequeños rumiantes también podría afectar al rendimiento de este método.

Sin embargo, independientemente del rendimiento inicial de monocitos, el número de MDMs obtenidos a partir de los monocitos purificados por columnas inmunomagnéticas fue significativamente menor en comparación con el método de adherencia. Esto se debe a una cuestión metodológica, de forma que, para la valoración del rendimiento de monocitos, los PBMCs sembrados en las placas fueron sometidos a un raspado obteniendo un número inferior de células que con las columnas inmunomagnéticas. En cambio, para la estimación del número final de MDMs, los monocitos no fueron sometidos a ningún proceso mecánico. Por ello, ya que el número de células sembrado en las placas fue inferior por columnas, tras la purificación, qué por adherencia, el número final de MDMs fue mayor en este último. Por esta razón, para el desarrollo del segundo estudio de esta Tesis Doctoral, se eligió

la purificación de monocitos mediante adherencia para generar posteriormente MDMs.

Las técnicas de obtención de macrófagos son laboriosas e incluso, en ocasiones, requieren la eutanasia de los animales, ya que el número de estas células en algunos órganos es reducido (Lyons et al., 2002). Por ello, para poder realizar estudios que impliquen conocer su funcionalidad, se han desarrollado protocolos que permiten la maduración *in vitro* de los monocitos aislados a partir de sangre periférica hacia MDMs, mediante la ausencia de suplementación o mediante la suplementación con suero autólogo, citoquinas (IL-3) o factores de crecimiento (p.ej. GM-CSF o M-CSF). Sin embargo, son pocos los estudios que indican los datos de rendimiento o las características fenotípicas de los MDMs tras la maduración (Olivier et al., 2001; Keane et al., 2002; Crespo et al., 2013; Wynn et al., 2013). Los resultados de este trabajo evidenciaron que la suplementación de los cultivos de monocitos ovinos y caprinos con GM-CSF favoreció su diferenciación hacia MDMs, al igual que en otros estudios llevados a cabo con monocitos ovinos y bovinos (Budhia et al., 2006; Souza, 2015), observándose un incremento del número de MDMs en función del incremento de la concentración de GM-CSF. Sin embargo, la suplementación con suero autólogo fue mucho menos eficaz, al visualizarse numerosas células redondeadas y de pequeño tamaño posiblemente correspondientes a monocitos que no llegaron a madurar. No obstante, debe tenerse en consideración que la suplementación de GM-CSF se ha señalado que ejerce una influencia sobre la polarización y la funcionalidad de los MDMs (Fejer et al., 2013; Draijer et al., 2019), por lo que hay autores que prefieren el uso de suero fetal bovino o suero autólogo para su obtención (Berger y Griffin, 2006; Elmowalid, 2012), ya que, en contra de los resultados obtenidos en este estudio, se ha descrito que favorece la maduración de monocitos bovinos (Czuprynski y Hamilton, 1985), aunque en monocitos humanos su empleo en concentraciones elevadas supone un efecto inhibitorio

sobre la misma (Maoz et al., 1986). En el segundo estudio de esta Tesis, los MDMs con los que se ha trabajado se obtuvieron mediante el procedimiento de adherencia y la posterior suplementación con GM-CSF y, si bien no se valoró si habían sufrido algún tipo de polarización, todos fueron tratados igual teniendo en cuenta que el objetivo era estudiar los cambios diferenciales asociados a la vacunación.

En cualquier caso, y teniendo en cuenta que los monocitos y los macrófagos son poblaciones celulares muy heterogéneas, con diversas características fenotípicas, es conveniente llevar a cabo una caracterización previa a su utilización en estudios funcionales (Gordon y Taylor, 2005). Al analizar el fenotipo de los monocitos aislados mediante las técnicas de purificación comparadas en este trabajo, el análisis por citometría de flujo, mostró que las poblaciones de monocitos obtenidas mediante columnas inmunomagnéticas eran morfológicamente (SSC:FSC) más homogéneas que aquellas purificadas por adherencia, posiblemente debido a la mayor presencia de linfocitos en estas últimas o a la alteración de la morfología de los monocitos por la separación mecánica de estas células del fondo de las placas. Sin embargo, cabe destacar que estas diferencias desaparecían una vez diferenciados a MDMs, debido a la eliminación de los linfocitos contaminantes tras los sucesivos lavados en ambas técnicas, apreciándose, además, un aumento significativo del tamaño y de la granularidad celular en ambos métodos. Por otro lado, el análisis de marcadores de superficie expresados en estos tipos celulares (p.ej. CD14, CD163, CMH-II, CD11b) también se ha empleado para la caracterización fenotípica de monocitos y MDMs aislados en rumiantes (Elmowalid, 2012; Corripio-Miyar et al., 2015). Al analizar estos marcadores por citometría de flujo, se observaron diferencias en cuanto al porcentaje de monocitos que ellos expresaban, en función del método de purificación empleado, ya que las células aisladas por columnas inmunomagnéticas presentaban un mayor porcentaje de células positivas a

CD14, CMH-II y CD11b que aquellas aisladas por adherencia. Esto, al igual que las variaciones de estas poblaciones en cuanto a su morfología (SSC:FSC), puede ser debido a la presencia de linfocitos contaminantes en estos últimos (Nielsen et al., 2020), como ya se ha sugerido previamente. No obstante, al emplear estos mismos marcadores celulares para estudiar la pureza en monocitos de las células aisladas por adherencia en ovejas, se han encontrado porcentajes muy elevados de positividad, incluso superiores al 90 % (Elmowalid, 2012), si bien la cuantificación de las células inmunomarcadas se realizó por recuento en extensiones citológicas, en vez de mediante citometría de flujo. Estos mismos marcadores se emplearon también para caracterizar fenotípicamente a MDMs, observándose que la maduración de los monocitos se asocia a un incremento de la intensidad de fluorescencia de CD14, CMH-II y CD11b, similar a lo descrito en otros estudios realizados en pequeños rumiantes (Olivier et al., 2001; Elmowalid, 2012), e independientemente del método inicial de purificación. Este incremento estaría directamente relacionado con el aumento del número de receptores de superficie en estas células, asociado a un mayor grado de diferenciación de los MDMs, lo que indica que la valoración mediante inmunofluorescencia de estos marcadores podría emplearse como indicador de la maduración de monocitos *in vitro* hacia MDMs.

En cuanto al aislamiento de los neutrófilos, la separación en ausencia de gradientes de densidad o mediante el empleo de Percoll[®] no fue efectiva, ya que no se logró diferenciar los PBMCs ni los eritrocitos de la fracción de neutrófilos purificada. Sin embargo, hay estudios que describen haber obtenido una elevada pureza de neutrófilos (60-70 %) utilizando estos métodos (Paltrinieri et al., 2000; Woldehiwet et al., 2003). Por el contrario, en nuestro caso, los mejores datos de pureza de neutrófilos se consiguieron al emplear la centrifugación en gradiente de densidad, concretamente Lymphoprep[™], con el cual se consiguió una pureza del 90 %, con una baja

contaminación de linfocitos. Cabe destacar, que este método también permitió el aislamiento simultáneo de PBMCs y neutrófilos a partir de la misma muestra de sangre en cabras y ovejas.

La optimización metodológica llevada a cabo en este estudio, permitió el posterior abordaje del segundo y tercer estudio. De esta manera, en el segundo estudio se utilizaron MDMs aislados a partir de cabras vacunadas y sin vacunar con Silirum[®] los cuales fueron infectados *in vitro* con *Map*. Los resultados de dicho estudio demostraron un incremento de la capacidad fagocítica y antimicrobiana frente a *Map* en los MDMs caprinos (CaMØs) procedentes de cabras vacunadas con Silirum[®] a los 30 días post-vacunación. De hecho, el porcentaje de CaMØs procedentes de cabras vacunadas que internalizaron *Map* fue más elevado (48 %) que en cabras no vacunadas (20 %), junto con una viabilidad de *Map* diez veces menor en los CaMØs de las cabras vacunadas, lo que sugiere que serían más eficientes en la internalización y destrucción de *Map*. La demostración de este hecho cobra una mayor importancia en el estudio de la patogenia durante la etapa inicial de la paratuberculosis, al poderse hipotetizar que los macrófagos localizados en las placas de Peyer, punto de entrada de *Map*, en animales vacunados, tendrían también una mayor capacidad bactericida, lo que podría asociarse al menor número de animales infectados y, en caso de haberlas, con lesiones de escasa entidad, encontrados en el cuarto estudio de este trabajo. En cualquier caso, apenas hay estudios que hayan desarrollado modelos experimentales *in vitro* para investigar el efecto de la vacunación en las fases iniciales de la infección (Pooley et al., 2018). Estos resultados contrastan con los de un estudio llevado a cabo con MDMs bovinos, en el que no se detectaron diferencias en la actividad antimicrobiana entre vacas sensibilizadas por la exposición ambiental con *Map* y vacas sin sensibilizar (Gollnick et al., 2007), si bien es cierto que el efecto de la sensibilización ambiental no sería comparable con la vacunación, dado que esta ejerce una respuesta inmunitaria

mucho más potente y prolongada (Coffman et al., 2010; Pooley et al., 2019). Sin embargo, en otro estudio llevado a cabo con monocitos ovinos infectados *in vitro* con *Map* tampoco se observaron diferencias en la viabilidad de la micobacteria al comparar monocitos procedentes de animales vacunados y sin vacunar con Gudair® (Pooley et al., 2018). No obstante, existen numerosas diferencias en el diseño experimental de este estudio y el que ha sido llevado a cabo en esta Tesis Doctoral que podrían explicar estas discrepancias como (i) diferencias entre las características funcionales de los monocitos y los macrófagos, (ii) la presencia de PBMCs co-cultivados con los monocitos ovinos que podrían alterar su funcionalidad, (iii) los distintos momentos post-vacunación evaluados (30 días *vs* 1 año), (iv) diferencias en la formulación (adyuvante) entre ambas vacunas (Gudair® *vs* Silirum®) y (v) entre especies (cabras *vs* ovejas).

En relación a la expresión génica, se observó un incremento de los niveles de transcripción de la enzima iNOS y la citoquina IL-10 en los CaMØs procedentes de animales vacunados con Silirum® respecto a los CaMØs de animales no vacunados, independientemente de la infección *in vitro* con *Map*. El incremento de la expresión de iNOS se ha relacionado con una respuesta de tipo proinflamatorio, asociada a una mayor eliminación de las micobacterias en modelos de MDMs bovinos (Chakravorty y Hensel, 2003; Khalifeh et al., 2009; Castillo-Velázquez et al., 2013; Souza, 2015). Por el contrario, la citoquina IL-10 se ha asociado con la supervivencia de *Map*, dado el efecto inhibitorio que provoca sobre la respuesta proinflamatoria (Hussain et al., 2016). De hecho, la actividad de esta citoquina podría afectar a los niveles de NO, llegando a limitar su producción (Weiss et al., 2005; Souza, 2015). No obstante, la presencia de niveles elevados de expresión de iNOS e IL-10 en los CaMØs de las cabras vacunadas sugiere que, tanto la respuesta proinflamatoria, como la antiinflamatoria participan activamente en la respuesta inmunitaria protectora generada por la vacunación, posiblemente

evitando la exacerbación de la respuesta proinflamatoria, la multiplicación de *Map* y, de esta forma, limitando el daño tisular (Coussens et al., 2004; Saraiva y O'Garra, 2010).

Este hecho pone en valor la complementariedad entre los estudios *in vitro* e *in vivo* y la necesidad de llevar a cabo estos últimos, ya que la falta de diferencias estadísticamente significativas entre los niveles de transcripción de las citoquinas TNF- α , IL-1 β , IFN- γ o IL-17A no puede descartarse que no suceda en los animales vacunados, ya que podría explicarse por la ausencia de señales bioquímicas *in vitro* dirigidas por los linfocitos u otras células que sí tendrían lugar en respuesta inmunitaria desarrollada en los tejidos. De hecho, sí se han observado cambios en la expresión de estas citoquinas en función de la vacunación, o no, de cabras cuando se han estudiado cultivos celulares de PBMCs estimulados antigénicamente (Kathaperumal et al., 2009; Faisal et al., 2013). Asimismo, la elevada variabilidad individual encontrada en sujetos experimentales que no pertenecen a especies de laboratorio, como los rumiantes, podría explicar esta falta de diferencias observada en la producción de citoquinas. Dichas variaciones han sido asociadas previamente con factores genéticos del hospedador, como mutaciones en el gen SCL11A1, un gen asociado a efectos pleiotrópicos antimicrobianos como la regulación positiva de iNOS (Arias et al., 1997), que hacen que determinados animales sean considerados resistentes o susceptibles a la infección micobacteriana (Reddacliff et al., 2005; Castillo-Velázquez et al., 2013; Abraham et al., 2017). Por otro lado, esta variabilidad individual en la respuesta a la vacunación e infección también se ha evidenciado en otros estudios *in vivo*, donde se ha encontrado que la vacunación no desencadena el mismo grado de protección en todos los animales estudiados del mismo rebaño o estudio experimental (Reddacliff et al., 2006; Muñoz, 2014), y se ha confirmado en el cuarto estudio de esta Tesis, donde también se ha visto una gran variabilidad en cuando a la producción local de IFN- γ o al número de lesiones que

mostraban los animales, con muchas diferencias dentro del mismo grupo de tratamiento.

Por otro lado, la respuesta obtenida en la infección *in vitro* de CaMØs procedentes de animales vacunados también podría guardar relación con la generación de una respuesta inmunitaria entrenada, tal y como afirmaron Juste et al. (2016) tras observar un incremento de la eliminación de *Mbv* en MDMs de bovinos vacunados con HIMB. Esta inmunidad se caracteriza por una mejora de la respuesta inmunitaria no específica mediada por células de la respuesta inmunitaria innata, sin participación de los linfocitos, que dura aproximadamente 3 meses tras la estimulación inicial y está producida por cambios epigenéticos en estas células (Kleinnijenhuis et al., 2012; Netea, 2013). Es por eso que, dada la ausencia de linfocitos en el modelo experimental *in vitro* empleado en este estudio y el tiempo transcurrido desde la vacunación (30 días), es posible que los CaMØs hayan experimentado una “mejora” tras la vacunación a causa de la reprogramación epigenética de sus progenitores durante su etapa en la médula ósea o como monocitos en la sangre.

En el tercer estudio de esta Tesis Doctoral, al estudiar la influencia que pueda tener la vacunación sobre los neutrófilos, otra población de células de la respuesta inmunitaria innata, se observó que, en los parámetros estudiados, la vacunación frente a paratuberculosis parece no influir sobre la generación de NETs en respuesta a la infección *in vitro* con *Map*, *S. aureus* y *E. coli*. Sin embargo, la vacunación oral y subcutánea de conejos sí que incrementó la producción de NETs frente a *Map*, *Mbv*, *C. pseudotuberculosis*, *S. aureus* y *E. coli*, lo que podría estar causado por el efecto de la respuesta inmunitaria entrenada (Ladero-Auñon et al., 2021b). Las discrepancias entre ambos estudios no solo podrían deberse a las diferencias en la respuesta inmunitaria entre conejos y pequeños rumiantes, sino también a diferencias en el diseño experimental de ambos estudios, como los diferentes momentos post-

vacunación (3 meses y un mes post-vacunación, respectivamente). Además, el efecto observado en neutrófilos de conejos es similar al determinado en neutrófilos humanos, donde la vacunación con BCG se asoció con un incremento de la actividad antimicrobiana frente a *C. albicans*, relacionado con cambios epigenéticos en estas células, aunque dicha mejora no afectó a la producción de NETs (Moorlag et al., 2020). En este sentido, el papel que juegan los neutrófilos durante la infección de *Map* y otros agentes intracelulares, y más concretamente el papel de las NETs en la misma, ha sido poco estudiado (Ladero-Auñon et al., 2021a). Esto es debido al carácter intracelular de la infección y al corto periodo de vida de los neutrófilos (< 7 horas a 5 días) (Dotta et al., 1999).

Lo que si se ha encontrado en este estudio es que la infección de los neutrófilos con *Map* sí que induce la generación de NETs, si bien fue significativamente menor, en cantidad, a la observada frente a la infección con *S. aureus* o *E. coli*. La formación de NETs por los neutrófilos en respuesta a la infección por *Map* se ha descrito con anterioridad en bovinos (Ladero-Auñon et al., 2021a). No está claro el papel que jugaría la formación de NETs en la patogenia de las infecciones por micobacterias, ya que, por ejemplo, en neutrófilos humanos, la liberación de estas redes no fue suficiente para eliminar a *M. tuberculosis*, por lo que se ha sugerido que su papel estaría más relacionado con la retención de las micobacterias, favoreciendo su eliminación posterior mediante otros mecanismos antimicrobianos, como la fagocitosis por macrófagos (Ramos-Kichik et al., 2009). Por ello, con el fin de profundizar en los resultados preliminares obtenidos en este trabajo, sería conveniente realizar más estudios incrementando el tiempo transcurrido tras la vacunación o analizando otros mecanismos antimicrobianos, como la fagocitosis o la generación de sustancias antimicrobianas.

Como ya se ha señalado, si bien los estudios *in vitro* aportan información relevante acerca de la interacción entre el agente patógeno y diferentes

poblaciones celulares implicadas en la respuesta inmunitaria, en condiciones controladas, estos modelos no reproducen de forma real el medio en el que tiene lugar dicha interacción, por lo que los modelos experimentales *in vivo* son necesarios. Por ello, y con el fin de comprobar la protección asociada a la vacunación, se desarrolló el cuarto estudio de esta Tesis Doctoral. Además, tuvo como objetivos adicionales conocer qué componentes de la vacuna estarían asociados a dicho efecto, así como conocer si la vacunación con una vacuna inactivada frente a la tuberculosis ejerce protección frente a la paratuberculosis, teniendo en cuenta evidencias previas que señalan que la vacunación con Silirum[®] es capaz de inducir una respuesta inmunitaria heteróloga frente a la infección por *Mbv* y *M. caprae* en terneros y cabras (Pérez de Val et al., 2012b; Serrano et al., 2017b).

Tras la infección experimental llevada a cabo en este estudio, en todos los grupos infectados se identificaron lesiones granulomatosas asociadas a la infección por *Map*, que fueron más numerosas y extensas en el grupo de cabras sin vacunar o inmunizar. No obstante, al igual que en otros estudios previos llevados a cabo en pequeños rumiantes (Juste et al., 1994; Faisal et al., 2013), la vacunación homóloga frente a la paratuberculosis fue capaz de controlar el desarrollo de las lesiones granulomatosas a los 150 días post-infección, limitándolas a lesiones de carácter leve. Esta reducción podría estar relacionada con el incremento de la actividad antimicrobiana de los CaMØs observada en el segundo estudio, que fueron obtenidos a partir de los monocitos de las mismas cabras empleadas en este estudio, extraídos a los 30 días post-vacunación. La protección conseguida mediante la vacunación frente a paratuberculosis y el posterior desafío con *Map* (protección homóloga), también se obtuvo en los animales vacunados con HIMB e infectados posteriormente con *Map*, ya que se detectó una reducción de las lesiones intestinales, demostrando así su capacidad de establecer una protección heteróloga frente a la infección. Esta respuesta heteróloga sería comparable a

la descrita en dos infecciones experimentales de cabras y terneros en los cuales la vacunación con Silirum[®] ocasionó una reducción de las lesiones pulmonares asociadas a la infección con micobacterias del complejo *M. tuberculosis* (Pérez de Val et al., 2012b; Serrano et al., 2017b). Sin embargo, al igual que ocurre con los resultados de nuestro estudio, se desconoce si esta protección se debe a la acción de la protección cruzada frente a la infección por bacterias estrechamente relacionadas (*Map* y complejo *M. tuberculosis*) o a la actividad de la respuesta inmunitaria entrenada.

A pesar de todo, y confirmándose una vez más lo que se observa en condiciones de campo y experimentales (Reddacliff et al., 2006; Muñoz, 2014), ninguna de las dos vacunas estableció una protección completa frente a la infección, dado que al menos una de las 5 cabras de cada grupo vacunado con Silirum[®] o con HIMB desarrollaron lesiones granulomatosas de carácter leve, identificándose, además, la presencia de *Map* en los nódulos linfáticos y las placas de Peyer de estos animales, respectivamente. Asimismo, las cabras vacunadas y con lesiones mostraron una respuesta inmunitaria periférica (celular y humoral) elevada, similar al resto de animales vacunados del mismo grupo, pero que no desarrollaron lesiones. El incremento de la respuesta inmunitaria celular y humoral tras la vacunación ya había sido documentado previamente en estudios experimentales en pequeños rumiantes en relación con vacunas inactivadas frente a *Map* (Corpa et al., 2000c; Koets et al., 2019; Pooley et al., 2019) o *Mbv* (Arrieta-Villegas et al., 2018; Roy et al., 2018b). De la misma manera, el aumento drástico de estas respuestas tras la infección oral con *Map* observado en los animales vacunados, coincide con una respuesta inmunológica de memoria frente a los antígenos de las micobacterias, siendo esta respuesta más rápida y robusta que aquella desarrollada por los animales no vacunados (Storset et al., 2005; Arrieta-Villegas et al., 2018). Sin embargo, aunque la vacunación genera una respuesta inmunitaria rápida y sostenida en el tiempo, esta no previene la

infección y la aparición de lesiones tal y como reflejan los resultados de este trabajo, por lo que no debe considerarse como un indicador de protección (Muñoz, 2014). En esta misma línea, la detección fecal de *Map* tampoco aportó información sobre el efecto protector de la vacuna, ya que no se detectó en ninguna cabra infectada, desarrollase o no lesiones, posiblemente por el corto periodo de tiempo del estudio (Whittington et al., 2000a; Kurade et al., 2004). Tampoco se observó una influencia clara de la vacunación sobre las subpoblaciones linfocitarias en sangre o en tejidos. El que no existieran diferencias claras en estos parámetros entre los grupos vacunados y no vacunados, podría ser debido a la elevada variabilidad individual detectada entre los animales pertenecientes al mismo grupo, similar a lo ya observado en los estudios *in vitro* al analizar la expresión de citoquinas en los CaMØs. Sin embargo, si se identificó un aumento de la producción local de IFN- γ en tejidos procedentes de cabras no vacunadas, sin que se observaran diferencias entre los otros grupos. Este incremento de la producción en los animales infectados y no vacunados, posiblemente esté ligado al mayor número de granulomas y gravedad de las lesiones (*multifocal b*) detectados en este grupo (Fernández et al., 2017b).

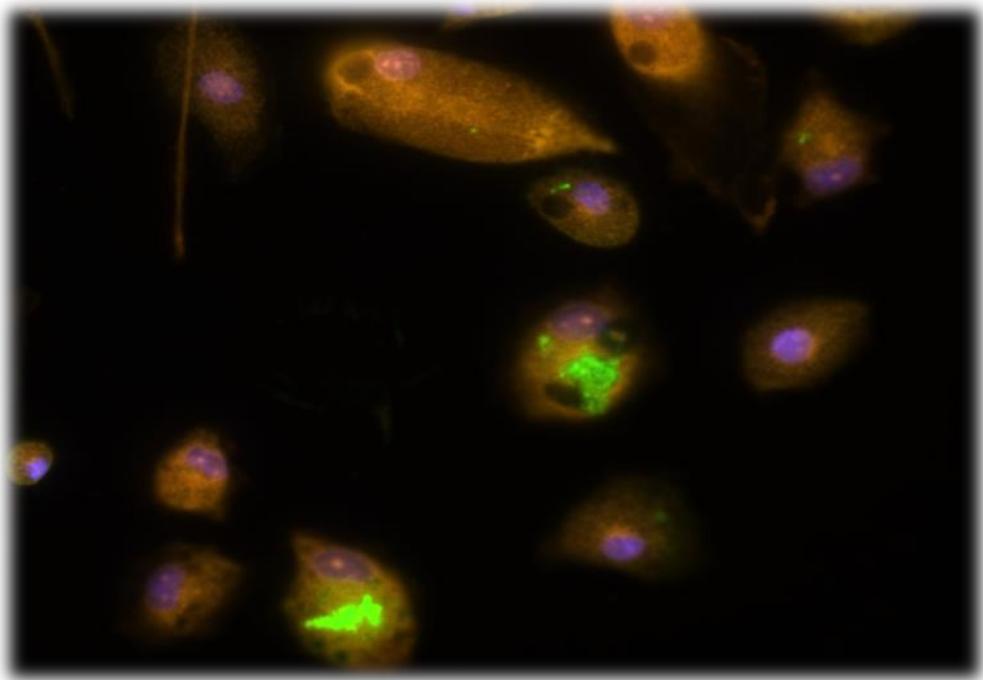
En relación con el efecto de la inoculación de los diferentes componentes de las dos vacunas por separado (cepas vacunales y adyuvantes), la administración subcutánea de las cepas *Map* 316F o *Mbv* 1403 se asoció con un menor número de granulomas en las placas de Peyer en comparación con los animales no vacunados, si bien las diferencias no fueron estadísticamente significativas. Sin embargo, las lesiones encontradas en estos animales (inoculados con las cepas presentes en las vacunas) fueron más graves (*multifocales b* mayoritariamente) y con un mayor número de granulomas que lo observado en los animales que recibieron las vacunas completas, de manera que el efecto protector de las bacterias inactivadas en ausencia de adyuvante fue considerablemente inferior que el de la vacuna completa. Esta menor

eficacia estaría estrechamente relacionada con la ausencia de adyuvantes que potencien la inmunogenicidad de las bacterias inactivadas y que faciliten la liberación sostenida de las mismas, estimulando de manera continuada, y por un mayor periodo de tiempo, la respuesta inmunitaria del hospedador (Coffman et al., 2010).

En cambio, los animales a los que solo se les administró el adyuvante de Silirum[®] o HIMB presentaron, sorprendentemente, un número inferior de granulomas que los grupos no vacunados o inmunizados con las cepas, pero, sobre todo, fueron de un carácter más leve, clasificadas mayoritariamente como lesiones *focales* y *multifocales a*, similares a las observadas en los animales que recibieron la vacuna completa que presentaron lesiones *focales*, de lo que se infiere que, en estos animales, se ha establecido una cierta protección frente a la infección. No se conoce con exactitud el efecto directo de los adyuvantes sobre la respuesta inmunitaria del hospedador, puesto que generalmente se estudia de manera conjunta con los antígenos. Sin embargo, el adyuvante parece jugar un papel importante en la respuesta inmunitaria, ya que se ha demostrado que la respuesta generada por la vacunación frente a infecciones como la leishmaniosis o la tuberculosis difiere en función del adyuvante empleado utilizando el mismo antígeno (Vordermeier et al., 2009b; Shokri et al., 2016). De manera similar, se ha determinado que la respuesta inmunitaria periférica generada por Gudair[®] es más potente que la provocada por la misma cepa combinada con otros adyuvantes como Montanide[™] ISA 80 o 103 (Begg et al., 2019). Además, la reducción de las lesiones descrita en esta Tesis Doctoral podría estar relacionada con una reducción de la colonización micobacteriana, ya que en un estudio llevado a cabo en 6 terneros, inmunizados con el mismo adyuvante de HIMB utilizado en este trabajo, en ausencia del antígeno, e infectados a las 9 semanas con *Mbv*, solo 2 de ellos resultaron ser positivos a *Mbv* por cultivo bacteriológico (van der Heijden et al., 2017). Por lo tanto, estos resultados sugieren que el adyuvante

podría limitar, en cierto grado, la diseminación de la infección por mecanismos de carácter inespecífico, de forma similar a nuestro estudio. De esta manera, y siguiendo la trayectoria de estos resultados, el adyuvante podría ejercer algún tipo de efecto sobre la respuesta inmunitaria del hospedador, probablemente de tipo entrenada, ya que no parece necesaria la participación de antígeno bacteriano. De todas formas, para comprobar esta hipótesis serían necesarios nuevos estudios *in vitro* basados en el uso de poblaciones concretas de leucocitos, como neutrófilos, MDMs o linfocitos provenientes de animales que hayan recibido el adyuvante en ausencia de antígeno, encaminados a analizar los cambios epigenéticos que se dan en estas poblaciones celulares tras la vacunación o la inmunización con diferentes productos vacunales.

Capítulo VI: Conclusiones/ *Conclusions*



CONCLUSIONES

1. Se ha establecido un protocolo estandarizado para el aislamiento simultáneo de PBMCs y neutrófilos a partir de sangre de pequeños rumiantes con una elevada eficiencia y pureza. Posteriormente, este método ha permitido, además, la purificación de monocitos y su maduración a MDMs, siendo la técnica de adherencia la de elección al permitir obtener un mayor número de células.

2. La vacunación frente a paratuberculosis con la vacuna inactivada Silirum[®] influye sobre la funcionalidad *in vitro* de los macrófagos, en los que provoca un incremento de su actividad antimicrobiana y cambios en la expresión de determinados componentes de la respuesta inmunitaria, con actividad tanto proinflamatoria como antiinflamatoria. Dichos efectos, evidentes durante el primer mes post-vacunación, son inespecíficos e independientes de la acción directa de los linfocitos, lo que sugiere que podrían intervenir mecanismos de la inmunidad entrenada.

3. La vacunación frente a paratuberculosis con la vacuna inactivada Silirum[®] no modifica la actividad de los neutrófilos ovinos, en lo que se refiere a la liberación de NETs, en respuesta a la infección *in vitro* con *Map* u otras bacterias no relacionadas, al menos en el primer mes post-vacunación y con los métodos de evaluación empleados en este estudio.

4. La caracterización y cuantificación de las lesiones granulomatosas inducidas por la infección por *Map* en el intestino, principalmente en las placas de Peyer y en los nódulos linfáticos mesentéricos, es el método más eficaz para valorar el efecto protector de la vacunación frente a paratuberculosis. Sin embargo, la producción periférica o local (en el intestino y nódulos linfáticos asociados) de IFN- γ o anticuerpos, o las proporciones de las distintas subpoblaciones linfocitarias, no guardan relación con el grado de protección vacunal.

5. La vacuna HIMB es capaz de inducir una protección parcial sobre la infección con *Map*, similar a la experimentada en los animales vacunados con la vacuna inactivada frente a paratuberculosis (Silirum[®]), de forma que reduce el número y la gravedad de las lesiones granulomatosas intestinales.

6. La administración subcutánea de dos adyuvantes basados en aceites minerales altamente refinados genera una reducción de la gravedad y el número de las lesiones granulomatosas causadas por la infección por *Map*. Este efecto, en ausencia de la estimulación antigénica de las bacterias inactivadas, estaría mediado por un mecanismo de carácter inespecífico, en el que podría participar una respuesta inmunitaria de tipo entrenado.

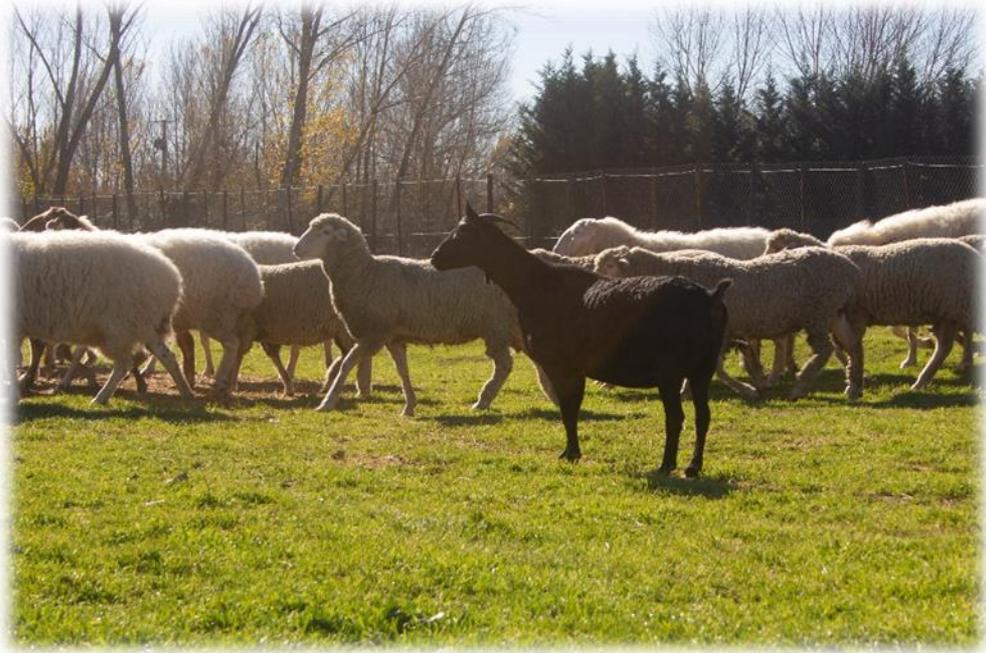
CONCLUSIONS

1. A standardized protocol for the simultaneous isolation of PBMCs and neutrophils from the blood of small ruminants with high efficiency and purity has been established. Subsequently, this method has also allowed the purification of monocytes and their maturation to MDMs, where the technique of adherence was the one chosen as it allows obtaining greater number of cells.
2. Vaccination against paratuberculosis with the inactivated Silirum[®] vaccine exerts an influence on the *in vitro* functionality of macrophages, with an increase in their antimicrobial activity and changes in the expression of certain components of the immune response, with both pro-inflammatory and anti-inflammatory activity. These effects, seen during the first month after vaccination, are non-specific and independent from the direct action of lymphocytes, suggesting that mechanisms of trained immunity could be involved
3. Vaccination against paratuberculosis with the inactivated Silirum[®] vaccine does not modify the activity of ovine neutrophils, assessed by the release of NETs in response, to *in vitro* infection with *Map* or other non-related bacteria, at least during the first month post-vaccination and with the methods used in this study
4. The characterization and quantification of granulomatous lesions induced by *Map* infection in the gut, mainly in Peyer's patches and in the mesenteric lymph nodes, is the most effective method to assess the protective effect of paratuberculosis vaccination. However, the peripheral or local (in the gut and associated lymph nodes) production of IFN- γ or antibodies, or the proportion of the different lymphocyte subpopulations, are not related to the degree of vaccine protection.

5. The HIMB vaccine is able to exert a partial protection against *Map* infection, similar to that experienced in animals vaccinated with the inactivated vaccine against paratuberculosis (Silirum[®]), thereby reducing the number and severity of intestinal granulomatous lesions.

6. Subcutaneous inoculation of two highly refined mineral-oil adjuvants results in a reduction of the severity and number of granulomatous lesions caused by *Map* infection. This effect, in the absence of antigenic stimulation by the inactivated bacteria, would be mediated by a nonspecific mechanism, in which a trained immune response could play a role.

Capítulo VII: Bibliografía



- Abadie, V.,** Badell, E., Douillard, P., Ensergueix, D., Leenen, P.J.M., Tanguy, M., Fiette, L., Saeland, S., Gicquel, B., Winter, N., 2005. Neutrophils rapidly migrate via lymphatics after *Mycobacterium bovis* BCG intradermal vaccination and shuttle live bacilli to the draining lymph nodes. *Blood*. 106, 1843-1850.
- Abendaño, N.,** Sevilla, I.A., Prieto, J.M., Garrido, J.M., Juste, R.A., Alonso-Hearn, M., 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.,** Tyukalova, L., Barandika, J.F., Balseiro, A., Sevilla, I.A., Garrido, J.M., Juste, R.A., 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, e104238.
- Abraham, A.,** Naicy, T., Raghavan, K.C., Siju, J., Aravindakshan, T., 2017. Evaluation of the association of SLC11A1 gene polymorphism with incidence of paratuberculosis in goats. *J. Genet.* 96, 641-646.
- Adams, J.L., Czuprynski, C.J.,** 1994. Mycobacterial cell wall components induce the production of TNF- α , IL-1, and IL-6 by bovine monocytes and the murine macrophage cell line RAW 264.7. *Microb. Pathog.* 16, 401-411.
- Adams, K.,** Weber, K.S., Johnson, S.M., 2020. Exposome and immunity training: how pathogen exposure order influences innate immune cell lineage commitment and function. *Int. J. Mol. Sci.* 21, 8462.
- Aderem, A., Underhill, D.M.,** 1999. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu. Rev. Immunol.* 17, 593-623.
- Adúriz, 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.
- Aho, A.D.,** McNulty, A.M., Coussens, P.M., 2003. Enhanced expression of interleukin-1 α and tumor necrosis factor receptor-associated protein 1 in ileal tissues of cattle infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Infect. Immun.* 71, 6479-6486.
- Akira, S.,** Uematsu, S., Takeuchi, O., 2006. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*. 124, 783-801.

- Albarrak**, S.M., Waters, W.R., Stabel, J.R., Hostetter, J.M., 2018. Evaluating the cytokine profile of the WC1⁺ $\gamma\delta$ T cell subset in the ileum of cattle with the subclinical and clinical forms of MAP infection. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 201, 26-31.
- Allen**, S., Sotos, J., Sylte, M.J., Czuprynski, C.J., 2001. Use of Hoechst 33342 staining to detect apoptotic changes in bovine mononuclear phagocytes infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 8, 460-464.
- Alonso-Hearn**, M., Molina, E., Geijo, M., Vazquez, P., Sevilla, I.A., Garrido, J.M., Juste, R.A., 2012. Immunization of adult dairy cattle with a new heat-killed vaccine is associated with longer productive life prior to cows being sent to slaughter with suspected paratuberculosis. *J. Dairy. Sci.* 95, 618-629.
- Alonso-Hearn**, M., Canive, M., Blanco-Vazquez, C., Torremocha, R., Balseiro, A., Amado, J., Varela-Martinez, E., Ramos, R., Jugo, B.M., Casais, R., 2019. RNA-Seq analysis of ileocecal valve and peripheral blood from Holstein cattle infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* revealed dysregulation of the CXCL8/IL8 signaling pathway. *Sci. Rep.* 9, 14845.
- Altreuther**, G., Llames, L., Neuenschwander, S., Langhans, W., Werling, D., 2001. Morphologic and functional changes in bovine monocytes infected *in vitro* with the bovine leukaemia virus. *Scand. J. Immunol.* 54, 459-469.
- Álvarez**, J., de Juan, L., Bezos, J., Romero, B., Sáez, J.L., Marqués, S., Domínguez, C., Mínguez, O., Fernández-Mardomingo, B., Mateos, A., Domínguez, L., Aranaz, A., 2009. Effect of paratuberculosis on the diagnosis of bovine tuberculosis in a cattle herd with a mixed infection using interferon-gamma detection assay. *Vet. Microbiol.* 135, 389-393.
- Alzuherri**, H.M., Woodall, C.J., Clarke, C.J., 1996. Increased intestinal TNF- α , IL-1 β and IL-6 expression in ovine paratuberculosis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 49, 331-345.
- Ambarus**, C.A., Krausz, S., van Eijk, M., Hamann, J., Radstake, T.R., Reedquist, K.A., Tak, P.P., Baeten, D.L., 2012. Systematic validation of specific phenotypic markers for *in vitro* polarized human macrophages. *J. Immunol. Methods.* 375, 196-206.
- Ameni**, G., Tafess, K., Zewde, A., Eguale, T., Tilahun, M., Hailu, T., Sirak, A., Salguero, F.J., Berg, S., Aseffa, A., Hewinson, R.G., Vordermeier, H.M., 2018. Vaccination of calves with *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette–Guerin reduces the frequency and severity of lesions of bovine tuberculosis under a natural transmission setting in Ethiopia. *Transbound. Emerg. Dis.* 65, 96-104.

- Appelberg, R.**, 2007. Neutrophils and intracellular pathogens: beyond phagocytosis and killing. *Trends Microbiol.* 15, 87–92.
- Arias, M., Rojas, M., Zabaleta, J., Rodríguez, J.I., París, S.C., Barrera, L.F., García, L.F.**, 1997. Inhibition of virulent *Mycobacterium tuberculosis* by *Bcg^r* and *Bcg^s* macrophages correlates with nitric oxide production. *J. Infect. Dis.* 176, 1552-1558.
- Arranz-Solís, D., Benavides, J., Regidor-Cerillo, J., Horcajo, P., Castaño, P., Ferreras, M.C., Jiménez-Pelayo, L., Collantes-Fernández, E., Ferre, I., Hemphill, A., Pérez, V., Ortega-Mora, L.M.**, 2016. Systemic and local immune responses in sheep after *Neospora caninum* experimental infection at early, mid and late gestation. *Vet. Res.* 47, 2.
- Arrazuria, R., Molina, E., Garrido, J.M., Pérez, V., Juste, R.A., Elguezabal, N.**, 2016. Vaccination sequence effects on immunological response and tissue bacterial burden in paratuberculosis infection in a rabbit model. *Vet. Res.* 47, 77.
- Arrazuria, R., Ladero, I., Molina, E., Fuertes, M., Juste, R., Fernández, M., Pérez, V., Garrido, J., Elguezabal, N.**, 2020. Alternative vaccination routes against paratuberculosis modulate local immune response and interference with tuberculosis diagnosis in laboratory animal models. *Vet. Sci.* 7, 7.
- Arrieta-Villegas, C., Perálvarez, T., Vidal, E., Puighibet, Z., Moll, X., Canturri, A., Sevilla, I.A., Espada, Y., Juste, R.A., Domingo, M., Pérez de Val, B.**, 2018. Efficacy of parenteral vaccination against tuberculosis with heat-inactivated *Mycobacterium bovis* in experimentally challenged goats. *PLoS One.* 13, e0196948.
- Arsenault, R.J., Maattanen, P., Daigle, J., Potter, A., Griebel, P., Napper, S.**, 2014. From mouth to macrophage: mechanisms of innate immune subversion by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Vet. Res.* 45, 54.
- Arteche-Villasol, N., Benavides, J., Espinosa, J., Vallejo, R., Royo, M., Ferreras, M.C., Pérez, V., Gutiérrez-Expósito, D.**, 2020. Optimized *in vitro* isolation of different subpopulation of immune cells from peripheral blood and comparative techniques for generation of monocyte-derived macrophages in small ruminants. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 230, 110131.
- Arteche-Villasol, N., Gutiérrez-Expósito, D., Vallejo, R., Espinosa, J., Elguezabal, N., Ladero-Auñon, I., Royo, M., Ferreras, M.C., Benavides, J., Pérez, V.**, 2021. Early response of monocyte-derived macrophages from vaccinated and non-vaccinated goats against *in vitro* infection with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Vet. Res.* 52, 69.

- Astarie-Dequeker**, C., N'Diaye, E.N., Le Cabec, V., Rittig, M.G., Prandi, J., Maridonneau-Parini, I., 1999. The mannose receptor mediates uptake of pathogenic and nonpathogenic mycobacteria and bypasses bactericidal responses in human macrophages. *Infect. Immun.* 67, 469-477.
- Aucouturier**, J., Dupuis, L., Ganne, V., 2001. Adjuvants designed for veterinary and human vaccines. *Vaccine.* 19, 2666-2672.
- Auffray**, C., Sieweke, M.H., Geissmann, F., 2009. Blood Monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells DCs. *Annu. Rev. Immunol.* 27, 669-692.
- Aulik**, N.A., Hellenbrand, K.M., Czuprynski, C.J., 2010. *Mannheimia haemolytica* and its leukotoxin cause macrophage extracellular trap formation by bovine macrophages. *Infect Immun.* 80, 1923-1933.
- Awate**, S., Babiuk, L.A., Mutwiri, G., 2013. Mechanisms of action of adjuvants. *Front. Immunol.* 4, 114.
- Ayele**, W.Y., Bartos, M., Svastova, P., Pavlik, I., 2004. Distribution of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in organs of naturally infected bull-calves and breeding bulls. *Vet. Microbiol.* 103, 209-217.
- Badell**, E., Nicolle, F., Clark, S., Majlessi, L., Boudou, F., Martino, A., Castello-Branco, L., Leclerc, C., Lewis, D.J.M., Marsh, P.D., Gicquel, B., Winter, N., 2009. Protection against tuberculosis induced by oral prime with *Mycobacterium bovis* BCG and intranasal subunit boost based on the vaccine candidate Ag85B-ESAT-6 does not correlate with circulating IFN- γ producing T-cells. *Vaccine.* 27, 28-37.
- Baquero**, M.M., Plattner, B.L., 2016. Bovine WC1⁺ $\gamma\delta$ T lymphocytes modify monocyte-derived macrophage responses during early *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 170, 65-72.
- Ballesteros**, C., Garrido, J.M., Vicente, J., Romero, B., Galindo, R.C., Minguijón, E., Villar, M., Martín-Hernando, M.P., Sevilla, I., Juste, R., Aranaz, A., de la Fuente, J., Gortázar, C., 2009. First data on Eurasian wild boar response to oral immunization with BCG and challenge with a *Mycobacterium bovis* field strain. *Vaccine.* 27, 6662-6668.
- Balseiro**, A., Altuzarra, R., Vidal, E., Moll, X., Espada, Y., Sevilla, I.A., Domingo, M., Garrido, J.M., Juste, R.A., Prieto, M., Pérez de Val, B., 2017. Assessment of BCG and inactivated *Mycobacterium bovis* vaccines in an experimental tuberculosis infection model in sheep. *PLoS One.* 12, e0180546.

- Balseiro, A.,** Perez, V., Juste, R.A., 2019. Chronic regional intestinal inflammatory disease: A trans-species slow infection? *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 62, 88-100.
- Balseiro, A.,** Prieto, J.M., Álvarez, V., Lesellier, S., Davé, D., Salguero, F.J., Sevilla, I.A., Infantes-Lorenzo, J.A., Garrido, J.M., Adriaensen, H., Juste, R.A., Barral, M., 2020a. Protective effect of oral BCG and inactivated *Mycobacterium bovis* vaccines in European badgers (*Meles meles*) experimentally infected with *M. bovis*. *Front. Vet. Sci.* 7, 41.
- Balseiro, A.,** Thomas, J., Gostázar, C., Risalde, M.A., 2020b. Development and challenges in animal tuberculosis vaccination. *Pathogens.* 9, 472.
- Bannantine, J.P.,** Everman, J.L., Rose, S.J., Babrak, L., Katani, R., Barletta, R.G., Talaat, A.M., Gröhn, Y.T., Chang, Y.F., Kapur, V., Bermudez, L.E., 2014a. Evaluation of eight live attenuated vaccine candidates for protection against challenge with virulent *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in mice. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 4, 88.
- Bannantine, J.P.,** Hines II, M.E., Bermudez, L.E., Talaat, A.M., Sreevatsan, S., Stabel, J.R., Chang, Y.F., Coussens, P.M., Barletta, R.G., Davis, W.C., Collins, D.M., Gröhn, Y.T., Kapur, V., 2014b. A rational framework for evaluating the next generation of vaccines against *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 4, 126.
- Barclay, R., Ratledge, C.,** 1983. Iron-binding compounds of *Mycobacterium avium*, *M. intracellulare*, *M. scrofulaceum*, and mycobactin-dependent *M. paratuberculosis* and *M. avium*. *J. Bacteriol.* 153, 1138-1146.
- Barkema, H.W.,** Orsel, K., Nielsen, S.S., Koets, A.P., Rutten, V.P.M.G., Bannantine, J.P., Keefe, G.P., Kelton, D.F., Wells, S.J., Whittington, R.J., Mackintosh, C.G., Manning, E.J., Weber, M.F., Heuer, C., Forde, T.L., Ritter, C., Roche, S., Corbett, C.S., Wolf, R., Griebel, P.J., Kastelic, J.P., De Buck, J., 2018. Knowledge gaps that hamper prevention and control of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection. *Transbound. Emerg. Dis.* 65, 125-148.
- Barros, M.H.M.,** Hauck, F., Dreyer, J.H., Kempkes, B., Niedobitek, G., 2013. Macrophage polarization: an immunohistochemical approach for identifying M1 and M2 macrophages. *PLoS One.* 8, e80908.
- Bassey, E.O.E., Collins, M.T.,** 1997. Study of T-lymphocyte subsets of healthy and *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*-infected cattle. *Infect. Immun.* 65, 4869-4872.

- Bastida, F., Juste, R.A.**, 2011. Paratuberculosis control: a review with a focus on vaccination. *J. Immune. Based. Ther. Vaccines*. 9, 8.
- Bauman, C.A., Jones-Bitton, A., Menzies, P., Toft, N., Jansen, J., Kelton, D.**, 2016. Prevalence of paratuberculosis in the dairy goat and dairy sheep industries in Ontario, Canada. *Can. Vet. J.* 57, 169-175.
- Beard, P.M., Henderson, D., Daniels, M.J., Pirie, A., Buxton, D., Greig, A., Hutchings, M.R., McKendrick, I., Rhind, S., Stevenson, K., Sharp, J.M.**, 1999. Evidence of paratuberculosis in fox (*Vulpes vulpes*) and stoat (*Mustela ermine*). *Vet. Rec.* 145, 612-613.
- Beard, P.M., Daniels, M.J., Henderson, D., Pirie, A., Rudge, K., Buxton, D., Rhind, S., Greig, A., Hutchings, M.R., McKendrick, I., Stevenson, K., Sharp, J.M.**, 2001a. Paratuberculosis infection of nonruminant wildlife in Scotland. *J. Clin. Microbiol.* 39, 1517-1521.
- Beard, P.M., Rhind, S.M., Buxton, D., Daniels, M.J., Henderson, S., Pirie, A., Rudge, K., Greig, A., Hutchings, M.R., Stevenson, K., Sharp, J.M.**, 2001b. Natural paratuberculosis infection in rabbits in Scotland. *J. Comp. Path.* 124, 290-299.
- Beard, P.M., Stevenson, K., Pirie, A., Rudge, K., Buxton, D., Rhind, S.M., Sinclair, M.C., Wildblood, L.A., Jones, D.G., Sharp, J.M.**, 2001c. Experimental paratuberculosis in calves following inoculation with a rabbit isolate of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.* 39, 3080-3084.
- Begara-Mcgorum, I., Wildblood, L.A., Clarke, C.J., Connor, K.M., Stevenson, K., McInnes, C.J., Sharp, J.M., Jones, D.G.**, 1998. Early immunopathological events in experimental ovine paratuberculosis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 63, 265-287.
- Begg, D.J., Griffin, J.F.T.**, 2005. Vaccination of sheep against *M. paratuberculosis*: Immune parameters and protective efficacy. *Vaccine*. 23, 4999-5008.
- Begg, D.J., O'Brien, R., Mackintosh, C.G., Griffin, J.F.T.**, 2005. Experimental infection model for Johne's disease in sheep. *Infect. Immun.* 73, 5603-5611.
- Begg, D.J., de Silva, K., Carter, N., Plain, K.M., Purdie, A., Whittington, R.J.**, 2011. Does a Th1 over Th2 dominance really exist in the early stages of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infections? *Immunobiology*. 216, 840-846.
- Begg, D.J., Dhungyel, O., Naddi, A., Dhand, N.K., Plain, K.M., de Silva, K., Purdie, A.C., Whittington, R.J.**, 2019. The immunogenicity and tissue reactivity of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* inactivated whole cell vaccine is dependent on the adjuvant used. *Heliyon*. 5, e01911.

- Bekkering**, S., Blok, B.A., Joosten, L.A.B., Riksen, N.P., van Crevel, R., Netea, M.G., 2016. *In vitro* experimental model of trained innate immunity in human primary monocytes. *Clin. Vaccine. Immunol.* 23, 926–933.
- Beliakova-Bethell**, N., Massanella, M., White, C., Lada, S., Du, P., Vaida, F., Blanco, J., Spina, C.A., Woelk, C.H., 2014. The effect of cell subset isolation method on gene expression in leukocytes. *Cytometry A.* 85A, 94-104.
- Beltrán-Beck**, B., de la Fuente, J., Garrido, J.M., Aranaz, A., Sevilla, I., Villar, M., Boadella, M., Galindo, R.C., Pérez de la Lastra, J.M., Moreno-Cid, J.A., Fernández de Mera, I.G., Alberdi, P., Santos, G., Ballesteros, C., Lyashchenko, K.P., Minguijón, E., Romero, B., de Juan L., Domínguez, L., Juste, R., Gortazar, C., 2014. Oral vaccination with heat inactivated *Mycobacterium bovis* activates the complement system to protect against tuberculosis. *PLoS One.* 9, e98048.
- Bendixen**, P.H., 1977. Application of the direct leukocyte-migration agarose test in cattle naturally infected with *Mycobacterium paratuberculosis*. *Am. J. Vet. Res.* 38, 1161-1162.
- Bendixen**, P., 1978. Immunological reactions caused by infection with *Mycobacterium paratuberculosis*. A review. *Nord. Vet. Med.* 30, 163-168.
- Benn**, C.S., Netea, M.G., Selin, L.K., Aaby, P., 2013. A small jab- a big effect: nonspecific immunomodulation by vaccines. *Trends Immunol.* 34, 431-439.
- Berg**, C., Wilker, S., Roider, J., Klettner, A., 2013. Isolation of porcine monocyte population: a simple and efficient method. *Vet. Res. Commun.* 37, 239-241.
- Berger**, S.T., **Griffin**, F.T., 2006. A comparison of ovine monocyte-derived macrophage function following infection with *Mycobacterium avium* ssp. *avium* and *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*. *Immunol. Cell Biol.* 84, 349-356.
- Bettelli**, E., Carrier, Y., Gao, W., Korn, T., Strom, T.B., Oukka, M., Weiner, H.L., Kuchroo, V.K., 2006. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature.* 441, 235-238.
- Beumer**, A., King, D., Donohue, M., Mistry, J., Covert, T., Pfaller, S., 2010. Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in drinking water and biofilms by quantitative PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 7367-7370.
- Bhide**, M.R., Mucha, R., Mikula, I., Kisova, L., Skrabana, R., Novak, M., Mikula, I., 2009. Novel mutations in TLR genes cause hyporesponsiveness to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection. *BMC Genet.* 10, 21.
- Biet**, F., Sevilla, I.A., Cochard, T., Lefrançois, L.H., Garrido, J.M., Heron, I., Juste, R.A., McLuckie, J., Thibault, V.C., Supply, P., Collins, D.M., Behr, M.A., Stevenson, K.,

2012. Inter- and intra-subtype genotypic differences that differentiate *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* strains. *BMC Microbiol.* 12, 264.
- Bickett**, T.E., McLean, J., Creissen, E., Izzo, L., Hagan, C., Izzo, A.J., Silva Angulo, F., Izzo, A.A., 2020. Characterizing the BCG induced macrophage and neutrophil mechanisms for defense against *Mycobacterium tuberculosis*. *Front. Immunol.* 11, 1202.
- Blanco**, F.C., Bianco, M.V., Meikle, V., Garbaccio, S., Vagnoni, L., Forrellad, M., Klepp, L.I., Cataldi, A.A., Bigi, F., 2011. Increased IL-17 expression is associated with pathology in a bovine model of tuberculosis. *Tuberculosis.* 91, 57-63.
- Blanco**, F.C., García, E.A., Aagaard, C., Bigi, F., 2021. The subunit vaccine H65⁺ CAF01 increased the BCG- protection against *Mycobacterium bovis* infection in a mouse model of bovine tuberculosis. *Res. Vet. Sci.* 136, 595-597.
- Blumerman**, S.L., Herzig, C.T.A., Rogers, A.N., Telfer, J.C., Baldwin, C.L., 2006. Differential TCR gene usage between WC1⁻ and WC1⁺ ruminant $\gamma\delta$ T cell subpopulations including those responding to bacterial antigen. *Immunogenetics.* 58, 680-692.
- Bolster**, C.H., Cook, K.L., Haznedaroglu, B.Z., Walker, S.L., 2009. The transport of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* through saturated aquifer materials. *Lett. Appl. Microbiol.* 48, 307-312.
- Borregaard**, N., 2010. Neutrophils, from marrow to microbes. *Immunity.* 33, 657-670.
- Borregaard**, N., Sørensen, O.E., Theilgaard-Mönch, K., 2007. Neutrophil granules: a library of innate immunity proteins. *Trends Immunol.* 28, 340-345.
- 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.
- Bower**, K.L., Begg, D.J., Whittington, R.J., 2011. Culture of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (MAP) from blood and extra-intestinal tissues in experimentally infected sheep. *Vet. Microbiol.* 147, 127-132.
- Braian**, C., Hogeia, V., Stendahl, O., 2013. *Mycobacterium tuberculosis*-induced neutrophil extracellular traps activate human macrophages. *J. Innate. Immun.* 5, 591-602.
- Brambilla**, C., Llorens-Fons, M., Julián, E., Noguera-Ortega, E., Tomàs-Martínez, C., Pérez-Trujillo, M., Byrd, T.F., Alcaide, F., Luquin, M., 2016. Mycobacteria clumping increase their capacity to damage macrophages. *Front. Microbiol.* 7, 1562.

- Brinkmann, V., Reichard, U., Goosmann, C., Fauler, B., Uhlemann, Y., Weiss, D.S., Weinrauch, Y., Zychlinsky, A., 2004.** Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*. 303, 1532-1535.
- Brumell, J.H., Scidmore, M.A., 2007.** Manipulation of rab GTPase function by intracellular bacterial pathogens. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 71, 636-652.
- Buddle, B.M., Pollock, J.M., Skinner, M.A., Wedlock, D.N., 2003a.** Development of vaccines to control bovine tuberculosis in cattle and relationship to vaccine development for other intracellular pathogens. *Int. J. Parasitol.* 33, 555-566.
- Buddle, B.M., Wedlock, D.N., Parlane, N.A., Corner, L.A.L., de Lisle, G.W., Skinner, M.A., 2003b.** Revaccination of neonatal calves with *Mycobacterium bovis* BCG reduces the level of protection against bovine tuberculosis induced by a single vaccination. *Infect. Immun.* 71, 6411-6419.
- Buddle, B.M., Hewinson, R.G., Vordermeier, H.M., Wedlock, D.N., 2013.** Subcutaneous administration of a 10-fold-lower dose of a commercial human tuberculosis vaccine, *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guefín Danish, induced levels of protection against bovine tuberculosis and responses in the tuberculin intradermal test. *Clin. Vaccine. Immunol.* 20, 1559-1562.
- Budhia, S., Haring, L., McConnell, I., Blacklaws, B.A., 2006.** Quantitation of ovine cytokine mRNA by real-time RT-PCR. *J. Immunol. Methods.* 309, 160-172.
- Buergelt, C.D., Hall, C., Mcentee, K., Duncan, J.R., 1978.** Pathological evaluation of paratuberculosis in naturally infected cattle. *Vet. Pathol.* 15, 196-207.
- Burgess, A.W., Metcalf, D., 1980.** The nature and action of granulocyte-macrophage colony stimulating factors. *Blood.* 56, 947-958.
- Burrells, C., Clarke, C.J., Colston, A., Kay, J.M., Porter, J., Little, D., Sharp, J.M., 1998.** A study of immunological responses of sheep clinically-affected with paratuberculosis (Johne's disease). The relationship of blood, mesenteric lymph node and intestinal lymphocyte responses to gross and microscopic pathology. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 66, 343-358.
- Burrells, C., Clarke, C.J., Colston, A., Kay, J.M., Porter, J., Little, D., Sharp, J.M., 1999.** Interferon-gamma and interleukin-2 release by lymphocytes derived from the blood, mesenteric lymph nodes and intestines of normal sheep and those affected with paratuberculosis (Johne's disease). *Vet. Immunol. Immunopathol.* 68, 139-148.
- Butot, S., Ricchi, M., Sevilla, I.A., Michot, L., Molina, E., Tello, M., Russo, S., Arrigoni, N., Garrido, J.M., Tomas, D., 2019.** Estimation of performance characteristics of

- analytical methods for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* detection in dairy products. *Front. Microbiol.* 10, 509.
- Buza, J.J., Hikono, H., Mori, Y., Nagata, R., Hirayama, S., Aodon-geril Bari, A.M., Shu, Y., Tsuji, N.M., Momotani, E., 2004.** Neutralization of interleukin-10 significantly enhances gamma interferon expression in peripheral blood by stimulation with Johnin purified protein derivative and by infection with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in experimentally infected cattle with paratuberculosis. *Infect. Immun.* 72, 2425-2428.
- Buza, J., Kiros, T., Zerihun, A., Abraham, I., Ameni, G., 2009.** Vaccination of calves with *Mycobacteria bovis* Bacilli Calmete Guerin (BCG) induced rapid increase in the proportion of peripheral blood $\gamma\delta$ T cells. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 130, 251-255.
- Cacciotto, C., Cubeddu, T., Addis, M.F., Anfossi, A.G., Tedde, V., Tore, G., Carta, T., Rocca, S., Chessa, B., Pittau, M., Alberti, A., 2016.** *Mycoplasma* lipoproteins are major determinants of neutrophil extracellular trap formation. *Cell. Microbiol.* 18, 1751-1762.
- Calmette, A., Guerin, C., Bouquet, A., Negre, L., 1928.** La vaccination préventive contre la tuberculose par le "BCG." *Am. J. Public. Health. Nations. Health.* 18, 1075.
- Camanes, G., Joly, A., Fourichon, C., Ben Romdhane, R., Ezanno, P., 2018.** Control measures to prevent the increase of paratuberculosis prevalence in dairy cattle herds: an individual-based modelling approach. *Vet. Res.* 49, 60.
- Carpenter, E., Fray, L., Gormley, E., 1997.** Cellular responses and *Mycobacterium bovis* BCG growth inhibition by bovine lymphocytes. *Immunol. Cell. Biol.* 75, 554-560.
- Carretta, M.D., Conejeros, I., Hidalgo, M.A., Burgos, R.A., 2013.** Propionate induces the release of granules from bovine neutrophils. *J. Dairy. Sci.* 96, 2507-2520.
- Castillo-Velázquez, U., Gomez-Flores, R., Tamez-Guerra, R., Tamez-Guerra, P., Rodríguez-Padilla, C., 2013.** Differential responses of macrophages from bovines naturally resistant or susceptible to *Mycobacterium bovis* after classical and alternative activation. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 154, 8-16.
- Ceciliani, F., Pocacqua, V., Miranda-Ribera, A., Bronzo, V., Lecchi, C., Sartorelli, P., 2007.** α_1 -Acid glycoprotein modulates apoptosis in bovine monocytes. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 116, 145-152.
- Ceciliani, F., Ávila Morales, G., De Matteis, G., Grandoni, F., Furioso Ferreira, R., Roccabianca, P., Lecchi, C., 2021.** Methods in isolation and characterization of bovine monocytes and macrophages. *Methods.* 186, 22-41.

- Chambers, M.A., Carter, S.P., Wilson, G.J., Jones, G., Brown, E., Hewinson, R.G., Vordermeier, M., 2014.** Vaccination against tuberculosis in badgers and cattle: an overview of the challenges, developments and current research priorities in Great Britain. *Vet. Rec.* 175, 90-96.
- Chakravorty, D., Hensel, M., 2003.** Inducible nitric oxide synthase and control of intracellular bacterial pathogens. *Microbes Infect.* 5, 621-627.
- Chan, J., Xing, Y., Magliozzo, R.S., Bloom, B.R., 1992.** Killing of virulent *Mycobacterium tuberculosis* by reactive nitrogen intermediates produced by activated murine macrophages. *J. Exp. Med.* 175, 1111-1122.
- Chan, S.S., McConnell, I., Blacklaws, B.A., 2002.** Generation and characterization of ovine dendritic cells derived from peripheral blood monocytes. *Immunology.* 107, 366-372.
- Chang, J.S., Huggett, J.F., Dheda, K., Kim, L.U., Zumla, A., Rook, G.A.W., 2006.** *Mycobacterium tuberculosis* induces selective up-regulation of TLRs in the mononuclear leukocytes of patients with active pulmonary tuberculosis. *J. Immunol.* 176, 3010-3018.
- Chang, Z., 2008.** Role of Toll-like receptors in regulatory functions of T and B cells. *Chinese. Sci. Bull.* 53, 1121-1127.
- Chang, D.T., Colton, E., Matsuda, T., Anderson, J.M., 2009.** Lymphocyte adhesion and interactions with biomaterial adherent macrophages and foreign body giant cells. *J. Biomed. Mater. Res. A.* 91, 1210-1220.
- Chaubey, K.K., Gupta, R.D., Gupta, S., Singh, S.V., Bhatia, A.K., Jayaraman, S., Kumar, N., Goel, A., Rathore, A.S., Sahzad., Sohal, J.S., Stephen, B.J., Singh, M., Goyal, M., Dhama, K., Derakhshandeh, A., 2016.** Trends and advances in the diagnosis and control of paratuberculosis in domestic livestock. *Vet. Q.* 36, 203-227.
- Chen, W., Jin, W., Hardegen, N., Lei, K.J., Li, L., Marinos, N., McGrady, G., Wahl, S.M., 2003.** Conversion of peripheral CD4⁺CD25⁻ naive T cells to CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells by TGF- β induction of transcription factor *Foxp3*. *J. Exp. Med.* 198, 1875-1886.
- Chen, J.W., Faisal, S.M., Chandra, S., McDonough, S.P., Moreira, M.A.S., Scaria, J., Chang, C.F., Bannantine, J.P., Akey, B., Chang, Y.F., 2012.** Immunogenicity and protective efficacy of the *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* attenuated mutants against challenge in a mouse model. *Vaccine.* 30, 3015-3025.
- Chiang, S.K., Sommer, S., Aho, A.D., Kiupel, M., Colvin, C., Tooker, B., Coussens, P.M., 2007.** Relationship between *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*, IL-

- 1alpha, and TRAF1 in primary bovine monocyte-derived macrophages. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 116, 131-144.
- Chiodini, R.J., Van Kruiningen, H.J., Merkal, R.S., 1984.** Ruminant paratuberculosis (Johne's disease): the current status and future prospects. *Cornell. Vet.* 74, 218-262.
- Chiodini, R.J., Davis, W.C., 1992.** The cellular immunology of bovine paratuberculosis: the predominant response is mediated by cytotoxic gamma/delta T lymphocytes which prevent CD4⁺ activity. *Microb. Pathog.* 13, 447-463.
- Clarke, C.J., Little, D., 1996.** The pathology of ovine paratuberculosis: gross and histological changes in the intestine and other tissues. *J. Comp. Pathol.* 114, 419-437.
- Clarke, C.J., 1997.** The pathology and pathogenesis of paratuberculosis in ruminants and other species. *J. Comp. Path.* 116, 217-261.
- Coccia, E.M., Passini, N., Battistini, A., Pini, C., Sinigaglia, F., Rogge, L., 1999.** Interleukin-12 induces expression of interferon regulatory factor-1 via signal transducer and activator of transcription-4 in human T helper type 1 cells. *J. Biol. Chem.* 274, 6698-6703.
- Coffman, R.L., Sher, A., Seder, R.A., 2010.** Vaccine adjuvants: putting innate immunity to work. *Immunity.* 33, 492-503.
- Collins, D.M., Gabric, D.M., De Lisle, G.W., 1990.** Identification of two groups of *Mycobacterium paratuberculosis* strains by restriction endonuclease analysis and DNA hybridization. *J. Clin. Microbiol.* 28, 1591-1596.
- Cook, K.L., Britt, J.S., Bolster, C.H., 2010.** Survival of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in biofilms on livestock watering trough materials. *Vet. Microbiol.* 141, 103-109.
- Corbett, C.S., De Buck, J., Orsel, K., Barkema, H.W., 2017.** Fecal shedding and tissue infections demonstrate transmission of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in group-housed dairy calves. *Vet. Res.* 48, 27.
- Corn, J.L., Manning, E.J., Sreevatsan, S., Fischer, J.R., 2005.** Isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from free-ranging birds and mammals on livestock premises. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 6963-6967.
- Corpa, J.M., Pérez, V., Sánchez, M.A., García Marín, J.F., 2000a.** Control of paratuberculosis (Johne's disease) in goats by vaccination of adult animals. *Vet. Rec.* 146, 195-196.
- Corpa, J.M., Garrido, J., García Marín, J.F., Pérez, V., 2000b.** Classification of lesions observed in natural cases of paratuberculosis in goats. *J. Comp. Pathol.* 122, 255-265.

- Corpa**, J.M., Pérez, V., García Marín, J.F., 2000c. Differences in the immune responses in lambs and kids vaccinated against paratuberculosis, according to the age of vaccination. *Vet. Microbiol.* 77, 475-485.
- Corripio-Miyar**, Y., Hope, J., McInnes, C.J., Wattedegera, S.R., Jensen, K., Pang, Y., Entrican, G., Glass, E.J., 2015. Phenotypic and functional analysis of monocyte populations in cattle peripheral blood identifies a subset with high endocytic and allogeneic T-cell stimulatory capacity. *Vet. Res.* 46, 112.
- Coussens**, P.M., 2001. *Mycobacterium paratuberculosis* and the bovine immune system. *Anim. Heal. Res. Rev.* 2, 141-162.
- Coussens**, P.M., Colvin, C.J., Wiersma, K., Abouzieed, A., Sipkovsky, S., 2002. Gene expression profiling of peripheral blood mononuclear cells from cattle infected with *Mycobacterium paratuberculosis*. *Infect. Immun.* 70, 5494-5502.
- Coussens**, P.M., Verman, N., Coussens, M.A., Elftman, M.D., McNulty, A.M., 2004. Cytokine gene expression in peripheral blood mononuclear cells and tissues of cattle infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: evidence for an inherent proinflammatory gene expression pattern. *Infect. Immun.* 72, 1409-1422.
- Coussens**, P.M., Sipkovsky, S., Murphy, B., Roussey, J., Colvin, C.J., 2012. Regulatory T cells in cattle and their potential role in bovine paratuberculosis. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 35, 233-239.
- Covián**, C., Fernández-Fierro, A., Retamal-Díaz, A., Díaz, F.E., Vasquez, A.E., Lay, M.K., Riedel, C.A., González, P.A., Bueno, S.M., Kalergis, A.M., 2019. BCG-induced cross-protection and development of trained immunity: implication for vaccine design. *Front. Immunol.* 10, 2806.
- Cowley**, S.C., **Elkins**, K.L., 2003. CD4⁺ T cells mediate IFN- γ -independent control of *Mycobacterium tuberculosis* infection both *in vitro* and *in vivo*. *J. Immunol.* 171, 4689-4699.
- Cranwell**, M., 1993. Control of Johne's disease in a flock of sheep by vaccination. *Vet. Rec.* 133, 219-220.
- Crespo**, H., Bertolotti, L., Juganaru, M., Glaria, I., de Andrés, D., Amorena, B., Rosati, S., Reina, R., 2013. Small ruminant macrophage polarization may play a pivotal role on lentiviral infection. *Vet. Res.* 44, 83.
- Criado**, M., Benavides, J., Vallejo, R., Arteché, N., Gutiérrez, D., Ferreras, M.C., Pérez, V., Espinosa, J., 2020. Local assessment of WC1⁺ $\gamma\delta$ T lymphocyte subset in the different types of lesions associated with bovine paratuberculosis. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 69, 101422.

- Cruz, A., Khader, S.A., Torrado, E., Fraga, A., Pearl, J.E., Pedrosa, J., Cooper, A.M., Castro, A.G., 2006.** Cutting edge: IFN- γ regulates the induction and expansion of IL-17-producing CD4 T cells during mycobacterial infection. *J. Immunol.* 177, 1416-1420.
- Czuprynski, C.J., Hamilton, H.L., 1985.** Bovine neutrophils ingest but do not kill *Haemophilus somnus in vitro*. *Infect. Immun.* 50, 431-436.
- Dalpke, A., Heeg, K., 2002.** Signal integration following toll-like receptor triggering. *Crit. Rev. Immunol.* 22, 217-250.
- Daniels, M.J., Ball, N., Hutchings, M.R., Greig, A., 2001.** The grazing response of cattle to pasture contaminated with rabbit faeces and the implications for the transmission of paratuberculosis. *Vet. J.* 161, 306-313.
- Danielsson, R., Eriksson, H., 2021.** Aluminium adjuvants in vaccines- A way to modulate the immune response. *Semin. Cell. Dev. Biol.* 115, 3-9.
- Daigneault, M., Preston, J.A., Marriott, H.M., Whyte, M.K.B, Dockrell, D.H., 2010.** The identification of markers of macrophage differentiation in PMA-stimulated THP-1 cells and monocyte-derived macrophages. *PLoS One.* 5, e8668.
- de Almeida, D.E., Colvin, C.J., Coussens, P.M., 2008.** Antigen-specific regulatory T cells in bovine paratuberculosis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 125, 234-245.
- 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
- de Juan, L., Álvarez, J., Aranaz, A., Rodríguez, A., Romero, B., Bezos, J., Mateos, A., Domínguez, L., 2006a.** Molecular epidemiology of Types I / III strains of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* isolated from goats and cattle. *Vet. Microbiol.* 115, 102-110.
- de Juan, L., Álvarez, J., Romero, B., Bezos, J., Castellanos, E., Aranaz, A., Mateos, A., Domínguez, L., 2006b.** Comparison of four different culture media for isolation and growth of type II and type I/III *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* strains isolated from cattle and goats. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 5927-5932.
- DeKuiper, J.L., Coussens, P.M., 2019.** Inflammatory Th17 responses to infection with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (MAP) in cattle and their potential role in development of Johne's disease. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 218, 109954.
- DeKuiper, J.L., Cooperider, H.E., Lubben, N., Ancel, C.M., Coussens, P.M., 2020.** *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* drives an innate Th17-like T cell

- response regardless of the presence of antigen-presenting cells. *Front. Vet. Sci.* 7, 108.
- Delgado, L.,** Juste, R.A., Muñoz, M., Morales, S., Benavides, J., Ferreras, M.C., García Marín, J.F., Pérez, V., 2012. Differences in the peripheral immune response between lambs and adult ewes experimentally infected with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 145, 23-31.
- Delgado, L.,** García Marín, J.F., Muñoz, M., Benavides, J., Juste, R.A., García-Pariente, C., Fuertes, M., González, J., Ferreras, M.C., Pérez, V., 2013. Pathological findings in young and adult sheep following experimental infection with 2 different doses of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Vet. Pathol.* 50, 857-866.
- de Moraes Pereira, H.,** Santos, H.P., de Oliveira, E.A.A., Rocha, T.B., Araújo, Í.M.S., Soares, D.M., Junior, F.G., de Albuquerque, P.P.F., Mota, R.A., 2020. High prevalence of subclinical paratuberculosis in buffaloes (*Bubalus bubalis*) in Maranhão, Brazil. *Braz. J. Microbiol.* 51, 1383-1390.
- Denis, M.,** Wedlock, D.N., Buddle, B.M., 2004. Ability of T cell subsets and their soluble mediators to modulate the replication of *Mycobacterium bovis* in bovine macrophages. *Cell. Immunol.* 232, 1-8.
- Derrick, S.C.,** Repique, C., Snoy, P., Yang, A.L., Morris, S., 2004. Immunization with a DNA vaccine cocktail protects mice lacking CD4 cells against an aerogenic infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Immun.* 72, 1685-1692.
- de Silva, K.,** Begg, D., Carter, N., Taylor, D., Di Fiore, L., Whittington, R., 2010. The early lymphocyte proliferation response in sheep exposed to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* compared to infection status. *Immunobiology.* 215, 12-25.
- de Silva, K.,** Plain, K.M., Begg, D.J., Purdie, A.C., Whittington, R.J., 2015. CD4⁺ T-cells, $\gamma\delta$ T-cells and B-cells are associated with lack of vaccine protection in *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection. *Vaccine.* 33, 149-155.
- Detmer, A., Glenting, J.,** 2006. Live bacterial vaccines--a review and identification of potential hazards. *Microb. Cell. Fact.* 5, 23.
- Dhand, N.K.,** Johnson, W.O., Eppleston, J., Whittington, R.J., Windsor, P.A., 2013. Comparison of pre- and post-vaccination ovine Johne's disease prevalence using a Bayesian approach. *Prev. Vet. Med.* 111, 81-91.
- Dhand, N.K.,** Eppleston, J., Whittington, R.J., Windsor, P.A., 2016. Changes in prevalence of ovine paratuberculosis following vaccination with Gudair®: Results of a longitudinal study conducted over a decade. *Vaccine.* 34, 5107-5113.

- Diéguez**, F.J., Arnaiz, I., Sanjuán, M.L., Vilar, M.J., López, M., Yus, E., 2007. Prevalence of serum antibodies to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in cattle in Galicia (northwest Spain). *Prev. Vet. Med.* 82, 321-326.
- Diéguez**, F.J., Arnaiz, I., Sanjuán, M.L., Vilar, M.J., Yus, E., 2008. Management practices associated with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection and the effects of the infection on dairy herds. *Vet. Rec.* 162, 614-617.
- Dierckins**, M.S., Sherman, D.M., Gendron-Fitzpatrick, A., 1990. Probable paratuberculosis in a Sicilian ass. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 196, 459-461.
- Díez-Delgado**, I., Rodríguez, O., Boadella, M., Garrido, J.M., Sevilla, I.A., Bezos, J., Juste, R., Domínguez, L., Gortázar, C., 2017. Parenteral vaccination with heat-inactivated *Mycobacterium bovis* reduces the prevalence of tuberculosis-compatible lesions in farmed wild boar. *Transbound. Emerg. Dis.* 64, e18-e21.
- Domingo**, M., Vidal, E., Marco, A., 2014. Pathology of bovine tuberculosis. *Res. Vet. Sci.* 97, S20-S29.
- Donaghy**, J., Keyser, M., Johnston, J., Cilliers, F.P., Gouws, P.A., Rowe, M.T., 2009. Inactivation of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* in milk by UV treatment. *Lett. Appl. Microbiol.* 49, 217-221.
- Dorshorst**, N.C., Collins, M.T., Lombard, J.E., 2006. Decision analysis model for paratuberculosis control in commercial dairy herds. *Prev. Vet. Med.* 75, 92-122.
- Dotta**, U., Guglielmino, R., Cagnasso, A., D'Angelo, A., Prato, S., Bosso, M., 1999. Effects of subclinical bovine paratuberculosis on *in-vitro* polymorphonuclear neutrophil migration. *J. Comp. Pathol.* 121, 399-403.
- Draijer**, C., Penke, L.R.K., Peters-Golden, M., 2019. Distinctive effects of GM-CSF and M-CSF on proliferation and polarization of two major pulmonary macrophage populations. *J. Immunol.* 202: 2700-2709.
- Dudemaine**, P.L., Fecteau, G., Lessard, M., Labrecque, O., Roy, J.P., Bissonnette, N., 2014. Increased blood-circulating interferon- γ , interleukin-17, and osteopontin levels in bovine paratuberculosis. *J. Dairy. Sci.* 97, 3382-3393.
- Dufour**, B., Pouillot, R., Durand, B., 2004. A cost/benefit study of paratuberculosis certification in French cattle herds. *Vet. Res.* 35, 69-81.
- Eamens**, G.J., Whittington, R.J., Turner, M.J., Austin, S.L., Fell, S.A., Marsh, I.B., 2007. Evaluation of radiometric faecal culture and direct PCR on pooled faeces for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in cattle. *Vet. Microbiol.* 125, 22-35.

- Eda, S.,** Bannantine, J.P., Waters, W.R., Mori, Y., Whitlock, R.H., Scott, M.C., Speer, C.A., 2006. A highly sensitive and subspecies-specific surface antigen enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of Johne's disease. *Clin. Vaccine. Immunol.* 13, 837-844.
- Edwards, D., Kikpatrick, C.H.,** 1986. The immunology of mycobacterial diseases. *Am. Rev. Respir. Dis.* 134, 1062-1071.
- El-Etr, S.H., Cirillo, J.D.,** 2001. Entry mechanisms of mycobacteria. *Front. Biosci.* 6, D737-747.
- Elmowalid, G.A.,** 2012. A simple method for generation of functional sheep peripheral blood monocytes-derived-macrophages *in vitro*. *Golb Vet.* 9, 590-599.
- Elmowalid, G., Amar, A.M., Ahmad, A.A.,** 2013. *Nigella sativa* seed extract: 1. Enhancement of sheep macrophage immune functions *in vitro*. *Res. Vet. Sci.* 95, 437-443.
- Elnaggar, M.M., Abdellrazeq, G.S., Mack, V., Fry, L.M., Davis, W.C., Park, K.T.,** 2016. Characterization and use of new monoclonal antibodies to CD11c, CD14, and CD163 to analyze the phenotypic complexity of ruminant monocyte subsets. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 178, 57-63.
- Elsbach, P., Weiss, J.,** 1985. Oxygen-dependent and oxygen-independent mechanisms of microbicidal activity of neutrophils. *Immunol. Lett.* 11, 159-163.
- Eltholth, M.M., Marsh, V.R., Van Winden, S., Guitian, F.J.,** 2009. Contamination of food products with *Mycobacterium avium paratuberculosis*: a systematic review. *J. Appl. Microbiol.* 107, 1061-1071.
- Endsley, J.J., Hogg, A., Shell, L.J., McAulay, M., Coffey, T., Howard, C., Capinos Scherer, C.F., Waters, W.R., Nonnecke, B., Estes, D.M., Villarreal-Ramos, B.,** 2007. *Mycobacterium bovis* BCG vaccination induces memory CD4⁺ T cells characterized by effector biomarker expression and anti-mycobacterial activity. *Vaccine.* 25, 8384-8394.
- Englund, S., Bölske, G., Johansson, K.E.,** 2002. An IS900-like sequence found in a *Mycobacterium* sp. other than *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 209, 267-271.
- Eibel, H., Kraus, H., Sic, H., Kienzler, A.K., Rizzi, M.,** 2014. B cell biology: an overview. *Curr. Allergy. Asthma. Rep.* 14, 434.
- Eppleston, J., Reddacliff, L., Windsor, P., Links, I., Whittington, R.,** 2005. Preliminary observations on the prevalence of sheep shedding *Mycobacterium avium* subsp

- paratuberculosis* after 3 years of a vaccination program for ovine Johne's disease. Aust. Vet. J. 83, 637-638.
- Eppleston**, J., Begg, D.J., Dhand, N.K., Watt, B., Whittington, R.J., 2014. Environmental survival of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in different climatic zones of eastern Australia. Appl. Environ. Microbiol. 80, 2337-2342.
- Eske**, K., Breitbart, K., Köhler, J., Wongprompitak, P., Steinmetz, I., 2009. Generation of murine bone marrow derived macrophages in a standardised serum-free cell culture system. J. Immunol. Methods. 342, 13-19.
- Espinosa**, J., de la Morena, R., Benavides, J., García-Pariente, C., Fernández, M., Tesouro, M., Arteché, N., Vallejo, R., Ferreras, M.C., Pérez, V., 2020. Assessment of acute-phase protein response associated with the different pathological forms of bovine paratuberculosis. Animals.10, 1925.
- Espinosa**, J., Fernández, M., Royo, M., Grau, A., Collazos, J.Á., Benavides, J., Ferreras, M.C., Mínguez, O., Pérez, V., 2021. Influence of vaccination against paratuberculosis on the diagnosis of caprine tuberculosis during official eradication programmes in Castilla y León (Spain). Transbound. Emerg. Dis. 68, 692-703.
- Facciolo**, A., Lee, A.H., Trimble, M.J., Rawlyk, N., Townsend, H.G.G., Bains, M., Arsic, N., Mutharia, L.M., Potter, A., Gerds, V., Napper, S., Hancock, R.E.W., Griebel, P.J., 2020. A bovine enteric *Mycobacterium* infection model to analyze parenteral vaccine-induced mucosal immunity and accelerate vaccine discovery. Front. Immunol. 11, 586659.
- Faisal**, S.M., Chen, J.W., Yan, F., Chen, T.T., Useh, N.M., Yan, W., Guo, S., Wang, S.J., Glaser, A.L., McDonough, S.P., Singh, B., Davis, W.C., Akey, B.L., Chang, Y.F., 2013. Evaluation of a *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis leuD* mutant as a vaccine candidate against challenge in a caprine model. Clin. Vaccine. Immunol. 20, 572-581.
- Fang**, Y., Wu, W.H., Pepper, J.L., Larsen, J.L., Marras, S.A.E., Nelson, E.A., Epperson, W.B., Christopher-Hennings, J., 2002. Comparison of real-time, quantitative PCR with molecular beacons to nested PCR and culture methods for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in bovine fecal samples. J. Clin. Microbiol. 40, 287-291.
- Fecteau**, M.E., Whitlock, R.H., 2011. Treatment and chemoprophylaxis for paratuberculosis. Vet. Clin. Food. Anim. 27, 547-557.

- Fecteau, M.E.,** Hovingh, E., Whitlock, R.H., Sweeney, R.W., 2013. Persistence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in soil, crops, and ensiled feed following manure spreading on infected dairy farms. *Can. Vet. J.* 54, 1083-1085.
- Fecteau, M.E.,** 2018. Paratuberculosis in cattle. *Vet. Clin. North. Am. Food. Anim. Pract.* 34, 209-222.
- Fejer, G.,** Wegner, M.D., Györy, I., Cohen, I., Engelhard, P., Voronov, E., Manke, T., Ruzsics, Z., Dölken, L., Prazeres da Costa, O., Branzk, N., Huber, M., Prasse, A., Schneider, R., Apte, R.N., Galanos, C., Freudenberg, M.A., 2013. Nontransformed, GM-CSF-dependent macrophage lines are a unique model to study tissue macrophage functions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, E2191-8.
- Feller, M.,** Huwiler, K., Stephan, R., Altpeter, E., Shang, A., Furrer, H., Pfyffer, G.E., Jemmi, T., Baumgartner, A., Egger, M., 2007. *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* and Crohn's disease: a systematic review and meta-analysis. *Lancet. Infect. Dis.* 7, 607-613.
- Feng, Y.,** Press, B., Wandinger-Ness, A., 1995. Rab 7: an important regulator of late endocytic membrane traffic. *J. Cell. Biol.* 131, 1435-1452.
- Fernández, M.,** Benavides, J., Sevilla, I.A., Fuertes, M., Castaño, P., Delgado, L., García Marín, J.F., Garrido, J.M., Ferreras, M.C., 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.
- Fernández, M.,** Benavides, J., Castaño, P., Elgueabal, N., Fuertes, M., Muñoz, M., Royo, M., Ferreras, M.C., Pérez, V., 2017a. Macrophage subsets within granulomatous intestinal lesions in bovine paratuberculosis. *Vet. Pathol.* 54, 82-93.
- Fernández, M.,** Fuertes, M., Elgueabal, N., Castaño, P., Royo, M., Ferreras, M.C., Benavides, J., Pérez, V., 2017b. Immunohistochemical expression of interferon- γ in different types of granulomatous lesions associated with bovine paratuberculosis. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 51, 1-8.
- Ferroglio, E.,** Nebbia, P., Robino, P., Rossi, L., Rosati, S., 2000. *Mycobacterium paratuberculosis* infection in two free-ranging Alpine ibex. *Rev. Sci. Tech.* 19, 859-862.
- Fikri, Y.,** Nyabenda, J., Denis, M., Pastoret, P.P., 2000. Purification and characterisation of bovine WC1⁺ $\gamma\delta$ T lymphocytes from peripheral blood. *Vet. Res.* 31, 229-239.
- Fox, C.B.,** Baldwin, S.L., Vedvick, T.S., Angov, E., Reed, S.G., 2012. Effects on immunogenicity by formulations of emulsion-based adjuvants for malaria vaccines. *Clin. Vaccine. Immunol.* 19, 1633-1640.

- Francis, J., Macturk, H.M., Madinaveitia, J., Snow, G.A., 1953.** Mycobactin, a growth factor for *Mycobacterium johnei*. 1. Isolation from *Mycobacterium phlei*. *Biochem. J.* 55, 596-607.
- Fratti, R.A., Backer, J.M., 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.* 154, 631-644.
- Fratti, R.A., Chua, J., Deretic, V., 2003.** Induction of p38 mitogen-activated protein kinase reduces early endosome autoantigen 1 (EEA1) recruitment to phagosomal membranes. *J. Biol. Chem.* 278, 46961-46967.
- Frey, J., 2007.** Biological safety concepts of genetically modified live bacterial vaccines. *Vaccine.* 25, 5598-5605-
- Frie, M.C., Sporer, K.R.B., Kirkpatrick, B.W., Coussens, P.M., 2017.** T and B cell activation profiles from cows with and without Johne's disease in response to *in vitro* stimulation with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 193-194, 50-56.
- Flynn, J.L., Goldstein, M.M., Chan, J., Triebold, K.J., Pfeffer, K., Lowenstein, C.J., Schreiber, R., Mak, T.W., Bloom, B.R., 1995.** Tumor necrosis factor- α is required in the protective immune response against *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *Immunity.* 2, 561-572.
- Fuchs, T.A., Abed, U., Goosmann, C., Hurwitz, R., Schulze, I., Wahn, V., Weinrauch, Y., Brinkmann, V., Zychlinsky, A., 2007.** Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J. Cell. Biol.* 176, 231-241.
- Galli, S.J., Borregaard, N., Wynn, T.A., 2011.** Phenotypic and functional plasticity of cells of innate immunity: macrophages, mast cells and neutrophils. *Nat. Immunol.* 12, 1035-1044.
- Garcia, A.B., Shalloo, L., 2015.** Invited review: The economic impact and control of paratuberculosis in cattle. *J. Dairy. Sci.* 98, 5019-5039.
- García-Sánchez, M., Jiménez-Pelayo, L., Horcajo, P., Regidor-Cerrillo, J., Ólafsson, E.B., Bhandage, A.K., Barragan, A., Werling, D., Ortega-Mora, L.M., Collantes-Fernández, E., 2019.** Differential responses of bovine monocyte-derived macrophages to infection by *Neospora caninum* isolates of high and low virulence. *Front. Immunol.* 10, 915.
- Garly, M.L., Martins, C.L., Balé, C., Baldé, M.A., Hedegaard, K.L., Gustafson, P., Lisse, I.M., Whittle, H.C., Aaby, P., 2003.** BCG scar and positive tuberculin reaction

- associated with reduced child mortality in West Africa. A non-specific beneficial effect of BCG? *Vaccine*. 21, 2782-2790.
- Garrido, J.M.,** Aduriz, G., Juste, R., Geijo, M., 2000. Los métodos de diagnóstico de la paratuberculosis en el ganado vacuno. *BOVIS. Aula. Vet.* 93, 49-61.
- Garrido, J.M.,** Sevilla, I.A., Beltrán-Beck, B., Minguijón, E., Ballesteros, C., Galindo, R.C., Boadella, M., Lyashchenko, K.P., Romero, B., Geijo, M.V., Ruiz-Fons, F., Aranaz, A., Juste, R.A., Vicente, J., de la Fuente, J., Gortázar, C., 2011. Protection against tuberculosis in Eurasian wild boar vaccinated with heat-inactivated *Mycobacterium bovis*. *PLoS One*. 6, e24905.
- Garrido, J.M.,** Molina, E., Plazaola, J., Sevilla, I., Geijo, M., Vázquez, P., Rodríguez, A., Alonso-Hearn, M., Juste, R.A., 2012. Effect of vaccination against paratuberculosis in the diagnosis of bovine tuberculosis with comparative cervical skin test. *Proceedings of the 11th International Colloquium on Paratuberculosis*. Sydney, Australia, pp. 166-7
- Garrido, J.M.,** Vazquez, P., Molina, E., Plazaola, J.M., Sevilla, I.A., Geijo, M.V., Alonso-Hearn, M., Juste, R.A., 2013. Paratuberculosis vaccination causes only limited cross-reactivity in the skin test for diagnosis of bovine tuberculosis. *PLoS One*. 8, e80985.
- Garvey, M.,** 2020. *Mycobacterium avium paratuberculosis*: a disease burden on the dairy industry. *Animals*. 10, 1773.
- Gibson, A.J.,** Woodman, S., Pennelegion, C., Patterson, R., Stuart, E., Hosker, N., Siviter, P., Douglas, C., Whitehouse, J., Wilkinson, W., Pegg, S.A., Villarreal-Ramos, B., Werling, D., 2016. Differential macrophage function in Brown Swiss and Holstein Friesian cattle. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 181, 15-23.
- Gilardoni, L.R.,** Paolicchi, F.A., Mundo, S.L., 2012. Bovine paratuberculosis: a review of the advantages and disadvantages of different diagnostic tests. *Rev. Argent. Microbiol.* 44, 201-215.
- Gill, C.O.,** Saucier, L., Meadus, W.J., 2011. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in dairy products, meat, and drinking water. *J. Food. Prot.* 74, 480-499.
- Gillan, S.,** O'Brien, R., Hughes, A.D., Griffin, J.F.T., 2010. Identification of immune parameters to differentiate disease states among sheep infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Clin. Vaccine Immunol.* 17, 108-117.
- Ginhoux, F., Jung, S.,** 2014. Monocytes and macrophages: developmental pathways and tissue homeostasis. *Nat. Rev. Immunol.* 14, 392-404.

- Glanemann, B.,** Schönenbrücher, H., Bridger, N., Abdulmawjood, A., Neiger, R., Bülte., 2008. Detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*-specific DNA by PCR in intestinal biopsies of dogs. *J. Vet. Intern. Med.* 22, 1090-1094.
- Gollnick, N.S.,** Mitchell, R.M., Baumgart, M., Janagama, H.K., Sreevatsan, S., Schukken, Y.H., 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.
- González, J.,** Geijo, M.V., García-Pariente, C., Verna, A., Corpa, J.M., Reyes, L.E., Ferreras, M.C., Juste, R.A., García Marín, J.F., Pérez, V., 2005. Histopathological classification of lesions associated with natural paratuberculosis infection in cattle. *J. Comp. Pathol.* 133, 184-196.
- Goodger, W.,** Collins, M., Nordlund, K., Eisele, C., Pelletier, J., Thomas, C., Sockett, D., 1996. Epidemiologic study of on-farm management practices associated with prevalence of *Mycobacterium paratuberculosis* infections in dairy cattle. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 208, 1877-1881.
- Gordon, S., Taylor, P.R.,** 2005. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat. Rev. Immunol.* 5: 953-964.
- Grant, I.R.,** 2005. Zoonotic potential of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*: the current position. *J. Appl. Microbiol.* 98, 1282-1293.
- Green, E.P.,** Tizard, M.L.V., Moss, M.T., Thompson, J., Winterbourne, D.J., McFadden, J.J., Hermon-Taylor, J., 1989. Sequence and characteristics of IS900, an insertion element identified in a human Crohn's disease isolate of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Nucleic. Acids. Res.* 17, 9063-9074.
- Greig, A.,** Stevenson, K., Perez, V., Pirie, A.A., Grant, J.M., Sharp, J.M., 1997. Paratuberculosis in wild rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). *Vet. Rec.* 140, 141-143.
- Greig, A.,** Stevenson, K., Henderson, D., Perez, V., Hughes, V., Pavlik, I., Hines, M.E. 2nd., Mckendrick, I., Sharp, J.M., 1999. Epidemiological study of paratuberculosis in wild rabbits in Scotland. *J. Clin. Microbiol.* 37, 1746-1751.
- Griffin, J.F.T.,** Hughes, A.D., Liggett, S., Farquhar, P.A., Mackintosh, C.G., Bakker, D., 2009. Efficacy of novel lipid-formulated whole bacterial cell vaccines against *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in sheep. *Vaccine.* 27, 911-918.
- Groenendaal, H.,** Zagmutt, F.J., Patton, E.A., Wells, S.J., 2015. Cost-benefit analysis of vaccination against *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* in dairy cattle, given its cross-reactivity with tuberculosis tests. *J. Dairy. Sci.* 98, 6070-6084.

- Guerra-Maupome, M., Vang, D.X., McGill, J.L., 2019a.** Aerosol vaccination with Bacille Calmette-Guerin induces a trained innate immune phenotype in calves. *PLoS One*. 14, e0212751.
- Guerra-Maupome, M., Slate, J.R., McGill, J.L., 2019b.** Gamma delta T cell function in ruminants. *Vet. Clin. North. Am. Food. Anim. Pract.* 35, 453-469.
- Guirado, E., Schlesinger, L.S., Kaplan, G., 2013.** Macrophages in tuberculosis: friend or foe. *Semin. Immunopathol.* 35, 563-583.
- Gupta, S., Singh, S.V., Singh, M., Chaubey, K.K., Karthik, K., Bhatia, A.K., Kumar, N., Dhama, K., 2019.** Vaccine approaches for the “therapeutic management” of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection in domestic livestock. *Vet. Q.* 39, 143-152.
- Gurung, R.B., Begg, D.J., Purdie, A.C., Bach, H., Whittington, R.J., 2014.** Immunoreactivity of protein tyrosine phosphatase A (PtpA) in sera from sheep infected with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 160, 129-132.
- Gwozdz, J.M., Thompson, K.G., Manktelow, B.W., Murray, A., West, D.M., 2000.** Vaccination against paratuberculosis of lambs already infected experimentally with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Aust. Vet. J.* 78, 560-566.
- Hasvold, H.J., Valheim, M., Berntsen, G., Storset, A.K., 2002.** *In vitro* responses to purified protein derivate of caprine T lymphocytes following vaccination with live strains of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 90, 79-89.
- Hedges, J.F., Lubick, K.J., Jutila, M.A., 2005.** $\gamma\delta$ T cells respond directly to pathogen-associated molecular patterns. *J. Immunol.* 174, 6045-6053.
- Hellenbrand, K.M., Forsythe, K.M., Rivera-Rivas, J.J., Czuprynski, C.J., Aulik, N.A., 2013.** *Histophilus somni* causes extracellular trap formation by bovine neutrophils and macrophages. *Microb. Pathog.* 54, 67-75.
- Hein, W.R., Mackay, C.R., 1991.** Prominence of gamma delta T cells in the ruminant immune system. *Immunol. Today.* 12, 30-34.
- Henao-Tamayo, M., Obregón-Henao, A., Creissen, E., Shanley, C., Orme, I., Ordway, D.J., 2015.** Differential *Mycobacterium bovis* BCG vaccine-derived efficacy in C3Heb/FeJ and C3H/HeOuJ mice exposed to a clinical strain of *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin. Vaccine Immunol.* 22, 91-98.

- Hendrick**, S.H., Kelton, D.F., Leslie, K.E., Lissemore, K.D., Archambault, M., Duffield, T.F., 2005. Effect of paratuberculosis on culling, milk production, and milk quality in dairy herds. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 227, 1302-1308.
- Hines**, S., Buergelt, C., Wilson, J., Bliss, E., 1987. Disseminated *Mycobacterium paratuberculosis* infection in a cow. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 190, 681-683.
- Hines**, M.E. 2nd., Stabel, J.R., Sweeney, R.W., Griffin, F., Talaat, A.M., Bakker, D., Benedictus, G., Davis, W.C., de Lisle, G.W., Gardner, I.A., Juste, R.A., Kapur, V., Koets, A., McNair, J., Pruitt, G., Whitlock, R.H., 2007. Experimental challenge models for Johne's disease: A review and proposed international guidelines. *Vet. Microbiol.* 122, 197-222.
- Hines**, M.E. 2nd., Turnquist, S.E., Ilha, M.R.S., Rajeev, S., Jones, A.L., Whittington, L., Bannantine, J.P., Barletta, R.G., Gröhn, Y.T., Katani, R., Talaat, A.M., 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.
- Hogarth**, P.J., Logan, K.E., Vordermeier, H.M., Singh, M., Hewinson, R.G., Chambers, M.A., 2005. Protective immunity against *Mycobacterium bovis* induced by vaccination with Rv3109c-- a member of the *esat-6* gene family. *Vaccine.* 23, 2557-2564-
- Hope**, J.C., Thom, M.L., McAulay, M., Mead, E., Vordermeier, H.M., Clifford, D., Hewinson, R.G., Villarreal-Ramos, B., 2011. Identification of surrogates and correlates of protection in protective immunity against *Mycobacterium bovis* infection induced in neonatal calves by vaccination with *M. bovis* BCG pasteur and *M. bovis* BCG Danish. *Clin. Vaccine Immunol.* 18, 373-379.
- Hostetter**, J.M., Steadham, E.M., Haynes, J.S., Bailey, T.B., Cheville, N.F., 2002. Cytokine effects on maturation of the phagosomes containing *Mycobacteria avium* subspecies *paratuberculosis* in J774 cells. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 34, 127-134.
- Hostetter**, J., Steadham, E., Haynes, J., Bailey, T., Cheville, N., 2003. Phagosomal maturation and intracellular survival of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in J774 cells. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 26, 269-283.
- Hothorn**, T., Bretz, F., Westfall, P., 2008. Simultaneous inference in general parametric models. *Biom J.* 50, 346-363.
- Huang**, Z., Luo, Q., Guo, Y., Chen, J., Xiong, G., Peng, Y., Ye, J., Li, J., 2015. *Mycobacterium tuberculosis*-induced polarization of human macrophage orchestrates the formation and development of tuberculous granulomas *in vitro*. *PLoS One.* 10, e0129744.

- Huda**, A., Jungersen, G., Lind, P., 2004. Longitudinal study of interferon-gamma, serum antibody and milk antibody responses in cattle infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Vet. Microbiol.* 104, 43-53.
- Hughes**, V., McNair, J., Strain, S., Barry, C., McLuckie, J., Nath, M., Caldow, G., Stevenson, K., 2017. Gamma interferon responses to proteome-determined specific recombinant proteins in cattle experimentally- and naturally-infected with paratuberculosis. *Res. Vet. Sci.* 114, 244-253.
- Hurley**, S., **Ewing**, E. 1983. Results of a field evaluation of a whole cell bacterin. Proceedings of the International Colloquium on Paratuberculosis. NADC, USDA, Ames, IA, USA, pp. 244-248.
- Hussain**, T., Shah, S.Z.A., Zhao, D., Sreevatsan, S., Zhou, X., 2016. The role of IL-10 in *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection. *Cell Commun. Signal.* 14, 29.
- Italiani**, P., **Boraschi**, D., 2014. From monocytes to M1/M2 macrophages: phenotypical vs. functional differentiation. *Front. Immunol.* 5, 514.
- Jahraus**, A., Tjelle, T.E., Berg, T., Habermann, A., Storrie, B., Ullrich, O., Griffiths, G., 1998. *In vitro* fusion of phagosomes with different endocytic organelles from J774 macrophages. *J. Biol. Chem.* 273, 30379-30390.
- 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.
- Jaillon**, S., Galdiero, M.R., Del Prete, D., Cassatella, M.A., Garlanda, C., Mantovani, A., 2013. Neutrophils in innate and adaptive immunity. *Semin. Immunopathol.* 35, 377-394.
- Jensen**, K., Anderson, J.A., Glass, E.J., 2014. Comparison of small interfering RNA (siRNA) delivery into bovine monocyte-derived macrophages by transfection and electroporation. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 158, 224-232.
- Jenvey**, C.J., Shircliff, A.L., Bannantine, J.P., Stabel, J.R., 2019. Phenotypes of macrophages present in the intestine are impacted by stage of disease in cattle naturally infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *PLoS One.* 14, e0217649.
- Jimbo**, S., Suleman, M., Maina, T., Prysliak, T., Mulongo, M., Perez-Casal, J., 2017. Effect of *Mycoplasma bovis* on bovine neutrophils. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 188, 27-33.

- Jo**, E.K., Yang, C.S., Choi, C.H., Harding, C.V., 2007. Intracellular signalling cascades regulating innate immune responses to *Mycobacteria*: branching out from Toll-like receptors. *Cell. Microbiol.* 9, 1087-1098.
- Johansen**, M.D., de Silva, K., Plain, K.M., Whittington, R.J., Purdie, A.C., 2019. *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* is able to manipulate host lipid metabolism and accumulate cholesterol within macrophages. *Microb. Pathog.* 130, 44-53.
- Johne**, H., **Frothingham**, L., 1895. Ein eigenthümlicher fall von tuberkulose beim rind. *Dtsch. Ztschr. Tiermed. Pathology.* 21, 438-454.
- Jones**, G.J., Steinbach, S., Sevilla, I.A., Garrido, J.M., Juste, R., Vordermeier, H.M., 2016. Oral vaccination of cattle with heat inactivated *Mycobacterium bovis* does not compromise bovine TB diagnostic tests. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 182, 85-88.
- Joosten**, S.A., van Meijgaarden, K.E., Arend, S.M., Prins, C., Oftung, F., Korsvold, G.E., Kik, S.V., Arts, R.J.W., van Crevel, R., Netea, M.G., Ottenhoff, T.H.M., 2018. Mycobacterial growth inhibition is associated with trained innate immunity. *J. Clin. Invest.* 128, 1837-1851.
- Jubb**, T., **Galvin**, J., 2000. Herd testing to control bovine Johne's disease. *Vet. Microbiol.* 77, 423-428.
- Judge**, J., Greig, A., Kyriazakis, I., Hutchings, M.R., 2005. Ingestion of faeces by grazing herbivores- risk of inter-species disease transmission. *Agric. Ecosyst. Environ.* 107, 267-274.
- Juste**, R., **Pérez**, V., 2011. Control of paratuberculosis in sheep and goats. *Vet. Clin. Food. Anim.* 27, 127-138.
- Juste**, R.A., García Marin, J.F., Peris, B., Sáez de Ocáriz, C., Badiola, J.J., 1994. Experimental infection of vaccinated and non-vaccinated lambs with *Mycobacterium paratuberculosis*. *J. Comp. Path.* 110, 185-194.
- Juste**, R.A., Alonso-Hearn, M., Molina, E., Geijo, M., Vazquez, P., Sevilla, I.A., Garrido, J.M., 2009. 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.
- Juste**, R.A., Alonso-Hearn, M., Garrido, J.M., Abendaño, N., Sevilla, I.A., Gortazar, C., de La Fuente, J., Dominguez, L., 2016. Increased lytic efficiency of bovine macrophages trained with killed mycobacteria. *PLoS One.* 11, e0165607.

- Juste**, R.A., Geijo, M.V., Elguezabal, N., Sevilla, I.A., Alonso-Hearn, M., Garrido, J.M., 2021. Paratuberculosis vaccination specific and non-specific effects on cattle lifespan. *Vaccine*. 39, 1631-1641.
- Kabara**, E., **Coussens**, P.M., 2012. Infection of primary bovine macrophages with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* suppresses host cell apoptosis. *Front. Microbiol.* 3, 215.
- Kagina**, B.M.N., Abel, B., Scriba, T.J., Hughes, E.J., Keyser, A., Soares, A., Gamielien, H., Sidibana, M., Hatherill, M., Gelderbloem, S., Mahomed, H., Hawkrigde, A., Hussey, G., Kaplan, G., Hanekom, W.A., 2010. Specific T cell frequency and cytokine expression profile do not correlate with protection against tuberculosis after bacillus Calmette-Guérin vaccination of newborns. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* 182, 1073-1079.
- Kaiko**, G.E., Horvat, J.C., Beagley, K.W., Hansbro, P.M., 2008. Immunological decision-making: how does the immune system decide to mount a helper T-cell response? *Immunology*. 123, 326-338.
- Kalis**, C.H.J., Hesselink, J.W., Barkema, H.W., Collins, M.T., 2001. Use of long-term vaccination with a killed vaccine to prevent fecal shedding of *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* in dairy herds. *Am. J. Vet. Res.* 62, 270-274.
- Kamoshida**, G., Kikuchi-Ueda, T., Tansho-Nagakawa, S., Nakano, R., Nakano, A., Kikuchi, H., Ubagai, T., Ono, Y., 2015. *Acinetobacter baumannii* escape from neutrophil extracellular traps (NETs). *J. Infect. Chemother.* 21, 43-49.
- Kaneko**, H., Yamada, H., Udagawa, T., Kazumi, Y., Sekikawa, K., Sugawara, I., 1999. Role of tumor necrosis factor-alpha in *Mycobacterium*-induced granuloma formation in tumor necrosis factor-alpha-deficient mice. *Lab. Investig.* 79, 379-386.
- Kapellos**, T.S., Taylor, L., Lee, H., Cowley, S.A., James, W.S., Iqbal, A.J., Greaves, D.R., 2016. A novel real time imaging platform to quantify macrophage phagocytosis. *Biochem. Pharmacol.* 116, 107-119.
- Karakousis**, P.C., Bishal, W.R., Dorman, S.E., 2004. *Mycobacterium tuberculosis* cell envelope lipids and the host immune response. *Cell. Microbiol.* 6, 105-116.
- Kathaperumal**, K., Park, S.U., McDonough, S., Stehman, S., Akey, B., Huntley, J., Wong, S., Chang, C.F., Chang, Y.F., 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.
- Kathaperumal**, K., Kumanan, V., McDonough, S., Chen, L.H., Park, S.U., Moreira, M.A.S., Akey, B., Huntley, J., Chang, C.F., Chang, Y.F., 2009. Evaluation of immune

- responses and protective efficacy in a goat model following immunization with a cocktail of recombinant antigens and a polyprotein of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Vaccine*. 27, 123-135.
- Kawai**, T., **Akira**, S., 2005. Pathogen recognition with Toll-like receptors. *Curr. Opin. Immunol.* 17, 338-344.
- Kawaji**, S., Taylor, D.L., Mori, Y., Whittington, R.J., 2007. Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in ovine faeces by direct quantitative PCR has similar or greater sensitivity compared to radiometric culture. *Vet. Microbiol.* 125, 36-48.
- Keane**, K.A., Mason, G.L., DeMartini, J.C., 2002. Inhibition of nitric oxide enhances ovine lentivirus replication in monocyte-derived macrophages. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 90, 179-189.
- Kennedy**, D., **Benedictus**, G., 2001. Control of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in agricultural species. *Rev. Sci. Tech.* 20, 151-179.
- Kennedy**, M.A., 2010. A brief review of the basics of immunology: the innate and adaptive response. *Vet. Clin. North. Am. Small. Anim. Pract.* 40, 369-379.
- Khader**, S.A., Guglani, L., Rangel-Moreno, J., Gopal, R., Fallert Junecko, B.A., Fountain, J.J., Martino, C., Pearl, J.E., Tighe, M., Lin, Y., Slight, S., Kolls, J.K., Reinhart, T.A., Randall, T.D., Cooper, A.M., 2011. IL-23 is required for long-term control of *Mycobacterium tuberculosis* and B cell follicle formation in the infected lung. *J. Immunol.* 187, 5402-5407.
- Khalifeh**, M.S., **Stabel**, J.R., 2004a. 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. *Infect. Immun.* 72, 1974-1982.
- Khalifeh**, M.S., **Stabel**, J.R., 2004b. Upregulation of transforming growth factor-beta and interleukin-10 in cows with clinical Johne's disease. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 99, 39-46.
- Khalifeh**, M.S., Al-Majali, A.M., Stabel, J.R., 2009. Role of nitric oxide production in dairy cows naturally infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 131, 97-104.
- Khare**, S., Nunes, J.S., Figueiredo, J.F., Lawhon, S.D., Rossetti, C., Gull, T., Rice-Ficht, A.C., Adams, L.G., 2009. Early phase morphological lesions and transcriptional responses of bovine ileum with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Vet. Pathol.* 46, 717-728.

- Kleinnijenhuis, J., Quintin, J., Preijers, F., Joosten, L.A.B., Ifrim, D.C., Saeed, S., Jacobs, C., van Loenhout, J., de Jong, D., Stunnenberg, H.D., Xavier, R.J., van der Meer, J.W., van Crevel, R., Netea, M.G., 2012.** Bacille Calmette-Guérin induces NOD2-dependent nonspecific protection from reinfection via epigenetic reprogramming of monocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 17537-17542.
- Kleinnijenhuis, J., Quintin, J., Preijers, F., Benn, C.S., Joosten, L.A.B., Jacobs, C., van Loenhout, J., Xavier, R.J., Aaby, P., van der Meer, J.W.M., van Crevel, R., Netea, M.G., 2014.** Long-lasting effects of BCG vaccination on both heterologous Th1/Th17 responses and innate trained immunity. *J. Innate. Immun.* 6, 152-158.
- Klimka, A., Michels, L., Glowalla, E., Tosetti, B., Krönke, M., Krut, O., 2015.** Montanide ISA 71 VG is advantageous to Freund's adjuvant in immunization against *S. aureus* infection of mice. *Scand. J. Immunol.* 81, 291-297.
- Kobayashi, S.D., Voyich, J.M., Burlak, C., DeLeo, F.R., 2005.** Neutrophils in the innate immune response. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* 53, 505-517.
- Koets, A.P., Rutten, V.P.M.G., Hoek, A., Bakker, D., van Zijderveld, F., Müller, K.E., van Eden, W., 1999.** Heat-shock protein-specific T-cell responses in various stages of bovine paratuberculosis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 70, 105-115.
- Koets, A., Rutten, V., Hoek, A., van Mil, F., Müller, K., Bakker, D., Gruys, E., van Eden, W., 2002.** Progressive bovine paratuberculosis is associated with local loss of CD4⁺ T cells, increased frequency of $\gamma\delta$ T cells, and related changes in T-cell function. *Infect. Immun.* 70, 3856-3864.
- Koets, A., Hoek, A., Langelaar, M., Overdijk, M., Santema, W., Franken, P., van 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.P., Eda, S., Sreevatsan, S., 2015.** The within host dynamics of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* infection in cattle: where time and place matter. *Vet. Res.* 46, 61.
- Koets, A., Ravesloot, L., Ruuls, R., Dinkla, A., Eisenberg, S., Lievaart-Peterson, K., 2019.** Effects of age and environment on adaptive immune responses to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) vaccination in dairy goats in relation to paratuberculosis control strategies. *Vet. Sci.* 6, 62.
- Köhler, H., Gyra, H., Zimmer, K., Dräger, K.G., Burkert, B., Lemser, B., Hausleithner, D., Cubler, K., Klawonn, W., Hess, R.G., 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. 48, 185-195.
- Kopecna, M., Ondrus, S., Literak, I., Klimes, J., Horvathova, A., Moravkova, M., Bartos, M., Trcka, I., Pavlik, I., 2006.** Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in two brown bears in the central European Carpathians. J. Wildl. Dis. 42, 691-695.
- Kowalewicz-Kulbat, M., Ograczyk, E., Krawczyk, K., Rudnicka, W., Fol, M., 2016.** Type of monocyte immunomagnetic separation affects the morphology of monocyte-derived dendritic cells, as investigated by scanning electron microscopy. J. Immunol. Methods. 439, 79-82.
- Kramsky, J.A., Miller, D.S., Hope, A., Collins, M.T., 2000.** Modification of a bovine ELISA to detect camelid antibodies to *Mycobacterium paratuberculosis*. Vet. Microbiol. 77, 333-337.
- Krüger, C., Köhler, H., Liebler-Tenorio, E.M., 2015a.** Cellular composition of granulomatous lesions in gut-associated lymphoid tissues of goats during the first year after experimental infection with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. Vet. Immunol. Immunopathol. 163, 33-45.
- Krüger, C., Köhler, H., Liebler-Tenorio, E.M., 2015b.** Sequential development of lesions 3, 6, 9, and 12 months after experimental infection of goat kids with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. Vet. Pathol. 52, 276-290.
- Kuehnel, M.P., Goethe, R., Habermann, A., Mueller, E., Rohde, M., Griffiths, G., Valentin-Weigand, P., 2001.** Characterization of the intracellular survival of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*: phagosomal pH and fusogenicity in J774 macrophages compared with other mycobacteria. Cell. Microbiol. 3, 551-566.
- Kugadas, A., Lamont, E.A., Bannantine, J.P., Shoyama, F.M., Brenner, E., Janagama, H.K., Sreevatsan, S., 2016.** A *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* predicted serine protease is associated with acid stress and intraphagosomal survival. Front. Cell. Infect. Microbiol. 6, 85.
- Kumar, H., Kawai, T., Akira, S., 2011.** Pathogen recognition by the innate immune system. Int. Rev. Immunol. 30, 16-34.
- Kunze, Z.M., Portaels, F., Mcfadden, J.J., 2000.** Biologically distinct subtypes of *Mycobacterium avium* differ in possession of insertion sequence IS901. 30, 2366-2372.
- Kurade, N.P., Tripathi, B.N., Rajukumar, K., Parihar, N.S., 2004.** Sequential development of histologic lesions and their relationship with bacterial isolation, fecal shedding, and

- immune responses during progressive stages of experimental infection of lambs with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Vet. Pathol.* 41, 378-387.
- Ladero-Auñón, I.,** Molina, E., Holder, A., Kolakowski, J., Harris, H., Urkitza, A., Anguita, J., Werling, D., Elguezabal, N., 2021a. Bovine neutrophils release extracellular traps and cooperate with macrophages in *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* clearance *in vitro*. *Front. Immunol.* 12, 645304.
- Ladero-Auñón, I.,** Molina, E., Oyanguren, M., Barriales, D., Fuertes, M., Sevilla, I.A., Luo, L., Arrazuria, R., De Buck, J., Anguita, J., Elguezabal, N., 2021b. Oral vaccination stimulates neutrophil functionality and exerts protection in a *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection model. *NPJ Vaccines.* 6, 102.
- Lambeth, C.,** Reddacliff, L.A., Windsor, P., Abbott, K.A., McGregor, H., Whittington, R.J., 2004. Intrauterine and transmammary transmission of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in sheep. *Aust. Vet. J.* 82, 504-508.
- Lambert, P.H.,** Hawkrigde, T., Hanekom, W.A., 2009. New vaccines against tuberculosis. *Clin. Chest. Med.* 30, 811-826.
- Lamont, E.A.,** Talaat, A.M., Coussens, P.M., Bannantine, J.P., Grohn, Y.T., Katani, R., Li, L.L., Kapur, V., Sreevatsan, S., 2014. Screening of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* mutants for attenuation in a bovine monocyte-derived macrophage model. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 4, 87.
- Larsen, A.B.,** Merkal, R.S., Cutlip, R.C., 1975. Age of cattle as related to resistance to infection with *Mycobacterium paratuberculosis*. *Am. J. Vet. Res.* 36, 255-257.
- LeBien, T.W., Tedder, T.F.,** 2008. B lymphocytes: how they develop and function. *Blood.* 112, 1570-1580.
- Lee, H.,** Stabel, J.R., Kehrli, M.E. Jr., 2001. Cytokine gene expression in ileal tissues of cattle infected with *Mycobacterium paratuberculosis*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 82, 73-85.
- Lehrer, R.I., Ganz, T.,** 1999. Antimicrobial peptides in mammalian and insect host defence. *Curr. Opin. Immunol.* 11, 23-27.
- Li, X.,** Xing, R., Xu, C., Liu, S., Qin, Y., Li, K., Yu, H., Li, P., 2021. Immunostimulatory effect of chitosan and quaternary chitosan: A review of potential vaccine adjuvants. *Carbohydr. Polym.* 264, 118050.
- Lyons, M.J.,** Yoshimura, T., McMurray, D.N., 2002. *Mycobacterium bovis* BCG vaccination augments interleukin-8 mRNA expression and protein production in guinea pig alveolar macrophages infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Immun.* 70, 5471-5478.

- Lippolis, J.D., Reinhardt, T.A., Goff, J.P., Horst, R.L., 2006.** Neutrophil extracellular trap formation by bovine neutrophils is not inhibited by milk. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 113, 248-255.
- Liu, X., Feng, Z., Harris, N.B., Cirillo, J.D., Bercovier, H., Barletta, R.G., 2001.** Identification of a secreted superoxide dismutase in *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*. *FEMS. Microbiol. Lett.* 202, 233-238.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001.** Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. *Methods.* 25, 402-408.
- LoBue, P.A., Enarson, D.A., Thoen, C.O., 2010.** Tuberculosis in humans and animals: an overview. *Int. J. Tuberc. Lung. Dis.* 14, 1075–1078.
- López, V., González-Barrio, D., Lima-Barbero, J.F., Ortiz, J.A., Domínguez, L., Juste, R., Garrido, J.M., Sevilla, I.A., Alberdi, P., de la Fuente, J., Gortázar, C., 2016.** Oral administration of heat-inactivated *Mycobacterium bovis* reduces the response of farmed red deer to avian and bovine tuberculin. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 172, 21-25.
- López-Olvera, J.R., Vidal, D., Vicente, J., Pérez, M., Luján, L., Gortázar, C., 2009.** Serological survey of selected infectious diseases in mouflon (*Ovis aries musimon*) from south-central Spain. *Eur. J. Wildl. Res.* 55, 75-79.
- Lopez-Valencia, G., Renteria-Evangelista, T., Williams, J.J., Licea-Navarro, A., De la Mora-Valle, A., Medina-Basulto, G., 2010.** Field evaluation of the protective efficacy of *Mycobacterium bovis* BCG vaccine against bovine tuberculosis. *Res. Vet. Sci.* 88, 44-49.
- Lovell, R., Levi, M., Francis, J., 1944.** Studies on the survival of Johne's bacilli. *J. Comp. Pathol. Ther.* 54, 120-129.
- Lu, Z., Mitchell, R.M., Smith, R.L., Van Kessel, J.S., Chapagain, P.P., Schukken, Y.H., Grohn, Y.T., 2008.** The importance of culling in Johne's disease control. *J. Theor. Biol.* 254, 135-136.
- Lubick, K., Jutila, M.A., 2006.** LTA recognition by bovine T cells involves CD36. *J. Leukoc. Biol.* 79, 1268-1270.
- Luca, S., Mihaescu, T., 2013.** History of BCG vaccine. *Meadica (Buchar).* 8, 53-58.
- Ludwig, L., Egan, R., Baquero, M., Mansz, A., Plattner, B.L., 2019.** WC1⁺ and WC1^{neg} $\gamma\delta$ T lymphocytes in intestinal mucosa of healthy and *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*-infected calves. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 216, 109919.
- Lybeck, K.R., Storset, A.K., Olsen, I., 2009.** Neutralization of interleukin-10 from CD14⁺ monocytes enhance gamma interferon production in peripheral blood mononuclear

- cells from *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*-infected goats. Clin. Vaccine Immunol. 16, 1003-1011.
- Lybeck**, K.R., Storset, A.K., Djønne, B., Valheim, M., Olsen, I., 2011. Faecal shedding detected earlier than immune responses in goats naturally infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. Res. Vet. Sci. 91, 32-39.
- Machackova**, M., Svastova, P., Lamka, J., Parmova, I., Liska, V., Smolik, J., Fischer, O.A., Pavlik, I., 2004. Paratuberculosis in farmed and free-living wild ruminants in the Czech Republic (1999–2001). Vet. Microbiol. 101, 225-234.
- Machugh**, N.D., Mburu, J.K., Carol, M.J., Wyatt, C.R., Orden, J.A., Davis, W.C., 1997. Identification of two distinct subsets of bovine CD4 T cells with unique cell surface. Immunology. 92, 340-345.
- Machugh**, D.E., Taraktoglou, M., Killick, K.E., Nalpas, N.C., Browne, J.A., De Park, S., Hokamp, K., Gormley, E., Magee, D.A., 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.
- Majlessi**, L., Simsova, M., Jarvis, Z., Brodin, P., Rojas, M.J., Bauche, C., Nouzé, C., Ladant, D., Cole, S.T., Sebo, P., Leclerc, C., 2006. An increase in antimycobacterial Th1-cell responses by prime-boost protocols of immunization does not enhance protection against tuberculosis. Infect. Immun. 74, 2128-2137.
- Mallikarjunappa**, S., Brito, L.F., Pant, S.D., Schenkel, F.S., Meade, K.G., Karrow, N.A., 2021. Johne's disease in dairy cattle: an immunogenetic perspective. Front. Vet. Sci. 8, 718987.
- Mangan**, P.R., Harrington, L.E., O'Quinn, D.B., Helms, W.S., Bullard, D.C., Elson, C.O., Hatton, R.D., Wahl, S.M., Schoeb, T.R., Weaver, C.T., 2006. Transforming growth factor- β induces development of the Th17 lineage. Nature. 441, 231-234.
- Manning**, E.J.B., Collins, M.T., 2001. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: pathogen, pathogenesis and diagnosis. Rev. Sci. Tech. 20: 133-150.
- Mantovani**, A., Sica, A., Sozzani, S., Allavena, P., Vecchi, A., Locati, M., 2004. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. Trends Immunol. 25, 677-686.
- Mantovani**, A., Cassatella, M.A., Costantini, C., Jaillon, S., 2011. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. Nat. Rev. Immunol. 11, 519-531.

- Maoz**, H., Polliack, A., Barak, V., Yatziv, S., Biran, S., Giloh, H., Treves, A.J., 1986. Parameters affecting the *in vitro* maturation of human monocytes to macrophages. *Int. J. Cell. Cloning*. 4, 167-185.
- Marco**, I., Ruiz, M., Juste, R., Garrido, J.M., Lavin, S., 2002. Paratuberculosis in free-ranging fallow deer in Spain. *J. Wildl. Dis.* 38, 629-632.
- Marino**, R., Capoferri, R., Panelli, S., Minozzi, G., Strozzi, F., Trevisi, E., Snel, G.G.M., Ajmone-Marsan, P., Williams, J.L., 2017. Johne's disease in cattle: an *in vitro* model to study early response to infection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* using RNA-seq. *Mol. Immunol.* 91, 259-271.
- Maroudam**, V., Mohana, S.B., Praveen, K., Dhinakar, R.G., 2015. Paratuberculosis: diagnostic methods and their constraints. *J. Veterinar. Sci. Technol.* 6, 1000259.
- Martineau**, A.R., Newton, S.M., Wilkinson, K.A., Kampmann, B., Hall, B.M., Nawroly, N., Packe, G.E., Davidson, R.N., Griffiths, C.J., Wilkinson, R.J., 2007. Neutrophil-mediated innate immune resistance to mycobacteria. *J. Clin. Invest.* 117, 1988-1994.
- Marsay**, L., Matsumiya, M., Tanner, R., Poyntz, H., Griffiths, K.L., Stylianou, E., Marsh, P.D., Williams, A., Sharpe, S., Fletcher, H., McShane, H., 2013. Mycobacterial growth inhibition in murine splenocytes as a surrogate for protection against *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tb*). *Tuberculosis.* 93, 551-557.
- Martin**, C., Aguilo, N., Gonzalo-Asensio, J., 2018. Vaccination against tuberculosis. *Enferm. Infec. Microbiol. Clin.* 3, 648-656.
- McClean**, C.M., **Tobin**, D.M., 2016. Macrophage form, function, and phenotype in mycobacterial infection: lessons from tuberculosis and other diseases. *Pathog. Dis.* 74, ftw068.
- McGregor**, H., Dhand, N.K., Dhungyel, O.P., Whittington, R.J., 2012. Transmission of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: dose-response and age-based susceptibility in a sheep model. *Prev. Vet. Med.* 107, 76-84.
- Meadus**, W.J., Gill, C.O., Duff, P., Badoni, M., Saucier, L., 2008. Prevalence on beef carcasses of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* DNA. *Int. J. Food. Microbiol.* 124, 291-294.
- Medzhitov**, R., **Janeway**, C.A. Jr., 1997. Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell.* 91, 295-298.
- Mercier**, P., Brémaud, I., Gautier, M.P., 2014. Vaccination of kids under one month of age with a killed vaccine and reduction in the frequency of faecal shedding of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Small Rumin. Res.* 121, 425-433.

- Merkal, R.S., Curran, B.J.**, 1974. Growth and metabolic characteristics of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Appl. Microbiol.* 28, 276-279.
- Merkal, R., Larsen, A., Booth, G.**, 1975. Analysis of the effect of inapparent bovine paratuberculosis. *Am. J. Vet. Res.* 36, 837-838.
- Metzler, K.D., Fuchs, T.A., Nauseef, W.M., Reumaux, D., Roesler, J., Schulze, I., Wahn, V., Papayannopoulos, V., Zychlinsky, A.**, 2011. Myeloperoxidase is required for neutrophil extracellular trap formation: implications for innate immunity. *Blood.* 117, 953-959.
- Miller, D.S., Collins, M.T., Smith, B.B., Anderson, P.R., Kramsky, J., Wilder, G., Hope, A.**, 2000. Specificity of four serologic assays for *Mycobacterium avium* ss *paratuberculosis* in llamas and alpacas: a single herd study. *J. Vet. Diagn. Invest.* 12, 345-353.
- Mills, C.D., Kincaid, K., Alt, J.M., Heilman, M.J., Hill, A.M.**, 2000. M-1/M-2 Macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *J. Immunol.* 164, 6166-6173.
- Minor, P.D.**, 2015. Live attenuated vaccines: Historical successes and current challenges. *Virology.* 479-480, 379-392.
- Miranda, C., Matos, M., Pires, I., Ribeiro, P., Álvares, S., Vieira-Pinto, M., Coelho, A.C.**, 2011. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in slaughtered domestic pigs for consumption detected by molecular methods. *Int. Food. Res. J.* 44, 3276-3277.
- Mitchell, R.M., Gollnick, N.S., Sreevatsan, S., Russell, D.G., Schukken, Y.H.**, 2011. Quantification of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) survival in monocyte-derived macrophages. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 139, 73-78.
- Mittrücker, H.W., Steinhoff, U., Köhler, A., Krause, M., Lazar, D., Mex, P., Miekley, D., Kaufmann, S.H.E.**, 2007. Poor correlation between BCG vaccination-induced T cell responses and protection against tuberculosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 12434-12439.
- Molina, J., Anguiano, A., Ferrer, O.**, 1996. Study on immune response of goats vaccinated with a live strain of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 19, 9-15.
- Momotani, E., Whipple, D.L., Thiermann, A.B., Cheville, N.F.**, 1988. Role of M cells and macrophages in the entrance of *Mycobacterium paratuberculosis* into domes of ileal Peyer's Patches in calves. *Vet. Pathol.* 25, 131-137.
- Moorlag, S.J.C.F.M., Rodriguez-Rosales, Y.A., Gillard, J., Fanucchi, S., Theunissen, K., Novakovic, B., de Bont, C.M., Negishi, Y., Fok, E.T., Kalafati, L., Verginis, P.**,

- Mourits, V.P., Koeken, V.A.C.M., de Bree, L.C.J., Pruijn, G.J.M., Fenwick, C., van Crevel, R., Joosten, L.A.B., Joosten, I., Koenen, H., Mhlanga, M.M., Diavatopoulos, D.A., Chavakis, T., Netea, M.G., 2020. BCG vaccination induces long-term functional reprogramming of human neutrophils. *Cell Rep.* 33, 108387.
- Mortier**, R.A., Barkema, H.W., Orsel, K., Wolf, R., De Buck, J., 2014a. Shedding patterns of dairy calves experimentally infected with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Vet. Res.* 45, 71.
- Mortier**, R.A.R., Barkema, H.W., Wilson, T.A., Sajobi, T.T., Wolf, R., De Buck, J., 2014b. Dose-dependent interferon-gamma release in dairy calves experimentally infected with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 161, 205–10
- Mosmann**, T.R., **Coffman**, R.L., 1989. TH1 and TH2 cells: Different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu. Rev. Immunol.* 7, 145-173.
- Mosser**, D.M., **Edwards**, J.P., 2008. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 958-969.
- Motiwala**, A.S., Amonsin, A., Strother, M., Manning, E.J.B., Kapur, V., Sreevatsan, S., 2004. Molecular epidemiology of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolates recovered from wild animal species. *J. Clin. Microbiol.* 42, 1703-1712.
- Mucha**, R., Bhide, M.R., Chakurkar, E.B., 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, 381-388.
- Mulder**, K., **Colditz**, I.G., 1993. Migratory responses of ovine neutrophils to inflammatory mediators *in vitro* and *in vivo*. *J. Leukoc. Biol.* 53, 273-278.
- Muñoz**, M., García Marín, J.F., García-Pariente, C., Reyes, L.E., Verna, A., Moreno, O., Fuertes, M., Doce, J., Puente, E., Garrido, J., Pérez, V., 2005. Efficacy of a killed vaccine (Silirum®) in calves challenged with *Map*. Proceedings of the 8th International Colloquium on Paratuberculosis. Copenhagen, Denmark, pp. 208-217.
- Muñoz**, M., Delgado, L., Verna, A., Benavides, J., García-Pariente, C., Fuertes, M., Ferreras, M.C., García-Marín, J.F., Pérez, V., 2009. Expression of transforming growth factor-beta 1 (TGF-β1) in different types of granulomatous lesions in bovine and ovine paratuberculosis. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 32, 239-352.
- Muñoz**, M., 2014. Eficacia de una vacuna inactivada frente a la paratuberculosis bovina en un modelo experimental de terneros y su influencia en la patogenia de la enfermedad. Tesis Doctoral. Universidad de León. Facultad de Veterinaria.

- Muñoz-Caro**, T., Hermosilla, C., Silva, L.M.R., Cortes, H., Taubert, A., Mun, T., 2014. Neutrophil extracellular traps as innate immune reaction against the emerging apicomplexan parasite *Besnoitia besnoiti*. *PLoS One*. 9, e91415.
- Murphy**, J.T., Sommer, S., Kabara, E.A., Verman, N., Kuelbs, M.A., Saama, P., Halgren, R., Coussens, P.M., 2006. Gene expression profiling of monocyte-derived macrophages following infection with *Mycobacterium avium* subspecies *avium* and *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Physiol. Genomics*. 28, 67-75.
- Muskens**, J., van Zijderveld, F., Eger, A., Bakker, D., 2002. Evaluation of the long-term immune response in cattle after vaccination against paratuberculosis in two Dutch dairy herds. *Vet. Microbiol.* 86, 269-278.
- Muskens**, J., Elbers, A.R.W., van Weering, H.J., Noordhuizen, J.P.T.M., 2003. Herd management practices associated with paratuberculosis seroprevalence in Dutch dairy herds. *J. Vet. Med. Ser. B*. 50, 372-377.
- Nagata**, R., Muneta, Y., Yoshihara, K., Yokomizo, Y., Mori, Y., 2005. Expression cloning of gamma interferon-inducing antigens of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Infect. Immun.* 73, 3778-3782.
- Nakazawa**, D., Shida, H., Kusunoki, Y., Miyoshi, A., Nishio, S., Tomaru, U., Atsumi, T., Ishizu, A., 2016. The responses of macrophages in interaction with neutrophils that undergo NETosis. *J. Autoimmun.* 67, 19-28.
- Nalubamba**, K., Smeed, J., Gossner, A., Watkins, C., Dalziel, R., Hopkins, J., 2008. Differential expression of pattern recognition receptors in the three pathological forms of sheep paratuberculosis. *Microbes. Infect.* 10, 598-604.
- Naser**, S.A., Ghobrial, G., Romero, C., Valentine, J.F., 2004. Culture of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* from the blood of patients with Crohn's disease. *Lancet*. 364, 1039-1044.
- Nedrow**, A.J., Gavalchin, J., Smith, M.C., Stehman, S.M., Maul, J.K., McDonough, S.P., Thonney, M.L., 2007. Antibody and skin-test responses of sheep vaccinated against Johne's disease. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 116, 109-112.
- Netea**, M.G., Quintin, J., van der Meer, J.W.M., 2011. Trained immunity: a memory for innate host defense. *Cell. Host. Microbe*. 9, 355-361.
- Netea**, M.G., 2013. Training innate immunity: the changing concept of immunological memory in innate host defence. *Eur. J. Clin. Invest.* 43, 881-884.
- Nielsen**, M.C., Andersen, M.N., Møller, H.J., 2020. Monocyte isolation techniques significantly impact the phenotype of both isolated monocytes and derived macrophages *in vitro*. *Immunology*. 159, 63-74.

- Nielsen, S.S., Toft, N.**, 2008. Ante mortem diagnosis of paratuberculosis: A review of accuracies of ELISA, interferon- γ assay and faecal culture techniques. *Vet. Microbiol.* 129, 217-235.
- Nielsen, S.S., Toft, N.**, 2009. A review of prevalences of paratuberculosis in farmed animals in Europe. *Prev. Vet. Med.* 88, 1-14.
- Notario, A., Moro, J., Fuentes, O., Castresana, L., Respaldiza, E., Ionescu, O., Nahlik, A.**, 2010. Comparative bacteriological study of two wild boar populations in Sierra Morena (Jaén, Spain). *Not. Sci. Biol.* 2, 18-23.
- Nugent, G., Yockney, I.J., Whitford, J., Aldwell, F.E., Buddle, B.M.**, 2017. Efficacy of oral BCG vaccination in protecting free-ranging cattle from natural infection by *Mycobacterium bovis*. *Vet. Microbiol.* 208, 181-189.
- O'Garra, A., Murphy, K.**, 1994. Role of cytokines in determining T-lymphocyte function. *Curr. Opin. Immunol.* 6, 458-466.
- Olivier, M., Berthon, P., Chastang, J., Cordier, G., Lantier, F.**, 2001. Establishment and characterization of ovine blood monocyte-derived cell lines. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 82, 139-151.
- Olsen, I., Sigurdardóttir, Ó.G., Djønne, B.**, 2002. Paratuberculosis with special reference to cattle. A review. *Vet. Q.* 24, 12-28.
- Orme, I.M., McMurray, D.N., Belisle, J.T.**, 2001. Tuberculosis vaccine development: recent progress. *Trends Microbiol.* 9, 115-118.
- Over, K., Crandall, P.G., O'Bryan, C.A., Ricke, S.C.**, 2011. Current perspectives on *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, Johne's disease, and Crohn's disease: a review. *Crit. Rev. Microbiol.* 37, 141-156.
- Paliwal, O., Kumar, R., Somvanshi, R.**, 1986. Immune spectrum of *Mycobacterium johnei* infections in goats. *Indian. Vet. J.* 62, 743-747.
- Palmer, M.V., Stoffregen, W.C., Carpenter, J.G., Stabel, J.R.**, 2005. Isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (*Map*) from feral cats on a dairy farm with *Map*-infected cattle. *J. Wildl. Dis.* 41, 629-635.
- Paltrinieri, S., Panelli, S., Sartorelli, P.**, 2000. Characteristics of the response of ovine granulocytes (PMNs) to Zymosan-Activated Serum (ZAS) and to recombinant human interleukin-8 (IL-8). *J. Vet. Med. A.* 47, 421-430.
- Park, S.U., Kathaperumal, K., McDonough, S., Akey, B., Huntley, J., Bannantine, J.P., Chang, Y.F.**, 2008. Immunization with a DNA vaccine cocktail induces a Th1 response and protects mice against *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* challenge. *Vaccine.* 26, 4329-4337.

- Park, H.E., Park, H.T., Jung, Y.H., Yoo, H.S., 2018.** Gene expression profiles of immune-regulatory genes in whole blood of cattle with a subclinical infection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *PLoS One*. 13, e196502.
- Parlane, N.A., Buddle, B.M., 2015.** Immunity and vaccination against tuberculosis in cattle. *Curr. Clin. Microbiol. Rept.* 2, 44-53.
- Parra, M., Yang, A.L., Lim, J.H., Kolibab, K., Derrick, S., Cadieux, N., Perera, L.P., Jacobs, W.R., Brennan, M., Morris, S.L., 2009.** Development of a murine mycobacterial growth inhibition assay for evaluating vaccines against *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin. Vaccine Immunol.* 16, 1025-1032.
- Parrish, N.M., Radcliff, R.P., Brey, B.J., Anderson, J.L., Clark, D.L., Koziczowski, J.J., Ko, C.G., Goldberg, N.D., Brinker, D.A., Carlson, R.A., Dick, J.D., Ellingson, J.L.E., 2009.** Absence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Crohn's patients. *Inflamm. Bowel. Dis.* 15, 558-565.
- Patel, D., Danelishvili, L., Yamazaki, Y., Alonso, 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.
- Patterson, S., Bond, K., Green, M., van Winden, S., Guitian, J., 2020.** *Mycobacterium avium paratuberculosis* infection of calves- The impact of dam infection status. *Prev. Vet. Med.* 181, 104634.
- Patton, E.A., 2011.** Paratuberculosis Vaccination. *Vet. Clin. Food. Anim.* 27, 573-580.
- 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, 155-167.
- Pavlik, I., Bartl, J., Dvorska, L., Svastova, P., du Maine, R., Machackova, M., Yayo, Ayele, W., Horvathova, A., 2000.** Epidemiology of paratuberculosis in wild ruminants studied by restriction fragment length polymorphism in the Czech Republic during the period 1995-1998. *Vet. Microbiol.* 77, 231-251.
- Payne, J.M., Rankin, J.D., 1961.** A comparison of the pathogenesis of experimental Johne's disease in calves and cows. *Res. Vet. Sci.* 2, 175.
- Pedrosa, J., Saunders, B.M., Appelberg, R., Orme, I.M., Silva, M.T., Cooper, A.M., 2000.** Neutrophils play a protective nonphagocytic role in systemic *Mycobacterium tuberculosis* infection of mice. *Infect. Immun.* 68, 577-583.

- Pepponi, I.,** Khatri, B., Tanner, R., Villarreal-Ramos, B., Vordermeier, M., McShane, H., 2017. A mycobacterial growth inhibition assay (MGIA) for bovine TB vaccine development. *Tuberculosis*. 106, 118-122.
- Pérez de Val, B.,** Villarreal-Ramos, B., Nofrarías, M., López-Soria, S., Romera, N., Singh, M., Abad, F.X., Xing, Z., Vordermeier, H.M., Domingo, M., 2012a. Goats primed with *Mycobacterium bovis* BCG and boosted with a recombinant adenovirus expressing Ag85A show enhanced protection against tuberculosis. *Clin. Vaccine. Immunol.* 19, 1339-1347.
- Pérez de Val, B.,** Nofrarías, M., López-soria, S., Garrido, J.M., Vordermeier, H.M., Villarreal-ramos, B., Martín, M., Puentes, E., Juste, R.A., Domingo, M., 2012b. Effects of vaccination against paratuberculosis on tuberculosis in goats: diagnostic interferences and cross-protection. *BMC Vet. Res.* 8, 191.
- Pérez de Val, B.,** Vidal, E., Villarreal-Ramos, B., Gilbert, S.C., Andaluz, A., Moll, X., Martín, M., Nofrarías, M., McShane, H., Vordermeier, H.M., Domingo, M., 2013. A multi-antigenic adenoviral-vectored vaccine improves BCG-induced protection of goats against pulmonary tuberculosis infection and prevents disease progression. *PLoS One.* 8, e081317.
- Pérez de Val, B.,** Vidal, E., López-Soria, S., Marco, A., Cervera, Z., Martín, M., Mercader, I., Singh, M., Raeber, A., Domingo, M., 2016. Assessment of safety and interferon gamma responses of *Mycobacterium bovis* BCG vaccine in goat kids and milking goats. *Vaccine.* 34, 881-886.
- Pérez, V.,** García Marin, J.F.G., Badiola, J.J., 1996. Description and classification of different types of lesion associated with natural paratuberculosis infection in sheep. *J. Comp. Pathol.* 114, 107-122.
- Pérez, V.,** Tellechea, J., Badiola, J.J., Gutiérrez, M., García-Marín, J., 1997. Relation between serologic response and pathologic findings in sheep with naturally acquired paratuberculosis. *Am. J. Vet. Res.* 58, 799-803.
- Pérez, V.,** Tellechea, J., Corpa, J., García-Marin, J.F., 1999. Relation between pathologic findings and cellular immune response in sheep with naturally acquired paratuberculosis. *Am. J. Vet. Res.* 60, 123-127.
- Pérez, V.,** Corpa, J., García-Marín, J.F., 2000. El cuadro clínico y lesional de la paratuberculosis bovina. *BOVIS. Aula. Vet.* 93, 39-47.
- Periasamy, S.,** Tripathi, B.N., Singh, N., 2013. Mechanisms of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* induced apoptosis and necrosis in bovine macrophages. *Vet. Microbiol.* 165, 392-401.

- Pesciaroli, M., Alvarez, J., Boniotti, M.B., Cagiola, M., Di Marco, V., Marianelli, C., Pacciarini, M., Pasquali, P., 2014.** Tuberculosis in domestic animal species. *Res. Vet. Sci.* 97, S78-S85.
- Peterson, K., Koets, A., Rutten, V.P.M.G., Colenbrander, B., Houwers, D.J., 2006.** Flowcytometric assessment of circulating peripheral blood monocytes in small ruminants. *Small Rumin. Res.* 65, 136-141.
- Petretto, A., Bruschi, M., Pratesi, F., Croia, C., Candiano, G., Ghiggeri, G., Migliorini, P., 2019.** Neutrophil extracellular traps (NET) induced by different stimuli: A comparative proteomic analysis. *PLoS One.* 14, e0218946.
- Petrofsky, M., Bermudez, L.E., 1999.** Neutrophils from *Mycobacterium avium*-infected mice produce TNF- α , IL-12 and IL-1 β and have a putative role in early host response. *Clin. Immunol.* 91, 354-358.
- Pilszczek, F.H., Salina, D., Poon, K.K.H., Fahey, C., Yipp, B.G., Sibley, C.D., Robbins, S.M., Green, F.H.Y., Surette, M.G., Sugai, M., Bowden, M.G., Hussain, M., Zhang, K., Kubes, P., 2010.** A novel mechanism of rapid nuclear neutrophil extracellular trap formation in response to *Staphylococcus aureus*. *J. Immunol.* 185: 7413-7425.
- Plain, K.M., Marsh, I.B., Waldron, A.M., Galea, F., Whittington, A.M., Saunders, V.F., Begg, D.J., de Silva, K., Purdie, A.C., Whittington, R.J., 2014.** High-throughput direct fecal PCR assay for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in sheep and cattle. *J. Clin. Microbiol.* 52, 745-757.
- Platt, R., Roth, J.A., Royer, R.L., Thoen, C.O., 2006.** Monitoring responses by use of five-color flow cytometry in subsets of peripheral T cells obtained from cattle inoculated with a killed *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* vaccine. *Am. J. Vet. Res.* 67, 2050-2058.
- Plattner, B.L., Chiang, Y.W., Roth, J.A., Platt, R., Huffman, E., Zylstra, J., Hostetter, J.M., 2011.** Direct inoculation of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* into ileocecal Peyer's patches results in colonization of the intestine in a calf model. *Vet. Pathol.* 48, 584-592.
- Pollock, J.M., McNair, J., Welsh, M.D., Girvin, R.M., Kennedy, H.E., Mackie, D.P., Neill, S.D., 2001.** Immune response in bovine tuberculosis. *Tuberculosis.* 81, 103-107.
- Pomeroy, B., Sipka, A., Klaessig, S., Schukken, Y., 2016.** Longitudinal characterization of bovine monocyte-derived dendritic cells from mid-gestation into subsequent lactation reveals nadir in phenotypic maturation and macrophage-like cytokine profile in late gestation. *J. Reprod. Immunol.* 118, 1-8.

- Ponnusamy, D.,** Periasamy, S., Tripathi, B.N., Pal, A., 2013. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* invades through M cells and enterocytes across ileal and jejunal mucosa of lambs. *Res. Vet. Sci.* 94, 306-312.
- Pooley, H.B.,** de Silva, K., Purdie, A.C., Begg, D.J., Whittington, R.J., Plain, K.M., 2016. A rapid method for quantifying viable *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in cellular infection assays. *Appl. Environ. Microbiol.* 82, 5553-5562.
- Pooley, H.B.,** Plain, K.M., Purdie, A.C., Begg, D.J., Whittington, R.J., de Silva, K., 2018. Integrated vaccine screening system: Using cellular functional capacity *in vitro* to assess genuine vaccine protectiveness in ruminants. *Pathog. Dis.* 76, fty029.
- Pooley, H.B.,** Begg, D.J., Plain, K.M., Whittington, R.J., Purdie, A.C., de Silva, K., 2019. The humoral immune response is essential for successful vaccine protection against paratuberculosis in sheep. *BMC. Vet. Res.* 15, 223.
- Pott, J.,** Basler, T., Duerr, C.U., Rohde, M., Goethe, R., Hornef, M.W., 2009. Internalization-dependent recognition of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* by intestinal epithelial cells. *Cell. Microbiol.* 11, 1802-1815.
- Pulendran, B.,** Ahmed, R., 2011. Immunological mechanisms of vaccination. *Nat. Immunol.* 12, 509-517.
- Quintín, J.,** Cheng, S.C., van der Meer, J.W.M., Netea, M.G., 2014. Innate immune memory: towards a better understanding of host defense mechanisms. *Curr. Opin. Immunol.* 29, 1-7.
- Radloff, J.,** Heyckendorf, J., van der Merwe, L., Carballo, P.S., Reiling, N., Richter, E., Lange, C., Kalsdorf, B., 2018. *Mycobacterium* growth inhibition assay of human alveolar macrophages as a correlate of immune protection following *Mycobacterium bovis* Bacille Calmette-Guérin vaccination. *Front. Immunol.* 9, 1708.
- Ramos-Kichik, V.,** Mondragón-Flores, R., Mondragón-Castelán, M., Gonzalez-Pozos, S., Muñoz-Hernandez, S., Rojas-Espinosa, O., Chacón-Salinas, R., Estrada-Parra, S., Estrada-García, I., 2009. Neutrophil extracellular traps are induced by *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis.* 89, 29-37.
- Rasmussen, P.,** Barkema, H.W., Mason, S., Beaulieu, E., Hall, D.C., 2021. Economic losses due to Johne's disease (paratuberculosis) in dairy cattle. *J. Dairy. Sci.* 104, 3123-3143.
- Rathnaiah, G.,** Zinniel, D.K., Bannantine, J.P., Stabel, J.R., Gröhn, Y.T., Collins, M.T., Barletta, R.G., 2017. Pathogenesis, molecular genetics, and genomics of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, the etiologic agent of Johne's disease. *Front. Vet. Sci.* 4, 187.

- Reddacliff**, L.A., Beh, K., McGregor, H., Whittington, R.J., 2005. A preliminary study of possible genetic influences on the susceptibility of sheep to Johne's disease. *Aust. Vet. J.* 83, 435-441.
- Reddacliff**, L., Eppleston, J., Windsor, P., Whittington, R., Jones, S., 2006. Efficacy of a killed vaccine for the control of paratuberculosis in Australian sheep flocks. *Vet. Microbiol.* 115, 77-90.
- Refai**, A., Gritli, S., Barbouche, M.R., Essafi, M., 2018. *Mycobacterium tuberculosis* virulent factor ESAT-6 drives macrophage differentiation toward the pro-inflammatory M1 phenotype and subsequently switches it to the anti-inflammatory M2 phenotype. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 8, 327.
- Regidor-Cerillo**, J., García-Lunar, P., Pastor-Fernández, I., Álvarez-García, G., Collantes-Fernández, E., Gómez-Bautista, M., Ortega-Mora, L.M., 2015. *Neospora caninum* tachyzoite immunome study reveals differences among three biologically different isolates. *Vet. Parasitol.* 212, 92-99.
- Reviriego**, F., Moreno, M.A., Domínguez, L., 2000. Soil type as a putative risk factor of ovine and caprine paratuberculosis seropositivity in Spain. *Prev. Vet. Med.* 43, 43-51.
- Reyes**, L., 2007. Evaluación de nuevos adyuvantes en la vacunación frente a la paratuberculosis ovina. Tesis Doctoral. Universidad de León, Facultad de Veterinaria.
- Rey-Giraud**, F., Hafner, M., Ries, C.H., 2012. *In vitro* generation of monocyte-derived macrophages under serum-free conditions improves their tumor promoting functions. *PLoS One.* 7, e42656.
- Reyes-García**, R., Pérez-de-la-Lastra, J.M., Vicente, J., Ruiz-Fons, F., Garrido, J.M., Gortázar, C., 2008. Large-scale ELISA testing of Spanish red deer for paratuberculosis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 124, 75-81.
- Reynolds**, J.D., **Morris**, B., 1983. The evolution and involution of Peyer's patches in fetal and postnatal sheep. *Eur. J. Immunol.* 13, 627-635.
- Rice**, J.H., McDaniel, M.M., Holland, A., Eda, S., 2019. Modelling bovine granuloma formation *in vitro* upon infection with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Vet. Sci.* 6, 80.
- Ridge**, S.E., Harkin, J.T., Badman, R.T., Mellor, A.M., Larsen, J.W., 1995. Johne's disease in alpacas (*Lama pacos*) in Australia. *Aust. Vet. J.* 72, 150-153.
- Rindi**, L., **Garzelli**, C., 2014. Genetic diversity and phylogeny of *Mycobacterium avium*. *Infect. Genet. Evol.* 21, 375-383.

- Ritter**, C., Jansen, J., Roth, K., Kastelic, J.P., Adams, C.L., Barkema, H.W., 2016. Dairy farmers' perceptions toward the implementation of on-farm Johne's disease prevention and control strategies. *J. Dairy. Sci.* 99, 1-12.
- Roach**, D.R., Bean, A.G.D., Caroline, D., France, M.P., Briscoe, H., Britton, W.J., 2002. TNF regulates chemokine induction essential for cell recruitment, granuloma formation, and clearance of mycobacterial infection. *J. Immunol.* 168, 4620-4627.
- Robino**, P., Nebbia, P., Tramuta, C., Martinet, M., Ferroglio, E., De Meneghi, D., 2008. Identification of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in wild cervids (*Cervus elaphus hippelaphus* and *Capreolus capreolus*) from Northwestern Italy. *Eur. J. Wildl. Res.* 54, 357-360.
- Rodríguez-Lázaro**, D., D'Agostino, M., Herrewegh, A., Pla, M., Cook, N., Ikonomopoulos, J., 2005. Real-time PCR-based methods for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in water and milk. *Int. J. Food Microbiol.* 101, 93-104.
- Rogall**, T., Wolters, J., Flohr, T., Bottger, E.C., 1990. Towards a phylogeny and definition of species at the molecular level within the genus *Mycobacterium*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 40, 323-330.
- Rosseels**, V., **Huygen**, K., 2008. Vaccination against paratuberculosis. *Expert. Rev. Vaccines.* 7, 817-832.
- Rossi**, G., Nigro, G., Tattoli, I., Vincenzetti, S., Mariani, P., Magi, G.E., Renzoni, G., Taccini, E., Bernardini, M.L., 2009. Adhesion molecules and cytokine profile in ileal tissue of sheep infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Microbes. Infect.* 11, 698-706.
- Rossi**, G., Grohn, Y.T., Schukken, Y.H., Smith, R.L., 2017. The effect of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* infection on clinical mastitis occurrence in dairy cows. *J. Dairy. Sci.* 100, 7446-7454.
- Rossiter**, C.A., **Burhans**, W.S., 1996. Farm-specific approach to paratuberculosis (Johne's disease) control. *Vet. Clin. North. Am. Food. Anim. Pract.* 12, 383-415.
- Rossjohn**, J., Gras, S., Miles, J.J., Turner, S.J., Godfrey, D.I., McCluskey, J., 2015. T cell antigen receptor recognition of antigen-presenting molecules. *Annu. Rev. Immunol.* 33, 169-200.
- Roupie**, V., Leroy, B., Rosseels, V., Piersoel, V., Noël-Georis, I., Romano, M., Govaerts, M., Letesson, J.J., Wattiez, R., Huygen, K., 2008. Immunogenicity and protective efficacy of DNA vaccines encoding MAP0586c and MAP4308c of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* secretome. *Vaccine.* 26, 4783-4794.

- Roussey, J.A., Steibel, J.P., Coussens, P.M., 2014.** Regulatory T cell activity and signs of T cell unresponsiveness in bovine paratuberculosis. *Front. Vet. Sci.* 1, 20.
- Roussey, J.A., Oliveira, L.J., Langohr, I.M., Sledge, D.G., Coussens, P.M., 2016.** Regulatory T cells and immune profiling in Johne's disease lesions. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 181, 39-50.
- Roy, Á., Infantes-Lorenzo, J.A., Blázquez, J.C., Venteo, Á., Mayoral, F.J., Domínguez, M., Moreno, I., Romero, B., de Juan, L., Grau, A., Domínguez, L., Bezos, J., 2018a.** Temporal analysis of the interference caused by paratuberculosis vaccination on the tuberculosis diagnostic tests in goats. *Prev. Vet. Med.* 156, 68-75.
- Roy, Á., Risalde, M.A., Bezos, J., Casal, C., Romero, B., Sevilla, I., Díez-Guerrier, A., Rodríguez-Bertos, A., Domínguez, M., Garrido, J., Gortázar, C., Domínguez, L., 2018b.** Response of goats to intramuscular vaccination with heat-killed *Mycobacterium bovis* and natural challenge. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 60, 28-34.
- Royo, M., Fuertes, M., Fernández, M., Castaño, P., Ferreras, M.C., Benavides, J., Pérez, V., 2016.** Effects of vaccination against paratuberculosis in a goat dairy flock: a two years follow-up. *Proceedings of the 13th International Colloquium on Paratuberculosis.* Nantes, Francia, P-05.6.
- Royo, M., 2018.** Efecto de la vacunación frente a la paratuberculosis caprina sobre la respuesta inmunitaria y la patogenia de la enfermedad. Tesis Doctoral. Universidad de León. Facultad de Veterinaria.
- Rusek, P., Wala, M., Druszczyńska, M., Fol, M., 2018.** Infectious agents as stimuli of trained innate immunity. *Int. J. Mol. Sci.* 19, 456.
- Ryffel, B., Fremond, C., Jacobs, M., Parida, S., Botha, T., Schnyder, B., Quesniaux, V., 2005.** Innate immunity to mycobacterial infection in mice: Critical role for toll-like receptors. *Tuberculosis.* 85, 395-405.
- Salgado, M., Monti, G., Sevilla, I., Manning, E., 2014.** Association between cattle herd *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) infection and infection of a hare population. *Trop. Anim. Health. Prod.* 46, 1313-1316.
- Sanderson, J.D., Moss, M.T., Tizard, M.L.V., Hermon-Taylor, J., 1992.** *Mycobacterium paratuberculosis* DNA in Crohn's disease tissue. *Gut.* 33, 890-896.
- Sangari, F.J., Parker, A., Bermudez, L., 1999.** *Mycobacterium avium* interaction with macrophages and intestinal epithelial cells. *Front. Biosci.* 4, D582-588.

- Sangari**, F.J., Goodman, J., Petrofsky, M., Kolonoski, P., Bermudez, L.E., 2001. *Mycobacterium avium* invades the intestinal mucosa primarily by interacting with enterocytes. *Infect. Immun.* 69, 1515-1520.
- Saraiva**, M., O'Garra, A., 2010. The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nat. Rev. Immunol.* 10, 170-181.
- Sartorelli**, P., Paltrinieri, S., Agnes, F., 1999. Non-specific immunity and ketone bodies. I: *In vitro* studies on chemotaxis and phagocytosis in ovine neutrophils. *Zentralbl. Veterinarmed. A.* 46, 613-619.
- Saunders**, B.M., Cooper, A.M., 2000. Restraining mycobacteria: role of granulomas in mycobacterial infections. *Immunol. Cell. Biol.* 78, 334-341.
- Saxegaard**, F., Baess, I., Jantzen, E., 1988. Characterization of clinical isolates of *Mycobacterium paratuberculosis* by DNA-DNA hybridization and cellular fatty acid analysis. *APMIS.* 96, 497-502.
- Scandurra**, G.M., de Lisle, G.W., Cavaignac, S.M., Young, M., Kawakami, R.P., Collins, D.M., 2010. Assessment of live candidate vaccines for paratuberculosis in animal models and macrophages. *Infect. Immun.* 78, 1383-1389.
- Schulz**, S.M., Köhler, G., Schütze, N., Knauer, J., Straubinger, R.K., Chackerian, A.A., Witte, E., Wolk, K., Sabat, R., Iwakura, Y., Holscher, C., Müller, U., Kastelein, R.A., Alber, G., 2008. Protective immunity to systemic infection with attenuated *Salmonella enterica* serovar enteritidis in the absence of IL-12 is associated with IL-23-dependent IL-22, but not IL-17. *J. Immunol.* 181, 7891-7901.
- Sechi**, L.A., Mara, L., Cappai, P., Frothingam, 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* subspecies *paratuberculosis* infection. *Vaccine.* 24, 229-235.
- Secott**, T.E., Lin, T.L., Wu, C.C., 2001. Fibronectin attachment protein homologue mediates fibronectin binding by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Infect. Immun.* 69, 2075-2082.
- Secott**, T.E., Lin, T.L., Wu, C.C., 2002. Fibronectin attachment protein is necessary for efficient attachment and invasion of epithelial cells by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Infect. Immun.* 70, 2670-2675.
- Secott**, T.E., Lin, T.L., Wu, C.C., 2004. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* fibronectin attachment protein facilitates M-cell targeting and invasion through a fibronectin bridge with host integrins. *Infect. Immun.* 72, 3724-3732.
- Segal**, A.W., 2005. How neutrophils kill microbes. *Annu. Rev. Immunol.* 23, 197-233.

- Seiler**, P., Aichele, P., Raupach, B., Odermatt, B., Steinhoff, U., Kaufmann, S.H.E., 2000. Rapid neutrophil response controls fast-replicating intracellular bacteria but not slow-replicating *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Infect. Dis.* 181, 671-680.
- Serbina**, N.V., Lazarevic, V., Flynn, J.L., 2001. CD4⁺ T cells are required for the development of cytotoxic CD8⁺ T cells during *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J. Immunol.* 167, 6991-7000.
- Serrano**, M., Elguezal, N., Sevilla, I.A., Geijo, M.V., Molina, E., Arrazuria, R., Urkitza, A., Jones, G.J., Vordermeier, M., Garrido, J.M., Juste, R.A., 2017a. Tuberculosis detection in paratuberculosis vaccinated calves: new alternatives against interference. *PLoS One.* 12, e0169735.
- Serrano**, M., Elguezal, N., Sevilla, I.A., Geijo, M.V., Molina, E., Juste, R.A., Garrido, J.M., 2017b. Preliminary results indicate that inactivated vaccine against paratuberculosis could modify the course of experimental *Mycobacterium bovis* infection in calves. *Front. Vet. Sci.* 4, 175.
- Sevilla**, I.A., Garrido, J.M., Molina, E., Geijo, M.V., Elguezal, N., Vázquez, P., Juste, R.A., 2014. Development and evaluation of a novel multicopy-element-targeting triplex PCR for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in feces. *Appl. Environ. Microbiol.* 80, 3757-3768.
- Shaughnessy**, L.J., Smith, L.A., Evans, J., Anderson, D., Caldow, G., Marion, G., Low, J.C., Hutchings, M.R., 2013. High prevalence of paratuberculosis in rabbits is associated with difficulties in controlling the disease in cattle. *Vet. J.* 198, 267-270.
- Shen**, H., **Chen**, Z.W., 2018. The crucial roles of Th17-related cytokines/signal pathways in *M. tuberculosis* infection. *Cell. Mol. Immunol.* 15, 216-225.
- Shin**, S.J., Chang, C.F., Chang, C.D., McDonough, S.P., Thompson, B., Yoo, H.S., Chang, Y.F., 2005. *In vitro* cellular immune responses to recombinant antigens of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Infect. Immun.* 73, 5074-5085.
- Shin**, G.A., Lee, J.K., Freeman, R., Cangelosi, G.A., 2008. Inactivation of *Mycobacterium avium* complex by UV irradiation. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 7067-7069.
- Shippy**, D.C., Lemke, J.J., Berry, A., Nelson, K., Hines, M.E. 2nd., Talaat, A.M., 2017. Superior protection from live- attenuated vaccines directed against Johne's disease. *Clin. Vaccine. Immunol.* 24, e00478.
- Shokri**, M., Roohvand, F., Alimohammadian, M.H., Ebrahimirad, M., Ajdary, S., 2016. Comparing Montanide ISA 720 and 50-V2 adjuvants formulated with LmSTI1 protein of *Leishmania major* indicated the potential cytokine patterns for induction of protective immune responses in BALB/c mice. *Mol. Immunol.* 76, 108-115.

- Sibley**, J.A., Woodbury, M.R., Appleyard, G.D., Elkin, B., 2007. *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in Bison (*Bison bison*) from Northern Canada. *J. Wildl. Dis.* 43, 775-779.
- Siemsen**, D.W., Malachowa, N., Schepetkin, I.A., Whitney, A.R., Kirpotina, L.N., Lei, B., Deleo, F.R., Quinn, M.T., 2014. Neutrophil isolation from nonhuman species. *Methods Mol. Biol.* 1124, 19-37.
- Sigurdardóttir**, Ó.G., Press, C.M., Saxegaard, F., Evensen, Ø., 1999. Bacterial isolation, immunological response, and histopathological lesions during the early subclinical phase of experimental infection of goat kids with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Vet. Pathol.* 36, 542-550.
- Sigurdardóttir**, O.G., Valheim, M., Press, C.M., 2004. Establishment of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in the intestine of ruminants. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 56, 819-834.
- Silva**, M.T., Silva, M.N.T., Appelberg, R., 1989. Neutrophil-macrophage cooperation in the host defence against mycobacterial infections. *Microb. Pathog.* 6, 369-380.
- Silva**, L.M.R., Muñoz Caro, T., Gerstberger, R., Vila-Viçosa, M.J.M., Cortes, H.C.E., Hermosilla, C., Taubert, A., 2014. The apicomplexan parasite *Eimeria arloingi* induces caprine neutrophil extracellular traps. *Parasitol. Res.* 113, 2797-2807.
- Simonsen**, A., Lippé, R., Christoforidis, S., Gaullier, J.M., Brech, A., Callaghan, J., Toh, B.H., Murphy, C., Zerial, M., Stenmark, H., 1998. EEA1 links PI(3)K function to Rab5 regulation of endosome fusion. *Nature.* 394, 494-498.
- Singh**, M., O'Hagan, D.T., 2003. Recent advances in veterinary vaccine adjuvants. *Int. J. Parasitol.* 33, 469-478.
- Skeiky**, Y.A.W., Alderson, M.R., Ovendale, P.J., Lobet, Y., Dalemans, W., Orme, I.M., Reed, S.G., Campos-Neto, A., 2005. Protection of mice and guinea pigs against tuberculosis induced by immunization with a single *Mycobacterium tuberculosis* recombinant antigen, MTB41. *Vaccine.* 23, 3937-3945.
- Smeed**, J.A., Watkins, C.A., Rhind, S.M., Hopkins, J., 2007. Differential cytokine gene expression profiles in the three pathological forms of sheep paratuberculosis. *BMC Vet. Res.* 3, 18.
- Smeed**, J.A., Watkins, C.A., Gossner, A.G., Hopkins, J., 2010. Expression profiling reveals differences in immuno-inflammatory gene expression between the two disease forms of sheep paratuberculosis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 135, 218-225.
- Sommer**, S., Pudrith, C.B., Colvin, C.J., Coussens, P.M., 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, 44-52.
- Souza, C.D.**, 2015. Blocking the mitogen activated protein kinase-p38 pathway is associated with increase expression of nitric oxide synthase and higher production of nitric oxide by bovine macrophages infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 164, 1-9.
- Souza, C.D.**, Evanson, O.A., Weiss, D.J., 2008. Role of cell membrane receptors in the suppression of monocyte anti-microbial activity against *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Microb. Pathog.* 44, 215-223.
- Souza, C.**, Davis, W.C., Eckstein, T.M., Sreevatsan, S., Weiss, D.J., 2013. Mannosylated lipoarabinomannans from *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* alters the inflammatory response by bovine macrophages and suppresses killing of *Mycobacterium avium* subsp. *avium* organisms. *PLoS One.* 8, e75924.
- Speziale, P.**, **Pietrocola, G.**, 2021. *Staphylococcus aureus* induces neutrophil extracellular traps (NETs) and neutralizes their bactericidal potential. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* 19, 3451-3457.
- Stabel, J.R.**, 1995. Temporal effects of tumor necrosis factor- α on intracellular survival of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 45, 321-332.
- Stabel, J.R.**, 1998. Johne's disease: A hidden threat. *J. Dairy. Sci.* 81, 283-288.
- Stabel, J.R.**, 2000a. Cytokine secretion by peripheral blood mononuclear cells from cows infected with *Mycobacterium paratuberculosis*. *Am. J. Vet. Res.* 61, 754-760.
- Stabel, J.R.**, 2000b. Transitions in immune responses to *Mycobacterium paratuberculosis*. *Vet. Microbiol.* 77, 465-473.
- Stabel, J.R.**, **Bannantine, J.P.**, 2020. Divergent antigen-specific cellular immune responses during asymptomatic subclinical and clinical states of disease in cows naturally infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Infec. Immun.* 88, e00650-19.
- Stabel, J.R.**, **Khalifeh, M.S.**, 2008. Differential expression of CD5 on B lymphocytes in cattle infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 126, 211-219.
- Stabel, J.R.**, Waters, W.R., Bannantine, J.P., Lyashchenko, K., 2011. Mediation of host immune responses after immunization of neonatal calves with a heat-killed *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* vaccine. *Clin. Vaccine. Immunol.* 18, 2079-2089.

- Stackebrandt**, E., Rainey, F.A., Ward-rainey, N.L., 1997. Proposal for a new hierarchic classification system, *Actinobacteria* classis nov. Int. J. Syst. Bacteriol. 47, 479-491.
- Stamp**, J., **Watt**, J., 1954. Johne's disease in sheep. J. Comp. Pathol. 64, 26-40.
- Steinbach**, S., Vordermeier, H.M., Jones, G.J., 2016. CD4⁺ and $\gamma\delta$ T cells are the main producers of IL-22 and IL-17A in lymphocytes from *Mycobacterium bovis*-infected cattle. Sci. Rep. 6, 29990.
- Stevenson**, K., Hughes, V.H., de Juan, L., Inglis, N.F., Wright, F., Sharp, M.J., 2002. Molecular characterization of pigmented and nonpigmented isolates of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. J. Clin. Microbiol. 40, 1798-1804
- 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.
- St-Jean**, G., 1996. Treatment of clinical paratuberculosis in cattle. Vet. Clin. North. Am. Food. Anim. Pract. 12, 417-430.
- Storset**, A.K., Hasvold, H.J., Valheim, M., Brun-Hansen, H., Berntsen, G., Whist, S.K., Djønne, B., Press, C.M., Holstad, G., Larsen, H.J.S., 2001. Subclinical paratuberculosis in goats following experimental infection: an immunological and microbiological study. Vet. Immunol. Immunopathol. 80, 271-287.
- Storset**, A.K., Berg, I., Djønne, B., 2005. Evaluation of the gamma interferon test for diagnosis of paratuberculosis in goats. Vet. Immunol. Immunopathol. 107, 87-94.
- Sut**, A., Sirugue, S., Sixou, S., Lakhdar-Ghazal, F., Tocanne, J.F., Lanéelle, G., 1990. Mycobacteria glycolipids as potential pathogenicity effectors: alteration of model and natural membranes. Biochemistry. 29, 8498-8502.
- Sweeney**, R.W., 1996. Transmission of paratuberculosis. Vet. Clin. North. Am. Food. Anim. Pract. 12, 305-312.
- Sweeney**, R.W., Whitlock, R.H., Bowersock, T.L., Cleary, D.L., Meinert, T.R., Habecker, P.L., Pruitt, G.W., 2009. Effect of subcutaneous administration of a killed *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* vaccine on colonization of tissues following oral exposure to the organism in calves. Am. J. Vet. Res. 70, 493-497.
- Sweeney**, R.W., 2011. Pathogenesis of Paratuberculosis. Vet. Clin. North. Am. Food. Anim. Pract. 27, 537-546.
- Tafti**, A.K., **Rashidi**, K., 2000. The pathology of goat paratuberculosis: gross and histopathological lesions in the intestines and mesenteric lymph nodes. J. Vet. Med. B. 47, 487-495.

- Tak**, T., Tesselaar, K., Pillay, J., Borghans, J.A.M., Koenderman, L., 2013. What's your age again? Determination of human neutrophil half-lives revisited. *J. Leukoc. Biol.* 94, 595-601.
- Taka**, S., Liandris, E., Gazouli, M., Sotirakoglou, K., Theodoropoulos, G., Bountouri, M., Andreadou, M., Ikonomopoulos, J., 2013. *In vitro* expression of the SLC11A1 gene in goat monocyte-derived macrophages challenged with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Infect. Genet. Evol.* 17, 8-15.
- Tan**, B.H., Meinken, C., Bastian, M., Bruns, H., Legaspi, A., Ochoa, M.T., Krutzik, S.R., Bloom, B.R., Ganz, T., Modlin, R.L., Stenger, S., 2006. Macrophages acquire neutrophil granules for antimicrobial activity against intracellular pathogens. *J. Immunol.* 177, 1864-1871.
- Tanaka**, S., Itohara, S., Sato, M., Taniguchi, T., Yokomizo, Y., 2000. Reduced formation of granulomata in $\gamma\delta$ T cell knockout BALB/c mice inoculated with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Vet. Pathol.* 37, 415-421.
- Tanaka**, S., Sato, M., Onitsuka, T., Kamata, H., Yokomizo, Y., 2005. Inflammatory cytokine gene expression in different types of granulomatous lesions during asymptomatic stages of bovine paratuberculosis. *Vet. Pathol.* 42, 579-588.
- Tanaka**, T., Narazaki, M., Kishimoto, T., 2014. IL-6 in inflammation, immunity, and disease. *Cold. Spring. Harb. Perspect. Biol.* 6, a016295.
- Taniguchi**, Y., Sakakibara, S.I., Fujihara, M., Yagi, A., Fujiyoshi, S., 2020. The association between detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* DNA in feces and histopathological classification. *J. Vet. Med. Sci.* 82, 541-545.
- Tanner**, R., O'Shea, M.K., Fletcher, H.A., McShane, H., 2016. *In vitro* mycobacterial growth inhibition assays: a tool for the assessment of protective immunity and evaluation of tuberculosis vaccine efficacy. *Vaccine.* 34, 4656-4665.
- Tanner**, R., Satti, I., Harris, S.A., O'Shea, M.K., Cizmeci, D., O'Connor, D., Chomka, A., Matsumiya, M., Wittenberg, R., Minassian, A.M., Meyer, J., Fletcher, H.A., McShane, H., 2020. Tools for assessing the protective efficacy of TB Vaccines in humans: *in vitro* mycobacterial growth inhibition predicts outcome of *in vivo* mycobacterial infection. *Front. Immunol.* 10, 02983.
- Tanner**, R., Hoogkamer, E., Bitencourt, J., White, A., Boot, C., Sombroek, C.C., Harris, S.A., O'Shea, M.K., Wright, D., Wittenberg, R., Sarfas, C., Satti, I., Verreck, F.A.W., Sharpe, S.A., Fletcher, H.A., McShane, H., 2021. The *in vitro* direct mycobacterial growth inhibition assay (MGIA) for the early evaluation of TB vaccine candidates

- and assessment of protective immunity: a protocol for non-human primate cells. F1000Res. 30, 257.
- Taubert**, A., Behrendt, J.H., Sühwold, A., Zahner, H., Hermosilla, C., 2009. Monocyte- and macrophage-mediated immune reactions against *Eimeria bovis*. Vet. Parasitol. 164, 141-153.
- Taylor**, D.L., Zhong, L., Begg, D.J., de Silva, K., Whittington, R.J., 2008. Toll-like receptor genes are differentially expressed at the sites of infection during the progression of Johne's disease in outbred sheep. Vet. Immunol. Immunopathol. 124, 132-151.
- Tewari**, D., Hoving, 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.
- Thakur**, A., Pedersen, L.E., Jungersen, G., 2012. Immune markers and correlates of protection for vaccine induced immune responses. Vaccine. 30, 4907-4920.
- Thakur**, A., Aagaar, C., Stockmarr, A., Andersen, P., Jungersena, G., 2013. Cell-mediated and humoral immune responses after immunization of calves with a recombinant multiantigenic *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* subunit vaccine at different ages. Clin. Vaccine. Immunol. 20, 551-558.
- Thammavongsa**, V., Missiakas, D., Scheneewind, O., 2013. *Staphylococcus aureus* degrades neutrophil extracellular traps to promote immune cell death. Science. 342, 863-866.
- Thirunavukkarasu**, S., de Silva, K., Begg, D.J., Whittington, R.J., Plain, K.M., 2015. Macrophage polarization in cattle experimentally exposed to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. Pathog. Dis. 73, ftv085.
- Thom**, M., Howard, C., Villarreal-Ramos, B., Mead, E., Vordermeier, M., Hope, J., 2008. Consequence of prior exposure to environmental mycobacteria on BCG vaccination and diagnosis of tuberculosis infection. Tuberculosis. 88, 324-334.
- Thomsen**, V.T., Nielsen, S.S., Thakur, A., Jungersen, G., 2012. Characterization of the long-term immune response to vaccination against *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Danish dairy cows. Vet. Immunol. Immunopathol. 145, 316-322.
- Thomas**, J., Rivalde, M.Á., Serrano, M., Sevilla, I., Geijo, M., Ortíz, J.A., Fuertes, M., Ruíz-Fons, J.F., de la Fuente, J., Domínguez, L., Juste, R., Garrido, J., Gortázar, C., 2017. The response of red deer to oral administration of heat-inactivated *Mycobacterium bovis* and challenge with a field strain. Vet. Microbiol. 208, 195-202.

- Thorel**, M., Krichevsky, M., Vincent Lévy-Frébault, V., 1990. Numerical taxonomy of mycobactin-dependent mycobacteria, emended description of *Mycobacterium avium*, and description of *Mycobacterium avium* subsp. *avium* subsp. nov., *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* subsp. nov., and *Mycobacterium avium* subsp. *silvaticum* subsp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 40, 254-260.
- Trentini**, M.M., de Oliveira, F.M., Kipnis, A., Junqueira-Kipnis, A.P., 2016. The role of neutrophils in the induction of specific Th1 and Th17 during vaccination against tuberculosis. *Front. Microbiol.* 7, 898.
- Trinchieri**, G., 2003. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 3, 133-146.
- Tripathi**, B.N., Periasamy, S., Paliwal, O.P., Singh, N., 2006. Comparison of IS900 tissue PCR, bacterial culture, johnin and serological tests for diagnosis of naturally occurring paratuberculosis in goats. *Vet. Microbiol.* 116, 129-137.
- Urata**, M., Koga-Wada, Y., Kayamori, Y., Kang, D., 2008. Platelet contamination causes large variation as well as overestimation of mitochondrial DNA content of peripheral blood mononuclear cells. *Ann. Clin. Biochem.* 45, 513-514.
- Urban**, C.F., Reichard, U., Brinkmann, V., Zychlinsky, A., 2006. Neutrophil extracellular traps capture and kill *Candida albicans* and hyphal forms. *Cell. Microbiol.* 8, 668-676.
- Valentin-Weigand**, P., Moriarty, K.M., 1992. *Mycobacterium paratuberculosis* binds fibronectin. *Res. Microbiol.* 143, 75-79.
- Valentin-Weigand**, P., Goethe, R., 1999. Pathogenesis of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infections in ruminants: still more questions than answers. *Microbes. Infect.* 1, 1121-1127.
- Valheim**, M., Siguroardóttir, Ó.G., Storset, A.K., Aune, L.G., Press, C.M., 2004. Characterization of macrophages and occurrence of T cells in intestinal lesions of subclinical paratuberculosis in goats. *J. Comp. Pathol.* 131, 221-232.
- van der Heijden**, P.J., Bokhout, B.A., Bianchi, A.T., Scholten, J.W., Stok, W., 1986. Separate application of adjuvant and antigen: the effect of a water-in-oil emulsion on the splenic plaque-forming cell response to sheep red blood cells in mice. *Immunobiology.* 171, 143-154.
- van der Heijden**, E.M.D.L., Chileshe, J., Vernooij, J.C.M., Gortazar, C., Juste, R.A., Sevilla, I., Crafford, J.E., Rutten, V.P.M.G., Michel, A.L., 2017. Immune response profiles of calves following vaccination with live BCG and inactivated *Mycobacterium bovis* vaccine candidates. *PLoS One.* 12, e0188448.

- van Schaik**, G., Kalis, C.H., Benedictus, G., Dijkhuizen, A.A., Huirne, R.B., 1996. Cost-benefit analysis of vaccination against paratuberculosis in dairy cattle. *Vet. Rec.* 139, 624-627.
- Vazquez**, P., Garrido, J.M., Juste, R.A., 2013. Specific antibody and interferon-gamma response associated with immunopathological forms of bovine paratuberculosis in slaughtered Friesian cattle. *PloS One.* 8, e64568.
- Vazquez**, P., Garrido, J.M., Molina, E., Geijo, M.V., Gomez, N., Perez, V., Sevilla, I.A., Alonso-Hearn, M., Cortes, A., Juste, R.A., 2014. Latent infections are the most frequent form of paratuberculosis in slaughtered Friesian cattle. *Span. J. Agric. Res.* 12, 1049-1060.
- Velasova**, M., Damaso, A., Prakashbabu, B.C., Gibbons, J., Wheelhouse, N., Longbottom, D., Van Winden, S., Green, M., Guitian, J., 2017. Herd-level prevalence of selected endemic infectious diseases of dairy cows in Great Britain. *J. Dairy. Sci.* 100, 9215-9233.
- Verna**, A.E., Garcia-Pariente, C., Muñoz, M., Moreno, O., García-Marin, J.F., Romano, M.I., Paolicchi, F., Pérez, V., 2007. Variation in the immuno-pathological responses of lambs after experimental infection with different strains of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Zoonoses. Public. Health.* 54, 243–252.
- Via**, L.E., Deretic, D., Ulmer, R.J., Hibler, N.S., Huber, L.A., Deretic, V., 1997. Arrest of mycobacterial phagosome maturation is caused by a block in vesicle fusion between stages controlled by rab5 and rab7. *J. Biol. Chem.* 272, 13326-13331.
- Vidal**, E., Arrieta-Villegas, C., Grasa, M., Mercader, I., Domingo, M., Pérez de Val, B., 2017. Field evaluation of the efficacy of *Mycobacterium bovis* BCG vaccine against tuberculosis in goats. *BMC Vet. Res.* 13, 252.
- Villagra-blanco**, R., Silva, L.M.R., Muñoz-Caro, T., Yang, Z., Li, J., Gärtner, U., Taubert, A., Zhang, X., Hermosilla, C., 2017. Bovine polymorphonuclear neutrophils cast neutrophil extracellular traps against the abortive parasite *Neospora caninum*. *Front. Immunol.* 8, 606.
- Vordermeier**, H.M., Villarreal-Ramos, B., Cockle, P.J., McAulay, M., Rhodes, S.G., Thacker, T., Gilbert, S.C., McShane, H., Hill, A.V.S., Xing, Z., Hewinson, R.G., 2009a. Viral booster vaccines improve *Mycobacterium bovis* BCG-induced protection against bovine tuberculosis. *Infect. Immun.* 77, 3364-3373.
- Vordermeier**, H.M., Dean, G.S., Rosenkrands, I., Agger, E.M., Andersen, P., Kaveh, D.A., Hewinson, R.G., Hogarth, P.J., 2009b. Adjuvants induce distinct immunological

- phenotypes in a bovine tuberculosis vaccine model. *Clin. Vaccine Immunol.* 16, 1443-1448.
- Wang, Z., Kong, L.C., Jia, B.Y., Chen, J.R., Dong, Y., Jiang, X.Y., Ma, H.X., 2019.** Analysis of the microRNA expression profile of bovine monocyte-derived macrophages infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* reveals that miR-150 suppresses cell apoptosis by targeting PDCD4. *Int. J. Mol. Sci.* 20, 2708.
- Wangoo, A., Johnson, L., Gough, J., Ackbar, R., Inglut, S., Hicks, D., Spencer, Y., Hewinson, G., Vordermeier, M., 2005.** Advanced granulomatous lesions in *Mycobacterium bovis*-infected cattle are associated with increased expression of type I procollagen, $\gamma\delta$ (WC1⁺) T cells and CD 68⁺ cells. *J. Comp. Pathol.* 133, 223-234.
- Waters, W.R., Stabel, J.R., Sacco, R.E., Harp, J.A., Pesch, B.A., Wannemuehler, M.J., 1999.** Antigen-specific B-cell unresponsiveness induced by chronic *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection of cattle. *Infect. Immun.* 67, 1593-1598.
- Waters, W.R., Miller, J.M., Palmer, M.V., Stabel, J.R., Jones, D.E., Koistinen, K.A., Steadham, E.M., Hamilton, M.J., Davis, W.C., Bannantine, J.P., 2003.** Early induction of humoral and cellular immune responses during experimental *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection of calves. *Infect. Immun.* 71, 5130–5138.
- Watkins, C., Schock, A., May, L., Denham, S., Sales, J., Welch, L., Sharp, J.M., Stevenson, K., 2010.** Assessing virulence of vaccine strains of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in a calf model. *Vet. Microbiol.* 146, 63-69.
- Wattegedera, S.R., Corripio-Miyar, Y., Pang, Y., Frew, D., McNeilly, T.N., Palarea-Albaladejo, J., McInnes, C.J., Hope, J.C., Glass, E.J., Entrican, G., 2017.** Enhancing the toolbox to study IL-17A in cattle and sheep. *Vet. Res.* 48, 20.
- Wedlock, D.N., Denis, M., Vordermeier, H.M., Hewinson, R.G., Buddle, B.M., 2007.** Vaccination of cattle with Danish and Pasteur strains of *Mycobacterium bovis* BCG induce different levels of IFN- γ post-vaccination, but induce similar levels of protection against bovine tuberculosis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 118, 50-58.
- Weiss, D.J., Evanson, O.A., McClenahan, D.J., Abrahamsen, M.S., Walcheck, B.K., 2001.** Regulation of expression of major histocompatibility antigens by bovine macrophages infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* or *Mycobacterium avium* subsp. *avium*. *Infect. Immun.* 69, 1002-1008.
- Weiss, D.J., Evanson, O.A., Moritz, A., Deng, M.Q., Abrahamsen, M.S., 2002.** Differential responses of bovine macrophages to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and *Mycobacterium avium* subsp. *avium*. *Infect. Immun.* 70, 5556-5561.

- Weiss, D.J.,** Evanson, O.A., Deng, M., Abrahamsen, M.S., 2004. Gene expression and antimicrobial activity of bovine macrophages in response to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Vet. Pathol.* 41, 326-337.
- 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.
- Weiss, D.J.,** Souza, C.D., Evanson, O.A., Sanders, M., Rutherford, M., 2008. Bovine monocyte TLR2 receptors differentially regulate the intracellular fate of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and *Mycobacterium avium* subsp. *avium*. *J. Leukoc. Biol.* 83, 48-55.
- Wentink, G.,** Bongers, J., Zeeuwen, A., Jaartsveld, F., 1994. Incidence of paratuberculosis after vaccination against *M. paratuberculosis* in two infected dairy herds. *Zentralbl. Vet. B.* 41, 517-522.
- Werling, D.,** Hope, J.C., Howard, C.J., Jungi, T.W., 2004. Differential production of cytokines, reactive oxygen and nitrogen by bovine macrophages and dendritic cells stimulated with Toll-like receptor agonists. *Immunology.* 111, 41-52.
- West, A.P.,** Brodsky, I.E., Rahner, C., Woo, D.K., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Walsh, M.C., Choi, Y., Shadel, G.S., Ghosh, S., 2011. TLR signalling augments macrophage bactericidal activity through mitochondrial ROS. *Nature.* 472, 476-480.
- Whan, L.B.,** Grant, I.R., Ball, H.J., Scott, R., Rowe, M.T., 2001. Bactericidal effect of chlorine on *Mycobacterium paratuberculosis* in drinking water. *Lett. Appl. Microbiol.* 33, 227-231.
- Whitlock, R., Buergelt, C.,** 1996. Preclinical and clinical manifestations of paratuberculosis (including pathology). *Vet. Clin. North. Am. Food. Anim. Pract.* 12, 345-356.
- Whittington, R.J.,** Marsh, I., McAllister, S., Turner, M.J., Marshall, D.J., Fraser, C.A., 1999. Evaluation of modified BACTEC 12B radiometric medium and solid media for culture of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from sheep. *J. Clin. Microbiol.* 37, 1077-1083.
- Whittington, R.J.,** Fell, S., Walker, D., McAllister, S., Marsh, I., Sergeant, E., Taragel, C.A., Marshall, D.J., Links, I.J., 2000a. Use of pooled fecal culture for sensitive and economic detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in flocks of sheep. *J. Clin. Microbiol.* 38, 2550-2556.
- Whittington, R.J.,** Hope, A.F., Marshall, D.J., Taragel, C.A., Marsh, I., 2000b. Molecular epidemiology of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: IS900 restriction

- fragment length polymorphism and IS1311 polymorphism analyses of isolates from animals and a human in Australia. *J. Clin. Microbiol.* 38, 3240-3248.
- Whittington, R.J., Taragel, C.A., Ottaway, S., Marsh, I., Seaman, J., Fridriksdottir, V., 2001.** 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, R.J., Marshall, D.J., Nicholls, P.J., Marsh, I.B., Reddacliff, L.A., 2004.** Survival and dormancy of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in the environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 2989-3004.
- Whittington, R.J., Marsh, I.B., Reddacliff, L.A., 2005.** Survival of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in dam water and sediment. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 5304-5308.
- Whittington, R.J., Marsh, I.B., Saunders, V., Grant, I.R., Juste, R., Sevilla, I.A., Manning, E.J.B., Whitlock, R.H., 2011.** Culture phenotypes of genomically and geographically diverse *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolates from different hosts. *J. Clin. Microbiol.* 49, 1822-1830.
- Whittington, R.J., Begg, D.J., de Silva, K., Purdie, A.C., Dhand, N.K., Plain, K.M., 2017.** Case definition terminology for paratuberculosis (Johne's disease). *BMC Vet. Res.* 13, 328.
- Whittington, R., Donat, K., Weber, M.F., Kelton, D., Nielsen, S.S., Eisenberg, S., Arrigoni, N., Juste, R., Sáez, J.L., Dhand, N., Santi, A., Michel, A., Barkema, H., Kralik, P., Kostoulas, P., Citer, L., Griffin, F., Barwell, R., Moreira, M.A.S., Slana, I., Koehler, H., Singh, S.V., Yoo, H.S., Chávez-Gris, G., Goodridge, A., Ocepek, M., Garrido, J., Stevenson, K., Collins, M., Alonso, B., Cirone, K., Paolicchi, F., Gavey, L., Rahman, M.T., de Marchin, E., Van Praet, W., Bauman, C., Fecteau, G., McKenna, S., Salgado, M., Fernández-Silva, J., Dziedzinska, R., Echeverría, G., Seppänen, J., Thibault, V., Fridriksdottir, V., Derakhshandeh, A., Haghkhal, M., Ruocco, L., Kawaji, S., Momotani, E., Heuer, C., Norton, S., Cadmus, S., Agdestein, A., Kampen, A., Szteyn, J., Frössling, J., Schwan, E., Caldow, G., Strain, S., Carter, M., Wells, S., Munyeme, M., Wolf, R., Gurung, R., Verdugo, C., Fourichon, C., Yamamoto, T., Thapaliya, S., Di Labio, E., Ekgatat, M., Gil, A., Alesandre, A.N., Piaggio, J., Suanes, A., de Waard, J.H., 2019.** Control of paratuberculosis: who, why and how. A review of 48 countries. *BMC Vet. Res.* 15, 198.

- Windsor**, P.A., 2006. Research into vaccination against ovine Johne's disease in Australia. *Small Rumin. Res.* 62, 139-142.
- Windsor**, P.A., 2013. Understanding the efficacy of vaccination in controlling ovine paratuberculosis. *Small Rumin. Res.* 110, 161-164.
- Windsor**, P.A., 2015. Paratuberculosis in sheep and goats. *Vet. Microbiol.* 181, 161-169.
- Windsor**, P.A., **Eppleston**, J., 2006. Lesions in sheep following administration of a vaccine of a Freund's complete adjuvant nature used in the control of ovine paratuberculosis. *N. Z. Vet. J.* 54, 237-241.
- Windsor**, P.A., **Whittington**, R.J., 2010. Evidence for age susceptibility of cattle to Johne's disease. *Vet. J.* 184, 37-44.
- Windsor**, P., Bush, R., Links, I., Eppleston, J., 2005. Injury caused by self-inoculation with a vaccine of a Freund's complete adjuvant nature (Gudair™) used for control of ovine paratuberculosis. *Aust. Vet. J.* 83, 216-220.
- Windsor**, P.A., Eppleston, J., Dhand, N.K., Whittington, R.J., 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.
- Woldehiwet**, Z., Scaife, H., Hart, C.A., Edwards, S.W., 2003. Purification of ovine neutrophils and eosinophils: *Anaplasma phagocytophilum* affects neutrophil density. *J. Comp. Pathol.* 128, 277-282.
- Wong**, D., Bach, H., Sun, J., Hmama, Z., Av-Gay, Y., 2011. *Mycobacterium tuberculosis* protein tyrosine phosphatase (PtpA) excludes host vacuolar-H⁺-ATPase to inhibit phagosome acidification. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 19371-19376.
- Woo**, S.R., Sotos, J., Hart, A.P., Barletta, R.G., Czuprynski, C.J., 2006. 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.* 110, 109-120.
- Wu**, C.W., Livesey, M., Schmoller, S.K., Manning, E.J.B., Steinberg, H., Davis, W.C., Hamilton, M.J., Talaat, A.M., 2007. Invasion and persistence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* during early stages of Johne's disease in calves. *Infect. Immun.* 75, 2110-2119.
- Wynn**, T.A., Chawla, A., Pollard, J.W., 2013. Macrophage biology in development, homeostasis and disease. *Nature.* 496, 445-455.
- Xing**, Z., Zganiacz, A., Santosuosso, M., 2000. Role of IL-12 in macrophage activation during intracellular infection: IL-12 and mycobacteria synergistically release TNF- α

- and nitric oxide from macrophages via IFN- γ induction. *J. Leukoc. Biol.* 68, 897-902.
- Yang, H.**, Biermann, M.H., Brauner, J.M., Liu, Y., Zhao, Y., Herrmann, M., 2016. New insights into neutrophil extracellular traps: mechanisms of formation and role in inflammation. *Front. Immunol.* 7, 302.
- Ye, P.**, Rodriguez, F.H., Kanaly, S., Stocking, K.L., Schurr, J., Schwarzenberger, P., Oliver, P., Huang, W., Zhang, P., Zhang, J., Shellito, J.E., Bagby, G.J., Nelson, S., Charrier, K., Peschon, J.J., Kolls, J.K., 2001. Requirement of interleukin 17 receptor signaling for lung CXC chemokine and granulocyte colony-stimulating factor expression, neutrophil recruitment, and host defense. *J. Exp. Med.* 194, 519-527.
- Yildiz, K.**, Gokpinar, S., Gazyagci, A.N., Babur, C., Sursal, N., Azkur, A.K., 2017. Role of NETs in the difference in host susceptibility to *Toxoplasma gondii* between sheep and cattle. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 189, 1-10.
- Yousefi, S.**, Mihalache, C., Kozlowski, E., Schmid, I., Simon, H.U., 2009. Viable neutrophils release mitochondrial DNA to form neutrophil extracellular traps. *Cell Death Differ.* 16, 1438-1444.
- Zhao, B.**, Collins, M.T., Czuprynski, C.J., 1997. Effects of gamma interferon and nitric oxide on the interaction of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* with bovine monocytes. *Infect. Immun.* 65, 1761-1766.
- Zoldan, K.**, Moellmer, T., Schneider, J., Fuedner, C., Knauer, J., Lehmann, J., 2014. Increase of CD25 expression on bovine neutrophils correlates with disease severity in post-partum and early lactating dairy cows. *Dev. Comp. Immunol.* 47, 254-263.
- Zurbrick, B.G.**, Follett, D.M., Czuprynski, C.J., 1988. Cytokine regulation of the intracellular growth of *Mycobacterium paratuberculosis* in bovine monocytes. *Infect. Immun.* 56, 1692-1697.
- Zurbrick, B.G.**, **Czuprynski, C.J.**, 1987. Ingestion and intracellular growth of *Mycobacterium paratuberculosis* within bovine blood monocytes and monocyte-derived macrophages. *Infect. Immun.* 55, 1588-1593.
- Zur Lage, S.**, Goethe, R., Darji, A., Valentin-Weigand, P., Weiss, S., 2003. Activation of macrophages and interference with CD4⁺ T-cell stimulation by *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* and *Mycobacterium avium* subspecies *avium*. *Immunology.* 108, 62-69.