



TESIS DOCTORAL

**EVALUACIÓN DEL CULTIVO FECAL DE *POOLS*  
Y DE LA qPCR EN MUESTRAS INDIVIDUALES  
Y SU APLICACIÓN EN EL DIAGNÓSTICO DE LA  
PARATUBERCULOSIS EN VACUNO DE LECHE**

*Fdo.:*

Alberto Prieto Lago

DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA ANIMAL

FACULTAD DE VETERINARIA

LUGO 2015



## AUTORIZACIÓN DE LOS DIRECTORES DE TESIS

D. Gonzalo Fernández Rodríguez

Profesor Titular del Área de Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria de Lugo, Universidad de Santiago de Compostela

D. Ceferino Manuel López Sánchez

Profesor Titular del Área de Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria de Lugo, Universidad de Santiago de Compostela

D. Luis Ángel Quintela Arias

Profesor Titular del Área de Medicina y Cirugía Animal de la Facultad de Veterinaria de Lugo, Universidad de Santiago de Compostela

Como Directores de la Tesis Doctoral titulada

**"Evaluación del cultivo fecal de *pools* y de la qPCR en muestras individuales y su aplicación en el diagnóstico de la paratuberculosis en vacuno de leche"**

Presentada por Don Alberto Prieto Lago

Alumno del Programa de Doctoramiento 2167-08-1 Introducción a la Investigación En Medicina Y Sanidad Veterinaria

*Autoriza la presentación de la tesis indicada, considerando que reúne los requisitos exigidos en el artículo 34 del reglamento de Estudios de Doctoramiento, y que como Director de la misma no incurre en las causas de abstención establecidas en la Ley 30/1992.*

Fdo.: D. Gonzalo Fernández Rodríguez

Fdo.: D. Ceferino Manuel López Sánchez

Fdo.: D. Luis Ángel Quintela Arias



“La felicidad no es hacer lo que uno quiere,  
sino querer lo que uno hace”

Jean Paul Sartre



*A mis padres Alberto y Gena, por enseñarme una de las lecciones más importantes en la vida:  
sólo pueden contigo si te acabas rindiendo.*



## **PUBLICACIONES**

Parte de los resultados obtenidos en el desarrollo de esta Tesis han dado lugar a las siguientes publicaciones:

### **Comunicaciones a congresos:**

1. **Prieto, A.**, Lago, N., Carballo, R., Quintela, L.A., Fernández, G., 2011. Concordancia entre la seropositividad por ELISA y el aislamiento en *pools* de heces en el diagnóstico de la paratuberculosis en vacuno de leche. **XVI Congreso Internacional ANEMBE de Medicina Bovina**. Ávila, España, 11-13 de mayo de 2011, pp. 285-286.
2. **Prieto, A.**, Lago, N., Díaz, J.M., Díaz, P., López, C., Vilariño, I., Fernández, G., 2013. Utilización de *pools* fecales para la detección de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* en explotaciones de vacuno de leche. **XVIII Congreso Internacional ANEMBE de Medicina Bovina**. Lleida, España, 24-26 de abril de 2013, pp. 177-179. Tercer Premio a las mejores Comunicaciones Orales del Congreso.
3. **Prieto, A.**, Lago, N., Díaz, J.M., Pérez, I., Díaz, P., López, C., Morrondo, P., Díez-Baños, P., Fernández, G., 2014. Validity of new molecular methods for paratuberculosis diagnosis in dairy cattle. **XXI International Congress of the Mediterranean Federation for Healthy and Production of Ruminants (FeMeSPRum)**. Cartagena, España, 23-26 de abril de 2014, pp. 297-300.
4. **Prieto, A.**, Lago, N., Díaz, J.M., Pérez, I., Guarddon, M., Díaz, P., López, C., Fernández, G., 2014. Diagnóstico de la paratuberculosis bovina: comparación entre cultivo fecal y qPCR sobre muestras de campo. **XIX Congreso Internacional ANEMBE de Medicina Bovina**. Oviedo, España, 25-27 de junio de 2014, pp. 268-269.

### **Artículos en revistas nacionales de divulgación:**

1. **Prieto, A.**, Lago, N., Valverde, S., Díaz, J.M., Carballo, R., Pardo, C., Fernández, G., 2011. Paratuberculose: cómo establecer un plan de control efectivo e rentable. **AFRIGA** 95, pp. 54-61.





## **FINANCIACIÓN**

Este trabajo se ha realizado gracias al soporte económico de los siguientes proyectos de investigación:

1. **Desarrollo de un programa de control de paratuberculosis bovina en base al estudio epidemiológico de la enfermedad** (2008-CE166) Ref. 08MR023E. Consellería de Innovación e Industria. Dirección Xeral de Investigación, Desenvolvemento e Innovación de la Xunta de Galicia. Investigador Principal: Gonzalo Fernández Rodríguez.
2. **Consolidación y estructuración de unidades de investigación competitivas (GPC)** (2012-PG243) Ref. CN2012/326. Consellería de Cultura, Educación e Ordenación Universitaria. Plan Galego de Investigación, Innovación e Crecemento (I2C). Investigador Principal: Pablo Díez Baños.
3. **Consolidación e estruturación. RUMIGAL: rede de estudo multidisciplinar dos ruminantes en Galicia** (Redes GI-1702) Ref. 2014-PG128. Consellería de Cultura, Educación e Ordenación Universitaria. Plan Galego de Investigación, Innovación e Crecemento (I2C). Investigador Principal: Rosario Panadero Fontán.





## **AGRADECIMIENTOS**

Y aquí estoy, finalmente, sentado delante de una página en blanco, escribiendo las últimas palabras de este documento que cierra una de las etapas más duras pero también más gratificantes de mi vida. Como reza la dedicatoria de esta tesis, “la felicidad no es hacer lo que uno quiere, sino querer lo que uno hace”. A día de hoy, puedo decir con orgullo que me encuentro dentro de ese pequeño grupo de afortunados, y esperemos poder seguir estándolo durante mucho más tiempo. Ahora es momento de mirar hacia delante, pero sin olvidar de dónde vengo, lo arduo que ha resultado el camino, ni a aquellos que de una manera u otra me han acompañado durante este recorrido... Espero, de corazón, que si me dejo a alguien atrás sepa perdonarme.

Así, me gustaría dar las gracias en primer lugar a mis directores de tesis por todo lo que me han enseñado y por su apoyo incondicional:

Al Dr. Gonzalo Fernández, por su fe ciega en mis posibilidades incluso cuando ni yo mismo las veía, por su incansable lucha en la búsqueda de recursos que me permitiesen seguir con esta formación, y por tener siempre cinco minutos para fumar un cigarrillo y escuchar mis preocupaciones. Sin ti este trabajo nunca hubiese llegado a ver la luz, gracias por apoyarme siempre ☺

Al Dr. Ceferino López, por ofrecerme siempre un punto de vista diferente sobre las cosas, por su disponibilidad y por sus conocimientos, aunque en más de una ocasión hubiese jurado que me hablaba en un idioma proveniente de alguna galaxia muy, muy lejana... y sí, hablo de la estadística :P

Al Dr. Luis Quintela, por su apoyo y confianza que me permitieron seguir trabajando en este mundo de la investigación cuando más difíciles estaban las cosas, pero también por su amistad y por tratarme siempre como a un compañero más.

En segundo lugar, quiero agradecer a toda la familia INVESAGA su ayuda y cariño desde el primer momento:

A los “jefes”, el Dr. Pablo Díez Baños y la Dra. Patrocinio Morrondo, por la protección que me han brindado siempre, por su simpatía y por demostrar que los logros alcanzados no están reñidos con mantener la misma curiosidad e ilusión del primer día.

A la Dra. Rosario Panadero, por tener siempre una palabra amable de ánimo y una sonrisa, muy necesarias en algunos días.

Al Dr. Pablo Díaz, colega y amigo a partes iguales, porque cada día sigo aprendiendo algo de ti al tiempo que no dejamos de reír, y también por haber hecho de psicólogo en mis momentos de frustración, que no han sido pocos... May the Force be with you! ;)

A José Manuel, compañero de despacho, de laboratorio y de largas horas de trabajo (y posteriores cervezas) que han conducido a una buena amistad; sin tu ayuda aún estaría escribiendo alguna parte

de esta tesis. Un currante, un chico incansable que llegará tan lejos como quiera llegar. Sólo recuerda que en el infierno todos los días son lunes, y siempre hay que hacer PCR... XD

Al resto de compañeros que forman parte de esta nuestra familia: Ana, compañera de fatigas y conversaciones trascendentales acerca del futuro; Eva, porque su punto de locura se hace querer; Esther, última incorporación del “mercado de fichajes”; y por supuesto a Carmen, con la que sé que podré contar siempre... al final podrás estrenar vestido ;)

Llegado a este punto, no quiero olvidarme de agradecer también el esfuerzo de dos compañeras que hoy ya no trabajan en el departamento, pero que fueron de gran ayuda durante muchas tardes de “mascarilla asfixiante” procesando mis queridos *pools*: Noelia y Sara. Sólo decir que gracias por todo, se os echa de menos.

En tercer lugar, agradecer el papel desempeñado en este proyecto por la cooperativa AGRIS, y muy especialmente a los compañeros veterinarios Rosa, Isabel, Carolina y Fernando, por su ayuda y todos esos buenos ratos que pasamos durante los muestreos. También a todos y cada uno de los ganaderos implicados, parte fundamental de esta ecuación, por abrirme las puertas de sus casas. Para todos ellos, veterinarios y productores, mil gracias por creer en este proyecto!!

También dar las gracias a Sofía, María y Diego, veterinarios de distintas ADSG's, por recogerme esas muestras positivas que permitieron ampliar los resultados de esta tesis. Da gusto tener compañeros con los que siempre se puede contar ;)

Tampoco quiero olvidarme del resto de personal de los diferentes departamentos de la facultad con los que guardo relación: a Pedro, Juan y Ana, de la Unidad de Reproducción y Obstetricia, por su cariño y por acogerme como uno más; a Mónica, mi maestra en el mundo de la biología molecular y con la que sé que siempre podré contar; al resto de compañeros de Parasitología, Rita, Adolfo y Marisol, por su buen humor siempre; y a toda la Unidad de Anatomía Patológica (lo siento, sois tantos que no voy a dar nombres por miedo a dejarme a alguien en el tintero... :P) De todos vosotros he aprendido algo cada día, y eso es lo que me llevo en la mochila. Muchas gracias a todos!! ☺

A continuación, y cambiando a un ámbito más personal, quiero dar las gracias también al resto de amigos que han compartido mi vida durante estos años:

A los dos mosqueteros restantes, Jorge y Salva: aunque soy hijo único, sé que tengo dos hermanos... qué más puedo decir, sin vuestro apoyo y confianza nunca habría llegado a la meta. Sois grandes!

A Miguel, gracias por estar siempre ahí y por esa tranquilidad innata que destilas y de la que tanta falta me hace contagiarme... ;)

A mis amigos y compañeros del saneamiento, especialmente a Guillermo, Olaia, Taboada, Juan David, Patricia y Sergi, con los que he forjado una gran amistad y que han soportado estoicamente mis charlas sobre la paratuberculosis tanto a pie de campo como tomando unas cañas.

Ya para terminar, quiero agradecer a TODA mi familia el creer en mí y defenderme siempre, y más especialmente:

A mi tía Mari, que siempre se acuerda de este sobrino aunque tenga más de una docena... gracias por preocuparte y cuidarme siempre.

A mi abuela Victoria, una superviviente curtida en mil batallas; esperemos que pueda ver finalmente a otro doctor en la familia.

A quienes va dedicada esta tesis, mi madre y mi padre, luchadores de profesión: me lo habéis dado todo. Sin vuestro esfuerzo y consejo no habría llegado nunca tan lejos... espero que os podáis sentir orgullosos de mí, pero ni de cerca lo estaréis tanto como lo estoy yo de vosotros. Os quiero.

Por último, a Silvia, esa brisa de aire fresco que me acompaña desde hace más de catorce años... tú eres la que más me ha sufrido durante este camino, has estado siempre a mi lado en mis días buenos y malos, y nunca has dejado de quererme y darme ánimos incluso en los días en los que ni yo mismo me aguanto. Eres la mitad que me falta, *"the Moon of my life"*, te quiero y te querré siempre.

Gracias, gracias, gracias por ser como eres.





## ABREVIATURAS

**ADSG:** Asociación de Defensa Sanitaria Ganadera

**APC:** célula presentadora de antígeno

**ATP:** adenosín trifosfato

**BAC:** cloruro de benzalconio

**BE:** blanco de extracción

**BHI:** infusión cerebro-corazón

**CF:** filtrado de cultivo

**CIP:** control interno positivo

**COR:** Característica Operativa de Receptor

**Ct:** ciclo umbral

**DI-C:** doble incubación + centrifugación

**DI-DC:** doble incubación + doble centrifugación

**dNTP:** desoxirribonucleótido trifosfato

**EDTA:** ácido etildiaminotetraacético

**ELISA:** ensayo enzimático de inmunoabsorbancia

**ERK1/2:** quinasa regulada por señal extracelular

**EVELISA:** Etanol-Vórtex ELISA

**FAP:** proteína de unión a fibronectina

**FRET:** transferencia de energía de resonancia fluorescente

**G+C:** guanina + citosina

**GPL:** glucopéptidolípido

**HEYM:** medio de Herrold con yema de huevo

**HPC:** cloruro de hexadecilpiridinio

**hsp:** proteína de choque térmico

**IAC:** control de amplificación interno

**IC95%:** intervalo de confianza al 95%

**IDGA:** inmunodifusión en gel de agar

**IDR:** intradermoreacción

**IFN- $\gamma$ :** gamma-interferón

**IL:** interleucina

**IMS:** separación inmunomagnética

**iNOS:** óxido nítrico-sintasa inducible

**IS:** secuencia de inserción

**ITS:** espaciador interno transcrito

**LAM:** lipoarabinomanano

**LJ:** Löwenstein-Jensen

**MAC:** complejo *Mycobacterium avium*

**ManLAM:** lipoarabinomanano manosilado

**Map:** *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*

**MAPK:** proteína quinasa activada por mitógeno

**mce:** entrada a células mamíferas

**MDM:** macrófago derivado de monocito

**MGIT:** tubo indicador de crecimiento de micobacterias

**MHC:** complejo mayor de histocompatibilidad

**MLSA:** análisis de secuencias multilocus

**MPN:** número más probable

**ND:** no disponible

**OA:** ácido oxálico

**OADC:** oleico-albúmina-dextrosa-catalasa

**OR:** odds ratio

**ORF:** marco de lectura abierto

**pb:** pares de bases

**PCR:** reacción en cadena de la polimerasa

**PE:** prolina-ácido glutámico

**PPA:** antígeno protoplasmático

**PPD:** derivado proteico purificado

**PPE:** prolina-prolina-ácido glutámico

**qPCR:** PCR cuantitativa

**REA:** análisis de enzimas de restricción

**RFLP:** polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción

**rRNA:** ácido ribonucleico ribosómico

**RT-PCR:** PCR a tiempo real

**SARS:** Síndrome Respiratorio Agudo Severo

**Se:** sensibilidad

**SIDA:** Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida

**SNP:** polimorfismo puntal de nucleótido

**Sp:** especificidad

**SS:** supereliminador

**TE:** Tris-EDTA

**TET:** Tris-EDTA-Triton

**TNF $\alpha$ :** factor de necrosis tumoral alfa

**TNTC:** demasiado numeroso para contar

**tRNA:** ácido ribonucleico transferente

**UFC:** unidad formadora de colonia

**US\$:** dólar estadounidense





## **TABLAS**

<b>Tabla 1.</b> Principales especies de micobacterias capaces de causar enfermedad en animales (adaptado de Quinn <i>et al.</i> , 1994).....	8
<b>Tabla 2.</b> Características de <i>Mycobacterium avium</i> y sus subespecies (Thorel <i>et al.</i> , 1990) .....	11
<b>Tabla 3.</b> Especies del género <i>Mycobacterium</i> de las que se ha secuenciado su genoma completo (Paustian <i>et al.</i> , 2010) .....	23
<b>Tabla 4.</b> Resultados de diversos estudios de presencia de <i>Map</i> en muestra de leche y queso (adaptado de Eltholth <i>et al.</i> , 2009) .....	30
<b>Tabla 5.</b> Valores de prevalencia real de paratuberculosis mediante ELISA indirecto sobre suero según el tipo de aptitud de las explotaciones (Diéguez <i>et al.</i> , 2007).....	33
<b>Tabla 6.</b> Especies de animales no rumiantes en los que ha sido aislado <i>Map</i> .....	36
<b>Tabla 7.</b> El “efecto iceberg” de la paratuberculosis y las fases de la enfermedad (adaptado de Fecteau y Whitlock, 2010) .....	52
<b>Tabla 8.</b> Clasificación lesional en la especie bovina (Buergelt <i>et al.</i> , 1978; González <i>et al.</i> , 2005) .....	57
<b>Tabla 9.</b> Comparación de la composición de los medios HEYM y LJ (cantidades por litro de medio) .....	68
<b>Tabla 10.</b> Composición de los medios modificados Middlebrook y el medio Watson Reid .....	68
<b>Tabla 11.</b> Métodos más comunes para el aislamiento de <i>Map</i> a partir de heces.....	73
<b>Tabla 12.</b> Porcentaje de explotaciones infectadas por <i>Map</i> detectadas mediante cultivo fecal de <i>pools</i> de heces en relación al cultivo fecal individual en diferentes estudios realizados en ganado vacuno .....	74
<b>Tabla 13.</b> Comparación de la sensibilidad de diferentes métodos de cultivo fecal de <i>Map</i> (adaptado de Whittington, 2010).....	76
<b>Tabla 14.</b> Tasas de contaminación de diferentes métodos de cultivo fecal (adaptado de Whittington, 2010) .....	80
<b>Tabla 15.</b> Principales inconvenientes de la PCR convencional (adaptado de Bölske y Herthnek, 2010).....	86
<b>Tabla 16.</b> Principales estudios de PCR frente a <i>Map</i> que describen el diseño de un IAC (= Control Interno de Amplificación) .....	89
<b>Tabla 17.</b> Dianas moleculares de <i>Map</i> empleadas en el diagnóstico de paratuberculosis.....	90
<b>Tabla 18.</b> Resumen de publicaciones que han empleado PCR directa sobre heces y comparación con cultivo fecal (adaptado de Bölske y Herthnek, 2010) .....	92
<b>Tabla 19.</b> Sensibilidad y especificidad estimadas para diferentes tests de ELISA indirecto sobre muestras de suero (adaptado de Nielsen y Toft, 2008).....	99

<b>Tabla 20.</b> Principales medidas para reducir la transmisión de paratuberculosis del ganado adulto a la cría .....	105
<b>Tabla 21.</b> Interpretación de los resultados del test ELISA de IDVet® .....	129
<b>Tabla 22.</b> Interpretación de los resultados del test ELISA de Pourquier® .....	131
<b>Tabla 23.</b> Programa de tiempos y temperaturas empleado para la PCR a tiempo real (kit ParaTB-Kuanti de Vacunek®, Derio, España) .....	139
<b>Tabla 24.</b> Combinaciones de todos los posibles resultados de la PCR a tiempo real .....	140
<b>Tabla 25.</b> Categorización de los factores de riesgo considerados a nivel individual .....	141
<b>Tabla 26.</b> Categorización de los factores de riesgo considerados a nivel de explotación .....	142
<b>Tabla 27.</b> Distribuciones Beta de probabilidad empleadas en el cálculo de la estimación bayesiana de la prevalencia individual de la población mediante esquema de muestreo de Gibbs .....	144
<b>Tabla 28.</b> Clasificación de los animales incluidos en el estudio según el resultado serológico de los tests ELISA A y B .....	150
<b>Tabla 29.</b> Seroprevalencia a nivel de rebaño obtenida mediante los tests ELISA A y B .....	152
<b>Tabla 30.</b> Clasificación de los recuentos bacterianos obtenidos según el grupo de edad de los animales del <i>pool</i> de cultivo .....	157
<b>Tabla 31.</b> Clasificación de los <i>pools</i> fecales según su resultado a cultivo y la presencia de animales seropositivos en dicho <i>pool</i> mediante el ELISA A y B .....	158
<b>Tabla 32.</b> Clasificación y análisis de concordancia de los resultados de cultivo de <i>pools</i> fecales y la presencia de animales seropositivos en dichos <i>pools</i> mediante el ELISA A y B, estratificado según el grupo de edad de los animales que conforman cada <i>pool</i> .....	159
<b>Tabla 33.</b> Número de cultivos de <i>pools</i> realizados por explotación, porcentaje de cultivos positivos, categorización de los recuentos bacterianos obtenidos y seroprevalencia de los ELISA´s A y B para cada explotación en estudio .....	161
<b>Tabla 34.</b> Clasificación y frecuencia de explotaciones según la combinación de resultados obtenidos mediante cultivo fecal de <i>pools</i> , ELISA A y ELISA B .....	162
<b>Tabla 35.</b> Clasificación de las explotaciones incluidas en estudio según el resultado del cultivo fecal de <i>pools</i> y de cada ELISA (A y B) .....	162
<b>Tabla 36.</b> Número de cultivos fecales de <i>pools</i> y porcentaje de cultivos positivos obtenidos por año y explotación, y número de controles anuales positivos para cada explotación .....	168
<b>Tabla 37.</b> Clasificación de las explotaciones y concordancia entre los diferentes tests diagnósticos (valor <i>kappa</i> y p-valor del test de McNemar) según el resultado final obtenido mediante cultivo fecal de <i>pools</i> tras 3 años de monitorización y el resultado obtenido mediante ELISA A, ELISA B y cultivo fecal de <i>pools</i> realizados el primer año de monitorización .....	170

<b>Tabla 38.</b> Resultados obtenidos en las cinco explotaciones seleccionadas para cada año de estudio (ELISA A, ELISA B y cultivo fecal de <i>pools</i> anual en 2009; cultivo fecal de <i>pools</i> anual, cultivo fecal individual de seguimiento y cultivo fecal de <i>pools</i> de seguimiento en 2010 y 2011).....	172
<b>Tabla 39.</b> Clasificación de los resultados de cultivos de <i>pools</i> fecales realizados durante la fase de seguimiento y de los cultivos fecales individuales de los animales que formaban cada <i>pool</i> .....	173
<b>Tabla 40.</b> Clasificación de los resultados obtenidos mediante cultivo fecal y qPCR directa sobre heces realizados sobre muestras individuales .....	175
<b>Tabla 41.</b> Valores de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo de la qPCR directa sobre heces en relación al cultivo fecal individual .....	175





## **FIGURAS**

<b>Figura 1.</b> Tinción de Ziehl-Neelsen realizada directamente sobre una colonia de <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> .....	6
<b>Figura 2.</b> Esquema de la pared celular micobacteriana.....	7
<b>Figura 3.</b> Reconstrucción filogénica del fragmento de $\approx 1400$ bp del gen rRNA de 16S. Las especies señaladas (MAC) representan el subcluster que incluye las especies del complejo <i>Mycobacterium avium</i> . La escala representa el número de pares de bases de diferencia (Turenne y Alexander, 2010).....	12
<b>Figura 4.</b> Separación filogenética de las subespecies de <i>M. avium</i> mediante MLSA (multilocus sequence analysis = análisis de secuencias multiloculares) (Turenne <i>et al.</i> , 2008) .....	14
<b>Figura 5.</b> Comparación de la homología del cluster de genes de la micobactina entre <i>M. avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> , <i>M. avium</i> subsp. <i>avium</i> y <i>M. tuberculosis</i> (el cluster es mostrado en gris, con la longitud de aminoácidos en la parte superior) (Li <i>et al.</i> , 2005).....	17
<b>Figura 6.</b> Pared celular del intestino y tácticas de invasión de macrófagos utilizadas por <i>Map</i> (adaptada de Coussens <i>et al.</i> , 2010).....	46
<b>Figura 7.</b> Vaca con paratuberculosis en fase clínica avanzada (Flecha: edema submandibular).....	54
<b>Figura 8.</b> Aspecto de una mucosa intestinal sana (arriba) y una mucosa intestinal en un animal afectado de paratuberculosis (abajo) ( <a href="http://johnes.org">http://johnes.org</a> ).....	56
<b>Figura 9.</b> Tinción de Ziehl-Neelsen sobre una muestra de heces.....	64
<b>Figura 10.</b> Aspecto de las colonias de <i>Map</i> en medio Herrold's con yema de huevo .....	67
<b>Figura 11.</b> Aspecto de las colonias de <i>Map</i> en medio Middlebrook sin Tween 80 ( <a href="http://johnes.org">http://johnes.org</a> ).....	67
<b>Figura 12.</b> Ilustración de la reacción de PCR. El molde inicial de ADN se muestra en negro, y los cebadores y el ADN de nueva síntesis en gris. A. Molde de ADN; B. Ciclo 1, desnaturalización; C. Alineamiento; D. Elongación; E. Ciclo 2, desnaturalización; F. Alineamiento y elongación, que genera el producto de PCR especificado por los cebadores; G. Ciclo 3, desnaturalización y alineamiento (adaptado de Bölske y Herthnek, 2010).....	85
<b>Figura 13.</b> Censo de cabezas de vacuno lechero en la Unión Europea (en miles de animales) (Instituto Nacional de Estadística, 2009) .....	117
<b>Figura 14.</b> Censo de vacuno lechero (rojo) y explotaciones de aptitud láctea (azul) según cada Comunidad Autónoma (Instituto Nacional de Estadística, 2009) .....	118
<b>Figura 15.</b> Censo de vacuno lechero (rojo) y explotaciones de aptitud láctea (azul) según cada provincia de Galicia (Instituto Nacional de Estadística, 2009).....	119
<b>Figura 16.</b> Mapa de distribución del ganado vacuno lechero en Galicia (Consellería de Medio Rural e do Mar, 2012).....	119

<b>Figura 17.</b> Estructura productiva del sector de ganado lechero en Galicia según tamaño de explotación (Instituto Nacional de Estadística, 2009) .....	120
<b>Figura 18.</b> Evolución temporal del nº de explotaciones, cabezas de vacuno y tamaño medio de explotación en Galicia entre 1999 y 2007 (Consellería do Medio Rural e do Mar, 2012) .....	120
<b>Figura 19.</b> Localización geográfica de las explotaciones incluidas en los estudios 1 y 2 (A) y en el estudio 3 (B) .....	121
<b>Figura 20.</b> Cronología del estudio 2 (CF = Cultivo fecal).....	123
<b>Figura 21.</b> Extracción de sangre mediante vacío.....	124
<b>Figura 22.</b> Placa madre .....	124
<b>Figura 23.</b> Grupos de 10 muestras fecales para la composición de <i>pools</i> fecales .....	131
<b>Figura 24.</b> <i>Pool</i> fecal de 10 muestras después de la homogenización.....	131
<b>Figura 25.</b> Procedimiento de análisis empleado para los <i>pools</i> fecales .....	132
<b>Figura 26.</b> Izquierda: tubo de medio Herrold's con colonias compatibles con <i>Mycobacterium</i> spp. Derecha: tubo de medio Herrold's negativo .....	134
<b>Figura 27.</b> Tinción de Ziehl-Neelsen realizada sobre cultivo puro.....	135
<b>Figura 28.</b> Esquema de los componentes e interpretación de los ciclos umbrales de la PCR a tiempo real.....	139
<b>Figura 29.</b> Porcentaje de animales seropositivos obtenidos mediante los tests ELISA A y B según grupo de edad.....	150
<b>Figura 30.</b> Regresión lineal calculada a partir de los ratios S/P obtenidos mediante los tests ELISA A y B ( $r^2$ = coeficiente de determinación) .....	151
<b>Figura 31.</b> Porcentaje de seroprevalencia mediante los ELISA's A y B a nivel de rebaño para cada explotación en estudio .....	153
<b>Figura 32.</b> Clasificación de los cultivos de <i>pools</i> fecales positivos en relación a la categoría de recuento bacteriano (UFC/tubo) .....	156
<b>Figura 33.</b> Porcentaje de cultivos fecales positivos y negativos obtenidos según el grupo de edad de los animales que conforman el <i>pool</i> de cultivo .....	156
<b>Figura 34.</b> Porcentaje de recuentos bacterianos bajos (1-10 UFC/tubo) y medio-altos (>10 UFC/tubo) obtenidos en relación al grupo de edad de los animales que forman el <i>pool</i> .....	157
<b>Figura 35.</b> Porcentaje de prevalencia individual anual estimado mediante aproximación frecuentista y bayesiana a partir de los resultados obtenidos en los cultivos de <i>pools</i> de heces realizados. En líneas de puntos se representan los intervalos de confianza al 95% para cada estimación .....	166

<b>Figura 36.</b> Porcentaje acumulado de explotaciones positivas detectadas cada año mediante cultivo fecal de <i>pools</i> , suponiendo que al tercer año (2011) se hubiesen detectado el 100% de las explotaciones infectadas .....	169
<b>Figura 37.</b> Curva COR (Característica Operativa de Receptor) obtenida a partir de los valores de sensibilidad y especificidad calculados para la técnica de qPCR directa sobre heces .....	176
<b>Figura 38.</b> Curva estándar construida a partir de controles de concentración conocida de la diana F57, empleada para el cálculo del número de copias obtenidas mediante qPCR directa sobre heces .....	178
<b>Figura 39.</b> Diagrama de cajas representando el log10 del número de copias de la diana F57 para cada una de las categorías de crecimiento contempladas en el cultivo fecal .....	178







# ÍNDICE

<b>I. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b> .....	1
<b>I.1. INTRODUCCIÓN: DEFINICIÓN, HISTORIA E IMPORTANCIA DE LA PARATUBERCULOSIS</b> .....	3
<b>I.2. ETIOLOGÍA</b> .....	5
<b>I.2.1. EL GÉNERO MYCOBACTERIUM</b> .....	5
<b>I.2.2. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA Y ANÁLISIS FILOGENÉTICO: EL COMPLEJO <i>MYCOBACTERIUM AVIUM</i></b> .....	9
<b>I.2.3. <i>MYCOBACTERIUM AVIUM</i> SUBSP. <i>PARATUBERCULOSIS</i></b> .....	14
<b>I.2.4. DEPENDENCIA DE MICOBACTINA</b> .....	16
<b>I.2.5. PRINCIPALES ANTÍGENOS DE INTERÉS INMUNOLÓGICO</b> .....	18
I.2.5.1. Antígeno protoplasmático (PPA) .....	18
I.2.5.2. Antígenos obtenidos a partir de filtrados de cultivos .....	19
I.2.5.3. Antígenos de superficie .....	20
I.2.5.4. Antígenos lipídicos.....	21
<b>I.2.6. CARACTERIZACIÓN GENÓMICA</b> .....	22
I.2.6.1. Secuencias de inserción (IS) .....	23
I.2.6.2. Genes únicos.....	25
I.2.6.3. Factores de virulencia .....	26
<b>I.2.7. RESISTENCIA</b> .....	27
I.2.7.1. Supervivencia en agua .....	27
I.2.7.2. Supervivencia en heces y suelos .....	28
I.2.7.3. Supervivencia al frío .....	28
I.2.7.4. Supervivencia a los tratamientos térmicos.....	28
I.2.7.5. Resistencia a desinfectantes .....	30
<b>I.3. EPIDEMIOLOGÍA</b> .....	31
<b>I.3.1. DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA Y PREVALENCIA DE LA PARATUBERCULOSIS BOVINA</b> .....	31
<b>I.3.2. FUENTES DE INFECCIÓN Y VÍAS DE TRANSMISIÓN</b> .....	33
<b>I.3.3. RANGO DE HOSPEDADORES</b> .....	36
<b>I.3.4. IMPLICACIONES EN SALUD PÚBLICA: <i>MYCOBACTERIUM AVIUM</i> SUBSP. <i>PARATUBERCULOSIS</i> Y LA ENFERMEDAD DE CROHN</b> .....	38
<b>I.4. PATOGENIA</b> .....	44
<b>I.4.1. VÍA DE ENTRADA DE <i>MAP</i> EN EL HOSPEDADOR</b> .....	44
<b>I.4.2. SUPERVIVENCIA EN MACRÓFAGOS</b> .....	46
<b>I.4.3. ALTERACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE CELULAR</b> .....	47
<b>I.4.4. RESPUESTA INMUNE HUMORAL</b> .....	49



<b>I.5. CUADRO CLÍNICO Y LESIONAL</b> .....	51
<b>I.5.1. FASES DE LA ENFERMEDAD</b> .....	52
I.5.1.1. Fase I: infección silente.....	52
I.5.1.2. Fase II: portadores adultos inaparentes.....	53
I.5.1.3. Fase III: enfermedad clínica.....	53
I.5.1.4. Fase IV: enfermedad clínica avanzada.....	54
<b>I.5.2. CUADRO LESIONAL</b> .....	54
I.5.2.1. Lesiones macroscópicas.....	54
I.5.2.2. Lesiones microscópicas.....	56
<b>I.5.3. ELIMINACIÓN DE <i>MAP</i></b> .....	58
I.5.3.1. Eliminación activa .....	58
I.5.3.2. Eliminación pasiva .....	58
I.5.3.3. Animales supereliminadores.....	59
<b>I.6. DIAGNÓSTICO</b> .....	61
<b>I.6.1. DIAGNÓSTICO CLÍNICO/EPIDEMIOLÓGICO</b> .....	61
<b>I.6.2. DIAGNÓSTICO ANATOMOPATOLÓGICO</b> .....	62
<b>I.6.3. DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO</b> .....	63
I.6.3.1. Tinción e identificación microscópica directa .....	63
I.6.3.2. Aislamiento bacteriológico mediante cultivo.....	64
I.6.3.2.1. Perspectiva histórica.....	64
I.6.3.2.2. Principios generales para el aislamiento de <i>Map</i> .....	65
I.6.3.2.3. Medios de cultivo.....	66
I.6.3.2.4. Aplicaciones específicas del cultivo bacteriológico.....	71
I.6.3.2.5. Recuento bacteriano.....	78
I.6.3.2.6. Contaminación y supervivencia de <i>Map</i> durante el cultivo microbiológico.....	79
I.6.3.2.7. Identificación de <i>Map</i> en el medio de cultivo .....	81
I.6.3.3. Detección de ADN bacteriano: reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	83
I.6.3.3.1. Tipos de ensayos de PCR.....	84
I.6.3.3.2. Dianas moleculares de <i>Map</i> más frecuentes para PCR .....	89
I.6.3.3.3. Procedimientos de extracción del ADN y pretratamientos utilizados.....	90
I.6.3.3.4. Naturaleza de la muestra .....	91
I.6.3.3.5. Comparación entre PCR y cultivo microbiológico .....	94
<b>I.6.4. DIAGNÓSTICO INMUNOLÓGICO</b> .....	94
I.6.4.1. Intradermorreacción .....	95
I.6.4.2. Prueba de detección del interferón gamma (IFN- $\gamma$ ).....	96
I.6.4.3. Inmunodifusión en gel de agar (IDGA) .....	97
I.6.4.4. <i>Enzyme linked immunosorbent assay</i> (ELISA).....	97



<b>I.7. TRATAMIENTO Y CONTROL</b> .....	100
<b>I.7.1. TRATAMIENTO</b> .....	100
<b>I.7.2. CONTROL</b> .....	100
I.7.2.1. Control sanitario basado en detección y eliminación (“ <i>test-and-cull</i> ”) .....	100
I.7.2.2. Control basado en vacunación .....	102
<b>I.7.3. MEDIDAS HIGIOSANITARIAS Y DE BIOSEGURIDAD</b> .....	104
<b>I.7.4. EJEMPLOS DE PROGRAMAS DE CONTROL Y CLASIFICACIÓN DE EXPLOTACIONES FRENTE A LA PARATUBERCULOSIS DESARROLLADOS EN LA ACTUALIDAD</b> .....	107
I.7.4.1. Estados Unidos de América.....	107
I.7.4.2. Dinamarca .....	107
I.7.4.3. Holanda .....	108
I.7.4.4. Alemania .....	109
I.7.4.5. Austria.....	109
<b>II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS</b> .....	111
<b>III. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	115
<b>III.1. POBLACIÓN EN ESTUDIO</b> .....	117
<b>III.2. ASPECTOS GENERALES DEL ESTUDIO</b> .....	121
<b>III.2.1. EXPLOTACIONES INCLUIDAS EN EL ESTUDIO</b> .....	121
<b>III.2.2. CRONOLOGÍA Y METODOLOGÍA DEL ESTUDIO</b> .....	122
<b>III.2.3. TOMA DE MUESTRAS</b> .....	124
III.2.3.1. Muestras de sangre .....	124
III.2.3.2. Muestras de heces .....	124
<b>III.2.4. RECOGIDA DE DATOS</b> .....	125
<b>III.2.5. COMUNICACIÓN DE RESULTADOS</b> .....	125
<b>III.3. PRUEBAS DIAGNÓSTICAS UTILIZADAS</b> .....	127
<b>III.3.1. ELISA INDIRECTO</b> .....	127
<b>III.3.2. COMPOSICIÓN DE LOS POOLS FECALES</b> .....	131
<b>III.3.3. CULTIVO FECAL</b> .....	132
<b>III.3.4. TINCIÓN DE ZIEHL-NEELSEN</b> .....	134
<b>III.3.5. PCR A TIEMPO REAL</b> .....	135
III.3.5.1. Extracción de ADN .....	135
III.3.5.2. PCR a tiempo real .....	138
<b>III.4. DESCRIPCIÓN DE VARIABLES Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO</b> .....	141
<b>III.4.1. ESTUDIO 1: PREVALENCIA DE LA PARATUBERCULOSIS BOVINA EN GRANJAS DE VACUNO DE LECHE MEDIANTE SEROLOGÍA Y CULTIVO MICROBIOLÓGICO A PARTIR DE POOLS DE HECES</b> .....	141
<b>III.4.2. ESTUDIO 2: EMPLEO DE CULTIVO FECAL DE POOLS DE HECES PARA LA MONITORIZACIÓN DE LA PARATUBERCULOSIS EN EXPLOTACIONES DE VACUNO DE LECHE</b> .....	144



III.4.3. ESTUDIO 3: COMPARACIÓN ENTRE CULTIVO FECAL Y qPCR DIRECTA SOBRE MUESTRAS FECALES INDIVIDUALES PARA LA DETECCIÓN DE <i>MYCOBACTERIUM AVIUM</i> SUBSP. <i>PARATUBERCULOSIS</i> .....	145
<b>IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	147
IV.1. ESTUDIO 1: PREVALENCIA DE LA PARATUBERCULOSIS BOVINA EN GRANJAS DE VACUNO DE LECHE MEDIANTE SEROLOGÍA Y CULTIVO MICROBIOLÓGICO A PARTIR DE <i>POOLS</i> DE HECES .....	149
IV.2. ESTUDIO 2: EMPLEO DE CULTIVO FECAL DE <i>POOLS</i> DE HECES PARA LA MONITORIZACIÓN DE LA PARATUBERCULOSIS EN EXPLOTACIONES DE VACUNO DE LECHE.....	165
IV.3. ESTUDIO 3: COMPARACIÓN ENTRE CULTIVO FECAL Y qPCR DIRECTA SOBRE MUESTRAS FECALES INDIVIDUALES PARA LA DETECCIÓN DE <i>Mycobacterium avium</i> SUBSP. <i>paratuberculosis</i> .....	175
<b>V. CONCLUSIONES</b> .....	181
<b>VI. RESUMEN – RESUMO – SUMMARY</b> .....	185
<b>VII. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	199
<b>VIII. ANEXOS</b> .....	243









## I. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA



## I.1. INTRODUCCIÓN: DEFINICIÓN, HISTORIA E IMPORTANCIA DE LA PARATUBERCULOSIS

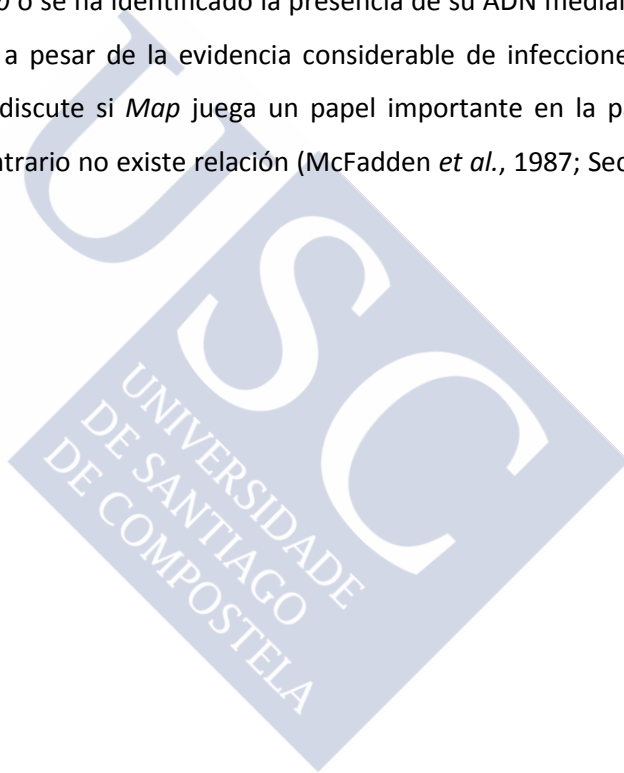
La paratuberculosis o Enfermedad de Johne se define como una enfermedad crónica inflamatoria y granulomatosa del intestino que afecta fundamentalmente a rumiantes (Kalis *et al.*, 2004). Debido al carácter crónico de la enfermedad, el proceso cursa de forma subclínica en la mayoría de los casos, y tan solo un reducido grupo de animales presenta la sintomatología típica de diarrea crónica, pérdida de peso e hipoproteinemias. El agente etiológico que la causa es el *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (Map).

Johne y Frothingham describieron por primera vez la enfermedad en Alemania en 1894 (Johne y Frothingham, 1895). Además de describir los signos clínicos de la enfermedad, también identificaron la presencia de organismos ácido-alcohol resistentes en las lesiones granulomatosas y especularon con que posiblemente se tratase de una forma atípica de tuberculosis de los rumiantes. Sin embargo, no fue hasta 1910 cuando Twort aplicó con éxito los postulados de Koch y consiguió aislar el microorganismo en el laboratorio por vez primera, siendo capaz de reproducir la enfermedad en vacuno infectado experimentalmente (Twort e Ingram, 1912). El nombre que propuso inicialmente para este agente fue *Mycobacterium enteritidis chronicae pseudotuberculosis bovis johne*. Posteriormente la enfermedad pasó a conocerse como paratuberculosis o enfermedad de Johne, y el agente causal fue renombrado como *Mycobacterium paratuberculosis* (Harding, 1959; Chiodini *et al.*, 1984).

La importancia de esta enfermedad en el ganado bovino lechero, objeto de este estudio, reside fundamentalmente en que se trata de un proceso que no responde al tratamiento y que causa considerables pérdidas económicas en las explotaciones ganaderas, atribuidas principalmente a la reducción de la producción lechera, aumento de gastos veterinarios, eliminación prematura de los animales, disminución del valor de sacrificio, descenso de la fertilidad e incremento de la mortalidad y de la susceptibilidad a otras enfermedades (Benedictus *et al.*, 1987; Whittington y Sergeant, 2001; Dorshorst *et al.*, 2006). Según un estudio de 1999 en Estados Unidos, se estima que las explotaciones con animales seropositivos sufren pérdidas económicas de casi 100 US\$ por vaca y año en relación a las explotaciones seronegativas, atendiendo únicamente a los gastos derivados de la reducción de producción láctea y del incremento de la reposición de animales. Además, en ganaderías donde al menos un 10% de los animales eliminados muestran signos clínicos compatibles con paratuberculosis, se estima que estas pérdidas superan los 200 US\$ por vaca y año (Ott *et al.*, 1999).

En términos de reducción de la producción láctea, se ha descrito que los animales con resultado positivo mediante técnicas ELISA presentan una producción de leche 376 kg/lactación menor que la de sus compañeras de rebaño con resultado negativo. En este mismo estudio también se concluye que las infecciones subclínicas están asociadas con una disminución de la producción láctea del 4%, pérdidas que deben añadirse a las producidas por los casos clínicos que existan en el establo (Nordlund *et al.*, 1996).

Otro aspecto de gran importancia es la posibilidad de la existencia de una conexión entre el agente causal de la paratuberculosis y la enfermedad de Crohn en la especie humana. Son numerosos los estudios en los que a partir de muestras clínicas de pacientes con enfermedad de Crohn se ha conseguido aislar *Map* o se ha identificado la presencia de su ADN mediante técnicas de biología molecular. Sin embargo, a pesar de la evidencia considerable de infecciones por *Map* en pacientes con Crohn, todavía se discute si *Map* juega un papel importante en la patogenia de la enfermedad de Crohn o por el contrario no existe relación (McFadden *et al.*, 1987; Sechi *et al.*, 2004; Naser, 2005).



## I.2. ETIOLOGÍA

### I.2.1. EL GÉNERO *MYCOBACTERIUM*

El género *Mycobacterium* spp. comprende más de 100 especies diferentes (Chacon *et al.*, 2004), que se caracterizan por ser bacilos delgados de tamaño variable (0,2-0,6 x 1.0-10,0 µm); son inmóviles, no esporulados y con una temperatura óptima de crecimiento que oscila entre 30 y 45°C (Lévy-Frébault y Portaels, 1992). Son organismos de metabolismo aeróbico y oxidativo, que emplean glicerol o piruvato como fuente de carbono y energía, y que pueden utilizar asparagina, glutamato y amonio como fuente de nitrógeno (Goodfellow y Magee, 1998). La mayoría de micobacterias producen sideróforos que son esenciales para el metabolismo del hierro, como la micobactina o la exoquelina. Otra característica inherente a todo el género es el alto contenido de G+C (Guanina+Citosina) en su ADN, entre 61 y 71% (Lévy-Frébault y Portaels, 1992; Shinnick y Good, 1994). Aunque no forman estructuras de tipo fúngico, la denominación del género es debida al aspecto miceliar/filamentoso de las colonias de *M. tuberculosis*. Las principales especies patógenas del género incluyen *Mycobacterium avium*, *M. bovis*, *M. leprae* y *M. tuberculosis*.

Hasta el año 1980, el género estaba constituido por 41 especies (Skerman, 1980), pero el desarrollo de nuevas técnicas de tipado en la última década del siglo XX ha permitido incrementar este número. Por una parte se han empleado técnicas de tipado genético basadas en el estudio de regiones del genoma altamente conservadas, como el gen 16S rRNA o el gen *hsp65* (65-kDa *heat shock protein*). Por otra parte, se han realizado estudios del patrón de ácidos micólicos de la pared celular característico de cada especie mediante distintas técnicas cromatográficas (Tortoli, 2003). Actualmente se reconocen 165 especies (incluyendo subespecies) según el listado *Bacterial Nomenclature Up-to-Date* del DSMZ – Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, Braunschweig, Alemania). De modo análogo, los avances en materia de secuenciación genética han permitido completar el genoma de diversas especies de interés, como *M. tuberculosis*, *M. leprae* o *Map*.

Aunque citológicamente son Gram-positivos, las bacterias de este género no se tiñen bien mediante tinción de Gram a causa de que su pared celular es rica en lípidos, y especialmente en ceras constituidas por ácidos micólicos de 60-90 carbonos. Esta característica es la responsable de su resistencia a soluciones de ácido-alcohol, es decir, una vez que un colorante penetra en ellas es difícil decolorarlas (Wayne y Kubica, 1986). Esta propiedad permite identificarlos como bacilos ácido-

alcohol resistentes mediante el empleo de tinciones específicas, como la tinción de Ziehl-Neelsen (figura 1) o la tinción de Kinyoun (Collins, 2003).

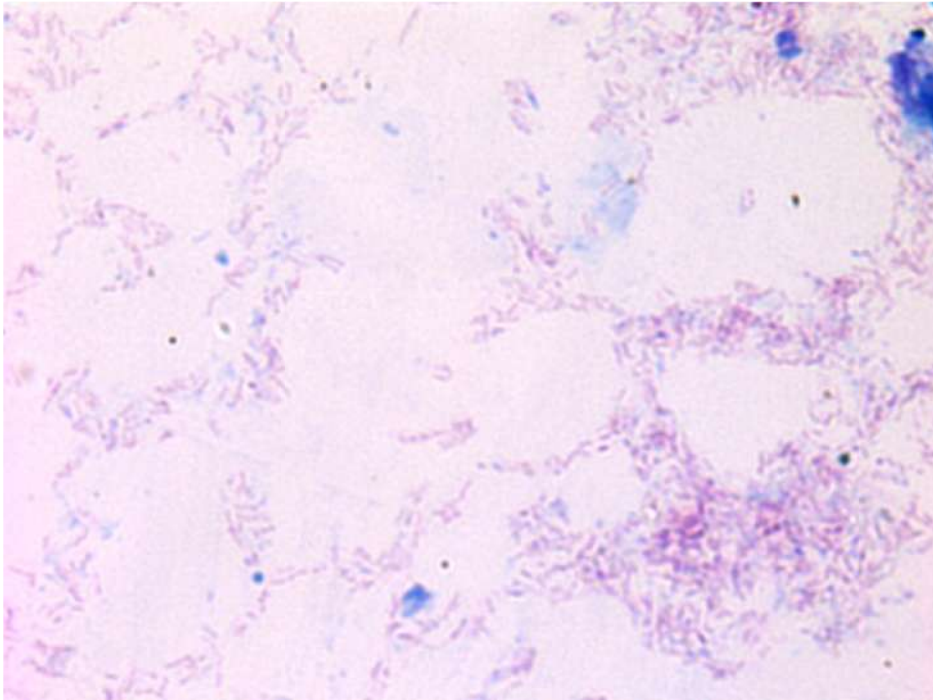


Figura 1. Tinción de Ziehl-Neelsen realizada directamente sobre una colonia de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*.

A modo de esquema, puede decirse que la pared celular micobacteriana está constituida por una capa externa y otra interna que rodean a la membrana plasmática. La capa externa está formada a su vez por lípidos y proteínas, que se asocian de forma libre a la pared celular. Entre los lipopolisacáridos de esta capa podemos señalar el lipoarabinomanano (LAM), lipomanano y también diversos lípidos tiocerolos. El LAM es un lipoglicano complejo de 17 kDa que atraviesa toda la envoltura celular y cuya composición difiere entre distintas especies (Daffé y Draper, 1997; Nigou *et al.*, 2003). Todos estos componentes representan la porción soluble de la pared celular y son los responsables de las funciones de interacción y relación entre el microorganismo y el medio. La capa interna de la pared celular está constituida desde el interior hacia el exterior por peptidoglicano (PG), arabinogalactano (AG) y ácidos micólicos (MA), unidos entre sí mediante enlace covalente formando un complejo denominado MA-AG-PG. Este complejo constituye la fracción insoluble de la pared y es responsable de mantener la estructura de la bacteria, además de ser el objetivo de la acción de gran número de agentes antimicrobianos empleados contra las micobacterias (Hett y Rubin, 2008). En la figura 2 se puede observar un esquema de la envoltura típica de este género.

El género *Mycobacterium* presenta unas tasas de crecimientos lentos muy características, con tiempos de generación entre 2-24h, y algunas especies (denominadas cromógenas) producen pigmentos carotenoides. Las micobacterias incluyen importantes patógenos humanos y animales, así como otras micobacterias saprófitas denominadas “atípicas” o “no tuberculosas” (Quinn *et al.*, 1994). Los miembros patógenos del género se caracterizan por su lento crecimiento en cultivo, con tiempos de generación entre 12 y 24 h, mientras que los miembros no patógenos se desarrollan considerablemente más rápido (Chacon *et al.*, 2004). Tradicionalmente las especies “atípicas” se han clasificado en base a características como la pigmentación, la morfología de las colonias y la tasa de crecimiento, según el esquema de grupos de Runyon (Runyon, 1959). Las especies escotocromógenas son aquellas que producen pigmentos amarillo-anaranjados tanto si se incuban en presencia de luz o en oscuridad, mientras que las especies fotocromógenas únicamente producen pigmentación si se exponen a la luz. Desde un punto de vista práctico, se definen como micobacterias de crecimiento lento aquellas que requieren de más de 7 días de incubación bajo condiciones óptimas para producir colonias visibles, mientras que las micobacterias de crecimiento rápido precisan menos de 7 días (Quinn *et al.*, 1994). En la tabla 1 pueden observarse las principales micobacterias capaces de producir enfermedad en animales, clasificadas según el esquema de Runyon (1959).

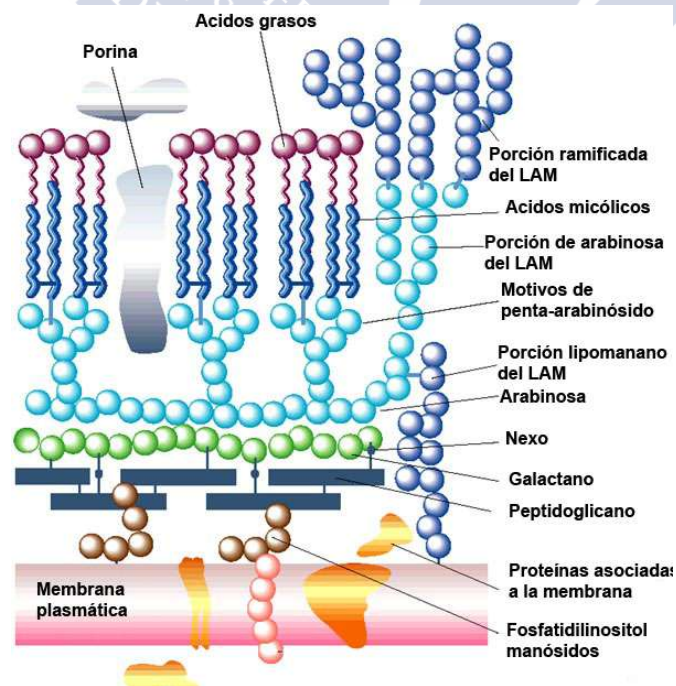


Figura 2. Esquema de la pared celular micobacteriana (adaptado de Park y Bendelac, 2000).

Tabla 1. Principales especies de micobacterias capaces de causar enfermedad en animales (adaptado de Quinn *et al.*, 1994).

Especie	Hospedador (es)	Importancia
<b>GRUPO TUBERCULOSIS: crecimiento lento</b>		
<i>M. africanum</i>	Humanos	Tuberculosis humana
<i>M. tuberculosis</i>	Humanos, perros, canarios y psitácidas	Tuberculosis humana
<i>M. bovis</i>	Muchas especies animales, humanos	Tuberculosis bovina
<i>M. microti</i>	Ratones de campo	Tuberculosis del ratón. Lesiones localizadas en conejos, cobayas y novillas
<b>GRUPOS DE RUNYON</b>		
<b>I. Micobacterias fotocromógenas: saprófitas de crecimiento lento (más de 7 días), rara vez provocan enfermedad</b>		
<i>M. kansasii</i>	Ciervo, cerdo, vacuno	Enfermedad similar a tuberculosis. Aislado de pulmón y nódulos linfáticos
<i>M. simiae</i>	Primates (humanos)	Aislado de nódulos linfáticos de primates sanos. Enfermedad pulmonar en humanos
<i>M. marinum</i>	Peces, mamíferos marinos y anfibios	Enfermedad similar a tuberculosis, enfermedad granulomatosa diseminada
<i>M. vaccae</i>	Saprófito	No patógeno
<b>II. Micobacterias escotocromógenas: saprófitas de crecimiento lento, muy ubicuo y común en pastos y praderas. Ocasionalmente producen enfermedad</b>		
<i>M. scrofulaceum</i>	Cerdo doméstico y salvaje, vacuno y búfalo	Lesiones tuberculosas en linfonódulos cervicales e intestinales
<b>III. Micobacterias no-cromógenas: crecimiento lento</b>		
<i>M. avium</i> subsp. <i>avium</i>	Aves de corral y salvajes	Tuberculosis aviar. Rara vez forma generalizada en mamíferos
	Cerdo	Lesiones en linfonódulos cervicales
	Caballo, cerdo y otras	Lesiones intestinales (raras)
<i>M. intracellulare</i>	Aves de corral y salvajes	Tuberculosis aviar. Saprófito del suelo y agua
	Cerdo y vacuno Primates (no humanos)	Puede estar presente en linfonódulos intestinales Enteritis granulomatosa (similar a paratuberculosis)
<i>M. ulcerans</i>	Gato	Lesiones cutáneas nódulo-ulcerativas
<i>M. xenopi</i>	Gato	Lesiones cutáneas nódulo-ulcerativas
	Cerdo	Lesiones tuberculosas en linfonódulos del tracto digestivo
<b>IV. Micobacterias de crecimiento rápido: necesitan menos de 7 días de incubación. Pigmentación variable. Saprófitas del suelo, agua y plantas. Normalmente se encuentran en el intestino de cerdo, rumiantes y otros animales. Ocasionalmente pueden ser patógenos.</b>		
<i>M. chelonae</i>	Peces	Lesiones granulomatosas diseminadas
	Tortuga	Lesiones similares a tuberculosis en pulmones
	Vacuno	Lesiones granulomatosas en linfonódulos
	Manatí, gato y cerdo	Abscesos y lesiones nódulo-ulcerativas en diversos tejidos
	Primates	Abscesos en linfonódulos o enfermedad diseminada



	Vacuno	Lesiones granulomatosas en linfonódulos y glándula mamaria
<i>M. fortuitum</i>	Gato	Lesiones cutáneas piogranulomatosas y ulcerativas
	Perro	Lesiones granulomatosas en piel y pulmones
	Cerdo	Granulomas en linfonódulos, articulaciones y pulmones
<i>M. phlei</i>	Gato	Lesiones nódulo-ulcerativas de piel (raras)
<i>M. smegmatis</i>	Vacuno	Mastitis granulomatosa
	Gato	Lesiones cutáneas ulcerativas

#### OTRAS MICOBACTERIAS

<i>M. avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i>	Vacuno, ovino, caprino y otros rumiantes	Paratuberculosis (enfermedad de Johne). Enfermedad intestinal crónica, progresiva que cursa con diarrea y emaciación
<i>M. lepraemurium</i>	Gatos y roedores	Lepra felina y murina respectivamente.
<i>M. leprae</i>	Humanos y armadillo de nueve bandas	Lepra en humanos. Replicación en armadillos.
Bacteria ácido-alcohol positiva sin identificar	Vacuno	Tuberculosis cutánea (linfangitis).

### 1.2.2. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA Y ANÁLISIS FILOGENÉTICO: EL COMPLEJO *MYCOBACTERIUM AVIUM*

*Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* pertenece al superreino *Bacteria*, división *Firmicutes*, clase *Actinobacteria*, subclase *Actinobacteridae*, orden *Actinomycetales*, suborden *Corynebacterinae*, junto a corinebacterias, nocardias y rodococos, de los que se separa en una familia (*Mycobacteriaceae*) muy homogénea en la que sólo se describe el género *Mycobacterium* spp. (Stackebrandt *et al.*, 1997). Dentro de éste, debemos destacar el denominado complejo *Mycobacterium avium* (MAC = *Mycobacterium avium* complex), que comprende varias especies de micobacterias de crecimiento lento de gran ubicuidad. El MAC incluye patógenos obligados de aves y del ganado, patógenos oportunistas del hombre así como organismos ambientales encontrados comúnmente en el agua y el suelo. Aunque en un principio el agente causal de la paratuberculosis fue considerado como una especie independiente, la taxonomía actual lo clasifica como *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, una subespecie patógena perteneciente al MAC.

Históricamente, la clasificación de los organismos del MAC se ha basado en caracteres fenotípicos, tales como características de crecimiento, fuente de aislamiento y virulencia en animales de experimentación (Turenne y Alexander, 2010). La designación de las subespecies de *M. avium* se determinó en un principio mediante estudios de hibridación ADN-ADN (Saxegaard y Baess, 1988; Thorel *et al.*, 1990) y análisis taxonómico numérico (Thorel *et al.*, 1990). Sin embargo, el actual

desarrollo de nuevas técnicas de biología molecular ha permitido un mejor conocimiento del MAC, así como el establecimiento de nuevas especies y subespecies. En la actualidad se reconocen tres subespecies de *M. avium*: *M. avium* subsp. *avium*, *M. avium* subsp. *silvaticum* y *M. avium* subsp. *paratuberculosis* (tabla 2). Cabe destacar la existencia de una cuarta designación no válida oficialmente, *M. avium* subsp. *hominissuis*, que permitiría separar cepas de origen humano y porcino de los aislados de origen aviar (Turenne y Alexander, 2010).

Como se ha comentado, la designación de especies en el grupo de micobacterias atípicas se ha basado tradicionalmente en características fenotípicas como la pigmentación, tiempo de generación, temperatura de crecimiento actividad bioquímica. El MAC está considerado como no pigmentado, aunque ciertas cepas pueden presentar pigmentación amarilla brillante y algunos cultivos envejecidos pueden desarrollar cierto tono amarillento. El MAC también puede presentar varias morfologías coloniales (lisas o rugosas) y crecer en un amplio rango de temperaturas y pH. Típicamente, se diferencia de otras especies del Grupo III (micobacterias no cromógenas de crecimiento lento) por ser positivo al test de telurito y negativo para la ureasa e hidrólisis de Tween (Kent y Kubica, 1985). Durante décadas se ha empleado el serotipado para la clasificación de las cepas de MAC, una técnica basada en la presencia de glucopeptidolípidos serovar-específicos (GPLs = glycopeptidolipids) (Brennan y Goren, 1979). Sin embargo, esta característica ha dejado de ser útil desde un punto de vista diagnóstico tras la aparición de mutantes GPL de *M. avium* y otros clones del MAC no serotipables. Además, los aislados de *Map* no producen GPLs y por lo tanto tampoco pueden ser serotipados (Belisle *et al.*, 1993; De Smet *et al.*, 1996). Se pueden emplear técnicas de HPLC de ácidos micólicos para diferenciar con éxito entre las especies del MAC (Butler *et al.*, 1992), pero la diferenciación de *Map* u otra subespecie de *M. avium* no es posible mediante esta técnica (Dei *et al.*, 1999).

Las técnicas modernas de biología molecular son menos subjetivas y más reproducibles que los esquemas de clasificación tradicionales, pero sus resultados parecen discrepar de las observaciones fenotípicas. A pesar de la similitud fenotípica de los aislados de MAC, existen estudios genéticos basados en el análisis de la región espaciadora interna transcrita 16S-23S (ITS1 = 16S-23S *internal transcribed spacer region*) que han revelado docenas de secuevares diferentes, señalando la existencia de otras especies del MAC diferentes de *M. avium* y *M. intracellulare* (Frothingham y Wilson, 1993; Mijs *et al.*, 2002). Sin embargo, este método no es capaz de discriminar entre los aislados de *Map* y las líneas de *M. avium* más comunes.

Tabla 2. Características de *Mycobacterium avium* y sus subespecies (Thorel *et al.*, 1990).

***Mycobacterium avium***

- Forma de bastón más o menos alargado
- Colonias lisas o rugosas
- La mayoría de las colonias son no fotocromógenas
- Crecimiento en más de 7 días a 37°C
- Puede requerir micobactina o medios especiales a base de huevo
- Crecimiento estimulado por pH 5,5 o piruvato
- No producen niacina, peroxidasa, nitrato reductasa, ureasa, arilsulfatasa, penicilinas ni  $\beta$ -glucosidasa
- No es capaz de hidrolizar el Tween 80 en 10 días
- Produce pequeñas cantidades de catalasa termorresistente
- Contiene micolato I, micolato IV y micolato VI
- Resistente a ácido tiopantano-2-carboxílico y a isoniacida
- Algunas cepas son sensibles a p-nitrobenzoato, ethambutol, pirazinamida, rifampicina y estreptomycin
- La mayoría de las cepas son sensibles a ansamicina
- Contenido de G+C 70%
- Subespecies basadas en la patogenicidad y el tipo de hospedador

***Mycobacterium avium subsp. avium***

- Colonias lisas y morfología cocobacilar
- Se encuentran frecuentemente en el ambiente
- Tuberculosis en pájaros y lesiones tuberculoideas en otros animales
- Infecciones pulmonares en personas adultas, adenopatías en niños e infecciones diseminadas en pacientes de SIDA
- Cepa tipo ATCC 25291

***Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis***

- Colonias rugosas y morfologías cocobacilar
- Carecen de fosfatasa alcalina
- Resistente a D-cycloserina y ansamicina
- Requiere micobactina para el crecimiento
- No aislado del ambiente
- Produce paratuberculosis en rumiantes y ha sido aislada en pacientes con enfermedad de Crohn
- Cepa tipo ATCC 19698

***Mycobacterium avium subsp. silvaticum***

- Colonias rugosas y morfología bacilar
- Incapaz de crecer en medios a base de huevo
- No requiere micobactina para el crecimiento
- Crecimiento estimulado por pH 5,5, pero no por el piruvato
- Sensible a p-nitrobenzoato y rifampicina
- No aislado del ambiente
- Produce tuberculosis en pájaros y paratuberculosis en rumiantes
- Cepa tipo CIP 103317

El gen rRNA de 16S ha sido utilizado ampliamente para la identificación bacteriana mediante secuenciación genética, incluido el género *Mycobacterium* (Rogall *et al.*, 1990). Los *primers*

universales presentan la capacidad de amplificar este gen virtualmente de cualquier aislado bacteriano, y la consiguiente secuenciación de las regiones hipervariables permite la identificación de las especies. Por medio de esta técnica, el descubrimiento de nuevas especies se ha incrementado de forma importante, de tal modo que dos tercios de las actuales especies de micobacterias han sido descritas en las últimas dos décadas. De forma análoga a la secuenciación del ITS1, las especies *M. avium* y *M. intracellulare* se diferencian de modo inequívoco mediante este método (Wayne *et al.*, 1996). No obstante, las 4 subespecies de *M. avium* poseen secuencias idénticas del gen rRNA de 16S, por lo que el empleo de esta técnica tampoco es útil en la identificación de *Map* (Figura 3; Turenne y Alexander, 2010).

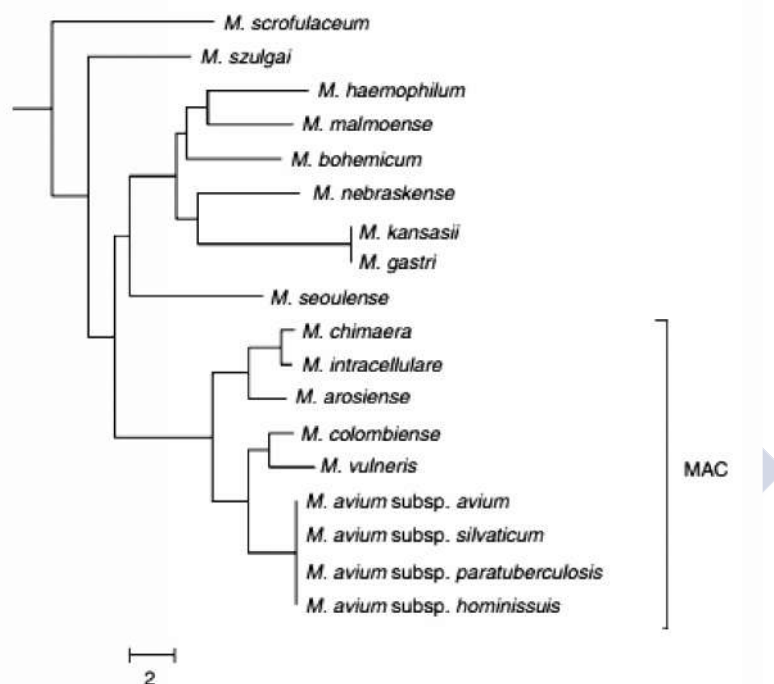


Figura 3. Reconstrucción filogénica del fragmento de  $\approx 1400$ bp del gen rRNA de 16S. Las especies señaladas (MAC) representan el subcluster que incluye las especies del complejo *Mycobacterium avium*. La escala representa el número de pares de bases de diferencia (Turenne y Alexander, 2010).

Como se ha visto, el empleo de análisis genéticos ha permitido confirmar que el MAC incluye otras especies diferentes de *M. avium* y *M. intracellulare*. En la última década se han establecido 4 nuevas especies pertenecientes al MAC en base a sus perfiles únicos de las secuencias ITS1 y del gen rRNA de 16S: *Mycobacterium chimaera* (Tortoli *et al.*, 2004), *Mycobacterium colombiense* (Murcia *et al.*, 2006), *Mycobacterium arosiense* (Bang *et al.*, 2008) y *Mycobacterium vulneris* (van Ingen *et al.*, 2009). Todas ellas son micobacterias de crecimiento lento y exhiben los perfiles típicos en HPLC propios del MAC. *M. vulneris* y *M. arosiense* son escotocromógenas (amarillas), mientras las otras son no cromógenas al igual que la mayoría del MAC. Estas nuevas especies son probablemente

menos comunes que *M. avium* o *M. intracellulare*, pero lo cierto es que todavía existe bastante desconocimiento acerca de su distribución.

Aunque los genes diana anteriormente mencionados permiten la identificación a nivel de especie de los organismos del MAC, ninguno de ellos puede discriminar entre las diferentes subespecies de *M. avium*. La identificación a nivel de subespecie precisa otro tipo de dianas, tales como las secuencias de inserción (IS = insertion sequence). Existe un esquema basado en tres IS (IS1245, IS901 e IS900) que ha sido empleado para definir las subespecies de *M. avium*: el fragmento IS901 sólo está presente en las cepas aviares (*M. avium* subsp. *avium* y *M. avium* subsp. *silvaticum*), el fragmento IS900 es específico de *Map*, y el fragmento IS1245 está ausente en *Map* pero se presenta en todas las demás subespecies (Ellingson *et al.*, 2000; Bartos *et al.*, 2006). Los métodos basados en hibridación de ADN (como por ejemplo el polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción, RFLP = Restriction Fragment Length Polymorphisms) que están dirigidos hacia estas secuencias diana pueden ser empleados para la identificación de las subespecies así como para el tipado de cepas. No obstante, las técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR = Polymerase Chain Reaction) basadas en la detección de estos IS deben utilizarse con precaución y deben ser verificadas mediante secuenciación del ADN, ya que pueden encontrarse elementos de inserción similares en microorganismos no pertenecientes al MAC (Turenne y Alexander, 2010).

Los avances experimentados en cuanto a los métodos de secuenciación genética han permitido mejorar la caracterización de las subespecies de *M. avium* y actualmente son capaces de identificar *Map* sin lugar a equívoco. La región de 441bp del extremo 5' del gen *hsp65* puede utilizarse para la identificación de micobacterias a nivel de especie (Telenti *et al.*, 1993), pero no diferencia de forma efectiva las distintas subespecies de *M. avium*. Por el contrario, el extremo 3' del gen *hsp65* permite diferenciar al mismo tiempo entre las diferentes subespecies y también entre los distintos subtipos asociados con el hospedador (Turenne *et al.*, 2006). De esta forma, *Map* está representado por dos secuevares, uno para las líneas de origen ovino (tipo I/III o tipo S, "Sheep") y otro para las líneas de origen bovino (tipo II o tipo C, "Cattle"). Otro secuevar engloba a los dos patógenos asociados a aves, esto es, *M. avium* subsp. *avium* y *M. avium* subsp. *silvaticum*. Se ha observado que *M. avium* subsp. *hominissuis* es más heterogéneo, con siete secuevares descritos, ninguno de los cuales están presentes en las demás subespecies. Recientemente se han descubierto polimorfismos de secuencia en otros genes, como *recF*, *lipT*, *pepB*, *rpoB* y *Map2698c* (Ben Salah *et al.*, 2008; Turenne *et al.*, 2008), los cuales permiten también diferenciar entre las subespecies de *M. avium*. Los polimorfismos presentes en las dianas *recF* y *lipT* permiten además diferenciar entre las líneas de origen ovino y bovino de *Map*, al igual que el gen *hsp65*. La combinación entre estas dianas y el uso de análisis de

secuencias multilocus (MLSA = Multilocus Sequence Analysis) ha permitido establecer las relaciones filogenéticas de todas las subespecies reconocidas de *M. avium*. En la figura 4 se puede observar que de la mezcla heterogénea de cepas oportunistas y ambientales que representa *M. avium* subsp. *hominissuis* surgen dos clones patógenos que han evolucionado de forma independiente: uno de ellos comprende a ambas subespecies aviarias (*M. avium* subsp. *avium* y subsp. *silvaticum*) y el otro incluye las cepas de *Map*, revelando además la existencia de ramas filogenéticamente diferenciadas para las líneas de origen ovino y bovino (Turenne *et al.*, 2008).

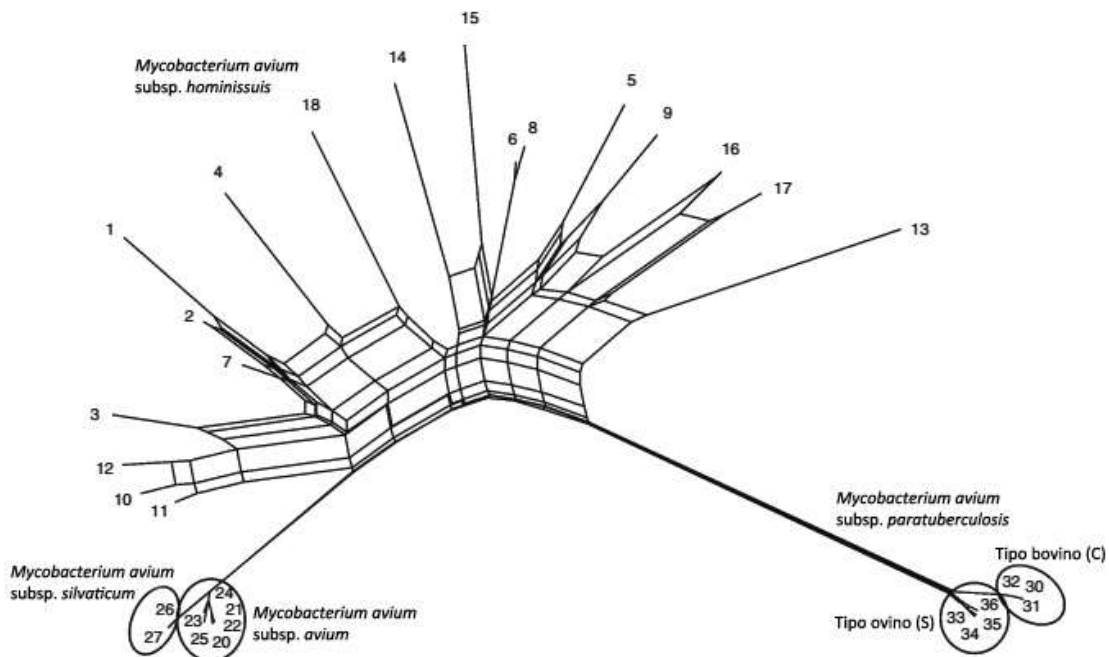


Figura 4. Separación filogenética de las subespecies de *M. avium* mediante MLSA (multilocus sequence analysis = análisis de secuencias multiloculares) (Turenne *et al.*, 2008).

### 1.2.3. MYCOBACTERIUM AVIUM SUBSP. PARATUBERCULOSIS

*Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* es un pequeño bacilo de 0,5 x 1,5  $\mu\text{m}$  que se encuadra dentro del complejo MAC y es el agente etiológico responsable de la paratuberculosis o enfermedad de Johne. Al igual que el resto de miembros del género, *Map* es un microorganismo ácido-alcohol resistente, aunque existen formas de pared deficiente o inexistente (esferoplastos) en las cuales esta premisa no se cumple (Chiodini *et al.*, 1986a) y que parecen desempeñar un papel de importancia en la patogenia de la enfermedad (Hulten *et al.*, 2000; Hines y Styer, 2003). En condiciones naturales, *Map* tiende a formar agregados de tipo nido o racimo, lo que obedece a la disposición que adoptan en el interior de los macrófagos en los que se multiplican (Thoen y

Muscoplat, 1979). En lo que respecta a las necesidades nutricionales, *Map* se comporta de manera similar al resto de especies del género. Aunque de modo general no precisan la adición de factores de crecimiento, compuestos como detergentes, triglicéridos, albúmina sérica bovina, ácido palmítico, ácido oleico y yema de huevo pueden potenciar su desarrollo. Un elemento esencial para el crecimiento de *Map* es el CO<sub>2</sub> (en forma de NaCO<sub>3</sub> o Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> añadido al medio de cultivo o en forma gaseosa), así como la biotina, cofactor necesario para la fijación del CO<sub>2</sub>. El glicerol y el piruvato son la fuente de carbono primaria, aunque puede emplear glucosa y otros azúcares. Otros compuestos que pueden utilizarse son los hidrocarburos, especialmente alcanos (con las excepciones del metano, olefinas e hidrocarburos cíclicos) y ácidos grasos derivados, así como alcoholes, cetonas y ácidos mono-, di- o tricarboxílicos. El citrato suele añadirse al medio en forma de citrato amónico férrico, pero no como fuente de energía sino como aporte de hierro. La fuente de nitrógeno de primera elección es la asparagina, si bien puede ser sustituida por glutamina, ácido aspártico, glutamato e incluso sales de amonio. En lo que respecta a las necesidades minerales, podemos diferenciar tres grupos en función de la cantidad necesaria (Ratledge, 1982):

- Macroelementos: potasio, magnesio, azufre y fósforo.
- Microelementos: hierro, zinc, manganeso y molibdeno.
- Oligoelementos: destacan aluminio, plata, cromo, cobalto y cobre entre otros. Este tipo de elementos suelen añadirse al medio como impurezas de otros constituyentes.

Tradicionalmente se han considerado la dependencia de micobactina (apartado 2.4) y la lentitud de crecimiento como características distintivas de *Map* a la hora de diferenciarlo de aislamientos de otras micobacterias (Merkal y Curran, 1974). Dentro del género, *Map* es la subespecie que presenta el crecimiento más lento, con tiempos de generación de alrededor de 20h, y que varían según el número de microorganismos presentes en el inóculo (Lambrecht *et al.*, 1988). Este elevado tiempo de generación parece ser consecuencia de la ausencia de una vía metabólica respiratoria (vía malato-vitamina K reductasa) que limitaría la capacidad de producir energía, aunque existe otra hipótesis alternativa que especula con la dificultad de paso del oxígeno y los nutrientes a través de la gruesa pared celular micobacteriana (Ratledge, 1982).

#### I.2.4. DEPENDENCIA DE MICOBACTINA

El hierro es un elemento esencial para el crecimiento de gran número de bacterias, y especialmente para las pertenecientes al género *Mycobacterium*. Para poder captar y emplear el hierro es necesario disponer en primer lugar de una fuente orgánica del mismo, así como de un sistema de transporte que permita introducirlo al interior de la célula. Es aquí donde entran en juego los sideróforos, que son compuestos proteicos quelantes de hierro. En el caso de las micobacterias existen dos sideróforos: las exoquelinas y las micobactinas. Las exoquelinas son pequeñas moléculas proteicas, hidrosolubles o liposolubles, que son liberadas al espacio extracelular en condiciones de escasez del metal, captando el hierro presente en el hospedador en forma de ferritina y transportándolo a través de la pared celular. A continuación se realiza el intercambio de hierro entre las exoquelinas y el otro sideróforo, la micobactina, que es la responsable última de mantener un depósito de hierro en el interior celular. Las micobactinas son compuestos liposolubles de elevado peso molecular del grupo de los hidroxamatos, y son producidas por las micobacterias en condiciones limitantes de hierro con el fin de transportar todo el que sea posible al interior del microorganismo. Debido a su estructura hidrofóbica, las micobactinas se encuentran incorporadas en la membrana celular.

La necesidad de micobactina para el crecimiento de *Map* en laboratorio ha sido descrita desde principios del siglo XX, cuando Twort e Ingram intentaron aislar el microorganismo sin éxito, llegando a la conclusión de que debía faltar algún nutriente esencial para el desarrollo de *Map*. Finalmente consiguieron solucionar el problema mediante la adición de extractos inactivados de *M. tuberculosis* al medio (Twort y Ingram, 1912). A partir de ese momento, empezaron a utilizarse de manera habitual extractos de *M. phlei* obtenidos por extracción y cultivo en medios con bajo nivel de hierro para el aislamiento de *Map* (micobactina P), aunque la purificación de la micobactina, el ingrediente clave para el crecimiento que contenían dichos extractos, no se logró hasta mediados del siglo XX (Francis *et al.*, 1953). En la actualidad la micobactina que se utiliza en los medios bacteriológicos se conoce como micobactina J, producida por una cepa específica de *Map* (cepa nº 18 del National Animal Disease Center, Estados Unidos) y purificada por vez primera en 1982. Esta micobactina permitió reducir los tiempos de incubación necesarios para la obtención de colonias visibles, así como conseguir el aislamiento de algunas cepas de *Map* que eran incultivables en medios suplementados con micobactina P (Merkal y McCullough, 1982). También se han descrito las concentraciones mínima y óptima de micobactina J necesarias para el aislamiento de *Map*, siendo 0,006µM y 1,2µM respectivamente (Lambrecht y Collins, 1992).



A lo largo del tiempo han surgido diferentes teorías para intentar explicar la dependencia de *Map* a la micobactina en condiciones de laboratorio. Se ha demostrado en diferentes estudios que *Map* puede desarrollarse en ausencia de micobactina si el medio contiene suficiente hierro y otros nutrientes disponibles (Merkal y Curran, 1974; Juste *et al.*, 1993; Aduriz *et al.*, 1995) y también se ha demostrado que posee la capacidad de sintetizar dicho compuesto (Merkal y McCullough, 1982; Barclay *et al.*, 1985). Según estos estudios, parece que la dependencia mostrada por *Map* se debe a una represión de la síntesis de micobactina (posiblemente derivada de su carácter parásito en el interior de macrófagos que le permite obtener directamente los nutrientes esenciales), más que a un defecto en la información genética que codifica dicha síntesis (Merkal y Curran, 1974). El hecho de que haya sido imposible detectar micobactina en tejidos afectados ayuda a sostener la hipótesis de que *Map* utiliza las propias proteínas quelantes del hospedador como fuente de hierro (Lambrecht y Collins, 1992). Se ha visto que la producción de micobactina depende de un grupo de 10 genes, denominado mtbA-J, que fue descrito por vez primera en *M. tuberculosis* (Quadri *et al.*, 1998). Al enfrentar este grupo de genes de *M. tuberculosis* con su homólogo de *Map*, se encontraron diferencias importantes en el tamaño del gen mtbA de *Map*, que es más corto (400 aminoácidos) en comparación con el de *M. tuberculosis* (565 aminoácidos) y el de *M. avium* (551 aminoácidos) (figura 5). Este gen es el que se supone responsable del inicio de la cascada de reacciones que conducen a la síntesis de la micobactina, y se cree en la posibilidad de que este truncamiento sea la razón por la cual la producción de micobactina está atenuada en *Map* (Li *et al.*, 2005).

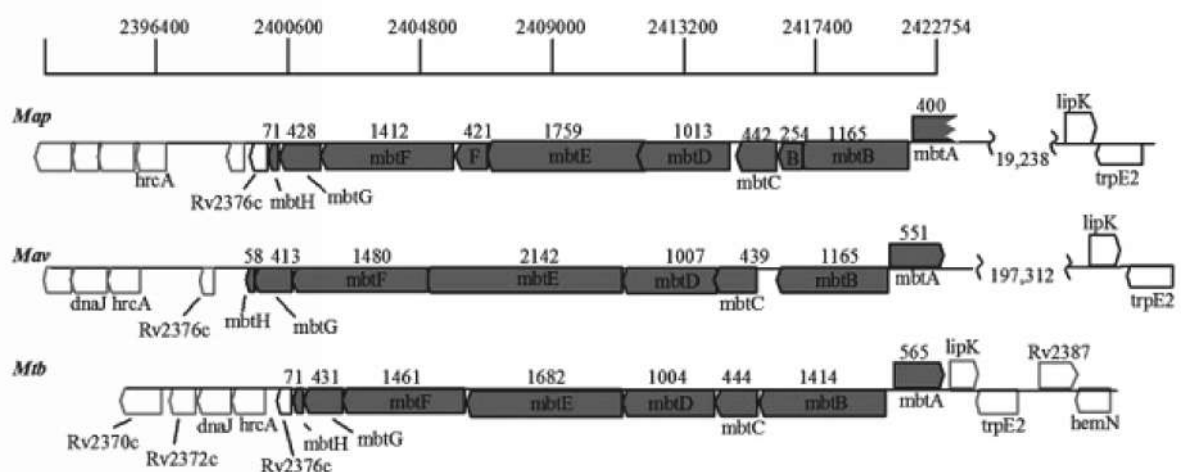


Figura 5. Comparación de la homología del cluster de genes de la micobactina entre *M. avium* subsp. *paratuberculosis*, *M. avium* subsp. *avium* y *M. tuberculosis* (el cluster es mostrado en gris, con la longitud de aminoácidos en la parte superior) (Li *et al.*, 2005).

### **I.2.5. PRINCIPALES ANTÍGENOS DE INTERÉS INMUNOLÓGICO**

La necesidad de desarrollar herramientas inmunológicas específicas para el diagnóstico y prevención de la paratuberculosis requiere obligatoriamente la búsqueda de antígenos específicos de *Map*. Los primeros antígenos utilizados para este fin fueron mezclas como la Johnina o los preparados de antígeno protoplasmático (PPA = Protoplasmic Antigen). Durante las últimas décadas se han evaluado varios tipos de estos preparados antigénicos, y se han empleado extensamente para el serodiagnóstico de la enfermedad de Johne (Nielsen y Toft, 2008). Estos extractos micobacterianos no purificados y preparaciones fraccionadas contienen de forma natural una multitud de antígenos diferentes. Este hecho se traduce en un problema de especificidad de los actuales test serológicos, ya que estos extractos crudos contienen una mezcla de proteínas de *Map* junto con abundantes polisacáridos antigénicos (predominantemente arabinomanano y arabinogalactano). Debido a que estos componentes se han conservado entre los integrantes del género *Mycobacterium*, los ensayos serológicos basados en estas preparaciones presentan numerosos fenómenos de reacciones cruzadas (Osterstock *et al.*, 2007). Al principio de los años 90 se estimaba que los ELISAs comerciales que emplean antígenos como el PPA o el LAM presentaban una sensibilidad de alrededor de 60%, pero estudios más recientes han demostrado que dicha sensibilidad no supera el 15-20% (Whitlock *et al.*, 2000; Nielsen and Toft, 2008; Shin *et al.*, 2008). Cabe destacar que la mayoría de estos trabajos evaluaron la sensibilidad del ELISA frente al aislamiento mediante cultivo fecal (considerado el test de referencia), con lo cual este hecho podría estar reflejando la mejora de la sensibilidad del cultivo fecal lograda durante la década de los 90 en lugar del aparente descenso de la sensibilidad del ELISA.

#### **I.2.5.1. Antígeno protoplasmático (PPA)**

El PPA es en realidad una mezcla cruda de antígenos que se obtiene mediante disrupción física de las micobacterias seguida de la retirada de los restos celulares y los componentes de la pared micobacteriana siguiendo un protocolo de ultracentrifugación, filtración y deslipidación (Beam *et al.*, 1969). Otros investigadores han preparado PPA simplemente mediante sonicación y posterior retirada de las partículas más grandes e insolubles mediante centrifugación. Es por esta razón que el PPA también recibe el nombre de antígeno sonicado (Waters *et al.*, 2003; Bannantine *et al.*, 2008) o extracto celular (Cho *et al.*, 2006). A pesar de las diferencias entre los protocolos de preparación, es probable que el PPA contenga la inmensa mayoría de las proteínas solubles asociadas a la célula.

En 1983 se desarrolló el primer ELISA basado en este preparado antigénico (Yokomizo *et al.*, 1983), y desde entonces ha sido utilizado en numerosos kits comerciales de ELISA. En estudios posteriores, se descubrió la existencia de falsos positivos causados por reacciones cruzadas, así como

que la preabsorción de los sueros con *Mycobacterium phlei* reducía estos falsos positivos (Yokomizo *et al.*, 1985). Es de destacar que este paso de preabsorción todavía se emplea en buena parte de los tests de ELISA actuales (Shin *et al.*, 2008). Sin embargo, la existencia de reacciones cruzadas parece en principio inevitable debido al gran número de proteínas citosólicas que presenta el preparado y que participan en procesos bioquímicos bien conservados genéticamente entre las diferentes especies y subespecies (Bannantine *et al.*, 2010).

#### **I.2.5.2. Antígenos obtenidos a partir de filtrados de cultivos**

Los preparados antigénicos obtenidos a partir de filtrados de cultivos (CF = culture filtrate) se han utilizado también como fundamento para herramientas diagnósticas. Este es el caso de los derivados proteicos purificados (PPD = purified protein derivative), y que son preparados antigénicos producidos a partir del filtrado de cultivos envejecidos y que se emplean como reactivo fundamental en la evaluación de la respuesta inmune celular en infecciones micobacterianas. Estos preparados son los antígenos de elección para el test gamma-interferón (Stabel y Whitlock, 2001; Stabel *et al.*, 2007) y también para las pruebas de intradermorreacción (Robbe-Austerman *et al.*, 2007). Históricamente, la tuberculina PPD se obtenía a partir de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* cultivadas durante largos periodos de tiempo, retirando los bacilos enteros del medio mediante centrifugación, y sometiendo el sobrenadante a calentamiento, filtrado y por último precipitación del mismo con ácido tricloroacético (Lachmann, 1988). En el caso de *Map*, el preparado PPD se denomina Johnina, y presenta el inconveniente de que su preparación es difícil de estandarizar, por lo que existe una gran variabilidad entre la potencia inmunogénica de los diferentes PPDs. De hecho, cada laboratorio que produce PPD utiliza diferentes cepas de *Map*, por lo que se han realizado estudios con el fin de caracterizar la diversidad genética de estas cepas como paso previo a la estandarización (Semret *et al.*, 2006). En estos estudios observaron que algunas de las cepas empleadas para la producción de Johnina PPD presentan una importante delección que comprende alrededor de siete genes, lo que podría estar en relación con la baja potencia inmunogénica observada con estos preparados. De cualquier manera, se cree que la variabilidad en la potencia de los preparados de Johnina PPD no depende únicamente de las diferentes cepas de partida, sino también del método de preparación, de por sí diferente del empleado en la preparación de tuberculina PPD (Bannantine *et al.*, 2010).

Dos grupos de investigación independientes han realizado recientemente importantes avances en la identificación de proteínas de CFs y su posible potencial como antígenos para diagnóstico. Leroy *et al.* (2007) fueron los primeros en analizar proteínas de CFs de *Map* cultivados en medio Sauton. En

base a los resultados obtenidos, este grupo de investigación concluyó que un cocktail de 5 de estas proteínas presentaba una sensibilidad diagnóstica muy similar al de un test ELISA comercial basado en PPD's. El segundo grupo de investigación (Cho y Collins, 2006) preparó un extracto celular (PPA) y un CF a partir de la cepa JTC303 de *Map*, cultivándola en un caldo modificado Watson-Reid. Posteriormente se evaluó la reactividad frente a anticuerpos de ambas preparaciones utilizando un panel de sueros de ganado vacuno infectado con *Map* y ganado vacuno no infectado. De los dos ELISAs diseñados para el estudio, el preparado a partir del CF (denominado JTC-ELISA) demostró ser más sensible que el preparado a partir del extracto PPA. En un estudio posterior, se comparó la sensibilidad diagnóstica del JTC-ELISA frente a 5 ELISAs comerciales utilizando un total de 856 sueros bovinos (Shin *et al.*, 2008). La sensibilidad demostrada por el JTC-ELISA (56,3%) fue significativamente mayor que la de cualquiera de los 5 ELISAs comerciales (28-44,5%). Además, el JTC-ELISA mostró una sensibilidad muy superior (40%) a la de los otros 5 ELISAs (20%) en aquellas muestras de vacuno que presentaban bajos niveles de eliminación fecal de *Map*. De modo general, todos estos datos sugieren que las proteínas de secreción de *Map* albergan en su conjunto algunos antígenos de interés para el desarrollo de pruebas basadas en la inmunidad humoral. Este grupo de investigación ha continuado su trabajo definiendo algunos de estos antígenos presentes en el CF, logrando identificar 14 proteínas con valor diagnóstico potencial, como *Map*1569 (ModD), *Map*3527 (PepA), *Map*3531c (antígeno 85C), *Map*1693c, *Map*2168c y *Map*1022c (Cho *et al.*, 2006). Curiosamente, la más antigénica de las 14 proteínas resultó ser ModD, que había sido identificada previamente como una proteína de unión a la fibronectina (FAP = fibronectin attachment protein) que interviene en la captación del patógeno por las células M del epitelio intestinal (Secott *et al.*, 2001, 2002, 2004).

### **I.2.5.3. Antígenos de superficie**

En 1995, un grupo de investigación empleó una técnica de citometría de flujo para demostrar que los anticuerpos presentes en el suero de bovinos infectados por *Map* se unían a la superficie de *Map*, pero no a la de otras especies micobacterianas. Esta observación parecía apuntar al hecho de que *Map* posee antígenos únicos en su superficie externa. Además, los complejos de unión *Map*-anticuerpos eran detectados en infecciones naturales en bovino varios meses antes que el diagnóstico a partir de cultivo fecal o a partir de tests comerciales de ELISA. La sensibilidad y especificidad empírica diagnóstica de este nuevo ensayo fue estimada en 95,2 y 96,7% respectivamente. Estos datos sugerían que sería posible desarrollar un test de diagnóstico basado en la detección de estos anticuerpos específicos que permitiese identificar la infección por *Map* en etapas más tempranas (Eda *et al.*, 2005). En un estudio posterior, los mismos investigadores descubrieron que una solución al 80% de etanol era el disolvente más efectivo que permitía extraer

estos antígenos de superficie que reaccionaban de manera específica con sueros de vacuno infectado por *Map*. Se desarrolló un ELISA utilizando esta extracción realizada con etanol y se le denominó EVELISA por el método de obtención (EVELISA = Ethanol Vortex ELISA). Este test mostró una interesante mejora sobre el ensayo de citometría de flujo, con una sensibilidad y especificidad empírica diagnóstica de 100 y 96,9% respectivamente (Eda *et al.*, 2006). Los antígenos obtenidos mediante extracción con etanol fueron posteriormente separados mediante el método de lavado de Folch y precipitación con acetona, obteniendo 3 fracciones: acuosa, interfase y cloroformo. Cada una de ellas mostró reactividad frente a sueros de bovinos infectados, pero sin embargo, la sensibilidad empírica de cada fracción fue menor que la obtenida con el EVELISA. Este hallazgo parece indicar que para mantener la alta sensibilidad del test es necesario el repertorio completo de antígenos presentes en el extracto de etanol. En cuanto a la identificación de los compuestos presentes en la preparación, los datos existentes sugieren que contiene predominantemente carbohidratos y lípidos, y una pequeña, pero importante, fracción proteica (Bannantine *et al.*, 2010).

#### **1.2.5.4. Antígenos lipídicos**

Todos los miembros del género *Mycobacterium* expresan componentes lipídicos complejos en su pared celular. Algunos de los más estudiados son los glucopeptidolípidos, lípidos de superficie que consisten en un núcleo lipopeptídico N-enlazado a ácidos grasos de cadena larga y O-enlazado a mono- y oligosacáridos. Esta fracción de azúcares es antigénica, y como se menciona en el apartado 2.2, ha sido la base empleada en la diferenciación de los 28 serovares del MAC (Brennan y Goren, 1979; Chatterjee y Khoo, 2001). Sin embargo, mientras que los GPLs pueden representar más del 70% de los lípidos expresados en la superficie de aislados de *M. avium*, la inspección del genoma de referencia de *Map* ha revelado la deficiencia en éste de los genes responsables de la biosíntesis de GPL (Biet *et al.*, 2008). Curiosamente, cepas ovinas de *Map* poseen los genes necesarios para sintetizar GPL (Paustian *et al.*, 2008), aunque todavía no se ha determinado si estas cepas producen GPLs realmente.

El LAM (apartado 2.1) es un lipoglicano de la pared celular que ha sido descrito en numerosas especies de micobacterias (Nigou *et al.*, 2003). Este compuesto es capaz de producir una fuerte respuesta inmune humoral (Waters *et al.*, 2003) y, de la misma manera que los PPA, se ha utilizado como antígeno en tests comerciales de diagnóstico de paratuberculosis. Sin embargo, también presenta el inconveniente de ser un compuesto altamente conservado filogenéticamente entre las especies del género. En una revisión reciente se comprobó que la sensibilidad de los tests ELISA que usaban LAM como antígeno (LAM-ELISA) era comparable a la descrita para los PPA-ELISA (Nielsen y

Toft, 2008). Sin embargo, el antígeno LAM presenta una ventaja importante sobre los preparados PPA, ya que se trata de una molécula purificada y bien caracterizada desde un punto de vista bioquímico, y por lo tanto se presta con mayor facilidad a la realización de controles de calidad en su producción.

Otros antígenos lipídicos incluyen el Para-LP-01 y el lipopentapéptido. El primero es un lipopéptido de la pared celular de *Map* y que ha demostrado ser específico e inmunogénico a nivel de subespecie en base a un ensayo ELISA que utilizaba este lípido como antígeno (Eckstein *et al.*, 2006). Lamentablemente, el Para-LP-01 no se sintetizaba en cantidad suficiente como para permitir una posterior validación. El segundo lípido, denominado lipopentapéptido, también demostró ser específico de cepas de *Map* (Biet *et al.*, 2008). Este grupo realizó una comparación entre este lipopentapéptido y PPD de *Map* mediante ELISA, describiendo una sensibilidad similar para ambos pero una mayor especificidad para el lípido. Además, al sintetizar de manera individual los diferentes núcleos del lipopentapéptido, pudieron determinar que el núcleo peptídico era fuertemente inmunógeno, mientras que el núcleo lipídico apenas presentaba reactividad (Biet *et al.*, 2008).

### 1.2.6. CARACTERIZACIÓN GENÓMICA

El hecho de poder disponer actualmente del genoma completo de *Map* está permitiendo el estudio de las bases genéticas de la virulencia y fisiología de este patógeno, y posibilita además el desarrollo de herramientas diagnósticas de nueva generación para el diagnóstico de la paratuberculosis. La era post-genómica de la investigación en *Map* comenzó en 2005 con la publicación de la secuenciación del genoma completo de la cepa de origen bovino K-10, aislada en un rebaño lechero de Wisconsin por investigadores del Departamento de Agricultura del National Animal Disease Center (NADC) de Estados Unidos a mediados de los años 70 (Li *et al.*, 2005). Este estudio mostró una secuencia circular única de 4.829.781 pares de bases, con un contenido de G+C del 69,3%, una proporción relativamente elevada pero similar al de otras micobacterias (tabla 3). Originariamente, se describieron en el genoma de *Map* K-10 un total de 4.350 marcos de lectura abiertos (ORF = Open Reading Frames), 45 tRNAs y un operón rRNA (Li *et al.*, 2005), aunque estudios posteriores de la secuencia genómica han aumentado la cifra hasta un total de 4.587 genes (Paustian *et al.*, 2010). La realización de análisis *in silico* mostró que más de 3.000 genes presentaban homólogos en *M. tuberculosis*, así como 161 regiones genómicas únicas de *Map* no descritas hasta el momento en ninguna otra especie (Li *et al.*, 2005).

Tabla 3. Especies del género *Mycobacterium* de las que se ha secuenciado su genoma completo (Paustian *et al.*, 2010).

Genomas completos	Tamaño	%G+C	Código de acceso
<i>Mycobacterium abscessus</i>	5,12	64,1	NC_010397.1
<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>hominissuis</i> 104	5,5	69	NC_008595.1
<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i>	4,8	69,3	NC_002944.2
<i>Mycobacterium bovis</i> AF2122/97	4,35	65,6	NC_002945.3
<i>Mycobacterium bovis</i> BCG str. Pasteur 1173P2	4,4	65,6	NC_008769.1
<i>Mycobacterium gilvum</i> PYR-GCK	5,96	67,7	NC_009338.1
<i>Mycobacterium leprae</i> TN	3,27	57,8	NC_002677.1
<i>Mycobacterium marinum</i> M	6,62	65,7	NC_010612.1
<i>Mycobacterium smegmatis</i> str. MC2 155	7	67,4	NC_008596.1
<i>Mycobacterium</i> sp. JLS	6	68,4	NC_009077.1
<i>Mycobacterium</i> sp. KMS	6,22	68,2	NC_008705.1
<i>Mycobacterium</i> sp. MCS	5,92	68,4	NC_008146.1
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> CDC1551	4,4	65,6	NC_002755.2
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> F11	4,4	65,6	NC_009565.1
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Ra	4,4	65,6	NC_009525.1
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv	4,4	65,6	NC_000962.2
<i>Mycobacterium ulcerans</i> Agy99	5,6	65,5	NC_008611.1
<i>Mycobacterium vanbaalenii</i> PYR-1	6,5	67,8	NC_008726.1

G+C: Guanina + Citosina.

El 91,5% del genoma de *Map* K-10 corresponde secuencias de codificación de proteínas. Los análisis mostraron que un 60% de las proteínas codificadas en el genoma de *Map* eran homólogas a otras proteínas microbianas de función conocida, y otro 25% eran homólogas a otras proteínas de función hipotética. Sin embargo, también se identificaron 39 proteínas únicas de *Map* que no presentaban homólogos descritos en ninguna de las bases de datos existentes hasta el momento (Li *et al.*, 2005).

#### I.2.6.1. Secuencias de inserción (IS)

Las secuencias de inserción son pequeños fragmentos de DNA que actúan como elementos de intercalado, es decir, contienen genes relacionados únicamente con funciones de inserción, y que están distribuidas a lo largo del genoma de organismos procarionas (Green *et al.*, 1989). En el caso de *Map*, un 1,5% de su genoma (72,2 Kb) se corresponden con estas secuencias, habiéndose encontrado 19 IS diferentes con un total de 58 copias (Li *et al.*, 2005). A continuación se describen las más importantes:

- **IS900:** fue la primera IS descrita e identificada en *Map*. Es una secuencia de 1451 pb que se encuentra distribuida en un total de 15 a 20 copias en el genoma de *Map* (McFadden *et al.*, 1987; Green *et al.*, 1989), siendo su número de 17 copias en el genoma de referencia K-10.

Esta IS ha sido empleada como secuencia diana en el diagnóstico e identificación de *Map* mediante diferentes técnicas moleculares (Turenne *et al.*, 2008), tales como PCR múltiple (Bull *et al.*, 2000; Irenge *et al.*, 2009), PCR anidada (Englund *et al.*, 2001; Ikonopoulou *et al.*, 2004; Möbius *et al.*, 2008) y PCR a tiempo real (Englund *et al.*, 2001; Fang *et al.*, 2002), entre otras.

- **IS1311:** otra IS que se presenta en 7 copias en el genoma de *Map* K-10 (Li *et al.*, 2005), y que se caracteriza por poseer un 85% de homología con la IS1245 (Whittington *et al.*, 1998), aunque ésta última no está presente en el genoma de *Map* (Johansen *et al.*, 2005). Esta secuencia ha sido utilizada para la tipificación de aislados de *Map* mediante PCR-REA (restriction enzyme analysis = análisis de enzimas de restricción), debido a una mutación altamente conservada de la posición 223 de la misma (Motiwala *et al.*, 2004; Singh *et al.*, 2009; Kumar *et al.*, 2010).
- **ISMav2:** esta secuencia presenta 3 copias en el genoma de *Map* (Li *et al.*, 2005). A pesar de que en un primer momento se creyó que era específica de *Map* (Strommenger *et al.*, 2001), un trabajo reciente demostró la amplificación de esta secuencia en otras micobacterias como *M. fortuitum* y *M. smegmatis*, así como en dos especies no pertenecientes al género, reduciendo su aplicabilidad como diana para la detección específica de *Map* (Möbius *et al.*, 2008).
- **ISMpa1:** secuencia presente en *Map* en 3 copias, con un tamaño de 1500 pb y un único ORF que codifica para una trasposasa (Olsen *et al.*, 2004). Esta IS fue también identificada en aislados de *M. avium* subsp. *hominissuis*, demostrando no ser específica de *Map* (Olsen *et al.*, 2004; Johansen *et al.*, 2007).
- **IS\_MAP02 e IS\_MAP04:** descubiertas a raíz de la secuenciación del genoma de *Map* K-10. Estas nuevas secuencias se distribuyen en 6 y 4 copias, respectivamente, y en un primer momento se creyó que eran específicas de *Map* (Li *et al.*, 2005). No obstante, estudios posteriores han revelado, en el caso de IS\_MAP02, la existencia de un 80% de homología con IS presentes en *M. vanbaalenii* y *M. gilvum*, si bien las IS de estos microorganismos presentan una delección de aproximadamente 100 pb en relación con IS\_MAP02. En lo que respecta a IS\_MAP04, ha resultado ser idéntica en un 80% a IS descritas en los genomas de *Mycobacterium* sp. KMS, *Mycobacterium* sp. MCS, *M. avium* subsp. *hominissuis* 104, *M. smegmatis*, *M. gilvum* y *Rhodococcus jostii* (Paustian *et al.*, 2010).



### I.2.6.2. Genes únicos

El genoma de *Map* contiene varios genes que no han sido descritos en ningún otro microorganismo según las actuales bases de datos. Muchas de estas secuencias únicas están agrupadas juntas, y algunas están incluidas en secuencias relacionadas con fagos, lo que indica el posible modo en el que fueron adquiridas. Actualmente varios grupos de investigación están trabajando en determinar si estos genes codifican para proteínas capaces de producir una respuesta inmune, ya que la naturaleza única de estas secuencias puede conducir al descubrimiento de nuevas dianas diagnósticas o nuevos factores de virulencia (Paustian *et al.*, 2010). Así mismo, el hecho de que sean elementos únicos del genoma de *Map* dota de una gran especificidad a las técnicas de diagnóstico e identificación que se basan en ellas. No obstante, debido a que la mayoría se presentan en una única copia en todo el genoma, se ha discutido acerca de que la sensibilidad diagnóstica pudiese ser menor en relación a la de otros tests basados en dianas moleculares con mayor número de copias, como el IS900 (Collins *et al.*, 1989; Green *et al.*, 1989). Algunas de estas secuencias sobre las que más se ha investigado se describen a continuación:

- **F57:** secuencia de 620 pb con un contenido en G+C de 58,9% de la que únicamente existe una copia en todo el genoma de *Map* (Poupart *et al.*, 1993). Desde su descubrimiento, esta secuencia ha sido empleada para el desarrollo de diversas técnicas de PCR (Coetsier *et al.*, 2000; Vansnick *et al.*, 2004; Tasara y Stephan, 2005; Herthnek y Bölske, 2006; Möbius *et al.*, 2008), aplicándose estos ensayos para la detección de *Map* en muestras de diversa naturaleza, como heces (Herthnek y Bölske, 2006; Irengue *et al.*, 2009; Kralik *et al.*, 2011), tejidos (Coetsier *et al.*, 2000; Bosshard *et al.*, 2006), leche y derivados (Tasara y Stephan, 2005; Bosshard *et al.*, 2006; Stephan *et al.*, 2007; Slana *et al.*, 2009). Esta secuencia presenta una elevada especificidad en la identificación de *Map*, y su sensibilidad es comparable a otras técnicas de PCR como las basadas en la secuencia IS900, demostrando que la sensibilidad parece en principio más dependiente de los *primers* escogidos para el ensayo que del hecho de que únicamente exista una copia en todo el genoma (Vansnick *et al.*, 2004; Möbius *et al.*, 2008).
- ***hspX*:** gen presente en el genoma de *Map* en una única copia, y que presenta una porción de 30 pb específica a nivel de subespecie que permite distinguir entre *Map* y otras subespecies del MAC (Ellingson *et al.*, 1998). Dicha secuencia ha sido empleada en diversos estudios para la identificación y diferenciación de *Map* (Enosawa *et al.*, 2003; Brey *et al.*, 2006; Clark *et al.*, 2006). Además, este gen codifica para una proteína de igual nombre,

siendo la primera en describirse e identificarse en el interior de macrófagos infectados (Bannantine y Stabel, 2000).

- **Loci 251 y 255:** estos genes se describieron en un estudio de secuenciación parcial del genoma de *Map*, demostrando además ser específicos del mismo (Bannantine *et al.*, 2002). Ambas dianas moleculares han sido empleadas en el desarrollo de técnicas de PCR para la identificación de *Map* en varios estudios (Motiwala *et al.*, 2003, 2004; Möbius *et al.*, 2008).

### I.2.6.3. Factores de virulencia

Se han asociado como factores de virulencia:

- **Proteínas PE/PPE:** denominadas de esta forma por los aminoácidos de sus dominios terminales, siendo éstos respectivamente prolina-ácido glutámico y prolina-prolina-ácido glutámico. Esta familia de proteínas son factores de virulencia originalmente identificados en *M. tuberculosis* (Cole *et al.*, 1998), y han sido descritos únicamente en bacterias de este género, comprendiendo desde un 1% del genoma en el caso de *Map* (Li *et al.*, 2005) hasta casi un 10% en el de *M. tuberculosis*. La secuenciación del genoma *Map* K-10 ha identificado un total de 10 proteínas PE y 37 PPE, 18 de las cuales son específicas de *Map* (Li *et al.*, 2005; van Pittius *et al.*, 2006). Entre las funciones hipotéticas de estas proteínas se incluyen unión a la célula huésped, variación antigénica, inhibición del procesado de antígenos, supervivencia en macrófagos y captación de hierro. Los genes que codifican estas proteínas presentan con frecuencia polimorfismos de secuencia, y se cree que dichas proteínas son expresadas en la superficie celular (Fleischmann *et al.*, 2002). Estudios experimentales demostraron que un mutante de *M. avium* subsp. *hominissuis* carente del gen PPE homólogo a *Map1505* era incapaz de desarrollarse en el interior de macrófagos (Li *et al.*, 2005), y otros análisis posteriores de las proteínas PPE de *Map* evidenciaron que *Map3420c* y *Map1506* se expresan en la superficie celular y además son inmunogénicas en ganado vacuno (Newton *et al.*, 2009). Además, las mutaciones puntuales (SNP = single polymorphism nucleotide) existentes en *Map1506* permiten también diferenciar entre los diferentes subtipos de *Map* (Griffiths *et al.*, 2008).

El análisis comparativo entre las familias de genes PE/PPE de los diferentes genomas micobacterianos conocidos demuestra que estas secuencias están altamente conservadas desde el punto de vista evolutivo (van Pittius *et al.*, 2006). Además del papel fundamental que juegan estas proteínas en la patogénesis de la enfermedad, algunos de estos genes han

sido empleados como diana para la detección e identificación del microorganismo (Mackenzie *et al.*, 2009; Deb y Goswami, 2010; Bannantine *et al.*, 2011).

- **Genes *mce* (mammalian cell entry = entrada a células mamíferas):** el genoma de *Map* contiene muchos homólogos de los genes *mce*, descritos por primera vez en *M. tuberculosis* y que presentan una gran importancia en la virulencia y la supervivencia de las micobacterias en el interior de los macrófagos (Arruda *et al.*, 1993; Gioffré *et al.*, 2005). El genoma de *Map* codifica un total de 62 proteínas *mce*, mientras que el genoma de *M. tuberculosis* únicamente contiene 32. Estas secuencias se agrupan en 8 operones distribuidos por todo el genoma de *Map* K-10, y comparten ciertas características con los sistemas de transporte basados en unión con ATP. Las micobacterias medioambientales no patógenas también poseen genes *mce*, lo que puede significar que esta familia de genes se originó como parte del sistema de transporte y más tarde se adaptó con el fin de facilitar la invasión celular. En base a esto se cree que los genes *mce* de las micobacterias patógenas juegan un importante papel en la modulación de la envoltura celular (Casali y Riley, 2007).

## I.2.7. RESISTENCIA

*Map* es un patógeno parásito obligado de mamíferos que únicamente puede crecer y multiplicarse de forma natural en el interior de los macrófagos de un hospedador susceptible. No es un microorganismo de vida libre, es decir, capaz de desarrollarse en el medio ambiente, a diferencia de otras micobacterias ambientales que sí poseen esta aptitud, y esto se debe fundamentalmente a su incapacidad para producir micobactina y, en consecuencia, su incapacidad de incorporar hierro del medio. Cuando *Map* se encuentra en muestras ambientales como suelo, agua, etc. se asume que simplemente persiste en dichos medios, después de que éstos hayan sido contaminados por un animal infectado mediante eliminación del patógeno, principalmente a través de las heces (Collins, 2003). Cualidades inherentes de *Map*, tales como su baja actividad metabólica y la protección que le confiere su gruesa pared celular, hacen de ella una bacteria extremadamente resistente a condiciones adversas (Ratledge, 1982).

### I.2.7.1. Supervivencia en agua

La supervivencia de *Map* en aguas de diferente naturaleza es elevada. Estudios realizados con agua de estanque esterilizada mantenida a temperatura ambiente, a la que posteriormente se inocularon diferentes cantidades de *Map*, demuestran que el microorganismo persiste hasta un máximo de 9 meses (Lovell *et al.*, 1944). En otro estudio realizado con agua corriente de consumo, se

inoculó el agente en muestras con diferente pH manteniéndolas en oscuridad a 38°C, observándose una persistencia de 17 meses para muestras con pH neutro y de 14 meses para muestras con pH ácido (5,0) y alcalino (8,5) (Larsen *et al.*, 1956). Un estudio más reciente ha logrado resultados muy similares: tras la inoculación de  $10^6$  células de *Map*/ml en agua destilada (pH 7,2), la recuperación de bacterias viables fue posible hasta 455 días post-inoculación (15 meses), con una reducción de la concentración inicial de 1 log<sub>10</sub> cada 68,5 días (Sung y Collins, 1998).

### **I.2.7.2. Supervivencia en heces y suelos**

*Map* es capaz de permanecer viable durante largos periodos de tiempo tanto en heces como en el suelo. En general, se ha observado que sobrevive entre 152 y 246 días en heces bovinas dependiendo de las condiciones meteorológicas, siendo la desecación y la luz solar directa los factores que más reducen su supervivencia (Lovell *et al.*, 1944). En purines bovinos puede aislarse durante un máximo de 287 días dependiendo de la temperatura y composición del purín (Jørgensen, 1977). Otro estudio realizado con heces ovinas infectadas ha demostrado que *Map* persiste hasta un total de 55 semanas en ambientes secos y completamente a la sombra, si bien la supervivencia es mucho menor en ambientes con luz solar directa (Whittington *et al.*, 2004). En relación al tipo de suelo, parece que la acidez del mismo y la existencia de hierro disponible en éste son factores que permiten una mejor supervivencia del agente, mientras que la aplicación de cales en el terreno disminuyen su viabilidad (Johnson-Ifearegundun y Kaneene, 1999).

### **I.2.7.3. Supervivencia al frío**

La resistencia de *Map* al frío y la congelación es un aspecto de gran interés, y especialmente desde el punto de vista de la conservación de muestras. Se ha observado que la congelación de muestras fecales a -70°C durante 3 semanas implica una reducción significativa de la viabilidad del microorganismo, aunque esta reducción no impide detectarlo mediante aislamiento hasta 15 semanas después (Richards y Thoen, 1977). Un estudio más reciente que valora diversos protocolos de conservación de muestras fecales ha obtenido resultados similares, concluyendo que las muestras almacenadas a -70°C durante un periodo de hasta 3 meses presentan mejor viabilidad que aquellas almacenadas a -20°C durante 1 semana (Khare *et al.*, 2008).

### **I.2.7.4. Supervivencia a los tratamientos térmicos**

La capacidad de supervivencia de *Map* a elevadas temperaturas es un tema que suscita gran interés a la comunidad científica, y especialmente en lo que concierne a los tratamientos térmicos de la leche de consumo humano y las posibles consecuencias en la Salud Pública. En 1993 se publicó el

primer trabajo en el cual se demostró que *Map* era capaz de sobrevivir a los tratamientos de pasteurización (Chiodini y Hermon-Taylor, 1993). Después de esto se han realizado numerosos trabajos con diferentes equipos, condiciones de temperatura/tiempo y concentración inicial de *Map*, demostrando la resistencia del agente a la pasteurización, especialmente cuando la concentración inicial es elevada (Grant *et al.*, 1996, 1998, 2002b; Sung y Collins, 1998; McDonald *et al.*, 2005). Algunos autores han discutido este hecho, sosteniendo que los diseños experimentales no reproducían exactamente los procesos de la industria, puesto que en ésta la leche es sometida a un flujo turbulento durante la homogenización que puede favorecer en la inactivación por ruptura de los agregados de *Map* (Stabel *et al.*, 1997). De hecho, algunos autores sugieren que sería necesario un adecuado proceso de homogenización, además del proceso de pasteurización, de cara a conseguir la completa inactivación del patógeno (Grant *et al.*, 2005; McDonald *et al.*, 2005). Sin embargo, un estudio posterior rebate esta hipótesis, concluyendo que la homogenización no es efectiva en la inactivación y argumentando diferencias entre las cepas empleadas y los protocolos realizados (Rademaker *et al.*, 2007). Debe tenerse en cuenta en la interpretación de estos estudios que las cepas cultivadas en laboratorio pueden presentar diferente resistencia térmica que las cepas salvajes, puesto que las condiciones *in vitro* afectan directamente a la expresión de proteínas y, por lo tanto, a la formación de la pared celular (Sung *et al.*, 2004). También se debe considerar que la sensibilidad del cultivo bacteriológico es limitada, ya que el proceso de descontaminación necesario para el aislamiento puede inactivar bacterias viables (Ayele *et al.*, 2005).

Pese a esta controversia, estudios realizados sobre leche pasteurizada comercial en diversos países han revelado la existencia de *Map* mediante aislamiento del patógeno (Grant *et al.*, 2002a; Ayele *et al.*, 2005; Ellingson *et al.*, 2005; Paolicchi *et al.*, 2005). En la tabla 4 se describen los resultados de varios de estos trabajos llevados a cabo sobre muestras comerciales de leche y queso.

Tabla 4. Resultados de diversos estudios de presencia de *Map* en muestra de leche y queso (adaptado de Eltholth *et al.*, 2009).

Autores	País	Muestra	Resultados (% positivos)	
			PCR	Cultivo
Millar <i>et al.</i> , 1996	Reino Unido	312 muestras de leche entera pasteurizada de venta al por menor	7%	ND
Gao <i>et al.</i> , 2002	Canadá	710 muestras de leche pasteurizada de venta al por menor	15%	0%
Grant <i>et al.</i> , 2002a	Reino Unido	567 muestras de leche pasteurizada (pasteurización comercial)	11,8%	1,8%
O'Reilly <i>et al.</i> , 2004	Irlanda	357 muestras de leche pasteurizada	9,8%	0%
Ayele <i>et al.</i> , 2005	República Checa	244 muestras de leche pasteurizada (pasteurización comercial)	ND	1,6%
		100 muestras de leche pasteurizada en laboratorio procedente de rebaños infectados	ND	2%
Ellingson <i>et al.</i> , 2005	Estados Unidos	720 muestras de leche entera pasteurizada de venta al por menor	ND	2,8%
Ikonomopoulos <i>et al.</i> , 2005	Grecia y República Checa	Quesos de venta al por menor (feta, queso tierno, queso curado y queso semi-curado)	31,7%	3,6%
Hruska <i>et al.</i> , 2005	República Checa	51 muestras de leche infantil en polvo	49%	ND
Paolicchi <i>et al.</i> , 2005	Argentina	70 muestras de leche pasteurizada	ND	2,9%
Clark <i>et al.</i> , 2006	Estados Unidos	98 muestras de queso en grano de venta al por menor	5%	0%
Lillini <i>et al.</i> , 2007	Italia	22 muestras de leche pasteurizada de venta al por menor	4,5%	0%
Stephan <i>et al.</i> , 2007	Suiza	143 muestras de queso de leche cruda (tierno, curado y semi-curado)	4,2%	0%

ND: no disponible.

### 1.2.7.5. Resistencia a desinfectantes

La resistencia de *Map* a los desinfectantes es muy similar a la del resto de micobacterias. Aunque es resistente a los desinfectantes comunes, se inactiva frente a soluciones de formol (5%), desinfectantes fenólicos (1:40) y cresólicos (1:32), bicloruro de mercurio (1:1000), hipoclorito cálcico (1:50), cianamida cálcica, clorina (2 µg/ml) o hidróxido de amonio (3%) (Chiodini *et al.*, 1984a; Bohm y Ley, 1994; Whan *et al.*, 2001; Katayama *et al.*, 2003). Debe tenerse en cuenta que la eficacia de estas sustancias disminuye en presencia de materia orgánica, aunque puede incrementarse si se incorporan detergentes a la solución desinfectante (Merkal y Whipple, 1982).

## I.3. EPIDEMIOLOGÍA

### I.3.1. DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA Y PREVALENCIA DE LA PARATUBERCULOSIS BOVINA

La paratuberculosis es una enfermedad de distribución mundial y creciente prevalencia que ha sido descrita en todos los continentes (Chiodini *et al.*, 1984a; Collins, 2003). No obstante, hay que tener en cuenta que las limitaciones en las técnicas diagnósticas disminuyen la exactitud de las estimaciones de la prevalencia real, por lo que los resultados obtenidos en los estudios epidemiológicos deben ser interpretados considerando el método empleado.

En **Estados Unidos** la paratuberculosis se considera una enfermedad endémica en el ganado vacuno y que no presenta una distribución uniforme (Collins *et al.*, 1994; Dargatz *et al.*, 2001; Roussel *et al.*, 2005). Por término general, en lo que respecta al ganado bovino de aptitud láctea y según diversos estudios serológicos, se ha estimado que la prevalencia individual oscila entre el 5-10%, con un 33% de explotaciones infectadas (Collins *et al.*, 1994; Thorne y Hardin, 1997; Wells y Wagner, 2000; Johnson *et al.*, 2001; Adaska y Anderson, 2003). Estos valores contrastan con los descritos para vacuno de producción cárnica en un estudio realizado con muestras procedentes de 21 estados, con un 0,4% de animales positivos a ELISA y aproximadamente un 8% de explotaciones con al menos un animal seropositivo (Dargatz *et al.*, 2001). Sin embargo, hay estados donde la prevalencia en vacuno de carne es mayor, habiéndose encontrado en un trabajo realizado en Texas en ganado de pura raza un 3% de seropositividad individual y casi un 44% de rebaños seropositivos (Roussel *et al.*, 2005). Cabe destacar que en este país la prevalencia a nivel de rebaño parece estar altamente relacionada con el número de cabezas, habiéndose encontrado alrededor del 40% de rebaños afectados en explotaciones de más de 300 animales (Manning y Collins, 2001). Esta distribución desigual de la enfermedad puede ser debida a su vez por diferencias regionales en el manejo de los animales, así como por otros factores de riesgo que intervienen en la transmisión de la paratuberculosis (Collins *et al.*, 1994; Wells y Wagner, 2000).

De manera análoga a Estados Unidos, **Canadá** también presenta diferencias regionales en cuanto a la prevalencia de la enfermedad en el ganado bovino. En vacuno lechero se han descrito desde un 7-9% de seroprevalencia individual y un 40-59% de rebaños con más de un animal seropositivo en la región de Alberta (Sorensen *et al.*, 2003; Scott *et al.*, 2006), hasta un 2,6% de vacas seropositivas y un 30% de rebaños con más de un animal seropositivo en Ontario (Hendrick *et al.*, 2005b).

En lo concerniente a **Europa**, la paratuberculosis se considera también una enfermedad endémica con distribución desigual según la población estudiada (Gasteiner *et al.*, 1999; Boelaert *et al.*, 2000; Muskens *et al.*, 2000). Según Manning y Collins (2001), el porcentaje de explotaciones infectadas en el continente oscila entre el 7-55%. Boelaert *et al.* (2000) describieron en Bélgica mediante ELISA un 18% de explotaciones afectadas de vacuno de diferente aptitud (cárnica, láctea o mixta) con una prevalencia aparente individual de 0,87%. En Holanda se ha encontrado una prevalencia mayor, con un 55% de rebaños seropositivos y una seroprevalencia aparente individual de 2,5% (Muskens *et al.*, 2000); sin embargo, en este estudio únicamente se tuvieron en cuenta explotaciones de aptitud láctea. En Italia también se describe una distribución desigual según la región, con datos de seroprevalencia aparente desde el 42% de explotaciones seropositivas y 2,4% de seroprevalencia individual en la región de Lazio (Lillini *et al.*, 2005) y 43,7% de explotaciones y 2,6% de animales seropositivos en la región de Lombardía (Arrigoni *et al.*, 2007), hasta un 64,9% de granjas y 3,5% de animales en la región de Véneto (Robbi *et al.*, 2002), siendo todos estos datos referidos únicamente a ganado vacuno lechero.

Al igual que en el resto del mundo, la paratuberculosis es también una enfermedad presente en la **cabaña ganadera española**. A pesar de no existir numerosos estudios acerca de su distribución y prevalencia, los trabajos realizados sí permiten establecer una idea sobre la situación de nuestro país así como afirmar que las prevalencias descritas son similares a las de otros estados europeos. En un estudio realizado sobre 201 bovinos de sacrificio procedentes de mataderos del País Vasco donde se aplicaron diversas técnicas diagnósticas (cultivo microbiológico de tejidos y heces, histopatología, PCR y ELISA) se obtuvo una prevalencia individual combinada del 30,4% (Juste *et al.*, 2000). Otro trabajo realizado en Asturias sobre 189 animales sacrificados en matadero indica una prevalencia del 44,97% mediante técnicas histopatológicas (Balseiro *et al.*, 2004). Hay que tener en cuenta que los muestreos en matadero normalmente incrementan la probabilidad de hallar animales infectados, ya que éstos tienen mayor probabilidad de ser sacrificados que los no infectados (Tiwari *et al.*, 2005). En el mismo trabajo realizado en Asturias (Balseiro *et al.*, 2004), se realizó también un estudio serológico mediante ELISA con muestras escogidas aleatoriamente de entre todas las recogidas por el programa autonómico de erradicación de tuberculosis y brucelosis entre 1995 y 2001 (2184 sueros), describiendo una prevalencia media individual de 1,23% para dicho periodo. Se ha realizado también un estudio más amplio desde el punto de vista geográfico, en el que se analizaron 5 muestras de leche de tanque procedentes de 14 comunidades autónomas mediante técnicas de PCR, obteniendo una prevalencia del 10% de explotaciones. Dado el bajo número de muestras de este estudio, los autores reconocen que este resultado solo tiene interés para establecer una estimación



de la prevalencia máxima, que se situaría en el 47,6% (Sevilla *et al.*, 2003). En Galicia se llevó a cabo un estudio serológico en 2004 sobre 61069 muestras de suero procedentes de 2735 rebaños de diferente aptitud seleccionados al azar, en el que se describieron seroprevalencias individuales reales de 3,02-4,03% para vacuno de leche, 1,03-2,07% para vacuno de carne y 2,83-3,84% en rebaños de aptitud mixta (considerando una especificidad de la técnica empleada de 98,9% y 99,4% respectivamente). En lo que respecta a las prevalencias a nivel de rebaño, la tabla 5 muestra un resumen de las estimaciones de la prevalencia real descritas en este estudio (Diéguez *et al.*, 2007).

Tabla 5. Valores de prevalencia real de paratuberculosis mediante ELISA indirecto sobre suero según el tipo de aptitud de las explotaciones (Diéguez *et al.*, 2007).

	Vacuno de leche	Vacuno de carne	Aptitud mixta
<b>Prevalencia real de rebaño (%) (Sp = 98,9%)</b>	10,7 <sup>a</sup> /14,8 <sup>b</sup>	0 <sup>a</sup> /1,5 <sup>b</sup>	2,7 <sup>a</sup> /12 <sup>b</sup>
<b>Prevalencia real de rebaño (%) (Sp = 99,4%)</b>	18,8 <sup>a</sup> /27,8 <sup>b</sup>	2,4 <sup>a</sup> /2,8 <sup>b</sup>	5,7 <sup>a</sup> /12,2 <sup>b</sup>

Sp: especificidad.

a. Valor de prevalencia considerando una granja afectada a partir de dos animales seropositivos.

b. Valor de prevalencia considerando una granja afectada a partir de un animal seropositivo.

### I.3.2. FUENTES DE INFECCIÓN Y VÍAS DE TRANSMISIÓN

*Map* es un patógeno obligado, lo que implica que el único lugar en el que puede multiplicarse de forma natural es en el interior de un macrófago de un hospedador susceptible. En consecuencia, la principal fuente de infección son los animales infectados que eliminan *Map* en sus heces (Collins, 2003). La entrada de la paratuberculosis en un rebaño se produce en la mayoría de casos a través de la adquisición de ganado infectado y que generalmente no muestra signos clínicos dado el carácter crónico del proceso (Sweeney, 1996), hecho al que se debe añadir la dificultad de determinar si un animal está realmente infectado, debido a la generalizada falta de sensibilidad de los actuales métodos diagnósticos (Fecteau y Whitlock, 2010). Aunque esta es la vía de entrada más importante, también existen otras posibles vías de introducción de la enfermedad, como el movimiento entre los rebaños de vehículos, personas, equipos o materiales contaminados con el microorganismo (Wells y Wagner, 2000; Fecteau y Whitlock, 2010; Elliott *et al.*, 2014). La enfermedad ha sido descrita también en la fauna silvestre, aunque el peso de ésta como fuente de infección de *Map* para las explotaciones ganaderas aún no ha sido estudiado en profundidad (Collins, 2003).

*Map* coloniza el intestino y se excreta fundamentalmente en heces, por lo tanto, la ruta fecal-oral es la vía más común por la cual se infectan los animales (Sweeney, 1996; Clarke, 1997). Según Jørgensen (1982), la eliminación fecal de *Map* en ganado vacuno se situaría entre  $1,3 \times 10^5$  y  $5,9 \times 10^6$  micobacterias por cada gramo de heces, por lo que los animales portadores contaminan de esta

forma los pastos, los alimentos y el agua provocando un alto riesgo de exposición para el resto de los animales, ya sean domésticos o salvajes (Chiodini *et al.*, 1984a; Manning *et al.*, 1998; Daniels *et al.*, 2003). En general se acepta que los animales recién nacidos (menores de 30 días de edad) son los más susceptibles a la infección, pudiendo estar expuestos a la ingestión de grandes cantidades de micobacteria al mamar de las ubres sucias de sus madres, o a través del calostro, leche, agua u otros alimentos contaminados (Chiodini *et al.*, 1984a; Sweeney, 1996). En la literatura se ha sugerido que una dosis de 50-1000 UFC es suficiente para infectar terneros jóvenes (Chiodini, 1996), y estudios experimentales han demostrado el establecimiento de la infección tres semanas después de administrar oralmente dosis de  $1,5 \times 10^6$  UFC a terneras de 21 y 22 días de edad (Sweeney *et al.*, 2006a). De cualquier forma, los animales adultos también pueden infectarse si se ven sometidos a una dosis lo suficientemente alta o repetida del microorganismo (Payne y Rankin, 1961; Larsen *et al.*, 1975). Cabe destacar que este riesgo es todavía más elevado en explotaciones de carácter intensivo, donde es más frecuente el contacto directo entre animales susceptibles y animales eliminadores. Un estudio reciente ha demostrado además que terneras recién infectadas pueden eliminar el agente durante un corto periodo de tiempo e infectar así a otras terneras sanas, con lo que la eliminación fecal de *Map* no se reduce exclusivamente a animales adultos con enfermedad clínica/subclínica (van Roermund *et al.*, 2007).

La leche y calostro de vacas infectadas es otra fuente de infección a tener en cuenta, especialmente si se trata de animales que también eliminan gran cantidad de la micobacteria en las heces (Sweeney, 1996). El bacilo puede ser aislado de la leche de vacas que presentan sintomatología clínica, pero también de animales subclínicos que presentan cultivo fecal positivo (Sweeney *et al.*, 1992a; Streeter *et al.*, 1995). En un trabajo realizado en Bélgica a partir de leche de vacas seropositivas se obtuvieron recuentos medios de *Map* de  $6,67 \pm 20,00$  UFC/100 ml y  $42,33 \pm 19,67$  UFC/100 ml en dos muestreos diferentes (Herman *et al.*, 2005). Un estudio epidemiológico realizado en Dinamarca muestra que los calostros procedentes de vacas infectadas tienen un riesgo mayor de transmitir la enfermedad que el procedente de vacas negativas, del mismo modo que las novillas alimentadas con mezcla de calostros (OR = 1,24; IC95% = 1,09 – 1,42) o aquellas que maman de madres de acogida (OR = 2,01; IC95% = 1,37 – 2,96) tienen una mayor probabilidad de convertirse en seropositivas (Nielsen *et al.*, 2008). La probabilidad de que los animales jóvenes se infecten por ingerir leche de madres afectadas es función directa del tiempo pasado con su madre y/o la frecuencia con la que se alimenten de calostro o leche procedente de animales infectados. Por lo tanto, las oportunidades para la transmisión desde las madres a la descendencia son mayores en aquellos sistemas de producción que permiten la cría natural (Collins, 2003).

La transmisión vertical prenatal también ha sido demostrada en abundantes estudios de investigación. Se ha logrado el aislamiento de *Map* a partir de órganos genitales y semen de toros con sintomatología clínica y también en los infectados subclínicamente (Larsen y Kopecky, 1970; (Larsen y Kopecky, 1970; Larsen *et al.*, 1981; Ayele *et al.*, 2004), de tejidos fetales y maternos procedentes de madres con infección clínica (Doyle, 1958; Rohde y Shulaw, 1990; Buergelt y Williams, 2003) e incluso en el caso de madres que no presentaban clínica pero sí cultivos fecales positivos (Sweeney *et al.*, 1992c). Aunque estos trabajos estimaban que aproximadamente un 25% de los animales nacidos de madres con enfermedad clínica nacerían infectados y que el riesgo para aquellos nacidos de madres asintomáticas era muy bajo, en un reciente metaanálisis se ha estimado que el 9% de fetos de madres infectadas subclínicamente y el 39% de fetos de madres con signos clínicos se infectarían en el útero (Whittington y Windsor, 2009). Otro estudio concluye que las novillas nacidas de madres seropositivas tienen una probabilidad 6,6 veces mayor de convertirse en seropositivas que aquellas nacidas de madres seronegativas (Aly y Thurmond, 2005). Cabe también destacar un estudio en el cual ovocitos infectados experimentalmente y procesados para realizar transferencia de embriones resultaron positivos (Rohde y Shulaw, 1990), aunque otros trabajos no han conseguido aislar el agente ni de ovocitos ni de embriones de madres con infección subclínica (Kruip *et al.*, 2003; Perry *et al.*, 2006).

Aunque la implicación de vectores no ha sido demostrada en la transmisión de la paratuberculosis, se ha logrado realizar el aislamiento del patógeno a partir de insectos como dípteros y cucarachas (Fischer *et al.*, 2001, 2003b, 2005), y también de lombrices de tierra (Fischer *et al.*, 2003a) y larvas de nematodos (Lloyd *et al.*, 2001; Whittington *et al.*, 2001), sugiriendo un posible papel como vectores mecánicos de *Map*. Un estudio reciente ha mostrado además la capacidad de *Map* para multiplicarse y sobrevivir durante largos periodos en el interior de protozoos ambientales como *Acanthamoeba polyphaga* (Mura *et al.*, 2006). Según algunos autores, este fenómeno podría facilitar la entrada del patógeno en el organismo, actuando estas amebas como un “caballo de Troya” que permitiría evadir los mecanismos de defensa iniciales del hospedador (Rowe y Grant, 2006).

### I.3.3. RANGO DE HOSPEDADORES

Clásicamente la paratuberculosis ha sido considerada una enfermedad que afecta a rumiantes, presentando mayor importancia en las especies bovina, ovina y caprina dado su interés desde un punto de vista productivo. Sin embargo, *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* tiene un rango de hospedadores mucho más amplio, incluyendo tanto animales rumiantes como no rumiantes.

Dentro de los rumiantes, la enfermedad ha sido descrita en numerosas especies de la familia *Cervidae*, como el ciervo común (*Cervus elaphus*) (Vance, 1961), el ciervo de cola blanca (*Odocoileus virginianus*) (Chiodini y van Kruiningen, 1983), el gamo (*Dama dama*) (Riemann *et al.*, 1979) o el corzo (*Capreolus capreolus*) (Pavlik *et al.*, 2000). Otros hospedadores rumiantes en los que se ha demostrado la existencia de paratuberculosis incluirían el bisonte (*Bison bison*) (Whitlock *et al.*, 1999), el búfalo (*Bubalus bubalis*) (Lillini *et al.*, 2003), el muflón (*Ovis musimon*) (Weber *et al.*, 1992), distintas especies de antílopes (*Saiga tatarica*, *Addax nasomaculatus*, *Oryx gazella*, *Gazella thomsoni*) (Dukes *et al.*, 1992; Burton *et al.*, 2001; Motiwala *et al.*, 2004) así como los camélidos: camello (*Camelus bactrianus*), llama (*Lama glama*), alpaca (*Lama pacos*), vicuña (*Vicugna vicugna*) y guanaco (*Lama guanicoe*) (Paling *et al.*, 1988; Belknap *et al.*, 1994; Ridge *et al.*, 1995; Stehman, 1996).

*Map* ha sido también aislado de numerosas especies de animales no rumiantes (tabla 6), tanto en infecciones naturales como experimentales. Entre todas ellas cabe destacar el conejo (*Oryctolagus cuniculus*), por los numerosos estudios que se han llevado a cabo en esta especie y por su importancia en la posible existencia de un ciclo salvaje de la enfermedad.

Tabla 6. Especies de animales no rumiantes en los que ha sido aislado *Map*.

ESPECIE	BIBLIOGRAFÍA
Conejo ( <i>Oryctolagus cuniculus</i> )	Fuentes y Cebrián, 1988; Greig <i>et al.</i> , 1997
Liebre ( <i>Lepus europaeus</i> )	Beard <i>et al.</i> , 2001a
Cerdo ( <i>Sus scrofa domestica</i> )	Jørgensen, 1969
Jabalí ( <i>Sus scrofa</i> )	Machackova <i>et al.</i> , 2003
Caballo ( <i>Equus caballus</i> )	Larsen <i>et al.</i> , 1972
Burro ( <i>Equus asinus</i> )	Dierckins <i>et al.</i> , 1990
Gallina ( <i>Gallus gallus domesticus</i> )	Larsen y Moon, 1972
Diferentes especies de córvidos ( <i>Corvus corone</i> , <i>Corvus frugilegus</i> , <i>Corvus monedula</i> )	Beard <i>et al.</i> , 2001a

<b>Diferentes especies de roedores</b> ( <i>Rattus norvegicus</i> , <i>Apodemus sylvaticus</i> , <i>Sigmodon hispidus</i> , <i>Sorex longirostris</i> , <i>Rattus rattus</i> , <i>Mus musculus</i> , <i>Microtus arvalis</i> , <i>Corcidura suaveolens</i> )	Beard <i>et al.</i> , 2001a; Corn <i>et al.</i> , 2005; Florou <i>et al.</i> , 2008; Kopecna <i>et al.</i> , 2008
<b>Zorro (<i>Vulpes vulpes</i>)</b>	Beard <i>et al.</i> , 1999
<b>Comadreja (<i>Mustela nivalis</i>)</b>	Beard <i>et al.</i> , 1999
<b>Armiño (<i>Mustela erminea</i>)</b>	Beard <i>et al.</i> , 2001a
<b>Tejón (<i>Meles meles</i>)</b>	Beard <i>et al.</i> , 2001a
<b>Perro (<i>Canis lupus familiaris</i>)</b>	Vogel, 1977
<b>Coyote (<i>Canis latrans</i>)</b>	Anderson <i>et al.</i> , 2007
<b>Gato (<i>Felis catus</i>)</b>	Corn <i>et al.</i> , 2005
<b>Oso pardo (<i>Ursus arctos</i>)</b>	Kopecna <i>et al.</i> , 2006
<b>Macaco (<i>Macaca arctoides</i>)</b>	McClure <i>et al.</i> , 1987
<b>Mandrill (<i>Papio sphinx</i>)</b>	Zwick <i>et al.</i> , 2002

El papel que desempeña la fauna silvestre en la epidemiología de la paratuberculosis no está todavía totalmente definido. La transmisión interespecie ha sido demostrada en abundantes trabajos realizados en diferentes especies, y en el caso del conejo, incluso en ambos sentidos (Mokresh y Butler, 1990; Beard *et al.*, 2001c). En varios estudios se ha considerado que la presencia de poblaciones de conejos silvestres en las inmediaciones de una explotación de vacuno se relaciona con un mayor riesgo de presentar la enfermedad, pudiendo actuar éstos como vectores (Greig *et al.*, 1997, 1999; Beard *et al.*, 2001a, 2001b; Daniels *et al.*, 2003). Sin embargo, un estudio posterior sugiere que el ganado doméstico podría suponer más riesgo para la fauna silvestre que el que constituye ésta para los animales de renta, al haber encontrado mayor prevalencia individual en las explotaciones de vacuno lechero incluidas en el estudio que entre los conejos y ciervos estudiados (Raizman *et al.*, 2005). Además otro estudio experimental señala la elevada susceptibilidad de los ciervos a la cepa bovina de *Map*, con una tasa de infección del 100% tras la administración de dosis altas y medias de bacteria ( $10^9$ - $10^7$  UFC/animal) y un 50% tras la administración de dosis bajas ( $10^3$  UFC/animal) (O'Brien *et al.*, 2006). En una revisión más reciente, se estima que la prevalencia en la fauna silvestre es baja (2,47%; IC95% = 1,76% – 3,06%), sugiriendo que aunque puedan existir reservorios localmente en ciertas zonas su importancia para el control de la paratuberculosis en el ganado es bastante limitada (Carta *et al.*, 2013). En España, un trabajo realizado sobre distintas poblaciones de ciervos (*Cervus elaphus*) describe una seroprevalencia media del 30% y una asociación estadísticamente significativa entre el status serológico de los ciervos y el contacto con

explotaciones de ganado vacuno (Reyes-García *et al.*, 2008). En contraste con los hallazgos encontrados en ciervo en España, un estudio de nuestro grupo de investigación sobre 65 corzos abatidos en Galicia no encontró ningún resultado positivo mediante cultivo de tejidos, examen histopatológico y tinción de Ziehl-Neelsen directa sobre heces, concluyendo que estos resultados pueden ser debidos al carácter selectivo del corzo en cuanto a hábitos alimentarios y también a su modo de vida, mucho menos gregario que otras especies de cérvidos (Pato *et al.*, 2010).

A pesar de que todavía es necesaria más investigación en este terreno con el fin de esclarecer la ecología de *Map*, es evidente la implicación de la fauna silvestre, ya sea como reservorio o vector de la enfermedad, por lo que resulta indispensable tener en cuenta este aspecto en el diseño de los planes de control y erradicación.

#### **1.3.4. IMPLICACIONES EN SALUD PÚBLICA: *MYCOBACTERIUM AVIUM* SUBSP. *PARATUBERCULOSIS* Y LA ENFERMEDAD DE CROHN**

La hipótesis de que *Map* pueda ser un agente zoonótico relacionado con la enfermedad de Crohn en la especie humana genera gran controversia entre la comunidad científica desde las últimas décadas. A pesar de que se han realizado numerosos estudios con la intención de demostrar o descartar esta relación entre *Map* y la enfermedad de Crohn, ninguno ha sido concluyente hasta la fecha.

La enfermedad de Crohn es un proceso crónico y sistémico que cursa con malestar general, pérdida crónica de peso, dolor abdominal y diarrea, y que se caracteriza por la alternancia de episodios de mejoría clínica y recidivas durante toda la vida (Chiodini, 1989). La enfermedad fue descrita por vez primera en 1932 por Crohn, Ginzburg y Oppenheimer como una inflamación crónica del íleon terminal que se asemejaba a la colitis ulcerosa (Crohn *et al.*, 1932). Posteriormente se demostró que en la enfermedad de Crohn las lesiones pueden extenderse desde la boca al ano, con patología transmural, mientras las lesiones de la colitis ulcerosa se limitan al colon, con patología restringida a la mucosa (Behr, 2010).

El origen de la hipótesis de que la enfermedad de Crohn pudiese estar provocada por una micobacteria data de 1913, cuando el cirujano Thomas Dalziel observó las semejanzas clínicas e histopatológicas existentes entre los casos de enteritis intersticial crónica (posteriormente denominada como enfermedad de Crohn), tuberculosis intestinal y una reciente afección descrita en ganado vacuno denominada pseudotuberculosis (conocida posteriormente como paratuberculosis)

(Dalziel, 1913). Sin embargo, el primer aislamiento de una micobacteria micobactina-dependiente en pacientes con enfermedad de Crohn no se logró hasta 1984 (Chiodini *et al.*, 1984b).

Históricamente, la analogía era la principal razón que sostenía la teoría de la relación entre *Map* y la enfermedad de Crohn: debido a que *Map* causaba enfermedad inflamatoria intestinal en rumiantes, también podría causar enfermedad intestinal crónica en la especie humana. En el caso de las infecciones micobacterianas, esta analogía no carece totalmente de sentido, puesto que la especificidad de hospedador no parece ser tan estricta como en otros microorganismos. Una muestra de ello es *Mycobacterium bovis*, que puede causar enfermedad en humanos, aunque típicamente no se contagia de modo efectivo entre personas (Evans *et al.*, 2007). Otro ejemplo sería *Mycobacterium avium* subsp. *avium*, patógeno responsable de enfermedad en aves, que también puede producir enfermedad en hospedadores mamíferos como el ciervo (Mackintosh *et al.*, 2004). Además, este último ha sido descrito como patógeno oportunista en personas inmunodeprimidas, así que se podría extrapolar que *Map* también pudiera actuar al menos como patógeno oportunista de la especie humana, debido a la gran similitud genética existente entre ambas micobacterias (Chacon *et al.*, 2004).

En términos de ensayos microbiológicos, los estudios epidemiológicos han utilizado fundamentalmente tres tipos de pruebas: cultivo, microscopía y PCR. De entre las tres técnicas, la más convincente (aislamiento en cultivo puro) ha sido la menos satisfactoria: el número de aislados de *Map* encontrado ha sido sorprendentemente bajo, sugiriendo para algunos autores que la implicación de *Map* en la enfermedad humana es improbable (Shanahan y O'Mahony, 2005). Las razones potenciales para el bajo número de aislamientos positivos en una enfermedad de hipotética naturaleza infecciosa son variadas. Un problema poco estudiado es la naturaleza de la muestra empleada: la mayoría de estudios buscan *Map* en biopsias de la mucosa, pero es sabido que la patología característica de la enfermedad de Crohn implica todo el espesor de la pared intestinal y zonas extraintestinales, como la grasa mesentérica y las fístulas (Pierce, 2009). A pesar de este conocimiento, muy pocos estudios han utilizado muestras más profundas, como los linfonódulos mesentéricos, para intentar evidenciar el microorganismo (Behr, 2010). Otro aspecto fundamental para el cultivo es que las micobacterias parecen encontrarse en los tejidos afectados en forma de esferoplastos de pared celular deficiente y crecimiento extraordinariamente lento, por lo que requieren ciertas condiciones especiales para su aislamiento (Chiodini *et al.*, 1986; Gitnick *et al.*, 1989; Hulten *et al.*, 2000). Aún con todo, existen trabajos donde se ha aislado *Map* de tejidos de enfermos de Crohn en mayores proporciones que en pacientes con colitis ulcerosa o controles sin enfermedad (Schwartz *et al.*, 2000; Bull *et al.*, 2003), y se ha logrado reproducir las lesiones

características de la enfermedad en cabritos mediante inoculación oral de aislados de origen humano (van Kruiningen *et al.*, 1986). Otro hallazgo muy interesante de la última década ha sido el aislamiento de la bacteria a partir de células blancas procedente de sangre periférica de pacientes (Naser *et al.*, 2004). En este estudio se consiguió aislar *Map* viable en un 50% de las muestras de sangre de enfermos de Crohn y un 22% de pacientes con colitis ulcerosa, mientras los cultivos realizados en el grupo control eran negativos. Esto demostraría una bacteriemia en enfermos de Crohn, y por lo tanto contribuye a la teoría de que *Map* puede estar implicado en la patogenia de la enfermedad. Sin embargo, otros estudios no han logrado realizar el aislamiento del agente en muestras de pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal, por lo que rechazan la hipótesis de la relación *Map*-Crohn (Kallinowski *et al.*, 1997; Clarkston *et al.*, 1998; Collins *et al.*, 2000).

Para el diagnóstico microscópico se han aplicado diversas técnicas, como tinción de Ziehl-Neelsen sobre tejidos, e hibridación *in situ* mediante ARN ribosómico o el elemento de inserción IS900. En lo que respecta a las tinciones como Ziehl-Neelsen, parece que estos esferoplastos de pared defectuosa no se tiñen con las técnicas habituales, pero al realizarse subcultivos sí que llegan a desarrollar una pared celular que se tiñe de modo positivo (Chiodini *et al.*, 1986a). Por lo tanto, las técnicas histológicas clásicas han fallado a la hora de visualizar *Map* en tejidos afectados, pero sin embargo trabajos basados en hibridación *in situ* mediante IS900 sí han logrado identificar ADN de *Map* en lesiones de enfermos de Crohn en mayores porcentajes que en los sujetos control (Sechi *et al.*, 2004; Romero *et al.*, 2005). Otro grupo de investigación utilizó hibridación *in situ* mediante ARN ribosómico en tejidos de ratones infectados experimentalmente, aunque la técnica fue incapaz de resolver hasta nivel de subespecie, únicamente pudiendo evidenciar la presencia de *M. avium*. Aplicando este método sobre muestras de enfermos de Crohn e individuos control, este mismo grupo describió un odds ratio de 8,6 (IC95% = 2,2 – 33,1) en la detección de *M. avium* en pacientes de Crohn (Jeyanathan *et al.*, 2007).

En contraste con la escasez de resultados de infección por *Map* mediante cultivo microbiológico y microscopía, sí existe abundante literatura acerca de la detección de ADN de *Map* mediante PCR. Bull *et al.* (2003) encontraron ADN de *Map* en un 26% de los tejidos control, comparado con el 92% de tejidos de enfermos de Crohn. Otro estudio describió muy pocos positivos en el grupo control, mientras que casi la mitad de las muestras de pacientes enfermos presentaban ADN de *Map* (Autschbach *et al.*, 2005). El primer trabajo sugiere que la infección por *Map* es común, pero está aumentada en el caso de la enfermedad de Crohn. El segundo estudio, al contrario, sugiere que la infección por *Map* es infrecuente y por tanto la detección del patógeno es un signo predictivo de enfermedad. Aunque muchos de estos trabajos se han llevado a cabo bajo el sello de “*in-house PCR*”



(deben tenerse en cuenta cuestiones como validación y reproductibilidad), dos meta-análisis han puesto de manifiesto la existencia de asociación positiva entre la presencia de ADN de *Map* y el padecimiento de la enfermedad en la mayoría de los estudios realizados (Feller *et al.*, 2007; Abubakar *et al.*, 2008). De cualquier modo, sería necesario realizar más estudios empleando técnicas estandarizadas de PCR con comparaciones inter-laboratorios, para poder elucidar la naturaleza de esta asociación (Behr, 2010).

Otro argumento que apoya la teoría de la implicación de *Map* en la patogenia de la enfermedad de Crohn está relacionado con la existencia de ciertos polimorfismos genéticos en la especie humana asociados al desarrollo del proceso. Aunque existe una gran cantidad de genes y *loci* vinculados al establecimiento de enfermedad inflamatoria intestinal, sólo tres están específicamente relacionados con la enfermedad de Crohn: NOD2, ATG16L1 e IRGM (Cho, 2008). Tanto modelos genómicos como estudios funcionales han confirmado que cada uno de estos genes codifican diferentes proteínas que actúan en la respuesta inmune frente a infecciones por bacterias intracelulares (Shih *et al.*, 2008). Teniendo en cuenta esto, serían necesarias más investigaciones que determinasen qué bacterias pueden aprovechar mutaciones en estos genes de cara a iniciar una infección y el establecimiento de una respuesta inflamatoria por parte del hospedador. También sería interesante descubrir si estos genes, que comparten un rol común en las respuestas a patógenos intracelulares, controlan diferentes infecciones o, por el contrario, representan diferentes fases de la respuesta innata del hospedador ante la misma infección intracelular. Un estudio reciente ha demostrado que las mutaciones del gen homólogo bovino de NOD2 están asociadas con la susceptibilidad a *Map* (Pinedo *et al.*, 2009).

Del mismo modo que hay numerosos artículos que defienden la hipótesis de un posible papel de *Map* en la etiopatogenia de la enfermedad de Crohn, también se pueden encontrar en la literatura abundantes estudios que rebaten dicha implicación. De manera general, los tres argumentos más generalizados son:

- No se ha demostrado que los productores y veterinarios tengan mayor riesgo de sufrir enfermedad de Crohn.
- Los tratamientos antimicobacterianos presentan una eficacia limitada para el tratamiento de la enfermedad de Crohn.
- El uso con éxito de inhibidores del Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF $\alpha$ ) en el tratamiento de la enfermedad de Crohn es incompatible con una etiología micobacteriana.

En lo referente al primer punto, el riesgo ocupacional de sufrir una enfermedad infecciosa es bien conocido en el caso de agentes que se contagian mediante contacto directo y aerosoles, pero en el caso de los patógenos entéricos la asociación entre exposición ocupacional y padecimiento de la enfermedad no es siempre un factor de riesgo. Un estudio realizado en Quebec establece una incidencia de la enfermedad de Crohn de alrededor de 20 casos/100000 habitantes, es decir, un caso cada 5000 individuos en un año, por lo que sería difícil observar un aumento de la enfermedad en dicho grupo de productores/veterinarios (Lowe *et al.*, 2009). En el caso de *Map*, los modelos animales estiman que sólo una pequeña parte de los animales infectados desarrollará enfermedad clínica (Whitlock y Buergelt, 1996; García-Marín *et al.*, 2000). Teniendo esto en cuenta, *Map* podría estar infectando a una parte importante de la población, pero sólo aquellos individuos con cierta predisposición genética presentarían la enfermedad. Esta hipótesis daría explicación a estudios que describen tasas de seropositividad similares en enfermos de Crohn, de colitis ulcerosa y controles sanos (Bernstein *et al.*, 2004).

Atendiendo al segundo argumento, cabe señalar en primer lugar que algunos de los antibióticos utilizados tradicionalmente contra *M. tuberculosis*, como la isoniazida, ethambutol o rifampicina no presentan actividad frente a *Map*. Para que esta terapia sea efectiva, es necesario el empleo combinado con macrólidos para evitar la tendencia de las micobacterias a desarrollar resistencias, junto a una duración del tratamiento no inferior a 6 meses (Chamberlin y Naser, 2006). Esta terapia ha demostrado ser eficaz en diferentes estudios, incluso permitiendo recuperar la motilidad en tramos de íleon y visualizándose un aspecto endoscópico normal de la mucosa (Borody *et al.*, 2002; Shafran *et al.*, 2002).

El último argumento en contra de un papel etiológico de *Map* en la enfermedad de Crohn sería la respuesta favorable al empleo de fármacos inmunosupresores. Estos tratamientos obedecen a la teoría mayoritaria de que la enfermedad de Crohn es un proceso autoinmune caracterizado por una excesiva respuesta inflamatoria. Aunque el uso de agentes anti-TNF pueda parecer contraproducente en una hipotética enfermedad infecciosa, hay que destacar que dichos fármacos fueron desarrollados originalmente para reducir la inflamación durante un choque séptico (Fisher Jr *et al.*, 1993). Además, existen estudios que describen el beneficio terapéutico de estos agentes, por ejemplo, en un caso de lepra recurrente (Faber *et al.*, 2006) y un caso de meningitis tuberculosa (Blackmore *et al.*, 2008). Por tanto, el empleo de fármacos inmunosupresores o inmunomoduladores no sería excluyente con una etiología infecciosa.

Como conclusión, no parece que el debate existente en lo que concierne a la relación *Map*-Enfermedad de Crohn tenga un final próximo. La presencia de *Map* ha sido demostrada en muchos alimentos de consumo como leche y productos lácteos, lo que implica la existencia de un teórico agente zoonótico en la cadena alimentaria. Por esto, la prueba de un rol de *Map* en la enfermedad humana provocaría un gran impacto en el sector primario mundial, y especialmente en lo que respecta al ganado y los programas de control de paratuberculosis.



## I.4. PATOGENIA

En el estudio de cualquier enfermedad resulta imprescindible el conocimiento de los mecanismos que provocan su aparición y desarrollo. En el caso de la paratuberculosis, el proceso patogénico está influenciado por diversos factores, entre los que se puede destacar factores genéticos y el status inmune del hospedador (Clarke, 1997; Koets *et al.*, 2000). Además, los problemas inherentes al aislamiento de *Map*, junto con los largos periodos de incubación de la enfermedad y la dificultad de reproducir experimentalmente las características típicas del proceso han obstaculizado también el estudio de su patogénesis, por lo que todavía existen importantes lagunas respecto a este conocimiento (Coussens, 2004).

### I.4.1. VÍA DE ENTRADA DE *MAP* EN EL HOSPEDADOR

La primera teoría acerca del sitio de entrada de *Map* al organismo se apoyó en la localización de las lesiones típicas en intestino delgado y nódulos linfáticos adyacentes, suponiendo que *Map* penetraba a través del intestino y a partir de ahí se extendería a los linfonódulos regionales e incluso a otras localizaciones como el hígado (Hallman y Witter, 1933). Esta hipótesis fue confirmada posteriormente mediante infecciones experimentales en caprino y ovino, demostrando no sólo el papel del intestino como puerta de entrada sino también la importancia de los nódulos linfáticos en el desarrollo de la infección y su diseminación a otras localizaciones extraintestinales (Karpinski y Zorawski, 1975). Gilmour y Angus (1973) demostraron mediante técnicas microbiológicas e histopatológicas que la mucosa intestinal era el lugar donde se producía la multiplicación inicial de *Map* tras la ingestión del microorganismo, con posterior colonización de los linfonódulos mesentéricos. Otros estudios más recientes han confirmado la existencia de lesiones granulomatosas focales en riñones, pulmones y nódulos linfáticos, fundamentalmente en casos con sintomatología clínica avanzada, así como la presencia de *Map* en células mononucleares de la sangre y fluidos de vacas clínicamente afectadas, lo que sugiere una diseminación tanto linfática como sanguínea (van der Giessen *et al.*, 1995; Juste *et al.*, 2005).

La invasión y colonización de la mucosa intestinal se produce principalmente a través de las células M del epitelio que recubre las cúpulas de las placas de Peyer del íleon y yeyuno (García-Marín *et al.*, 1992; Cocito *et al.*, 1994; Tiwari *et al.*, 2006). Este puede ser además el motivo por el cual los animales jóvenes son más susceptibles a la infección que aquellos de edad más avanzada, puesto que

las placas de Peyer abarcan una extensa superficie del intestino en animales jóvenes que va involucionando con la edad hasta que sólo permanecen unos pocos folículos linfoides (Larsen *et al.*, 1975; Momotani *et al.*, 1988). Las células M presentan en su superficie luminal un número elevado de integrinas  $\beta 1$ , receptores para la fibronectina, una glicoproteína presente en los fluidos corporales y matriz extracelular de los vertebrados. De manera análoga, *Map* posee una proteína de acoplamiento a fibronectina (FAP), que permite por tanto la unión de *Map* a las células M a través de un puente de fibronectina (figura 6) (Sigurdardottir *et al.*, 1999; Secott *et al.*, 2002, 2004). La preferencia de *Map* por las células M puede deberse a la alta densidad de integrinas  $\beta 1$  en su superficie en comparación con otros tipos celulares como los enterocitos (Secott *et al.*, 2001, 2004). Otro aspecto que podría explicar el tropismo de *Map* por las células M es la falta de lisosomas y enzimas hidrolíticas característica de dichas células (Miller *et al.*, 2007). Cabe destacar las diferencias significativas encontradas acerca de la capacidad de adhesión de diferentes cepas de *Map* a las células M, lo que podría implicar a su vez diferencias en la virulencia (Schleig *et al.*, 2005). Otra proteína que podría jugar un papel como factor de virulencia es la proteína de membrana de 35kDa, que parece expresarse en condiciones de bajo nivel de oxígeno y alta osmolaridad, condiciones similares a las de la luz intestinal. Los estudios *in vitro* han demostrado una reducción significativa de la invasión de cultivos celulares tras el bloqueo con anticuerpos específicos de esta proteína, sugiriendo un posible rol en los mecanismos de adhesión/invasión (Bannantine *et al.*, 2003).

Aunque las células M parecen ser el tipo celular predilecto para invadir la pared intestinal, diversos estudios sugieren otras vías de invasión complementarias a través del epitelio de las microvellosidades o por vía hematológica, lo que explicaría las lesiones de microvellosidades intestinales sin lesión manifiesta de la submucosa observadas por Sigurdardottir *et al.* (1999, 2001). Un trabajo más reciente del mismo grupo de investigación ha demostrado la capacidad de *Map* para penetrar la mucosa a través de enterocitos, además de células M, aunque el mecanismo empleado es todavía desconocido (Sigurdardottir *et al.*, 2005). Otra teoría más reciente es la posibilidad de que *Map* utilice las células dendríticas intestinales para su invasión, ya que la función de éstas es recoger bacterias presentes en la luz intestinal a través de las uniones estrechas y presentarlas a las células del tejido linfóide intestinal. *Map* interactúa con las células dendríticas a través del glucolípidio LAM manosilado (ManLAM = mannosylated lipoarabinomannan) de la pared celular, que se une al receptor DC-SIGN presente en las células dendríticas (figura 6) (Coussens *et al.*, 2010). Además, la interacción ManLAM/DC-SIGN podría preparar a *Map* hacia una respuesta inmune Th2, lo que conduciría a alteraciones inmunes tal y como se ha sugerido para *M. tuberculosis* (Józefowski *et al.*, 2008).

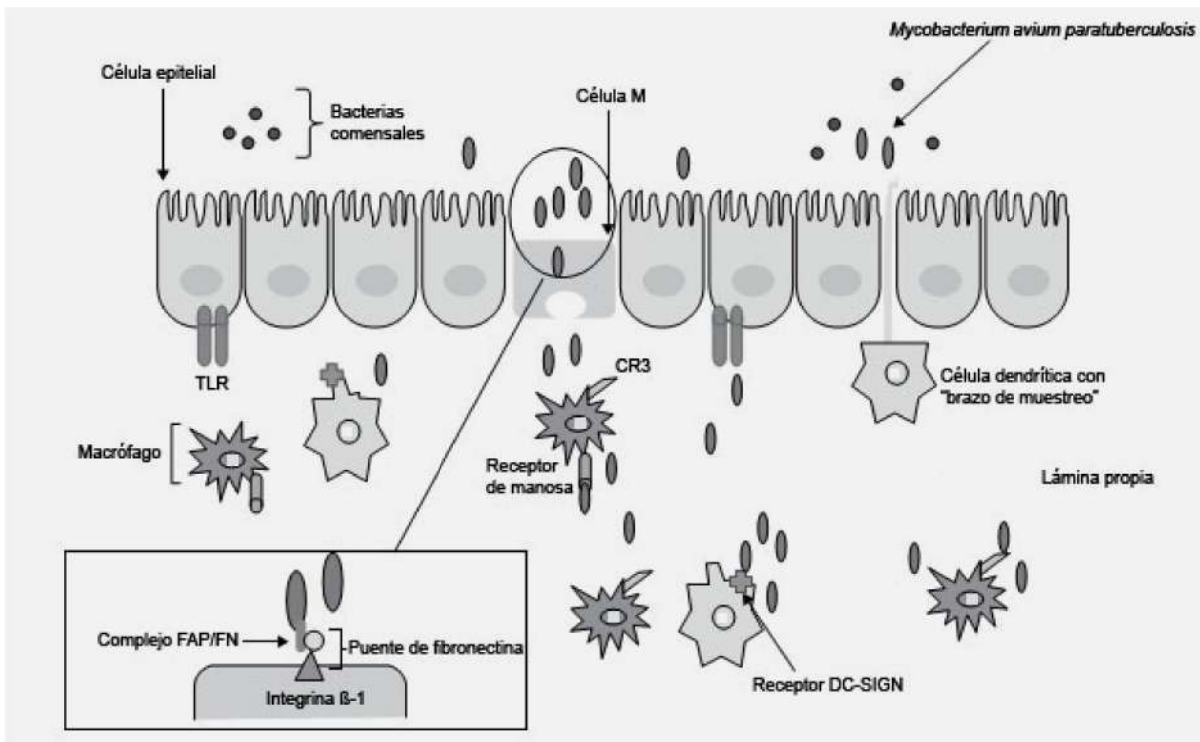


Figura 6. Pared celular del intestino y tácticas de invasión de macrófagos utilizadas por *Map* (adaptada de Coussens *et al.*, 2010).

#### 1.4.2. SUPERVIVENCIA EN MACRÓFAGOS

Una vez atraviesa la barrera epitelial del intestino, *Map* puede ser fagocitado por macrófagos y/o células dendríticas. El efecto patógeno de *Map* se basa fundamentalmente en su multiplicación en el interior de los macrófagos, puesto que no produce toxinas ni posee factores de virulencia que provoquen daño tisular (Chiodini *et al.*, 1984a). Al igual que ocurría con las células dendríticas, el ManLAM de *Map* es capaz de interactuar con diversos receptores presentes en la superficie de los macrófagos. La interacción mejor documentada es la que se establece entre el ManLAM de *Map* y el receptor de manosa, provocando un incremento de la fagocitosis de la bacteria por parte de los macrófagos (Pieters, 2001; Rowe y Grant, 2006; Souza *et al.*, 2007). Tras la entrada de *Map* a la célula, se producen replicación y destrucción bacteriana simultáneamente, lo que implica una respuesta inmune Th1 (Rowe y Grant, 2006; Alonso *et al.*, 2007; Woo *et al.*, 2007). Esta eliminación inicial de *Map* puede ser debida a una rápida respuesta de acidificación del fagosoma mediante la fusión fagosoma-lisosoma, lo que resultaría en destrucción de la bacteria y presentación de antígenos a las células T vía Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC = Major

Histocompatibility Complex). No obstante, la mayoría de fagosomas que contienen *Map* u otras micobacterias patógenas fallan en la maduración. Estudios realizados acerca de las interacciones entre el ManLAM de *M. tuberculosis* y los macrófagos indican que el ManLAM es indispensable en el bloqueo de la maduración de los fagosomas (Russell *et al.*, 2002; Yates y Russell, 2005). Esta habilidad de *Map* y otras micobacterias para inhibir la unión fagosoma-lisosoma es esencial para evitar el reconocimiento del patógeno por el sistema inmune, además de permitir el secuestro de los recursos del macrófago y la persistencia de *Map*. Parece ser que la bacteria juega un papel activo en este mecanismo, puesto que se ha observado que los aislados vivos son capaces de persistir dentro de fagosomas de macrófagos durante 15 días, mientras que la fagocitosis de *Map* inactivo no altera la función de los fagosomas (Kuehnel *et al.*, 2001). Estudios basados en los perfiles de expresión génica de los macrófagos han hallado diferencias en dichos perfiles tras la fagocitosis de *Map* en comparación con la fagocitosis de *Escherichia coli* o de perlas de látex, apoyando la hipótesis de que la fagocitosis de *Map* inhibe la expresión de genes críticos para la maduración de los fagosomas así como la correcta activación de los macrófagos (Tooker *et al.*, 2002; Weiss *et al.*, 2004). Además, otro estudio similar llevado a cabo con macrófagos bovinos infectados con tres cepas diferentes de *Map* ha revelado la sobrerregulación de un número variable de genes de *Map* (22-35), muchos de ellos similares en lo referente a la función celular que codifican. Este análisis sugiere que las diferentes cepas de *Map* emplean un *modus operandi* similar en cuanto al mecanismo de supervivencia en el hospedador (Zhu *et al.*, 2008).

### **I.4.3. ALTERACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE CELULAR**

Existen todavía muchas lagunas de conocimiento en relación a qué mecanismos patogénicos utiliza *Map* para alterar la respuesta inmune adaptativa. Los estudios más recientes están basados en el examen de patrones de expresión génica (especialmente aquellos relacionados con citoquinas) y de señales intracelulares en macrófagos infectados y no infectados, los cuales han permitido mejorar el entendimiento de la patogenia de este proceso. En uno de estos trabajos se examinó la expresión de genes diferenciales en tres grupos de macrófagos derivados de monocitos (MDM = Monocyte Derivated Macrophage): no infectados, infectados por *Mycobacterium avium* subsp. *avium* e infectados por *Map*. Un 41% de los genes expresados diferencialmente en los MDM infectados por *M. avium* subsp. *avium* y *Map* pertenecían a la ruta bioquímica de la proteína kinasa activada por mitógeno (MAPK = Mitogen-activated protein Kinase). También pudo observarse que la infección por *M. avium* subsp. *avium* producía una activación más robusta y prolongada de MAPK p38 y de la

kinasa regulada por señal extracelular (ERK1/2 = Extracelular Regulated Kinase), dos de los miembros más destacados de la ruta metabólica de MAPK, que en aquellos MDM infectados por *Map*. Este hallazgo podría explicar porqué *M. avium* subsp. *avium* es fácilmente eliminado por los MDM bovinos mientras *Map* consigue permanecer viable en su interior y mantener la infección (Murphy *et al.*, 2006). Por lo tanto, parece que uno de los elementos clave en la persistencia de las infecciones y la supervivencia de las micobacterias podría ser la interferencia en las rutas de activación de los macrófagos, pero todavía no está claro qué mecanismos emplea *Map* en el interior de los macrófagos para asegurar su supervivencia y prevenir una respuesta inmune adecuada. Según algunos estudios recientes, los macrófagos infectados con *Map* sufren una sobreexpresión de IL-10, una interleucina que puede disminuir drásticamente la respuesta inmune de carácter proinflamatorio, fundamental en el caso de infecciones intracelulares (de Almeida *et al.*, 2008).

Otra de las cuestiones clave que todavía no está clara es qué papel juega *Map* en la habilidad de los macrófagos para responder a las células T y activarlas de cara a lograr una respuesta inmune efectiva. Uno de los componentes más críticos en las interacciones macrófago-linfocito T es la unión entre el receptor CD40 de los macrófagos con el CD154 (ligando del receptor CD40) expresado en las células T activadas. Este acoplamiento es uno de los mecanismos básicos por los que se produce la activación de macrófagos mediante células T (Grewal *et al.*, 1997). En los monocitos y macrófagos, la activación de CD40 conduce a la secreción de citoquinas proinflamatorias como la IL-12, (Stout y Suttles, 1996; di Marzio *et al.*, 2000), inducción de óxido nítrico-sintasa inducible (iNOS = inducible Nitric Oxide Sintase), producción de óxido nítrico (van Kooten y Banchereau, 1996), aumento de la supervivencia celular e inducción de moléculas coestimuladoras (Kiener *et al.*, 1995). Los estudios focalizados en la transducción de la señal de CD40 han señalado la activación de dos rutas principales que provocan la activación de factores de transcripción latentes. Una de ellas supone la activación del inhibidor del complejo kinasa del factor nuclear *kappa* B, mientras que la segunda provoca la activación de la ruta de MAPK, que resulta en la activación de diferentes factores de transcripción (Van Kooten y Banchereau, 1996). Ambas rutas convergen en la expresión de genes de carácter inflamatorio, incluyendo la expresión de IL-12p40, iNOS, IL-6, IL-8 y TNF $\alpha$ . Un estudio reciente ha podido demostrar que los macrófagos infectados por *Map* presentan ciertos defectos tras la señalización a través de CD40 (Sommer *et al.*, 2009). En macrófagos infectados por *Map*, la expresión de los genes para IL-6 y TNF $\alpha$  provocada por la unión CD40-CD154 no sufre apenas cambios. Sin embargo, la activación de la expresión de IL-12p40 e iNOS sí se ve disminuida. Esta diferencia es crítica, ya que la IL-12 es el mayor desencadenante para el desarrollo de una correcta respuesta de tipo Th1 y la consecuente producción de IFN- $\gamma$  por las células T, mientras que la actividad de iNOS



promueve la producción de especies reactivas de nitrógeno que son el mecanismo fundamental empleado por los macrófagos para eliminar las bacterias fagocitadas. Para un microorganismo intracelular como *Map*, la disminución en la producción de IL-12 e iNOS podría mejorar su supervivencia y provocar una respuesta inmune inadecuada, y en especial si tenemos en cuenta la sobreexpresión de IL-10 descrita anteriormente. Estos resultados son también coherentes con observaciones *in vivo*, donde se ha demostrado que muestras de tejido intestinal infectadas con *Map* contenían altos niveles de IL-10, pero no de IL-12 (Coussens *et al.*, 2004).

En resumen, son muchos los estudios que han señalado los efectos de *Map* en la señalización a través de MAPK en macrófagos infectados, pero todavía se desconoce cuál es el mecanismo exacto que los produce. La activación de MAPK implica la fosforilación y desfosforilación de sustratos específicos como p38, SAPK/JNK o ERK1/2. Por lo tanto, *Map* podría alterar el estado de fosforilación de alguna de estas proteínas. Sin embargo, a las 2-4 horas de la infección por *Map*, la activación de p38, SAPK/JNK y ERK1/2 está bloqueada, probablemente por la acción de fosfatasa MAPK (Sommer *et al.*, 2009). Una posibilidad es que *Map* modifique la disponibilidad de un sustrato específico para alguna de las proteínas MAPK, ya que muchos de los sustratos de la mayoría de miembros de la familia MAPK son factores de transcripción, lo que tendría un profundo efecto en la expresión génica de los macrófagos infectados. Otra teoría es que *Map* afecte a la actividad de una o más fosfatasas MAPK. El descenso de la actividad fosfatasa produciría una activación sostenida de uno o más factores de transcripción dependientes de MAPK, mientras que una actividad fosfatasa prolongada podría disminuir la activación de uno o más factores. Cualquiera de estas dos posibilidades conduce a una alteración continuada de la señalización de MAPK, lo cual es consistente con las observaciones descritas en algunos estudios (Weiss y Souza, 2008; Sommer *et al.*, 2009). Por último, la posibilidad restante sería que *Map* expresase una quinasa o fosfatasa activa frente a una o más proteínas MAPK, alterando entonces directamente la ruta de MAPK. Esta hipótesis podría demostrarse directamente con nuevos estudios mediante el empleo de métodos para modificar genéticamente *Map* (Harris *et al.*, 1999; Park *et al.*, 2008), unido al conocimiento actual del genoma completo de *Map* (Li *et al.*, 2005).

#### **I.4.4. RESPUESTA INMUNE HUMORAL**

La respuesta inmune de tipo humoral se asocia con el fallo de la respuesta inmune celular, y por tanto con la progresión de la infección, ya que la existencia de anticuerpos frente a *Map* no parece proteger a los animales infectados y está más relacionada con las fases avanzadas de la enfermedad

(Stabel, 2000). Tradicionalmente se ha teorizado que la evolución de la respuesta inmune a la infección por *Map* responde a un cambio en la respuesta adaptativa desde células Th1 a células Th2, es decir, un paso desde una respuesta proinflamatoria protectora a una respuesta humoral ineficaz (Chiodini, 1996). Existen estudios que han comparado el estado clínico del animal con la frecuencia de las diferentes poblaciones de células T en animales sintomáticos y asintomáticos, observando que en las fases de sintomatología clínica se producía una reducción del número de linfocitos T CD4+, lo que lleva a una falta de control sobre la replicación de *Map* y al desarrollo de la enteritis granulomatosa típica del proceso (Koets *et al.*, 2002; Koo *et al.*, 2004). El proceso de desarrollo de la respuesta humoral es consecuencia de la estimulación de los linfocitos B por parte de las células Th activadas unido a la presentación de antígenos por las APCs (Antigen Presenting Cells = células presentadoras de antígeno). Una vez activados, los linfocitos B comienzan a diferenciarse y a producir anticuerpos IgM e IgG1 contra los antígenos de *Map*. El momento en el que comienza esta respuesta parece estar relacionado con la dosis infectiva inicial y la vía de infección (Waters *et al.*, 2003). Lo que sí parece claro es la existencia de una relación directa entre el grado de eliminación fecal de *Map* y el título de anticuerpos detectados mediante ELISA (Storset *et al.*, 2001; Whittington y Sergeant, 2001; Stewart *et al.*, 2006). Las hipótesis más actuales sugieren que la respuesta inmune humoral se podría producir en cualquier momento, pero con la progresiva depleción de la respuesta inmune proinflamatoria acabaría siendo la respuesta predominante, considerando el proceso como clínico y terminal a partir de este momento (Coussens, 2004).

## I.5. CUADRO CLÍNICO Y LESIONAL

Clásicamente, el cuadro clínico de la paratuberculosis se ha caracterizado por la aparición de diarrea, más o menos intermitente según la especie, que evoluciona hacia una emaciación progresiva que conduce a la muerte del animal. Sin embargo, esta forma representa un porcentaje relativamente bajo de la casuística de la enfermedad, puesto que la fase más prolongada es la fase subclínica. El signo más característico y evidente de la enfermedad en todas las especies es la pérdida progresiva de condición corporal (Chiodini *et al.*, 1984a; Gilmour y Angus, 1991; García-Marín *et al.*, 1994), que suele aparecer asociado a otros síntomas relacionados con la caquexia, como la aparición de edema submandibular y atrofia de la masa muscular glútea y femoral (Dunkin, 1934), deterioro del pelo y lana y empaldecimiento de las mucosas (Behrens, 1955; Badiola *et al.*, 1980). Este empeoramiento del estado general se acompaña de pérdidas en la producción, que en vacuno lechero pueden oscilar entre un 4 - 14% dependiendo del número de lactación (Benedictus *et al.*, 1985; Nordlund *et al.*, 1996; Stabel, 1998; Losinger, 2005). Entre otros procesos relacionados de manera indirecta, se pueden incluir mamitis y problemas reproductivos como infertilidad (Merkal *et al.*, 1975; Wilson *et al.*, 1997; Corpa *et al.*, 1998).

De manera general, la paratuberculosis se divide en cuatro fases, dependiendo de la severidad de los signos clínicos, la capacidad potencial de eliminación de microorganismos al ambiente y la facilidad con la que puede detectarse la enfermedad mediante técnicas de diagnóstico en laboratorio. Por cada vaca nacida en la explotación que presente paratuberculosis en un estado avanzado, se estima que pueden existir otros 15-25 animales infectados (Whitlock, 1992). Sin embargo, sólo un 25-30% de estos animales podrán ser detectados como tal, aún con el empleo de las técnicas moleculares más sensibles (Whitlock, 2009). El animal con sintomatología clínica representa la “punta del iceberg”. A modo de ejemplo, si aparecen dos animales con síntomas clínicos en un rebaño con 100 vacas adultas y 100 novillas de recría, existirán entre 30 y 50 animales infectados, pero sólo 10 - 15 de éstos aproximadamente serán detectables mediante cultivo fecal o PCR. Por lo tanto, es razonable concluir que si en un rebaño de 100 animales adultos hay 25 - 30 vacas positivas mediante cultivo fecal, entonces la mayoría del rebaño ha estado expuesto y posiblemente pueda estar infectado. En la tabla 7 puede verse un resumen de las fases de la enfermedad así como su importancia relativa en un rebaño afectado (Fecteau y Whitlock, 2010).

Tabla 7. El “efecto iceberg” de la paratuberculosis y las fases de la enfermedad (adaptado de Fecteau y Whitlock, 2010).

Fase	Estado de la infección	Nº de animales
Fase IV	Enfermedad clínica avanzada	1 animal
Fase III	Enfermedad clínica	1-2 animales
Fase II	Adultos portadores inaparentes	6-8 animales
Fase I	Infección silente en terneras y novillas	15-25 animales

### I.5.1. FASES DE LA ENFERMEDAD

#### I.5.1.1. Fase I: infección silente

La enfermedad comienza tras la entrada de *Map* a la mucosa intestinal a través de las células epiteliales. Una vez se establece la infección, *Map* se multiplica lentamente en la mucosa de yeyuno e íleon y se disemina hacia los nódulos linfáticos regionales (Clarke, 1997). De manera general esta fase de eclipse suele tener una duración mínima de dos años, pudiendo llegar a ser superior a diez años o más en algunos casos. Sin embargo, en rebaños con una alta prevalencia de paratuberculosis, el ganado en fase I puede evolucionar a fase II o incluso fase III (paratuberculosis clínica) en menos de un año. De esto puede extraerse que la progresión de la enfermedad es dependiente de la dosis de *Map*, junto con la edad en el momento de infección. Típicamente, el ganado vacuno infectado durante el periodo perinatal evoluciona hacia la fase III y IV en un periodo de 1-3 años antes de ser eliminado del rebaño (Fecteau y Whitlock, 2010).

Los animales infectados en fase I pueden eliminar *Map* en las heces, pero siempre por debajo de los límites de detección de los métodos actuales de diagnóstico como el cultivo fecal y/o PCR. Si se recogieran muestras de este ganado de manera frecuente, se podría detectar *Map* ocasionalmente en las heces a concentraciones muy bajas (Waters *et al.*, 2003). En el examen post-mortem, es posible que no puedan observarse los bacilos de *Map* mediante microscopía, pero pueden ser detectados mediante cultivo de tejido intestinal de diferentes zonas (Sweeney *et al.*, 2006; Stabel *et al.*, 2009), lo que sugiere que la diseminación del agente por el intestino se produce ya en fases tempranas de la enfermedad. En contraste con el dogma generalizado, se ha descrito que novillas infectadas con *Map* de manera natural y experimental desarrollan una respuesta inmune medible frente a proteínas específicas de *Map*, tanto celular como humoral (Waters *et al.*, 2003; Stabel *et al.*, 2009). Sin embargo, los actuales ELISA's disponibles comercialmente fallan en la detección de una respuesta humoral, lo que pone de manifiesto la necesidad de desarrollar tests con mayor sensibilidad para la detección precoz de la infección.

### **I.5.1.2. Fase II: portadores adultos inaparentes**

Los animales que pasan a la fase II presentan mayores concentraciones de *Map* en el tejido intestinal. Estos animales no manifiestan pérdida de peso o diarrea pero pueden revelar una respuesta inmune alterada, con aumento de la producción de IFN- $\gamma$  por parte de las células T sensibilizadas y/o aumento de la respuesta de tipo humoral (Bassey y Collins, 1997). Las concentraciones de *Map* en la mucosa intestinal necesitan alcanzar un nivel crítico antes de que se eliminen con las heces en cantidad suficiente para ser detectables por los métodos disponibles. Con todo, la mayoría de animales en fase II eliminan *Map* en sus deposiciones, lo que contribuye a contaminar el ambiente, actuando como fuente de infección para otros animales presentes en la explotación.

El grado de progresión de la enfermedad en la fase II es muy variable y parece estar influenciado por un amplio rango de factores, entre los que se podrían incluir la edad en el momento de la primera exposición, la dosis inicial de *Map*, la frecuencia de re-exposición, factores genéticos del hospedador y del patógeno, así como factores ambientales, nutricionales y de estrés. Muchos de estos animales, o quizá la mayoría, serán eliminados del establo por razones no relacionadas con el estatus frente a la enfermedad, como pueden ser infertilidad, mamitis, cojeras o descenso de la producción láctea (Merkal *et al.*, 1975).

### **I.5.1.3. Fase III: enfermedad clínica**

Los animales en fase III presentan pérdida de peso gradual y diarrea. El apetito permanece sin alteraciones y la diarrea suele manifestarse de manera intermitente durante semanas. El resto de signos vitales como frecuencia cardíaca, frecuencia respiratoria y temperatura son normales. La emaciación y caquexia se desarrolla gradualmente, con un descenso paulatino de la producción de leche. Prácticamente todos los animales en esta fase presentan cultivo fecal positivo, y generalmente existe también un incremento de la producción de anticuerpos detectable mediante el empleo de ELISA's comerciales e inmunodifusión en gel de agar. El ganado que alcanza esta fase de la enfermedad rara vez permanece más de unas pocas semanas en el rebaño, ya que suelen ser eliminados debido a la pérdida de peso, disminución de la producción láctea y diarrea incoercible que no responde a tratamiento. En esta fase, la población de *Map* en la mucosa intestinal es muy alta. La capacidad de absorción del intestino está reducida, lo que conduce a una disminución de peso asociada a pérdida de proteína. El engrosamiento de la mucosa intestinal junto con la linfadenopatía asociada a lo largo de un tramo sustancial del intestino es signo característico del avance del proceso. La proliferación de linfocitos reactivos, macrófagos y células gigantes en las

vellosidades provoca su ensanchamiento y la consecuente disminución de la capacidad de absorción. La infección se disemina a localizaciones extraintestinales, pudiendo detectar *Map* mediante cultivo postmortem en los linfonódulos supramamarios, pulmonares, hepáticos y también de la cabeza. Estas vacas presentan también un alto riesgo de transmitir el patógeno *in utero*, y existe una mayor frecuencia de aislamiento de *Map* en leche. El ganado en esta fase elimina cantidades muy elevadas de *Map* en sus heces, contaminando el ambiente, lo que incluye frecuentemente a su vez comederos, bebederos, sala de partos, etc. (Fecteau y Whitlock, 2010).

#### **I.5.1.4. Fase IV: enfermedad clínica avanzada**

Los animales que llegan a esta fase son débiles, caquécticos, y generalmente presentan una diarrea crónica y profusa. El edema intermandibular es un signo típico de esta fase (figura 7). El ganado puede evolucionar de la fase II a la fase IV en unas pocas semanas, pero la progresión típica de la enfermedad acostumbra a ser más gradual. Una vez se instauran los síntomas de diarrea copiosa e hipoproteinemia, la condición general del animal se deteriora rápidamente, incluso en cuestión de días. La mayoría de animales en este estado son enviados a sacrificio; en otro caso, morirán como resultado de la severa caquexia y deshidratación (Fecteau y Whitlock, 2010).



Figura 7. Vaca con paratuberculosis en fase clínica avanzada (Flecha: edema submandibular).

### **I.5.2. CUADRO LESIONAL**

#### **I.5.2.1. Lesiones macroscópicas**

En general, las lesiones macroscópicas que se describen en un caso de paratuberculosis clínica pueden dividirse, por una parte, en lesiones comunes a cualquier proceso caquetizante, como es la

falta de depósitos grasos, atrofia de las serosas y de la masa muscular, edema submandibular y acumulación de líquido en cavidad abdominal, torácica y pericárdica (Buergelt *et al.*, 1978; Chiodini *et al.*, 1984a; Gilmour y Angus, 1991; García-Marín *et al.*, 1994; Clarke y Little, 1996), y por otra parte, en lesiones del aparato digestivo que son más específicas de la enfermedad. Estos fenómenos más específicos incluyen afectación de íleon, yeyuno, válvula ileocecal, nódulos linfáticos mesentéricos e incluso ciego y primer tramo del colon (McEwen, 1939; Stamp y Watt, 1954; Chiodini *et al.*, 1984a; Reddy *et al.*, 1984; Van Kruiningen *et al.*, 1986; García-Marín *et al.*, 1994).

En la especie bovina, la lesión más característica de la paratuberculosis es el engrosamiento de la pared intestinal, principalmente en el íleon, con la mucosa y submucosa edematosas y tumefactas, de aspecto aterciopelado y carnoso, formando gruesos pliegues de aspecto similar a las circunvoluciones cerebrales que no desaparecen a la tracción, y que pueden presentar congestión, petequias e incluso ulceraciones (Buergelt *et al.*, 1978; Chiodini *et al.*, 1984a; Blood y Radostits, 1989) (Figura 8). También es frecuente observar linfangitis y linfangiectasia, con los vasos linfáticos a modo de cordón tortuoso de color blanquecino, conectando la serosa intestinal con los ganglios linfáticos a través del mesenterio (Buergelt *et al.*, 1978; Badiola *et al.*, 1980; Blood y Radostits, 1989; Pérez *et al.*, 2000). Los ganglios mesentéricos, y en especial los ileocecales y yeyunales, suelen estar aumentados de tamaño, con aspecto tumefacto y edematoso, y con la zona medular de color marrón verdoso al corte. La aparición de lesiones en otras localizaciones es menos frecuente y está circunscrita a estadios avanzados de la enfermedad, pudiendo aparecer granulomas en el hígado y ganglios asociados, o lesiones arterioescleróticas en aorta torácica, mesentérica y/o endocardio (Chiodini *et al.*, 1984a; Blood y Radostits, 1989; Clarke, 1997; Corpa *et al.*, 1998).

En los pequeños rumiantes, a diferencia de la especie bovina, el engrosamiento de la pared y la formación de pliegues suele ser menos evidente. Sin embargo, no es extraño encontrar lesiones caseificadas o calcificadas, especialmente en la especie caprina. La linfangitis y linfangiectasia son también normalmente muy marcadas (Stamp y Watt, 1954; Badiola *et al.*, 1980; Buergelt *et al.*, 1978; Chiodini *et al.*, 1984a; García-Marín *et al.*, 1994; Clarke, 1997; Corpa *et al.*, 2000). Por otra parte, en ocasiones se ha descrito en el ganado ovino la presencia de un tono amarillento en la mucosa intestinal, debido a infección por cepas pigmentadas de *Map* (Taylor, 1945; Stamp y Watt, 1954; Clarke y Little, 1996; Stevenson *et al.*, 2002).



Figura 8. Aspecto de una mucosa intestinal sana (arriba) y una mucosa intestinal en un animal afectado de paratuberculosis (abajo) (<http://johnes.org>).

#### I.5.2.2. Lesiones microscópicas

A nivel microscópico, la paratuberculosis se corresponde con una enteritis granulomatosa que se localiza en los últimos tramos de intestino delgado, primeros del grueso y nódulos y vasos linfáticos asociados. Se describe un infiltrado celular que afecta a la lámina propia de la mucosa, y que está compuesto por linfocitos, células plasmáticas, células epitelioides y gran cantidad de macrófagos, que normalmente aparecen repletos de bacilos en su interior. Este infiltrado puede distribuirse de manera focal o difusa, lo que provoca la dilatación de las vellosidades intestinales (llegando incluso a atrofiarlas) y el desplazamiento de las criptas de Lieberkhün, que pueden contener restos celulares, lo que produce su obliteración (Stamp y Watt, 1954; Buergelt *et al.*, 1978; Badiola *et al.*, 1980; Chiodini *et al.*, 1984a; Corpa *et al.*, 2000a; González *et al.*, 2005).

De manera general las lesiones microscópicas muestran una gran variabilidad en cuanto a intensidad, gravedad y tipos celulares implicados, lo que parece depender de la dosis infectiva, estado inmunológico y grado de susceptibilidad del hospedador, así como de la cepa específica de *Map* (Chiodini *et al.*, 1984a; Clarke, 1997). Como ejemplo, dos trabajos recientes realizados mediante infección experimental en ganado ovino ha descrito diferencias importantes en los hallazgos histológicos en función de la edad y la dosis infectiva (Delgado *et al.*, 2013), así como en función del



tipo de cepa implicada (tipo S o tipo C) (Fernández *et al.*, 2104). Debido a esta variabilidad, diversos autores han realizado diferentes clasificaciones de las lesiones descritas para cada una de las especies domésticas, según criterios como la localización, intensidad, tipos de células inflamatorias y número de bacilos. En la tabla 8 pueden verse las clasificaciones realizadas por Buergelt *et al.* en 1978 y por González *et al.* en 2005.

Tabla 8. Clasificación lesional en la especie bovina (Buergelt *et al.*, 1978; González *et al.*, 2005).

---



---

**Buergelt *et al.*, 1978**

- **Lesiones leves (clase 1):** presencia de células gigantes de Langhans aisladas en la lámina propia o dispersas en la zona paracortical de nódulos linfáticos mesentéricos. Escasos BAAR.
- **Lesiones moderadas (clase 2):** pequeños grumos de macrófagos y/o células gigantes de Langhans aisladas en la lámina propia, submucosa, seno subcapsular y zona paracortical de nódulos linfáticos mesentéricos. Pocos BAAR.
- **Lesiones graves (clase 3):** numerosos macrófagos y células gigantes que infiltran todas las capas de varios segmentos de intestino delgado, alterando la estructura histológica normal. También afectados los nódulos mesentéricos. Incremento en el número de BAAR.

---



---

**González *et al.*, 2005**

- **Lesiones focales:** pequeños granulomas de entre 5-30 células macrofágicas en los espacios interfoliculares del tejido linfoide intestinal y/o de los nódulos linfáticos ileales y yeyunales. Escaso número de linfocitos y células gigantes asociadas a los granulomas o aisladas, principalmente en la válvula ileocecal. Ausencia de BAAR pero positividad a la técnica inmunohistoquímica frente a la lisozima.
  - **Lesiones multifocales:** pequeños granulomas formados por 15-40 macrófagos o células gigantes de Langhans rodeados por un pequeño infiltrado de linfocitos y células plasmáticas, localizados en las vellosidades intestinales sin producir alteración morfológica, salvo un ligero engrosamiento en algunos tramos de intestino. Lesiones en la mucosa y en los espacios interfoliculares de la placa de Peyer y/o de los nódulos linfáticos ileales o yeyunales, de mayor tamaño y más numerosas que en las lesiones focales. Presencia de un número moderado de BAAR y positividad a la técnica inmunohistoquímica frente a la lisozima.
  - **Lesiones difusas:** afectan a grandes tramos de pared intestinal, con o sin tejido linfoide. Marcado engrosamiento y alteración de la morfología de la pared intestinal. Se subdividen en:
    - **Lesiones difusas multibacilares:** grave enteritis granulomatosa con predominio de macrófagos cargados de BAAR y células epitelioides que infiltran de forma difusa la lámina propia dando una apariencia de mosaico. Marcado engrosamiento de las vellosidades y desplazamiento de las criptas de Lieberkhün hacia zonas más basales, pudiendo aparecer dilatadas y con un material necrótico purulento en su interior. Número variable de linfocitos y células gigantes de Langhans. Este infiltrado afecta también a la submucosa (espacios interfoliculares de la placa de Peyer), la muscular y la serosa. En ocasiones, grave arteritis trombótica de carácter granulomatoso. Serosa afectada con infiltrados granulomatosos multifocales y endolinfangitis trombótica. Linfadenitis granulomatosa difusa en los nódulos linfáticos ileocecales y yeyunales, con un infiltrado de macrófagos y células gigantes en cortical y paracortical, alterando la estructura histológica. Gran número de BAAR.
-

- **Lesiones difusas linfocíticas (paucibacilares):** enteritis granulomatosa grave difusa con infiltrado inflamatorio con predominio de linfocitos, algunas células plasmáticas y células gigantes de Langhans. Alteración de la estructura normal de la mucosa, engrosamiento y acortamiento de las vellosidades y desplazamiento de las criptas de Lieberkhün hacia zonas basales. Granulomas en la submucosa con moderado número de macrófagos y células gigantes en espacios interfoliculares de la placa de Peyer que no alteran gravemente la estructura histológica. Muscular no afectada y serosa con perilinfangitis y serositis. Linfadenitis granulomatosa difusa grave en nódulos linfáticos con granulomas esporádicos y numerosas células gigantes, principalmente en la cortical. Escasos o nulos BAAR.
- **Lesiones difusas intermedias:** Enteritis granulomatosa difusa grave con infiltrado celular formado por linfocitos, células plasmáticas, células gigantes y macrófagos, aislados o formando pequeños granulomas. Vellosidades intestinales engrosadas y criptas desplazadas hacia zonas más basales. Submucosa severamente afectada por infiltrado inflamatorio que generalmente rodea vasos conteniendo trombos. Acúmulos de células inflamatorias mononucleares de distribución multifocal en la muscular. Linfangitis y serositis en la serosa. Nódulos linfáticos afectados. Número variable de BAAR, menor que en las lesiones multibacilares.

### I.5.3. ELIMINACIÓN DE *MAP*

#### I.5.3.1. Eliminación activa

La eliminación activa de *Map* se produce cuando un animal infectado sistémicamente excreta *Map* en su tracto gastrointestinal. Cuando un animal se infecta, generalmente en el periodo neonatal, comienza una fase de eclipse de unos 2 años o más de duración, durante la cual no es posible detectar *Map* en sus heces. A continuación, y debido a la multiplicación de *Map* y la formación de granulomas en la mucosa intestinal y tejido linfoide asociado, la cantidad de *Map* excretada con las heces comienza a aumentar, hasta que dicha cantidad es suficiente para ser detectada por los métodos actuales como el cultivo fecal o PCR (Fecteau y Whitlock, 2010).

#### I.5.3.2. Eliminación pasiva

La eliminación pasiva de *Map* ocurre cuando el ganado presenta cantidades de micobacterias detectables en heces tras la ingestión oral del microorganismo. Este proceso se ha descrito como un fenómeno de “pass-through” o pase intestinal de *Map* en animales no infectados, los cuales presentan cultivos fecales positivos durante varios días después del consumo de alimentos o agua contaminados con heces procedentes de animales infectados (Sweeney *et al.*, 1992a). La eliminación pasiva ocurre típicamente tras inoculaciones orales experimentales de la bacteria en terneros neonatales (Sweeney *et al.*, 2006; van Roermund *et al.*, 2007; Stabel *et al.*, 2009), pero si *Map* se

sigue detectando tras 14 días o más de la última inoculación oral debe ser considerado como una evidencia de eliminación activa (Hines *et al.*, 2007).

Los animales supereliminadores (apartado 5.3.3) contribuyen enormemente a la existencia de este suceso en el ganado no infectado. El hecho de que algunos eliminadores bajos e incluso moderados puedan ser en realidad falsos positivos (causados por eliminación pasiva de *Map* en lugar de eliminación activa) es uno de los mayores problemas para el diagnóstico y manejo de la paratuberculosis en una explotación (Fecteau y Whitlock, 2010).

### **I.5.3.3. Animales supereliminadores**

Tradicionalmente, el ganado vacuno con resultado positivo al cultivo fecal ha sido considerado como infectado y por lo tanto una amenaza para la diseminación de la enfermedad en la explotación. Con el tiempo, se descubrió que existían diferencias en el nivel de eliminación de *Map* en aquellos animales con cultivo fecal positivo, siendo mayor el riesgo de propagación de la enfermedad cuanto mayor era el recuento de colonias de la bacteria en el medio de cultivo. Durante los últimos 20 años, el nivel de eliminación fecal de *Map* se ha dividido en 3 categorías en base al recuento bacteriano en medio de Herrold con yema de huevo: bajo (1-9 UFC/tubo), moderado (10-50 UFC/tubo) o alto (>50 UFC/tubo) (Crossley *et al.*, 2005). La mayoría de laboratorios siguen esta clasificación, por lo que en general nunca se realiza un recuento más allá de 50 colonias. Sin embargo, los animales con recuentos elevados (grandes eliminadores) representan un espectro de concentración fecal de *Map* desde  $10^3$  a  $10^7$  de UFC por cada gramo de muestra de heces. Cabe suponer que algunos de estos tubos con recuentos TNTC (“too numerous to count”= demasiado numerosos para contar) procedan de muestras de animales supereliminadores (SSs = supershedders), y por lo tanto deberían ser identificados antes de que las consecuencias para la explotación sean más severas (Fecteau y Whitlock, 2010).

El término “supereliminador” se propuso finalmente para describir a aquellos animales que presentaban una eliminación superior a  $10^4$  UFC/g de heces. Este fenómeno ha sido descrito para otras enfermedades bacterianas y víricas, incluyendo el SARS (Severe Acute Respiratory Syndrome = Síndrome Respiratorio Agudo Severo), SIDA (Síndrome de la Inmunodeficiencia Adquirida) y también *Escherichia coli* O157 verotoxigénico en el ganado vacuno (Cray y Moon, 1995; Bach *et al.*, 2005). La mayoría de los SSs de *Map* son animales asintomáticos, sin evidencias de diarrea y/o pérdida de peso, pero que eliminan cantidades muy elevadas de *Map* al ambiente (Whitlock *et al.*, 2005). Aunque las vacas lecheras SS han existido siempre, este fenómeno no ha sido tenido en cuenta para la mayoría de programas de control establecidos (Fecteau y Whitlock, 2010).

Hasta la fecha no se han publicado estimaciones consistentes acerca de la frecuencia de estos animales SS entre el ganado con cultivo positivo de rebaños infectados. Estimaciones preliminares sugieren que el 10% de los grandes eliminadores de una granja pueden ser SSs, con una excreción superior a 10 billones de UFCs de *Map* por vaca y día. Diversos estudios previos realizados en explotaciones de aptitud láctea han encontrado una alta proporción (40-60%) de eliminadores bajos (Whitlock *et al.*, 2000; Wells *et al.*, 2002; Crossley *et al.*, 2005), lo que podría significar un fenómeno de eliminación pasiva para muchos de esos animales con cultivos positivos y recuentos bajos después de haber consumido alimentos o agua contaminada por un número muy bajo de animales SS. Los cálculos indican que un solo gramo de heces de una vaca SS ( $3 \times 10^6$  UFC/g) podría resultar en una eliminación pasiva de *Map* por parte de una vaca no infectada. Si esta hipótesis se demuestra como correcta, este fenómeno de eliminación pasiva podría explicar hasta un 50% de todo el ganado con cultivo positivo en un rebaño cuando un SS está presente. De hecho, una vaca SS elimina más *Map* al medio que 2000 eliminadores moderados o 20000 eliminadores bajos (Fecteau y Whitlock, 2010).

Por lo tanto, los animales SS asumen el rol de ser el “caballo de Troya” en la paratuberculosis. Estas vacas pueden no manifestar la enfermedad clínica inicialmente, pero representan la mayor amenaza para la diseminación de *Map* al resto del rebaño. Tal y como se menciona anteriormente, estos animales excretan *Map* de un modo tan eficaz que con un solo gramo de heces que ingiera un animal sano pueden provocar una eliminación fecal transitoria de la bacteria, aunque también puede producir infección en vacas adultas si la cantidad ingerida es elevada o si las re-exposiciones son frecuentes. Por otro lado, hay que tener en cuenta que el calzado, las ruedas de vehículos y cualquier otro fómite contaminado con unos pocos gramos de heces de estas vacas SS son también fuentes potenciales de infección para la cría recién nacida. Además, las crías nacidas de estas SSs tienen una mayor probabilidad de infectarse *in utero*. La leche y el calostro de una vaca SS presentan también mayores niveles de *Map*, y por tanto su descendencia tiene mayor probabilidad de infectarse. Por último, en sistemas de producción en extensivo basados en pastoreo estos animales SS pueden diseminar y contaminar el pasto, exponiendo a los lotes que pastan el mismo terreno posteriormente a ingentes cantidades de *Map* (Fecteau y Whitlock, 2010).

## I.6. DIAGNÓSTICO

El diagnóstico de la paratuberculosis ha sido y es una cuestión de gran complejidad, debido a las dificultades que suponen su elevado tiempo de incubación hasta la aparición de los primeros signos clínicos, el carácter inespecífico de los mismos, y la amplia diversidad en cuanto a las lesiones producidas y la respuesta inmune del hospedador. Los métodos diagnósticos más empleados se basan, por una parte, en la detección e identificación del agente causal, y por otra parte, en la detección y medición de la respuesta inmune desarrollada por el hospedador. A pesar del amplio abanico de técnicas disponibles, es altamente recomendable emplear diferentes combinaciones de dichas técnicas a fin de garantizar un correcto diagnóstico y, en especial, a nivel de animal individual, ya que en general la sensibilidad de la mayoría de tests diagnósticos no es muy elevada (Chiodini *et al.*, 1984a; Clarke y Little, 1996; Stabel y Whitlock, 2001).

### I.6.1. DIAGNÓSTICO CLÍNICO/EPIDEMIOLÓGICO

El prototipo más tradicional de animal con paratuberculosis serían hembras entre 2-4 años de edad, y que generalmente tras el parto comienzan a presentar un cuadro de adelgazamiento progresivo, reducción de la producción láctea y diarrea incoercible de carácter intermitente o continuo en las últimas fases (Chiodini *et al.*, 1984a; García-Marín *et al.*, 1994). En una explotación afectada, este episodio se produce a lo largo de todo el año, con especial incidencia en los momentos de mayor estrés para los animales, provocando entre un 1-10% de bajas por goteo (García-Marín *et al.*, 1994). Con todo, no se puede descartar la existencia de la enfermedad en un rebaño en base a la ausencia de sintomatología, ya que los casos clínicos solamente representan la punta del iceberg (Kalis *et al.*, 1999a).

En el ganado vacuno, el proceso suele diagnosticarse en un principio como una diarrea no infecciosa, puesto que generalmente los casos clínicos no aparecen de manera simultánea (Corpa *et al.*, 1998). En el ganado ovino y caprino el diagnóstico clínico presenta todavía una mayor complejidad, ya que el síntoma más destacado es la emaciación (García-Marín *et al.*, 1994). Cabe mencionar que en el diagnóstico diferencial en ganado vacuno se debe incluir cualquier proceso crónico caquetizante, como gastroenteritis parasitarias, procesos hepáticos crónicos, presencia de abscesos internos, carencia de cobalto, o formas crónicas causadas por infecciones por *Salmonella* spp. o el virus de la diarrea vírica bovina (Kimberling, 1988; Carrigan y Seaman, 1990). En los

pequeños rumiantes, deben considerarse también las infecciones por lentivirus (Blood y Radostits, 1989; Pérez *et al.*, 1991).

Según algunos estudios, entre un 13-32% de las explotaciones de bovino consideradas libres de la enfermedad en base a la ausencia de signos clínicos observados podrían estar infectadas de manera subclínica (Daniels *et al.*, 2002; Kalis *et al.*, 2004). En estas explotaciones las manifestaciones producidas por la paratuberculosis serían más discretas, como es la reducción de la producción láctea (Benedictus *et al.*, 1987; Nordlund *et al.*, 1996; Hendrick *et al.*, 2005b) o una mayor susceptibilidad al padecimiento de otros procesos tales como desórdenes reproductivos o incluso mamitis (Chiodini *et al.*, 1984a; Kostoulas *et al.*, 2006). Queda patente, por lo tanto, la necesidad de emplear datos epidemiológicos y análisis laboratoriales tanto para confirmar la sospecha obtenida mediante la observación clínica como para garantizar el estatus sanitario de las explotaciones en relación a la enfermedad.

### **I.6.2. DIAGNÓSTICO ANATOMOPATOLÓGICO**

El examen histopatológico de los últimos tramos de intestino delgado y primeros del grueso, y en especial de la válvula ileocecal, es una técnica con buena sensibilidad y especificidad (Whitlock *et al.*, 1999; Gwozdz *et al.*, 2000), y que permite detectar animales en fase clínica así como animales en fase subclínica que presenten lesiones focales (Pérez *et al.*, 1996; Corpa *et al.*, 2000; González *et al.*, 2005). En general, las técnicas histopatológicas son capaces de detectar un mayor número de animales positivos que el cultivo (Pérez *et al.*, 1996; Corpa *et al.*, 2000; González *et al.*, 2005), aunque algunos autores consideran que la sensibilidad es menor en comparación al cultivo en el caso del ganado vacuno (de Lisle *et al.*, 1980). Cabe destacar que los fallos obtenidos con las técnicas histopatológicas pueden deberse a una mala selección de la muestra, en el caso de que no se incluyan las porciones que contienen el tejido linfoide organizado intestinal, ya que son éstas las zonas donde se localizan las primeras lesiones de la enfermedad (García-Marín *et al.*, 1992b; Pérez *et al.*, 1996).

Para la detección de las alteraciones microscópicas típicas, se suelen emplear métodos rutinarios como la tinción de hematoxilina-eosina, que se puede complementar con tinción de Ziehl-Neelsen para poner de manifiesto la presencia de bacilos ácido-alcohol resistentes (Johne y Frothingham, 1895; Stamp y Watt, 1954). Hay que señalar que existen numerosos casos donde los bacilos son escasos o nulos, o incluso puede tratarse de formas bacterianas con pared celular

defectuosa, pudiendo conducir a un diagnóstico erróneo (Pérez *et al.*, 1996; Corpa *et al.*, 2000; González *et al.*, 2005). Para estos casos puede recurrirse a técnicas más específicas como la inmunohistoquímica, donde se realiza el marcaje de los antígenos micobacterianos mediante el empleo de anticuerpos específicos frente a *Map* (Massone *et al.*, 1990; Coetsier *et al.*, 1998; Balseiro *et al.*, 2003).

Otra técnica más reciente es la hibridación *in situ*, que combina las técnicas clásicas de histopatología con las nuevas técnicas moleculares de detección de ácidos nucleicos. Para su realización se emplea una sonda específica de ADN de *Map*, concretamente un fragmento biotinilado del elemento de inserción IS900, que se aplica sobre tejidos desparafinados y tratados previamente con proteinasa K. El inconveniente que presenta esta técnica es que sólo detecta aquellos bacilos con pared celular defectuosa, por lo que se ha empleado en mayor medida en estudios enfocados a la detección de esferoplastos en pacientes humanos con enfermedad de Crohn (Hulten *et al.*, 2001; Sechi *et al.*, 2004; Romero *et al.*, 2005).

A pesar de presentar unos valores de sensibilidad y especificidad razonables, la principal desventaja del diagnóstico anatomopatológico es la imposibilidad de realizarlo sobre el animal vivo. Aunque se ha propuesto su empleo mediante biopsia de ganglios mesentéricos o íleon (Benedictus y Bosma, 1985; Coetsier *et al.*, 1998), es una técnica invasiva, laboriosa y de elevado coste económico, por lo que se emplea casi exclusivamente en estudios experimentales o en el caso de animales de gran valor genético (Garrido *et al.*, 2000a).

### **I.6.3. DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO**

#### **I.6.3.1. Tinción e identificación microscópica directa**

Esta técnica consiste en la realización de un frotis o impronta de heces que posteriormente se tiñe mediante el procedimiento de Ziehl-Neelsen. La tinción se basa en la retención del colorante primario (fuschina básica fenicada) por parte de los bacilos ácido-alcohol resistentes, en los cuales la solución decolorante añadida a continuación (ácido-alcohol) no penetra, pudiendo visualizarse los bacilos teñidos de color rojo mediante el empleo del microscopio. Con este procedimiento, *Map* puede observarse en su forma característica de agregados o nidos, ya que mantienen la forma que poseían en el interior de los macrófagos (figura 9). Esta técnica puede realizarse también con raspados de mucosa intestinal o de ganglios linfáticos, aunque para ello debe realizarse postmortem.

Como principales ventajas de la técnica hay que destacar la velocidad y sencillez (Juste y Aduriz, 1990), ofreciendo buenos resultados en los casos en fase clínica con gran abundancia de micobacterias. En el caso de infecciones subclínicas y formas paucibacilares, su sensibilidad se ve notablemente reducida (Taylor, 1951; Merkal *et al.*, 1968), puesto que la variabilidad en la intensidad de eliminación del agente puede conducir a resultados falsamente negativos. Según la literatura, en el ganado vacuno se detectarían mediante este método un 46% de los casos clínicos confirmados mediante cultivo fecal (Jørgensen, 1983a), mientras que si se incluyen también los casos subclínicos, la sensibilidad cae al 36,4% (Zimmer *et al.*, 1999). En lo que respecta a la especificidad, tampoco es elevada, puesto que en las heces pueden aparecer bacilos saprofitos similares a *Map* que, aunque no forman los típicos agregados, pueden producir falsos resultados positivos (Larsen, 1972; Juste y Aduriz, 1990).

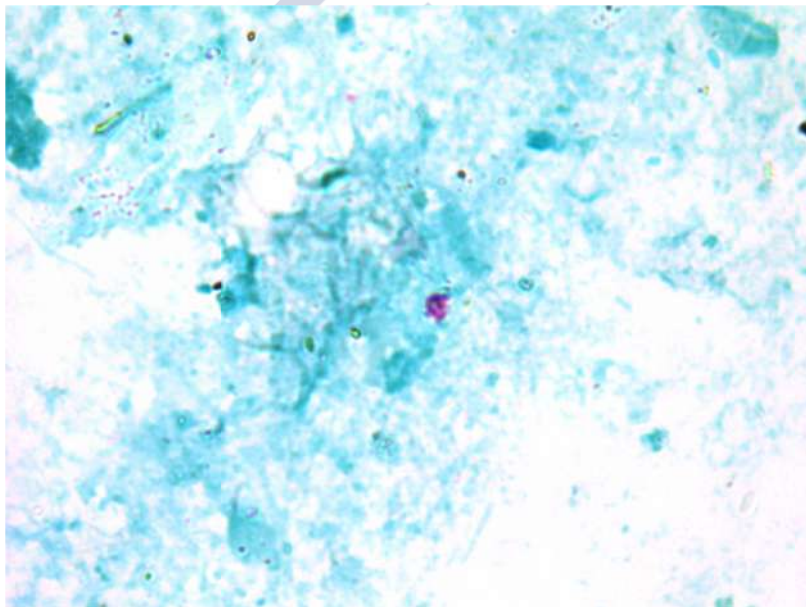


Figura 9. Tinción de Ziehl-Neelsen sobre una muestra de heces.

### **I.6.3.2. Aislamiento bacteriológico mediante cultivo**

#### **I.6.3.2.1. Perspectiva histórica**

El primer aislamiento de *Map* del que se tiene constancia fue realizado por Twort e Ingram en 1912. Ante los continuos intentos fallidos de aislar el organismo a partir de las lesiones de animales afectados, ambos investigadores dedujeron que debía existir un nutriente esencial para el crecimiento *in vitro* del bacilo de la enfermedad de Johne. Sus especulaciones los llevaron a pensar que, tal vez debido a una larga existencia como patógeno obligado, este microorganismo había



perdido algún atributo presente en su ancestro salvaje y todavía mantenido en las micobacterias tuberculoides. Para compensar dicha pérdida, añadieron bacilos de la tuberculosis humana inactivados por calor a un medio Dorset con base de huevo, consiguiendo el aislamiento de *Map* a partir de muestras clínicas de vacas con la enfermedad. Tras este hallazgo, continuaron testando otras micobacterias que soportaran el crecimiento de *Map*, y encontraron que esta propiedad era muy variable entre las distintas especies, siendo *Mycobacterium phlei* la que presentaba una capacidad superior. La inclusión de este organismo, o de micobactina derivada de éste u otra micobacteria, ha permitido el aislamiento de *Map* desde entonces. Estos investigadores también demostraron que la inclusión de huevo al medio era beneficiosa, y que la albúmina no era necesaria para el aislamiento. También son suyas las primeras descripciones acerca de las características *in vitro* de *Map*, todavía vigentes en la actualidad: crecimiento entre 28-43°C, inmóvil, ácido-alcohol resistente, que no forma esporas, con una baja tasa de crecimiento, aerobio estricto pero con una persistencia de tres meses en ausencia de oxígeno y resistente a la luz y a gran parte de los desinfectantes (Twort y Ingram, 1912). Por lo tanto, este logro ha sido la base necesaria que ha permitido el desarrollo de avances posteriores, como la evaluación de medios de cultivo alternativos, valoración de diferentes soluciones descontaminantes o mejoras en los protocolos de preparación de muestras (Minett, 1942; Merkal y McCullough, 1982).

Otro progreso importante fue el descubrimiento de que existían dos tipos diferentes de *Map* (tipo C y tipo S), que presentaban diferentes requerimientos para su cultivo. Este hallazgo se produjo en la década de 1930, al descubrir que la paratuberculosis en ganado ovino podía estar producida por cualquiera de dos microorganismos muy relacionados, el tipo “clásico” similar al descrito en ganado vacuno, y un nuevo tipo “ovino”, que se diferenciaba del primero por su resistencia al cultivo *in vitro* con los medios usados tradicionalmente hasta la fecha (Dunkin y Balfour-Jones, 1935; McEwen, 1939).

#### 1.6.3.2.2. Principios generales para el aislamiento de *Map*

El aislamiento mediante cultivo bacteriológico de *Map* se basa en los métodos tradicionales para el cultivo de micobacterias de crecimiento lento a partir de muestras clínicas (Merkal *et al.*, 1964; Gillespie, 1999). Para ello se describen cuatro fases críticas:

1. Descontaminación de las muestras clínicas para destruir o suprimir organismos irrelevantes de crecimiento más rápido, incluyendo tanto bacterias como hongos, que normalmente está presentes en gran número en muestras como heces.

2. Incubación prolongada en medios apropiados el tiempo suficiente que permita crecer a *Map*, y que contengan agentes antimicrobianos para suprimir cualquier contaminante presente.
3. Reconocimiento de las colonias de *Map* en medio sólido o una señal particular de crecimiento en medio líquido.
4. Identificación de *Map* mediante características fenotípicas y/o genotípicas.

#### 1.6.3.2.3. Medios de cultivo

Para el aislamiento de *Map* pueden emplearse tanto medios sólidos como líquidos. En general, los medios sólidos son los más empleados, debido a su menor coste, menores requerimientos de instrumentación y mayor facilidad para la identificación de los crecimientos. Los medios de cultivo para *Map* deben incluir nutrientes esenciales, y con frecuencia incluyen sustancias antimicrobianas para impedir el crecimiento de agentes contaminantes. Asimismo, también pueden incluir colorantes que ayuden al reconocimiento de las colonias.

En general, los medios de cultivo empleados para el aislamiento de *Map* son idénticos a los que se utilizan para el aislamiento del resto de micobacterias, salvo por la necesidad añadida de tener que incorporar micobactina al medio. Existen medios sólidos elaborados con base de huevo (Herrold's, Löwenstein-Jensen, Coletsos) o con base sintética (Middlebrook 7H10, Middlebrook 7H11), y también pueden emplearse medios líquidos (Middlebrook 7H9, Watson-Reid, Dubos). En el caso de *Map*, los más empleados son el medio de Herrold's con yema de huevo (HEYM) y el Löwenstein-Jensen (LJ) suplementados con micobactina, y también diferentes variedades de medio Middlebrook enriquecidos con OADC (oleico-albúmina-dextrosa-catalasa) y micobactina (Goodfellow y Magee, 1998). El tamaño, color y textura de las colonias dependen en buena parte del medio empleado para su cultivo. Sobre el medio sólido de Herrold con yema de huevo, las colonias son pequeñas, firmes, convexas, ligeramente rugosas y de color que varía entre el blanco hueso y el amarillo (figura 10), aunque se han descrito cepas que pueden presentar colonias más lisas, brillantes y pigmentadas de color amarillo-naranja (Stevenson *et al.*, 2002). En medio sólido Middlebrook sin Tween 80 (un detergente empleado como potenciador de crecimiento) las colonias de *Map* son muy rugosas y recuerdan a las de *M. tuberculosis* (figura 11), mientras que con la adición de Tween 80 al medio, las colonias se vuelven lisas y abombadas, recordando a las de *M. avium* (Collins, 2003).



Figura 10. Aspecto de las colonias de *Map* en medio Herrold's con yema de huevo.



Figura 11. Aspecto de las colonias de *Map* en medio Middlebrook sin Tween 80 (<http://johnes.org>).

En la tabla 9 puede verse la composición de los medios HEYM y LJ. Los medios sólidos Middlebrook 7H10 y 7H11 y el caldo Middlebrook 7H9 son también adecuados para el cultivo de *Map*, pero para un óptimo crecimiento es necesario añadir yema de huevo (Tabla 10). En la mayoría de casos, la micobactina es un componente esencial para la obtención de cultivos primarios, pero es posible que se produzca suficiente arrastre de micobactina desde el cultivo primario a un nuevo medio como para obviar este nutriente en un subcultivo (Lambrecht y Collins, 1992). La adaptación al laboratorio de algunas cepas ha permitido que éstas crezcan en medios químicamente definidos como el caldo Watson-Reid sin adición de micobactina o yema de huevo (Tabla 10) (Watson, 1935; Morrison, 1965). No obstante, estos medios no son adecuados para el cultivo de cepas de campo (Merkal y Curran, 1974).

Tabla 9. Comparación de la composición de los medios HEYM y LJ (cantidades por litro de medio).

Ingrediente	HEYM <sup>a</sup>	LJ <sup>b</sup>
Base LJ (Difco)		23,25 g
Cloruro sódico	4,5 g	
Extracto de carne	2,7 g	
Peptona	9,0 g	
Agar	15,3 g	
Homogenato de huevo entero		625 ml
Yema de huevo	120 ml	
Verde malaquita	100 mg	250 mg
Glicerol	34 ml	7,5 ml
Piruvato sódico	4,1 g <sup>c</sup>	4,0 g
Micobactina		2,0 mg
Cicloheximida		0,75 g
Cloranfenicol		0,20 g
Penicilina G		2 x 10 <sup>5</sup> UI

a. Herrold, 1931; Merkal *et al.*, 1964; Merkal y Curran, 1974. La mayoría de laboratorios fabricantes incluyen vancomicina, anfotericina B y ácido nalidíxico.

b. Kalis *et al.*, 2000.

c. Opcional.

Tabla 10. Composición de los medios modificados Middlebrook y el medio Watson Reid.

Ingrediente <sup>a</sup>	Caldo Middlebrook modificado 7H9 <sup>e</sup>	Agar Middlebrook modificado 7H10 <sup>c</sup>	Agar Middlebrook modificado 7H11 <sup>c</sup>	Medio Watson Reid <sup>d</sup>
<b>Medio base</b>				
Caseína	667 mg	1 g	1 g	-
Sulfato de amonio	333 mg	500 mg	500 mg	-
Fosfato monopotásico	557 mg	1,5 g	1,5 g	2 g
Fosfato disódico	1,7 g	1,5 g	1,5 g	-
Citrato sódico	67 mg	400 mg	400 mg	-
Sulfato de magnesio	33 mg	25 mg	50 mg	1 g
Cloruro cálcico	0,33 mg	0,5 mg	-	20 mg
Sulfato de zinc	0,67 mg	1 mg	-	10 mg
Sulfato de cobre	0,67 mg	1 mg	-	-
Arginina	-	-	-	5 g
Ácido L-glutámico	333 mg	500 mg	500 mg	-
Cloruro de cobalto	-	-	-	2 mg
Cloruro sódico	-	-	-	2 g
Citrato de amonio férrico	27 mg	40 mg	40 mg	75 mg
Piridoxina	0,67 mg	1 mg	1 mg	-
Biotina	0,33 mg	0,5 mg	0,5 mg	-
Verde malaquita	-	0,25 mg	1 mg	-
Agar Bacto	-	15 g	15 g	-
<b>Enriquecimiento</b>				
Ácido oleico	-	-	50 mg	-
Fracción V de albúmina bovina	3,3 g	5 g	5 g	-

Dextrosa	-	2 g	2 g	10 g
Catalasa	32000 U	3 mg	4 mg	-
Cloruro sódico	-	-	850 mg	-
Ácido palmítico C-14	667 $\mu$ Ci	-	-	-
<b>Aditivos</b>				
Yema de huevo	167 ml	250 ml	250 ml	-
Micobactina J	0,83 mg	1,25 mg	1,25 mg	-
PANTA PLUS <sup>b</sup>	33,3 ml	50 ml	50 ml	-
Glicerol	-	5 ml	5 ml	60 ml

a. Cantidades por 1000 ml para Middlebrook 7H9 y Watson Reid y por 1330 ml para Middlebrook 7H10 y 7H11.

b. Polimixina B 1000U/ml, anfotericina B 100  $\mu$ g/ml, ácido nalidíxico 400  $\mu$ g/ml, trimetoprim 100  $\mu$ g/ml, azlocilina 100  $\mu$ g/ml y estearato de polioxietileno 4 mg/ml.

c. Adaptado de Whittington *et al.*, 1999.

d. Merkal y Curran, 1974.

Como alternativa a los medios de cultivo convencionales, se desarrollaron otros métodos basados en el empleo de caldos unido a un sistema de detección automatizado. El primero fue el sistema radiométrico BACTEC 460TB™ (Becton Dickinson®, Nueva Jersey, Estados Unidos), que consiste en la inclusión de ácido palmítico marcado con C<sup>14</sup> en el medio de cultivo como fuente de carbono, lo que permite detectar radiométricamente el dióxido de carbono marcado con C<sup>14</sup> producido durante la respiración microbiana (Middlebrook *et al.*, 1977). La señal de crecimiento no es específica, pero indica qué viales deben examinarse en busca del patógeno de interés. Aunque este sistema fue desarrollado inicialmente para el diagnóstico de micobacteriosis humanas, ha sido adaptado para el cultivo de *Map* mediante la adición de yema de huevo, micobactina J y varios antibióticos al medio comercial BACTEC 12B, que a su vez está basado en el caldo Middlebrook 7H9. Como principales ventajas, este sistema presenta una mayor sensibilidad y una reducción del tiempo necesario para la detección del crecimiento en comparación con los sistemas tradicionales que emplean medios sólidos (Damato y Collins, 1990; Cousins *et al.*, 1995). Por otra parte, la utilización de material radioactivo es un gran inconveniente para muchos laboratorios, lo que ha llevado a desarrollar otros sistemas similares. En general, todos ellos emplean un medio propietario basado en el caldo Middlebrook 7H9:

- Sistema MGIT™ (Mycobacteria Growth Indicator Tube) (Becton Dickinson®, Nueva Jersey, Estados Unidos): se basa en la detección de una señal fluorescente que se produce en un indicador situado en la base del tubo a medida que se consume el oxígeno durante la respiración bacteriana.
- Sistema ESP® (TREK Diagnostic Systems Inc., Westlake, Ohio, Estados Unidos): consiste en la detección de un cambio de presión en la fase gaseosa del vial mediante monitorización del consumo de oxígeno.

- Sistema MB/BacT® (BioMérieux, Marcy l'Étoile, Francia): se basa en un método colorimétrico que detecta la producción de CO<sub>2</sub>.

Al igual que con el sistema BACTEC 460TB™, todos estos métodos requieren de la identificación *a posteriori* del patógeno cuando se detecta una señal. De entre ellos, parece que el sistema MGIT™ es el más aceptado (Grant *et al.*, 2003; Shin *et al.*, 2007), aunque existen estudios que han mostrado su incapacidad para el cultivo de ciertas cepas comunes de *Map* (Thornton *et al.*, 2002; Gumber y Whittington, 2007).

En lo que respecta a las necesidades específicas de *Map*, los beneficios de la inclusión de yema de huevo al medio de cultivo se conocen desde 1912 (Twort y Ingram, 1912), pero las razones de esta necesidad aún no están claras, ya que existen cepas de *Map* capaces de crecer en medios sin huevo mientras en otros casos su inclusión es vital (Cousins *et al.*, 1995; Whittington *et al.*, 1999; Grant *et al.*, 2003). Cuando se emplea cloruro de benzalconio (benzalkonium chloride = BAC) o cloruro de hexadecilpiridinio (hexadecylpyridinium chloride = HPC) en la descontaminación de la muestra, es necesario incluir yema de huevo a los medios Middlebrook 7H10 o 7H9 para permitir el crecimiento de *Map*. Sin embargo, el simple hecho de lavar el pellet de *Map* con agua permite el crecimiento de *Map* en dichos medios sin la adicción de yema de huevo (Whipple y Merkal, 1983), lo que sugiere que tal vez la yema de huevo neutralice el efecto de los desinfectantes arrastrados en el inóculo (Merkal y Curran, 1974). Esta teoría explicaría por qué es necesaria la adicción de yema de huevo para el cultivo primario pero no para la realización de subcultivos (Cousins *et al.*, 1995).

El piruvato de sodio ha sido descrito como estimulante del crecimiento de *Map*, y se incluye en los medios LJ y HEYM usados por algunos laboratorios (Merkal y Curran, 1974; Jørgensen, 1982; Juste *et al.*, 1991). El piruvato de sodio permite el crecimiento de colonias de mayor tamaño en medio LJ, lo que parece compensar el efecto inhibitorio de los antibióticos incluidos en este medio (Jørgensen, 1982).

La inclusión de diferentes antimicrobianos como el verde malaquita, cicloheximida, anfotericina B, vancomicina, ácido nalidíxico, cloranfenicol, penicilina G, polimixina B, trimetoprim, azlocilina y ampicilina también se ha empleado en la preparación de diferentes medios, pero en general no existen demasiados datos acerca del potencial inhibitorio de la mayoría de estas sustancias sobre el crecimiento de *Map* (Stabel, 1997; Kalis *et al.*, 1999b; Gumber y Whittington, 2007).

Colorantes como el verde brillante también pueden ser añadidos al medio para mejorar la visibilidad de las colonias (Minett, 1942). El azul de metileno se concentra en las colonias a medida que éstas se desarrollan (Whittington *et al.*, 1999), aunque la captación del colorante por parte de las

colonias puede variar entre distintas cepas (Parrish *et al.*, 2004). Las colonias de *Map* son fácilmente visibles en medios que contienen verde malaquita, y particularmente en LJ, ya que presenta una superficie lisa, mientras que la visualización de colonias en medio HEYM puede ser más dificultosa a pesar de la inclusión del colorante, debido a que su superficie suele ser más rugosa (Whittington, 2010).

#### I.6.3.2.4. Aplicaciones específicas del cultivo bacteriológico

##### A. Muestras fecales.

- Descontaminación de las muestras. Históricamente, los primeros intentos para cultivar *Map* emplearon los métodos de descontaminación disponibles para el diagnóstico de la tuberculosis. El hipoclorito sódico fue uno de los más populares (Dunkin, 1928), pero también se realizaron ensayos con hidróxido sódico (NaOH), ácido sulfúrico, ácido clorhídrico, fenol, cloruro de benzalconio y ácido oxálico (oxalic acid = OA) (Minett, 1942; Merkal *et al.*, 1964; Gunnarsson, 1979; Gunnarsson y Fodstad, 1979). Sobre el año 1980 los protocolos empleados en el norte de Europa empleaban una combinación de NaOH y OA (Jørgensen, 1982). El compuesto catiónico de amonio cuaternario cloruro de hexadecilpiridinio se utilizó inicialmente en protocolos en Estados Unidos de América para sustituir al BAC (Merkal, 1984), y actualmente es la base de los protocolos de descontaminación en la mayoría de laboratorios del mundo. En muchos casos se han añadido también a las soluciones de descontaminación otros compuestos como verde malaquita y diferentes combinaciones de antibióticos (Whitlock y Rosenberger, 1990; Kalis *et al.*, 2000; Ellingson *et al.*, 2005).

Las muestras fecales presentan ciertos problemas debido a la elevada carga de bacterias entéricas, y la mayoría de protocolos contemplan la eliminación de la materia más grosera. Esto se logra mediante suspensión de las heces en agua o una solución de descontaminación, seguido de filtración (Cameron, 1956), centrifugación suave (Merkal *et al.*, 1968) o más comúnmente mediante sedimentación. A continuación se retira el filtrado o el sobrenadante, y en el caso de que ya sea ésta una solución de descontaminación, se realiza la inoculación directamente al medio. Si la primera suspensión se realiza en agua, entonces dicho filtrado o sobrenadante es añadido a una solución de descontaminación, inoculándose el sedimento resultante en esta última preparación (Merkal *et al.*, 1968).

Las preocupaciones sobre la posibilidad de que el proceso de descontaminación fallase en el caso de contaminantes que presentan formas de resistencia condujeron a la incubación

de las muestras en soluciones antibióticas realizadas en medios con nutrientes, con la esperanza de que las esporas germinasen y fuesen sensibles a los descontaminantes. Esta estrategia se utiliza frecuentemente con muestras fecales, constituyendo la solución de HPC y antibióticos en un caldo infusión cerebro corazón (Brain Heart Infusion = BHI) (Whitlock y Rosenberger, 1990; Ellingson *et al.*, 2005).

Los protocolos de cultivo de *Map* han evolucionado independientemente en los diferentes laboratorios con el paso de los años. La tabla 11 recoge tres de los métodos más ampliamente utilizados. En algunos países europeos se emplea el protocolo de descontaminación de NaOH-OA en combinación con el medio LJ. Otros países, incluido Estados Unidos, suelen utilizar el protocolo de sedimentación con HPC en medio HEYM o medio líquido. Collins *et al.* (1990) utilizaron 20 muestras fecales y de tejidos, todas positivas a tinción de Ziehl-Neelsen, para su descontaminación en NaOH-OA y HPC en paralelo en combinación con medio LJ, consiguiendo una sensibilidad de 70 y 85% respectivamente. Todas las muestras resultaron positivas mediante cultivo en sistema BACTEC 460TB™ con descontaminación previa en HPC. Otro estudio más extenso llevado a cabo en Dinamarca realizó una comparación entre los medios LJ y HEYM utilizando únicamente el protocolo de descontaminación de NaOH-OA, consiguiendo una sensibilidad ligeramente superior para el medio HEYM (Nielsen *et al.*, 2004). Con todo, y debido a la ausencia de estudios más extensos, no está claro si los protocolos de descontaminación o los medios empleados pueden intercambiarse sin que se produzca una pérdida de sensibilidad o un incremento del porcentaje de contaminaciones.

- Concentración de *Map* en muestras fecales. Para poder incrementar la sensibilidad analítica del cultivo fecal, es necesario concentrar las micobacterias, ya sea durante o después de la descontaminación de la muestra. Este procedimiento fue descrito por primera vez por Merkal *et al.* (1964), quienes permitieron la sedimentación de los materiales más groseros presentes en la muestra y después centrifugaron el sobrenadante de la suspensión fecal antes de realizar la descontaminación. Posteriormente se realizaron diferentes modificaciones, como la centrifugación de la solución de descontaminación (Kim *et al.*, 1989), uso de doble centrifugación (Stabel, 1997) o la incorporación de tres descontaminantes (Kalis *et al.*, 2000). Otra alternativa a la centrifugación ha sido el empleo de filtración con membrana de 3µm (Collins *et al.*, 1990). Todos estas estrategias han demostrado ser útiles para la concentración de *Map* en las muestras fecales, aunque por



otro lado también pueden provocar un aumento de la tasa de contaminaciones (Eamens *et al.*, 2000).

Tabla 11. Métodos más comunes para el aislamiento de *Map* a partir de heces.

Método	Descontaminación	Medio e inóculo	Incubación	Referencia
<b>Sedimentación</b>	1 g de heces en 25 ml de HPC 0,75%. Agitación 30 min y reposo durante 2 h. 4 ml de sobrenadante se recogen con una pipeta y se deja sedimentar toda la noche. Las primeras gotas de la pipeta se utilizan como inóculo.	HEYM con piruvato sódico 4,1 mg/ml; 3 tubos/muestra; 3 gotas de inóculo/tubo que se dejan secar 1 semana sin cerrar el tapón.	16 semanas; 37°C	Kim <i>et al.</i> , 1989; Collins <i>et al.</i> , 1990; Cousins <i>et al.</i> , 1995
<b>Doble incubación-centrifugación (NADC)</b>	1-2 g de heces en 35 ml de agua. Agitación 30 min y reposo 30 min. Se retiran 25-30 ml de sobrenadante y se centrifugan 20 min a 1700 x g. Se resuspende el pellet en 30 ml de HPC-BHI 0,9% y se incuba toda la noche a 37°C. Se centrifuga 20 min a 1700 x g y se resuspende el pellet en VAN y se incuba toda la noche a 37°C. Esta suspensión se utiliza como inóculo.	HEYM con ácido nalidíxico 50 µg/ml y vancomicina 50 µg/ml; 4 tubos/muestra; 0,2 ml de inóculo/tubo que se dejan secar 1 semana sin cerrar el tapón.	12 semanas; 37°C	Stabel, 1997
<b>Doble centrifugación y sedimentación (método europeo)</b>	2 g en 8 ml de NaOH 4%, agitación 15 min, centrifugación 15 min a 1000 x g. Se resuspende el pellet en 5 ml de solución 5 mg/ml de OA y 1 mg/ml de verde malaquita, mezclado 15 min y centrifugación 15 min a 1000 x g. Se resuspende el pellet en 4 ml de neomicina 0,5 mg/ml y anfotericina B 50 mg/ml, y se deja reposar toda la noche. La capa clara superior se usa como inóculo.	LJ. 3-4 gotas de inóculo/tubo que se dejan secar 1 semana sin cerrar el tapón.	26 semanas; 37°C	Jørgensen, 1982; Kalis <i>et al.</i> , 1999b

Abreviaturas: NADC, National Animal Disease Center, Estados Unidos; HPC, cloruro de hexadecilpiridinio; HEYM, medio Herrold's con yema de huevo; VAN, vancomicina 100 µg/ml, anfotericina B 50 µg/ml, ácido nalidíxico 100 µg/ml; OA, ácido oxálico; LJ, medio Löwenstein-Jensen.

- Cultivo fecal de *pools* (= mezclas) de muestras. El hecho de agrupar muestras fecales de más de un animal para cultivo es una manera lógica de reducir el coste de la detección de *Map* a nivel de rebaño. Aunque los primeros intentos en ganado vacuno fueron bastante desalentadores debido a la pérdida de sensibilidad (Vialard *et al.*, 1993), los estudios realizados con *pools* fecales en ovino demostraron una alta sensibilidad para este método, siempre y cuando hubiese al menos una muestra procedente de un animal con lesiones multibacilares, puesto que eliminan alrededor de  $10^8$  UFC de *Map* por gramo de heces (Whittington *et al.*, 2000b). En los ensayos prácticos se empleó un tamaño de *pool* de 50 animales, logrando una mayor sensibilidad a nivel de rebaño para este método que mediante el análisis serológico de los mismos animales (Whittington *et al.*, 2000a; Sergeant *et al.*, 2002). Por ello, este test ha sustituido desde 2002 en Australia a cualquier otro método de *screening* de la enfermedad, empleándolo junto con la vigilancia en matadero en busca de lesiones severas. La investigación en ganado vacuno ha conseguido demostrar resultados similares, si bien es necesario emplear un tamaño de *pool* más pequeño, generalmente entre 5-10 muestras (tabla 12) (Kalis *et al.*, 2000, 2004; van Schaik *et al.*, 2003; Wells *et al.*, 2003; Tavornpanich *et al.*, 2004). Otros trabajos que comparan los resultados empíricos con modelos computerizados también concluyen que el empleo del cultivo de *pools* fecales es una herramienta práctica y económicamente eficiente para el ganado bovino (van Schaik *et al.*, 2003; Kalis *et al.*, 2004). Esta misma estrategia es aplicable para la especie caprina y probablemente para la mayoría de otras especies (Eamens *et al.*, 2007).

Tabla 12. Porcentaje de explotaciones infectadas por *Map* detectadas mediante cultivo fecal de *pools* de heces en relación al cultivo fecal individual en diferentes estudios realizados en ganado vacuno.

Estudio	País	Nº de rebaños <sup>a</sup>	Tamaño de pool	% de rebaños positivos detectados
Kalis <i>et al.</i> , 2000 <sup>b</sup>	Holanda	11 (11)	5	73%
Wells <i>et al.</i> , 2003	Estados Unidos	24 (17)	5	94%
Kalis <i>et al.</i> , 2004	Dinamarca	90 (55)	5	100% <sup>c</sup>
Tavornpanich <i>et al.</i> , 2004	Estados Unidos	29 (21)	10	81%
van Schaik <i>et al.</i> , 2007	Chile	12 (10)	5, 10	100% <sup>d</sup>

a. (número de rebaños positivos).

b. Sólo se emplearon rebaños de baja prevalencia (<5%).

c. Asumiendo que se habían detectado todas las explotaciones infectadas.

d. Porcentaje obtenido para ambos tamaños de *pool*.

Hay que señalar que el cultivo de *pools* fecales proporciona resultados globales, pero los datos pueden ser empleados para estimar la prevalencia de infección en la población en estudio, siempre y cuando exista algún cultivo negativo. Existen varios métodos publicados para el cálculo de la prevalencia de rebaño a partir de los resultados del cultivo de *pools* (Sacks *et al.*, 1989; Cowling *et al.*, 1999; Toribio y Sergeant, 2007; Messam *et al.*, 2008). La realización de esta técnica no entraña mayores consideraciones técnicas que la excepción de garantizar una mezcla adecuada de las muestras que lo forman. Además, las muestras empleadas en la composición del *pool* pueden ser almacenadas si se desea determinar *a posteriori* cuales son los animales individuales que han contribuido al resultado positivo del cultivo del *pool*.

- Comparación de los diferentes métodos de cultivo. El sistema de cultivo ideal para el aislamiento de *Map* a partir de muestras fecales debería presentar las siguientes características: capacidad de soportar el crecimiento de todas las cepas de *Map*, elevada sensibilidad analítica, baja tasa de contaminación, corto periodo de incubación, facilidad para identificar el agente y, además, presentar un coste razonable. Como se ha comentado, no todos los medios disponibles en la actualidad pueden soportar el crecimiento de todas las cepas, aunque el agar modificado 7H10, agar 7H11 y el medio BACTEC® 12B parecen conseguirlo dentro de unos tiempos de incubación razonables. Otros medios como HEYM, LJ o MGIT no consiguen obtener crecimiento (o crecimientos razonables) con la mayoría de cepas S más frecuentes. Además, se ha observado que el rango de cepas seleccionadas mediante HEYM es más reducido que el que se obtiene con cultivos en medio líquido (Cernicchiaro *et al.*, 2008).

Los protocolos empleados para el cultivo de *Map* en medio sólido presentan, en general, diferente sensibilidad. Aparentemente, las pequeñas diferencias existentes entre los distintos métodos pueden afectar tanto a la sensibilidad de la técnica como a la tasa de contaminación de los cultivos. Por ejemplo, en un estudio que empleaba diferentes variaciones del protocolo de HPC con medio HEYM la sensibilidad osciló entre un 39-68% (Eamens *et al.*, 2000). La baja sensibilidad de los medios sólidos puede mejorarse con la utilización de varias réplicas (hasta 4), de tal manera que la reducción de 4 a 3 tubos de HEYM provoca una reducción de la sensibilidad del 8% (Whitlock *et al.*, 1989). Como ya se ha comentado, los medios líquidos presentan una mayor sensibilidad que los medios sólidos, independientemente de la cepa en estudio (tabla 13).

Tabla 13. Comparación de la sensibilidad de diferentes métodos de cultivo fecal de *Map* (adaptado de Whittington, 2010).

Especie	Nº	Nº de positivos	Sensibilidad (nº de tubos/viales inoculados)				Referencia
			Medio Sólido		Medio Líquido		
			HPC <sup>a</sup> HEYM	HPC 7H10	HPC BACTEC12B	HPC MB/BacT	
Vacuno	603	75	60% (2)	-	92%	-	Collins <i>et al.</i> , 1990
Vacuno	179	38	39-68% (3)	-	89%	-	Eamens <i>et al.</i> , 2000
Vacuno	25 <sup>b</sup>	17	82%	-	-	88%	Stich <i>et al.</i> , 2004
Vacuno	240	81	46-65% (2)	-	-	80%; 94% <sup>c</sup>	Motiwala <i>et al.</i> , 2005
Ovino	1535	202	-	34% (1)	98%	-	Whittington, 2009

Abreviaturas: HPC, cloruro de hexadecilpiridinio; HEYM, medio Herrold's con yema de huevo.

a. Diferentes métodos de descontaminación empleados.

b. Muestras seleccionadas para tests de sensibilidad interlaboratorios.

c. Identificación mediante subcultivo y mediante PCR.

En lo que respecta al tiempo de obtención de aislamientos, también existen importantes diferencias en función del medio de cultivo empleado. La aparición de colonias visibles se demora 3 semanas más en medio HEYM que en agar 7H10, y hasta 5 semanas más si lo comparamos con el medio líquido BACTEC® 12B (Damato y Collins, 1990).

### B. Muestras histológicas

*Map* se puede aislar con facilidad a partir de tejido intestinal de animales infectados, y también se ha aislado de muestras de tejidos humanos (Chiodini, 1989). En general, los esfuerzos destinados al desarrollo de protocolos para el cultivo de tejidos han sido menores que en caso del cultivo fecal, debido fundamentalmente a que las tasas de contaminación de los cultivos de tejidos no son preocupantes (Taylor, 1950). Los métodos descritos para tejidos son más simples y generalmente sólo contemplan un único paso de descontaminación. La incubación de los homogeneizados de tejidos durante una noche o hasta tres días en una solución de HPC es suficiente para eliminar la mayoría de contaminantes presentes en las paredes intestinales o linfonódulos (Cousins *et al.*, 1995; Whittington *et al.*, 1999).

### C. Muestras de leche

La eliminación de *Map* en la leche de vacas infectadas es un hecho que se conoce desde hace años (Alexejeff-Goloff, 1935; Taylor *et al.*, 1981), y el aislamiento del patógeno a partir de la leche de pacientes con enfermedad de Crohn ha avivado el debate acerca del papel que juega *Map* en esta enfermedad (Naser *et al.*, 2000). Entre la literatura científica existen diversos estudios que han

conseguido detectar *Map* en muestras de vacas individuales, leche de tanque y leche pasteurizada, e incluso en muestras comerciales (Millar *et al.*, 1996; Grant *et al.*, 2002a).

#### *D. Muestras de sangre*

El aislamiento de *Map* a partir de muestras de sangre no es un procedimiento rutinario, por lo que no se han realizado estudios sistemáticos acerca de las metodologías disponibles o de la prevalencia de bacteriemia. Existe un trabajo realizado en ganado vacuno donde se emplearon muestras de sangre recogidas en heparina, que posteriormente se descontaminaron en 0,75% de HPC y se inocularon en medio HEYM. De un total de siete animales con enfermedad en fase avanzada se obtuvo un único resultado positivo (Koenig *et al.*, 1993). A pesar de la escasez de datos, se han realizado al menos dos estudios para la detección de *Map* en sangre de pacientes con enfermedad de Crohn empleando varios métodos, pero con resultados que difieren enormemente (Naser *et al.*, 2004; Parrish *et al.*, 2009).

#### *E. Muestras ambientales*

El cultivo de muestras ambientales como suelos, agua o pastos no entraña dificultades técnicas, y los métodos de cultivo empleados son los mismos que los descritos para muestras fecales (Whittington *et al.*, 2004, 2005; Pickup *et al.*, 2005). Cabe señalar que las muestras de agua deben ser concentradas por filtración o centrifugación antes de realizar el protocolo de cultivo. Por otra parte, el cultivo de muestras fecales recogidas del ambiente es una aplicación del cultivo de *pools* fecales, y presenta una utilidad especialmente interesante en el caso del vacuno de leche, ya que en este tipo de explotaciones todas las deyecciones son recogidas mediante canales que drenan a una fosa común, con lo que se realiza un mezclado al menos parcial de las heces de gran cantidad de animales del establo, siendo además fácilmente disponible para su muestreo. Este método de recogida de muestras se ha descrito como el más económico de cara a establecer el estatus de infección a nivel de granja (Lombard *et al.*, 2006b; Tavornpanich *et al.*, 2008; Eisenberg *et al.*, 2013). Debido a que el número de animales que componen una muestra es desconocido, hay que señalar que estos procedimientos no permiten realizar una estimación fiable de la prevalencia intrarrebaño, aunque existe la posibilidad de calcular un umbral mínimo con una probabilidad determinada (Donat *et al.*, 2014). Por último, otra aplicación de este tipo de muestreos es la búsqueda de posibles vectores de *Map*, como moscas, lombrices de tierra y larvas de nematodos parásitos (Whittington *et al.*, 2001; Fischer *et al.*, 2003a, 2004).

### I.6.3.2.5. Recuento bacteriano

La estimación del número de organismos de *Map* presentes en una muestra clínica puede emplearse para valorar el riesgo de exposición del ganado presente en la explotación. Asimismo, en estudios de infección experimental es necesario conocer con una precisión determinada la cantidad de *Map* que se administra en cada inóculo, y en el caso de experimentos sobre la eficacia de vacunas, es fundamental para poder valorar la tasa de eliminación entre animales vacunados y controles (Reddacliff *et al.*, 2006; Begg y Whittington, 2008).

Algunos métodos como el recuento mediante microscopía directa o los métodos moleculares como la PCR cuantitativa pueden sobreestimar el número de bacterias, puesto que tienen en cuenta tanto las micobacterias vivas como las muertas. Sin embargo, los métodos basados en el cultivo microbiológico permiten estimar únicamente el número de microorganismos viables. En el caso de cultivos en medio sólido, se emplea con frecuencia el recuento directo de colonias (UFC/g o UFC/tubo). La mayoría de trabajos emplean una clasificación en tres grupos: recuento bajo (<10 UFC/tubo), recuento medio (10-50 UFC/tubo) y recuento alto (>50 UFC/tubo) (Whitlock *et al.*, 2000; Wells *et al.*, 2002, 2003; Tavoranpanich *et al.*, 2004; Crossley *et al.*, 2005). En lo respectivo a medios líquidos, los métodos más empleados son técnicas de turbidimetría, técnicas de número más probable (MPN = most probable number) o la evaluación del tiempo hasta lograr crecimiento. Debido a la tendencia de *Map* a formar agregados cuando crece en suspensión, es importante conseguir una adecuada dispersión de las células para evitar una subestimación del recuento. Hay que señalar que los métodos turbidimétricos sólo son aplicables en el caso de una alta concentración de células, ya que una unidad de absorbancia a 600nm se corresponde con una concentración de  $10^8$  células/ml (Shin *et al.*, 2007). Por otra parte, los métodos MPN pueden aplicarse sobre un rango más amplio, pero requiere el cultivo de diferentes diluciones hasta un punto final (dilución más alta en la cual no se produce crecimiento) con lo que el gasto necesario en términos de medios de cultivo es elevado (Whittington *et al.*, 2000b; Reddacliff *et al.*, 2003). La estimación del número de bacterias presentes en una muestra en función del tiempo necesario para detectar crecimiento en sistemas de cultivo radiométricos (BACTEC 460TB™) se basan en la observación de que el tiempo de generación es proporcional al tamaño del inóculo. En general, esta técnica es menos susceptible que las otras a los errores por formación de agregados de *Map*, presenta una elevada sensibilidad, puede realizarse con un único vial de medio de cultivo y es aplicable a un amplio rango de muestras y cepas de *Map* (Lambrecht *et al.*, 1988; Reddacliff *et al.*, 2003). Esta misma estrategia ha sido validada también para el sistema MGIT™, en un trabajo que muestra además una buena correlación entre los recuentos obtenidos sobre medio HEYM, medio BACTEC 12B y MGIT™ (Shin *et al.*, 2007).

### I.6.3.2.6. Contaminación y supervivencia de *Map* durante el cultivo microbiológico

#### A. Tasa de contaminación

Como se ha comentado, una característica fundamental de cualquier protocolo de aislamiento de *Map* es la capacidad de prevenir o evitar el crecimiento de microorganismos no deseados, y especialmente cuando se trata de muestras fecales. Sin embargo, no existe un consenso en la literatura acerca de qué situaciones comprende el término “contaminación”, pudiendo englobar crecimientos mixtos de *Map* con otros organismos, un ligero crecimiento de organismos irrelevantes, o un completo sobrecrecimiento que obliga en muchos casos a repetir el cultivo. Debido a esto, es muy difícil poder comparar las tasas de contaminación obtenidas en distintos estudios, puesto que los valores son extremadamente variables entre sí (Tabla 14). Para minimizar este efecto, la mayoría de protocolos contemplan la inoculación de la misma muestra en 3-4 tubos del medio de cultivo empleado.

En el caso de cultivos fecales, se ha observado que la dieta del ganado y la situación geográfica son factores determinantes en este problema, ya que las contaminaciones se agrupan típicamente en grupos de muestras de ciertas granjas o localizaciones (Whitlock *et al.*, 1989; Whittington, 2009).

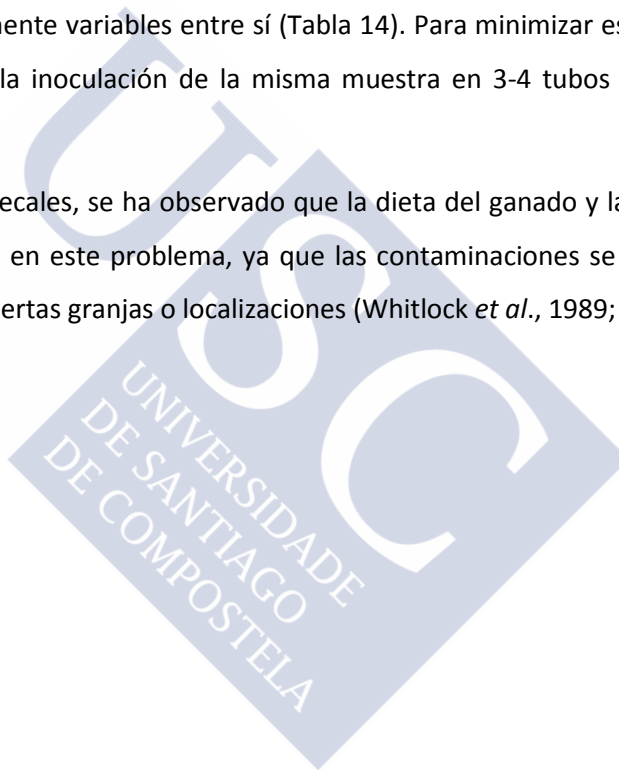


Tabla 14. Tasas de contaminación de diferentes métodos de cultivo fecal (adaptado de Whittington, 2010).

Especie	Protocolo	Medio	Nº de muestras (nº de tubos/muestra)	Tasa de contaminación	Definición de contaminación
Vacuno	Sedimentación con HPC	HEYM	4688 (4)	9,6% muestras 58% tubos	Sobrecrecimiento de microorganismos contaminantes en $\geq 2$ tubos/muestra (Whitlock <i>et al.</i> , 1989)
Vacuno	1) Sedimentación con HPC 2) Centrifugación con HPC	HEYM	131 (3)	1) 26% 2) 60%	Presencia de microorganismos contaminantes (Kim <i>et al.</i> , 1989)
Vacuno	Sedimentación con HPC	BACTEC12B	603	3,9%	No especificado (Collins <i>et al.</i> , 1990)
Vacuno	Sedimentación con HPC	BACTEC12B	453	7,7%	Presencia de microorganismos contaminantes (Coussins <i>et al.</i> , 1995)
Alpaca	Sedimentación con HPC	BACTEC12B	137	7,3%	Presencia de microorganismos contaminantes (Coussins <i>et al.</i> , 1995)
Vacuno	Centrifugación con NaOH-OA	LJ	2989 (4)	0,13% muestras 7% tubos	Sobrecrecimiento de microorganismos contaminantes (Kalis <i>et al.</i> , 1999b)
Vacuno	Centrifugación con HPC	HEYM	463 (4)	30%	Sobrecrecimiento de microorganismos contaminantes en $\geq 1$ tubos/muestra (Secott <i>et al.</i> , 1999)
Vacuno	Centrifugación con NaOH-OA	LJ, HEYM	2513 (4 HEYM; 2 LJ)	13-14% muestras	Sobrecrecimiento de microorganismos contaminantes (Nielsen <i>et al.</i> , 2004)
Ovino	Centrifugación en HPC	BACTEC12B	5066	11,7%	Presencia de microorganismos contaminantes (Whittington, 2009)

Abreviaturas: HPC, cloruro de hexadecilpiridinio; HEYM, medio Herrold's con yema de huevo; LJ, medio Lowenstein-Jensen; NaOH-OA, hidróxido sódico con ácido oxálico.



### *B. Sensibilidad analítica y reducción del número de Map durante el procesado de las muestras*

Cuando se prepara una muestra para su cultivo bacteriológico siempre hay una fuerte reducción en el número de *Map* viables debido a las soluciones de descontaminación y antibióticos utilizadas durante el proceso. De la misma forma, también se producen pérdidas de *Map* en cada paso de centrifugación o sedimentación. Los protocolos que emplean NaOH y/o OA reducen la concentración de *Map* en muestras de ganado bovino en 1-2 log en un plazo de 4 h, mientras que la utilización de BAC lo hace en 1 log. El HPC parece no afectar a la viabilidad de *Map* al menos durante 5 días de incubación al 1% de concentración (Jørgensen, 1982; Merkal *et al.*, 1982). No obstante, los protocolos de cultivo con doble incubación con HPC y antibióticos VAN (VAN = vancomicina, anfotericina B y ácido nalidíxico) se asocian con una pérdida de 2,7 log en el caso de cepas tipo S (Reddacliff *et al.*, 2003b). Por lo tanto, alrededor de un 99% de los organismos viables presentes en una muestra pueden ser eliminados durante el procesado de la misma. Teniendo en cuenta estos factores, la sensibilidad analítica descrita para el cultivo fecal no parece ser mayor de  $10^2$  bacterias viables por cada 1-2 g de heces (Jørgensen, 1982; Reddacliff *et al.*, 2003b). Obviamente, esto implica la posibilidad de que se obtengan falsos resultados negativos en aquellas muestras que presenten una baja carga de *Map* debido a estas pérdidas producidas durante el procesado de la muestra.

En lo que concierne a muestras de tejidos, la pérdida de *Map* viables es aún más notable, con reducciones de 3,1 log utilizando el protocolo con HPC (Reddacliff *et al.*, 2003b). Las muestras de leche también acusan la descontaminación con HPC, de tal modo que la duración de la fase de incubación (óptimo: 2-5 h) y la temperatura durante dicha incubación (óptimo: 22°C) son factores críticos. Tras 5 h de incubación en HPC, la sensibilidad analítica en medio líquido se reduce hasta  $10^2$ - $10^3$  células de *Map* por ml de leche (Grant *et al.*, 2003). La variabilidad de todos estos datos sugiere que deben existir diversas interacciones complejas entre el HPC, el tipo de muestra, el medio de cultivo y la cepa de *Map* implicada.

#### 1.6.3.2.7. Identificación de *Map* en el medio de cultivo

##### *A. Características fundamentales*

Una vez se evidencian colonias de bacilos ácido-alcohol resistentes en medio sólido o se produce una señal de crecimiento en tubo de medio líquido, es necesaria la identificación del agente. En general, se puede establecer una identificación presuntiva en base al crecimiento lento ( $\geq 3$  semanas) y las características de las colonias, que inicialmente son redondas, lisas y blanquecinas pero con el

tiempo se vuelven más voluminosas, rugosas y de color amarillento (Twort y Ingram, 1912). Sin embargo, esta morfología varía según el medio de cultivo empleado, y la adición de ciertos suplementos puede alterarla drásticamente: los compuestos Tween, por ejemplo, que pueden ser empleados como fuente de ácido oleico, provocan la formación de colonias irregulares y granulares en el agar 7H9 (van Boxtel *et al.*, 1990). Por el contrario, las colonias de *Map* tipo S en agar 7H10 son blancas, circulares, brillantes y convexas, con un tamaño  $\leq 1$  mm en 6 semanas (Whittington *et al.*, 1999).

### B. Dependencia de micobactina

De manera general, el aislamiento de *Map* requiere la adición de una fuente exógena de micobactina, de tal modo que dicha característica se ha convertido en el rasgo principal utilizado para diferenciar *Map* de otras micobacterias (Morrison, 1965; Thorel *et al.*, 1990). La confirmación de esta dependencia supone la realización de un subcultivo desde el medio primario a otros dos medios, uno con micobactina y otro sin ella (Whipple *et al.*, 1991). Sin embargo, esta demostración no es infalible, y el resultado está influenciado por el pH del medio, la concentración de hierro y el arrastre de micobactina adherida a la pared celular de *Map* desde el cultivo primario (Lambrecht y Collins, 1992). También se ha demostrado que existen cepas ovinas no dependientes de micobactina para el aislamiento primario en agar 7H11, pero que sí son micobactina-dependientes en medio LJ (Aduriz *et al.*, 1995). Además, para complicar aún más esta discusión, parece que ciertas cepas de *Mycobacterium avium* son también dependientes de micobactina (Matthews *et al.*, 1978; Thorel, 1984).

### C. Confirmación molecular

El descubrimiento del IS900, un elemento de inserción que se creía específico de *Map*, asentó la primera base molecular para la identificación de *Map* (Green *et al.*, 1989). Actualmente, la técnica PCR se emplea sola o en combinación con la demostración de dependencia de micobactina para la identificación de *Map* en los cultivos bacteriológicos. En general puede decirse que es un método que goza de buena especificidad y que se ha empleado con éxito desde finales de los años 90 (Cousins *et al.*, 1999; Whittington *et al.*, 1999; Englund *et al.*, 2001; Sweeney *et al.*, 2006b). En el siguiente apartado (6.3.3) se recoge con más detalle las características y aplicaciones de estas técnicas moleculares.

### I.6.3.3. Detección de ADN bacteriano: reacción en cadena de la polimerasa

La detección del ADN específico de un microorganismo implica necesariamente su presencia en la muestra analizada. Aunque existen diversas técnicas de biología molecular que permiten realizar esta detección, la más extendida y empleada es la PCR. Tradicionalmente, la PCR no se ha considerado una herramienta lo suficientemente adecuada para la detección directa de *Map* en una muestra (Nielsen *et al.*, 2001b), relegando su uso a la confirmación de los cultivos bacteriológicos (Manning y Collins, 2001). Su aplicación directa sobre muestras biológicas se ha visto entorpecida por las interferencias que pueden provocar ciertos componentes de la matriz de la muestra sobre la reacción, produciendo en muchos casos inhibición de la PCR, lo que se traduce en la posibilidad de obtener falsos resultados negativos (Stevenson y Sharp, 1997). Sin embargo, los avances logrados durante la última década tanto en las técnicas de PCR como en los métodos de extracción de ADN parecen muy prometedores de cara a su utilización directa en el diagnóstico de la paratuberculosis.

El desarrollo de la PCR ha tenido una gran importancia en el campo de la biología molecular (Mullis y Faloona, 1987; Mullis, 1990), con un elevado rango de aplicaciones tanto clínicas como en investigación. La PCR es la replicación enzimática termo-dirigida de una secuencia de ADN específica, en donde los productos resultantes de la primera replicación sirven de plantilla o molde para el siguiente ciclo de replicación, permitiendo por lo tanto una amplificación exponencial de la secuencia de ADN deseado. Esta técnica cobra especial interés en el caso de organismos con crecimientos muy lentos o incultivables, permitiendo la identificación de los mismos de una manera más sencilla.

En el caso de aplicaciones diagnósticas de la PCR, la secuencia de ADN “diana” que se emplea para la amplificación debe presentar un grado apropiado de especificidad. Dicha especificidad puede ser tan amplia como un género completo o tan estrecha como cierta cepa de una especie bacteriana concreta, y está definida por el diseño de unos oligonucleótidos denominados cebadores o *primers*, que se unen a la secuencia objetivo e inician la reacción. Tras un número determinado de ciclos de reacción, el número elevado de copias de ADN producidas permite la detección del mismo, su visualización en un gel de agarosa o su secuenciación.

### I.6.3.3.1. Tipos de ensayos de PCR

#### A. PCR convencional

La configuración más básica de la PCR es la denominada comúnmente como PCR convencional, y que emplea un único par de *primers* (que generalmente se denominan como cebador directo o *forward primer* y cebador inverso o *reverse primer*), desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTP's = deoxynucleoside triphosphates) que actúan como “bloques de construcción” para la replicación del ADN, ADN-polimerasa, solución tampón y generalmente iones de  $Mg^{2+}$ . El ADN molde se añade a esta mezcla en tubos o pocillos, y la reacción se lleva a cabo en un termociclador, el cual calienta y enfría la mezcla durante 20-40 ciclos de desnaturalización, alineamiento y elongación. En la figura 12 se esquematiza las diferentes fases de la reacción de PCR (Bölske y Herthnek, 2010).

En la PCR convencional los productos obtenidos se separan mediante electroforesis en gel, y más generalmente en geles de agarosa. Mediante la tinción del gel con bromuro de etidio, que al unirse al ADN bicatenario se vuelve intensamente fluorescente, se puede visualizar el ADN amplificado como bandas fluorescentes bajo luz UV. La distancia recorrida por el ADN analizado se compara con una escala estándar, también denominada *ladder*, para determinar el tamaño del producto. De esta manera se confirma que el producto obtenido en la reacción es del tamaño esperado para el patógeno de interés, o si por el contrario es un producto de una amplificación inespecífica. La intensidad de fluorescencia de las bandas observadas también puede servir para valorar la cantidad de material inicial presente en la muestra, pero si la cantidad de ADN de partida es baja, las bandas obtenidas pueden ser difíciles de leer o interpretar. También existen otros métodos empleados para la detección de los amplicones como son la hibridación en puntos (*spot hybridization*) y técnicas de detección colorimétrica (Halldórsdóttir *et al.*, 2002; Taddei *et al.*, 2004).

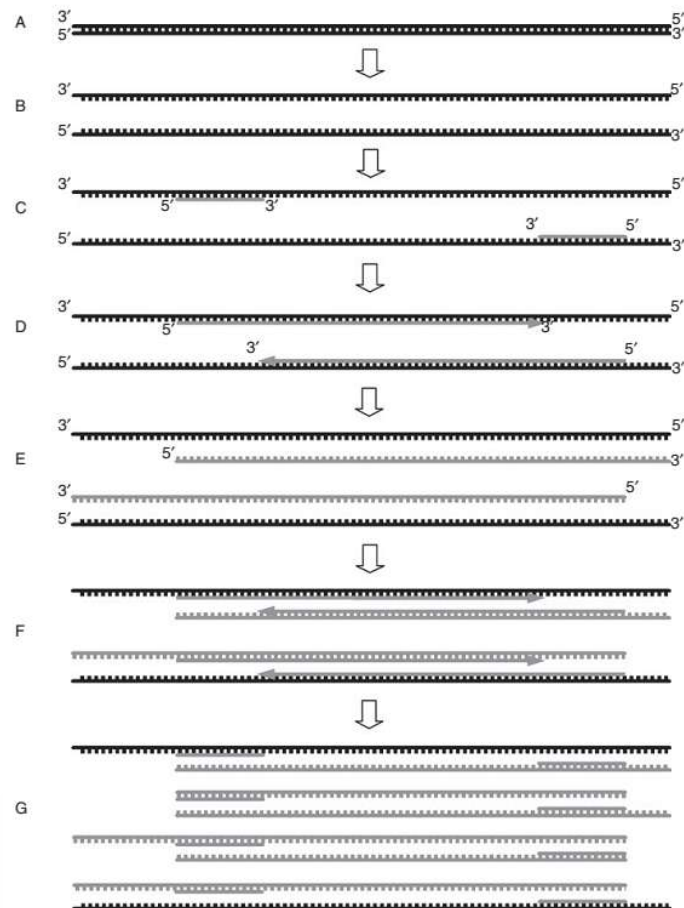


Figura 12. Ilustración de la reacción de PCR. El molde inicial de ADN se muestra en negro, y los cebadores y el ADN de nueva síntesis en gris. A. Molde de ADN; B. Ciclo 1, desnaturalización; C. Alineamiento; D. Elongación; E. Ciclo 2, desnaturalización; F. Alineamiento y elongación, que genera el producto de PCR especificado por los cebadores; G. Ciclo 3, desnaturalización y alineamiento (adaptado de Bölske y Herthnek, 2010).

Para la detección de *Map*, el gen diana más popular es el elemento de inserción IS900 (descrito en el apartado 2.6.1). Éste fue descrito por primera vez por Green *et al.* (1989), aunque también fue aislado por Collins *et al.* (1989) y utilizado por primera vez como diana de PCR por Vary *et al.* (1990). Entre los estudios más citados donde se ha empleado PCR convencional en investigación sobre *Map* se incluyen trabajos sobre la presencia de *Map* en lesiones de pacientes con enfermedad de Crohn (Moss *et al.*, 1992; Sanderson *et al.*, 1992) y la monitorización de muestras de leche de consumo (Millar *et al.*, 1996).

La PCR convencional ha sido una técnica que se ha ido mejorando sensiblemente dando lugar a otros métodos más complejos, que se describen a continuación. En la tabla 15 se muestran algunos de los problemas y limitaciones de los que adolece esta técnica.

Tabla 15. Principales inconvenientes de la PCR convencional (adaptado de Bölske y Herthnek, 2010).

Problemática	Explicación
<b>Sensibilidad limitada</b>	Debido a que las bandas en el gel deben ser analizadas a simple vista, es preciso que la reacción contenga suficiente ADN de partida para la visualización de bandas positivas (problema frecuente en PCR directa sobre muestras clínicas)
<b>Mayor tiempo de procesado y trabajo de laboratorio</b>	Los geles deben ser preparados, cargados, sometidos a electroforesis y analizados
<b>Cuantificación</b>	Imprecisa, no fiable
<b>Riesgo de contaminación cruzada</b>	Para propósitos diagnósticos, los tubos de PCR para electroforesis deben ser manipulados en una dependencia aislada del resto del laboratorio
<b>Inhibición</b>	Sustancias como sales, detergentes iónicos, alcoholes, etc. pueden inhibir la reacción de PCR (problema más frecuente en PCR directa)

### B. PCR anidada

La PCR anidada o *nested PCR* consiste en la realización de dos PCR consecutivas con dos sets diferentes de *primers*, en la que se emplea el amplicón generado en la primera reacción como ADN molde para la segunda. Entre las ventajas que posee esta técnica en relación a la PCR convencional puede destacarse una mejora tanto en la sensibilidad como en la especificidad. El segundo par de *primers* se une a una región más pequeña dentro de la secuencia que delimita el primer par, lo que conlleva la obtención de amplicones más cortos progresivamente. Como ambos pares de *primers* deben poseer su diana en la misma región del ADN para conseguir el producto final, existe una mejora de la especificidad. Además, ya que deben añadirse nuevos reactivos para la segunda reacción, la sensibilidad también se mejora (Englund *et al.*, 2001; Ikonopoulou *et al.*, 2004). En el caso de que existiese una cantidad insuficiente de amplicón después de la primera PCR, en la segunda reacción sí habría suficiente producto de ADN para la visualización de los fragmentos. Además, si existiese una inhibición incompleta en la primera PCR, los posibles inhibidores presentes tras la primera reacción se verán diluidos en la segunda PCR, por lo que la reacción podría llevarse a cabo sin problemas.

Entre los principales inconvenientes de la técnica hay que señalar que la PCR anidada conlleva un mayor tiempo y trabajo que la PCR convencional y existe mayor riesgo de contaminación cruzada a partir de las reacciones positivas a la primera PCR. Desde el punto de vista de la detección de *Map* en cultivos líquidos, la alta sensibilidad de la PCR anidada no es generalmente necesaria, ya que la cantidad de micobacteria presente debería ser suficiente tras la señal positiva de crecimiento, por lo que no debería utilizarse esta técnica debido al riesgo considerable de provocar una contaminación cruzada (Bölske y Herthnek, 2010).

El primer trabajo que menciona la utilización de PCR anidada para la detección de *Map* fue una comparación entre cultivo fecal y PCR (Collins *et al.*, 1993). Sin embargo, muchos de los artículos más citados que emplearon esta técnica para la detección de *Map* son estudios sobre la enfermedad de Crohn (Lisby *et al.*, 1994; Bull *et al.*, 2003; Autschbach *et al.*, 2005). Entre otros estudios destacados se incluirían una comparación entre PCR a tiempo real, PCR anidada y cultivo microbiológico (Fang *et al.*, 2002), y un estudio de la presencia de *Map* en leche pasteurizada (Gao *et al.*, 2002). En la bibliografía más reciente, podemos encontrar dos estudios más de comparación de métodos: el primero entre PCR convencional y anidada con diferentes dianas genéticas en muestras inoculadas experimentalmente (Möbius *et al.*, 2008), y el segundo entre ELISA, cultivo microbiológico y PCR anidada sobre muestras de leche, sangre y heces de bovino (Pinedo *et al.*, 2008).

### C. PCR a tiempo real

En la PCR convencional sólo es posible determinar la cantidad final del producto amplificado, por lo que se considera una técnica de punto final. Por el contrario, en la PCR a tiempo real (*Real-time* PCR = RT-PCR) o PCR cuantitativa (*quantitative* PCR = qPCR), el propio termociclador es el instrumento encargado de monitorizar el progreso de la reacción a través de la fluorescencia emitida por un agente fluorescente incorporado en el propio producto, ya sea mediante el uso de agentes fluoróforos intercalantes que se unen inespecíficamente a cualquier ADN bicatenario (por ejemplo SYBR Green) o mediante el uso de sondas fluorescentes específicas de la diana en cuestión. Todo el proceso de la reacción y la fluorescencia emitida se registra ciclo a ciclo en un ordenador.

En lo que respecta a los sistemas de detección, debido a que los agentes intercalantes como el SYBR Green se unen inespecíficamente a cualquier ADN de doble hebra, en caso de su empleo es necesario realizar *a posteriori* un análisis de punto de fusión para comprobar que el producto obtenido es realmente el buscado y no un producto de ADN de doble hélice inespecífico. Por el contrario, las sondas fluorescentes se unen a un lugar específico en la secuencia diana, lo que les confiere una mayor especificidad. Existen diferentes tecnologías en la fabricación de sondas, como las sondas Scorpion, sondas Molecular Beacons y sondas FRET (FRET = *Fluorescence Resonance Energy Transfer*), aunque las más extendidas son las denominadas sondas TaqMan®. Estas sondas presentan en el extremo 3' una molécula fluorescente o fluorocromo denominado *quencher* o inhibidor, que bloquea la señal fluorescente emitida por el fluorocromo *reporter* o delator situado en el extremo 5'. Debido a la actividad exonucleásica de la Taq-polimerasa, la sonda es digerida por la enzima durante la fase de elongación, por lo que ambos fluorocromos se separan espacialmente permitiendo que la fluorescencia producida por el *reporter* sea detectada. A medida que aumenta la

cantidad del producto diana, también lo hace la señal de fluorescencia producida por las moléculas de *reporter* liberadas. El número de ciclos necesarios para que la señal de fluorescencia alcance cierto valor umbral, normalmente denominado ciclo umbral ( $Ct = Cycle\ threshold$ ), es una medida objetiva que permite realizar comparaciones entre las distintas muestras, así como la cuantificación del ADN diana. La relación entre el  $Ct$  y el número inicial de muestras es inversamente proporcional, por lo que a menor valor del  $Ct$ , mayor es la cantidad de copias del amplicón objetivo y viceversa. Además, si se realiza una curva estándar con diferentes cantidades conocidas de la secuencia, es posible realizar una cuantificación absoluta.

La principal ventaja de la qPCR es que no sólo presenta una mayor especificidad que la PCR convencional, sino también una mayor sensibilidad debido a que la lectura de la fluorescencia a través del instrumento es extremadamente precisa. Con todo, las comparaciones directas realizadas entre qPCR y PCR anidada muestran una sensibilidad similar para ambos métodos (Fang *et al.*, 2002; Christopher-Hennings *et al.*, 2003; Schönerbrücher *et al.*, 2008). Otra importante ventaja es que no es necesario realizar ningún ensayo más sobre el producto amplificado, puesto que los datos recogidos durante la reacción son suficientes para su análisis.

El primer estudio de relevancia veterinaria que empleó qPCR para la detección de *Map* fue el ya mencionado trabajo de comparación de Fang *et al.* (2002). Otros trabajos frecuentemente citados en la bibliografía incluyen el primer desarrollo de una qPCR basada en el empleo de SYBR Green (O'Mahony y Hill, 2002), y la aplicación de inmunoseparación magnética (IMS = *Inmuno-Magnetic separation*) en combinación con qPCR para detección de *Map* en leche (Khare *et al.*, 2004). Otra importante aplicación de la qPCR es que puede combinarse con el uso de transcriptasa inversa para la detección de ARN mensajero y análisis de expresión génica (Basler *et al.*, 2008).

#### D. PCR múltiple o multiplex

El empleo de diferentes sets de *primers* diseñados para diferentes dianas permite analizar diferentes secuencias simultáneamente en una muestra. En la qPCR, las diferentes sondas empleadas para cada secuencia se marcan con fluorocromos que emitan fluorescencia a distintas longitudes de onda que se leen en canales independientes.

La primera aplicación de un PCR múltiple para *Map* fue un estudio de identificación de crecimientos en medio BACTEC™ utilizando *primers* para el IS900 y para el gen del fragmento 16S del ARNr, específico del género *Mycobacterium* (Cousins *et al.*, 1995). También se desarrolló otro PCR doble basado en los genes F57 y p34 para discriminar entre distintas micobacterias en muestras de tejidos fijados en formol e incluidos en parafina (Coetsier *et al.*, 2000). Bull *et al.* (2000) describieron



un método de PCR múltiple que, apuntando a diferentes *loci* del IS900, podía diferenciar entre diez tipos de *Map* en función del patrón de bandas observado en el gel. Entre otros trabajos de interés más recientes podemos destacar la combinación de PCR múltiple con el uso del ensayo FASTPlaqueTB™ para identificar células viables de *Map* (Stanley *et al.*, 2007) o el desarrollo de una PCR múltiple que permite detectar y discriminar entre las diferentes subespecies de *M. avium* utilizando las dianas IS900, IS901, IS1245 y el gen *dnaJ* (Moravkova *et al.*, 2008).

En la PCR múltiple, es habitual co-amplificar una molécula que actúa como control de amplificación interno (IAC = *Internal Amplification Control*) que sirve para monitorizar la presencia de inhibición en la PCR (Ballagi-Pordany y Belak, 1996). La tabla 16 recoge algunos de los trabajos que describen el empleo de un IAC.

Tabla 16. Principales estudios de PCR frente a *Map* que describen el diseño de un IAC (= Control Interno de Amplificación).

Referencia	Tipo de ensayo	Diana <i>Map</i>	IAC <sup>a</sup>
Englund <i>et al.</i> , 1999	PCR anidada	IS900	$\beta$ -actina humana <sup>b</sup>
Halldórsdóttir <i>et al.</i> , 2002	PCR convencional	IS900	$\beta$ -actina humana <sup>b</sup>
Rodríguez-Lázaro <i>et al.</i> , 2004	PCR a tiempo real	F57	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>sepedonicus</i> <sup>c,d</sup>
Tasara <i>et al.</i> , 2005	PCR convencional	16S rRNA IS900 F57	pUC19 <sup>b</sup>
Brey <i>et al.</i> , 2006	PCR a tiempo real	IS900 <i>hspX</i>	<i>hspX</i> modificado <sup>b</sup>
Herthnek <i>et al.</i> , 2006	PCR a tiempo real	IS900	IS900 modificado <sup>b</sup>
Schönenbrücher <i>et al.</i> , 2008	PCR a tiempo real	F57 IS <i>Mav</i> 2	F57 modificado <sup>b</sup>
Slana <i>et al.</i> , 2008	PCR a tiempo real	IS900 F57	StTS1 <sup>b</sup>

a. Nombre del gen empleado en el diseño del IAC.

b. IAC en forma de plásmido.

c. Gen no especificado.

d. IAC de ARN.

#### I.6.3.3.2. Dianas moleculares de *Map* más frecuentes para PCR

El elemento de inserción IS900 se ha usado extensamente como diana específica de *Map*, tanto para estudios de PCR como filogenéticos. Aunque esta diana sólo se ha identificado en *Map*, se han descrito casos de reacciones positivas con otras micobacterias con algunos protocolos de PCR (Cousins *et al.*, 1999; Englund *et al.*, 2002; Taddei *et al.*, 2008). Algunos de los nuevos diseños de PCR de IS900 han sido desarrollados con el objetivo de intentar solventar esas reacciones cruzadas que producen estos elementos similares al IS900 (Bull *et al.*, 2003; Herthnek y Bölske, 2006; Kawaji *et al.*,

2007). En la tabla 17 pueden verse diferentes trabajos basados en esta diana y otras identificadas también como específicas de *Map*, tanto de copia única como múltiple (Stabel *et al.*, 2004; Hertnek y Bölske, 2006; Ireng *et al.*, 2009).

Tabla 17. Dianas moleculares de *Map* empleadas en el diagnóstico de paratuberculosis.

Diana molecular	Nº copias/genoma <i>Map</i>	Referencias
<b>IS900</b>	15-20	Publicaciones recientes: Herthnek <i>et al.</i> , 2006; Möbius <i>et al.</i> , 2008; Slana <i>et al.</i> , 2008; Ireng <i>et al.</i> , 2009; Logar <i>et al.</i> , 2012; Plain <i>et al.</i> , 2014; Sevilla <i>et al.</i> , 2014
<b>F57</b>	1	Vansnick <i>et al.</i> , 2004; Tasara y Stephan, 2005; Bosshard <i>et al.</i> , 2006; Herthnek y Bölske, 2006; Glanemann <i>et al.</i> , 2008; Herthnek <i>et al.</i> , 2008; Möbius <i>et al.</i> , 2008; Schönenbrücher <i>et al.</i> , 2008; Ireng <i>et al.</i> , 2009
<b>ISMav2</b>	3	Strommenger <i>et al.</i> , 2001; Stratmann <i>et al.</i> , 2002; Shin <i>et al.</i> , 2004; Glanemann <i>et al.</i> , 2008; Möbius <i>et al.</i> , 2008; Schönenbrücher <i>et al.</i> , 2008
<b><i>hspX</i></b>	1	Ellingson <i>et al.</i> , 1998, 2000; Stabel <i>et al.</i> , 2004; Brey <i>et al.</i> , 2006
<b>Gen 251</b>	1	Bannantine <i>et al.</i> , 2002; Sibley <i>et al.</i> , 2007
<b>Gen 255</b>	1	Bannantine <i>et al.</i> , 2002; Möbius <i>et al.</i> , 2008
<b>ISMAP02</b>	6	Stabel y Bannantine, 2005; Ireng <i>et al.</i> , 2009; Sevilla <i>et al.</i> , 2014

#### 1.6.3.3.3. Procedimientos de extracción del ADN y pretratamientos utilizados

1. Inmunoseparación magnética (IMS). Este método se basa en la captura de las células de *Map* mediante microesferas magnéticas tapizadas con anticuerpos específicos y la separación del resto de la muestra utilizando un imán. Su primera aplicación en estudios sobre *Map* fue para el cultivo de muestras de leche (Grant *et al.*, 1998b) y posteriormente en combinación con la PCR (Grant y Rowe, 2001). La extracción en fenol-cloroformo puede integrarse junto con la IMS para la purificación del ADN. Se ha descrito también un método similar a la IMS que emplea un péptido para la captura de *Map* (Stratmann *et al.*, 2006).
2. Lisis bacteriana. Conseguir romper la gruesa pared de *Map* es un requisito indispensable para poder obtener el ADN. Los métodos simples como la digestión enzimática o el hervido han demostrado ser inadecuados por separado, pero sin embargo es posible realizar una lisis efectiva combinando métodos químicos y la agitación con microesferas (Herthnek, 2009), que consiste en añadir a la muestra unas diminutas esferas y someterla a una agitación vigorosa en un vórtex o instrumento similar. Se han evaluado diferentes combinaciones de tratamiento enzimático, ciclos de congelación/hervido, agitación con microesferas e incluso kits de extracción de ADN para plantas (Garrido *et al.*, 2000b; Odumeru *et al.*, 2001; Zecconi *et al.*, 2002; Chui *et al.*, 2004; Sting *et al.*, 2014), siendo la

inclusión de agitación con microesferas el método que ofrece una mayor sensibilidad en la mayoría de casos (Logar *et al.*, 2012; Plain *et al.*, 2014).

3. Captura por hibridación. Se basa en la unión de secuencias de oligonucleótidos específicos (como el IS900) con microesferas magnéticas, que se emplean para capturar y separar el ADN específico de *Map* de otros ADN no específicos y sustancias inhibitoras que puedan estar presentes en muestras de naturaleza compleja como heces o tejidos (Marsh *et al.*, 2000; Englund *et al.*, 2001; Halldórsdóttir *et al.*, 2002; Vansnick *et al.*, 2007).
4. Columnas de centrifugado (spin columns). Son dispositivos diseñados para la centrifugación de la muestra, aumentando la tasa de flujo en comparación con las columnas de flujo por gravedad. El ADN es purificado mediante su unión a una membrana de sílica que se somete a diferentes pasos de lavado antes de realizar la elución del material genético en una solución tampón. Esta técnica es la empleada por la mayoría de kits comerciales de extracción y purificación de ADN (Bölske y Herthnek, 2010; Leite *et al.*, 2013).
5. Solventes orgánicos. Es uno de los métodos más sencillos para purificar ADN en mezclas de proteínas, grasas y ácidos nucleicos. Generalmente, la mezcla es extraída primero en fenol y posteriormente en cloroformo. Los solventes orgánicos disuelven las moléculas hidrofóbicas y desnaturalizan las proteínas, volviéndolas insolubles al agua. Por lo tanto, las membranas celulares y las proteínas presentes se disuelven o quedan atrapadas en la fase fenol-cloroformo, que se descarta, mientras el ADN y ARN permanece disuelto en la fase acuosa. Debido a que se emplean compuestos dañinos y peligrosos, este procedimiento debe ser realizado en una cabina o campana con extracción de gases (Bölske y Herthnek, 2010).

#### I.6.3.3.4. Naturaleza de la muestra

1. Heces. Los ensayos de PCR para la detección de *Map* en muestras fecales se han optimizado notablemente en los últimos años, y en especial han mejorado su sensibilidad en la detección de animales con niveles bajos de eliminación de *Map*. Estos avances se han producido debido a la mejora de los protocolos de extracción y purificación del ADN junto con el desarrollo de nuevos sistemas de PCR más sensibles. Los métodos de extracción para muestras fecales también han sido modificados para su empleo en muestras de carácter ambiental como suelos y estiércol (Cook y Britt, 2007). La tabla 18 recoge un resumen de algunos trabajos de investigación realizados con muestras de origen fecal y su comparación con el cultivo microbiológico.

Tabla 18. Resumen de publicaciones que han empleado PCR directa sobre heces y comparación con cultivo fecal (adaptado de Bölske y Herthnek, 2010).

Muestras (nº)	Método de lisis	Extracción ADN	Diana molecular	PCR	Cultivo fecal (descontaminación y medio)	Resultados (muestras positivas/total)	Referencia
Vacuno (63)	Agitación con microesferas	a) Columnas de centrifugación b) Método propio	IS900	qPCR <sup>a</sup>  PCR anidada	DI-C, HEYM	a) qPCR (41/63) b) qPCR (43/63) Anidada (44/63) Cultivo (44/63)	Christopher-Hennings <i>et al.</i> , 2003
Vacuno (23)	Agitación con microesferas	IMS, solventes orgánicos	IS900	qPCR <sup>a</sup>	DI-C, HEYM	qPCR (17/23) Cultivo (17/23)	Khare <i>et al.</i> , 2004
Vacuno (310)	Hervido/ congelación	Columnas de centrifugación	IS900	qPCR <sup>b</sup>  PCR semi-anidada	NaOH-OA, LJ	qPCR (31/310) Cultivo (20/310)	Bögli-Stuber <i>et al.</i> , 2005
Vacuno (81)	100°C durante 10 min	Centrifugación y lavado con tampón Tris-EDTA	IS900 ISMAP02	qPCR <sup>b</sup>  PCR anidada	DI-DC, HEYM	qPCR IS900 (60/81) qPCR ISMAP02 (59/81) Anidada IS900 (59/81) Anidada ISMAP02 (59/81) Cultivo (60/81)	Stabel y Bannantine, 2005
Vacuno (1808)	Agitación con microesferas	Columnas de centrifugación	ISMap2	qPCR <sup>a</sup>	DI-C, HEYM	qPCR (137/ 1808) Cultivo (333/1808)	Wells <i>et al.</i> , 2006
Vacuno (47)	Agitación con microesferas	Columnas de centrifugación	IS900 F57	qPCR <sup>a</sup>	a) NaOH-OA, HEYM, LJ b) DI-C, HEYM	qPCR IS900 (47/47) qPCR F57 (47/47) Cultivo (47/47)	Herthnek y Bölske, 2006
Ovino (68)	Agitación con microesferas	Solventes orgánicos	IS900 F57 ISMAP02	qPCR multiplex	DI-C, BACTEC12B	qPCR multiplex (52/68) Cultivo (28/68)	Kawaji <i>et al.</i> , 2007
Vacuno (328)	Agitación con microesferas	Columnas de centrifugación	IS900	PCR anidada	DI-C, HEYM	Anidada (27/328) Cultivo (11/328)	Pinedo <i>et al.</i> , 2008
Vacuno (143)	Agitación con microesferas	Columnas de centrifugación	<i>hspX</i>	qPCR	DI-C, HEYM	qPCR (31/143) Cultivo (27/143)	Aliinovi <i>et al.</i> , 2009

Abreviaturas: IMS, inmunoseparación magnética; DI-C, doble incubación + centrifugación (Whitlock y Rosenberg, 1990); HEYM, medio Herrold's con yema de huevo; NaOH-OA, hidróxido sódico + ácido oxálico; LJ, medio Lowenstein-Jensen; DI-DC, doble incubación + doble centrifugación.

a. Química TaqMan.

b. Química SYBR Green.

2. Leche. Debido a que la concentración de *Map* en la leche es baja en general, la mayoría de métodos de extracción suelen emplear la centrifugación de un volumen relativamente alto, normalmente 10 ml, para conseguir aumentar la concentración (Slana *et al.*, 2008b). La IMS, que se emplea frecuentemente en muestras de leche (Grant y Rowe, 2001; Khare *et al.*, 2004), puede emplearse sobre volúmenes más pequeños, aunque de manera habitual se emplean también volúmenes más grandes. No obstante, la elección de qué fracción descartar tras la centrifugación parece esencial. En la mayoría de métodos, incluyendo la IMS, suelen descartarse tanto la nata como el suero de la leche (Tasara y Stephan, 2005;

Pinedo *et al.*, 2008; Slana *et al.*, 2008a). Sin embargo, la fracción de la nata de la leche cruda puede contener la mayoría de *Map* presente en la muestra, por lo que la inclusión de esta fracción debería ser tomada en cuenta (Millar *et al.*, 1996). El pellet resultante y la fracción de nata pueden combinarse (Gao *et al.*, 2007; Herthnek *et al.*, 2008), o se puede procesar la muestra entera directamente (Stratmann *et al.*, 2006; Donaghy *et al.*, 2008).

3. Tejidos. Se han realizado abundantes estudios acerca de la presencia de *Map* en biopsias de diferentes especies, como la detección de *Map* en biopsias intestinales humanas mediante PCR anidada (Bull *et al.*, 2003) o la aplicación de un PCR múltiple de los genes F57 e IS*Mav*2 en biopsias de perro (Glanemann *et al.*, 2008). En bovino y ovino con signos clínicos se realizó un estudio de qPCR basado en el IS900 sobre diferentes muestras de tejidos, encontrando presencia de *Map* en la mayoría de muestras de heces, sangre y tejidos (con concentraciones de hasta  $9,5 \times 10^6$  copias de ADN de *Map/g* de tejido muscular), aunque en este trabajo no se realizó una confirmación posterior sobre los amplicones obtenidos (Nelli *et al.*, 2008). Otro trabajo realizado sobre muestras de 101 vacas lecheras de sacrificio mediante PCR del gen F57 encontró presencia de *Map* en el 8,9% de las muestras fecales, 4,9% de los linfonódulos mesentéricos, 0,9% de muestras de tejido ileocecal, 3,6% de las muestras de leche y 2,9% de muestras de músculo diafragmático, con posterior secuenciación de los productos de la PCR (Bosshard *et al.*, 2006). La detección de *Map* en tejidos fijados con formol e incluidos en parafina también es posible tras someter a las muestras a ciertos pretratamientos (Coetsier *et al.*, 2000; Miller *et al.*, 2002; Ikonomopoulos *et al.*, 2004).
4. Semen. La detección de *Map* en semen mediante técnicas de PCR también ha sido objeto de estudio, como por ejemplo la monitorización de pajuelas de semen de toros infectados (Ayele *et al.*, 2004), estudios comparativos entre diferentes dianas de PCR (Khol *et al.*, 2007a) o la evaluación de la sensibilidad de un PCR de IS900 en muestras de semen inoculadas experimentalmente (Herthnek *et al.*, 2006).
5. Cultivos en medio líquido. Aunque generalmente la obtención de ADN a partir de caldos de cultivo es más sencilla que en el caso de muestras clínicas, existen ciertos componentes del medio como la yema de huevo que pueden provocar inhibición de la PCR. Se han realizado estudios con diferentes pretratamientos, como la combinación de hervido con centrifugación en etanol (Whittington *et al.*, 1999), el empleo de kits comerciales de columnas de centrifugado (Kim *et al.*, 2004), lisis mediante congelación/hervido y

purificación con solventes orgánicos (Naser *et al.*, 2004) e incluso solamente hervido de la muestra (Sweeney *et al.*, 2006b).

#### 1.6.3.3.5. Comparación entre PCR y cultivo microbiológico

En términos generales, existen varios aspectos fundamentales a la hora de poder realizar comparaciones entre la técnica de la PCR y los métodos de cultivo convencionales. Normalmente la sensibilidad analítica de una técnica de cultivo para *Map* suele expresarse como UFC por unidad de peso o volumen, mientras que en el caso de la PCR cuantitativa se habla de número de copias del amplicón en cuestión. Esto implica tener en cuenta si la diana empleada para la PCR es de copia única o múltiple. Por otro lado, el recuento de células viables de *Map* en medios sólidos generalmente tiende a la subestimación por varios motivos (Bölske y Herthnek, 2010):

- Las células de *Map* tienden a formar agregados, por lo que en muchos casos una colonia representa a más de una célula (una única célula de una cepa de pobre crecimiento no será capaz de desarrollar una colonia, por lo que las colonias observadas serán fruto de agregados de varias células).
- El cultivo bacteriológico no tiene en cuenta las células muertas, mientras que la PCR sí puede detectarlas si su ADN permanece intacto.
- Los tratamientos de descontaminación empleados para el cultivo de muestras clínicas también influyen sobre la viabilidad de *Map*, y por lo tanto en el recuento obtenido.

Otros métodos que podrían ser *a priori* más precisos para el recuento de *Map* en medios de cultivo incluyen el recuento de células en una cámara de Bürker (Herthnek *et al.*, 2006) y la citometría en fase sólida (Vansnick *et al.*, 2007). Debe comprenderse que la subestimación de los recuentos de *Map* en el cultivo va a producir una sobreestimación de la sensibilidad de la PCR al comparar ambos métodos. Adicionalmente, los diversos modos empleados en la literatura para expresar la sensibilidad de los diferentes tests hacen todavía más complicada la comparación entre ellos.

#### 1.6.4. DIAGNÓSTICO INMUNOLÓGICO

Las pruebas de diagnóstico inmunológico están basadas en la detección de la respuesta inmune que se produce en el hospedador a consecuencia de la infección. Como se explicó con anterioridad, la infección por *Map* produce una respuesta inmune de tipo espectral, comenzando con una respuesta de tipo celular que evoluciona hacia una respuesta de tipo humoral, con un periodo de

transición entre ambas muy variable y generalmente largo. Debido a que existen diferentes pruebas para la detección de una u otra respuesta, es de vital importancia realizar una elección cuidadosa de la técnica a utilizar en función del objetivo buscado.

#### **I.6.4.1. Intradermorreacción**

La prueba de la intradermorreacción o IDR es un test de inmunidad celular que se realiza *in vivo*, y se basa en la evaluación de la reacción de hipersensibilidad retardada que se produce tras la inoculación intradérmica de un antígeno determinado (generalmente un extracto de tipo PPD), midiendo el incremento del grosor de la piel antes de la IDR y después de 48-72h. El lugar de aplicación es diferente según la especie, siendo las tablas del cuello el sitio preferente en vacuno y caprino, y el pliegue de la cola en la especie ovina (Chiodini *et al.*, 1984a; Juste y Aduriz, 1990).

Esta prueba se desarrolló para la lucha contra la tuberculosis bovina, y posteriormente fue adaptada para el diagnóstico de la paratuberculosis mediante el empleo de johnina o tuberculina aviar, que son PPD's específicos de *Map* y de *M. avium* respectivamente (Johnson *et al.*, 1949; Stuart, 1962; Collins, 1996). Su sensibilidad es baja si se compara con el cultivo fecal, mientras que al compararla con el ELISA o con la IDGA esta prueba ha demostrado ser específica en rebaños no infectados y sensible en rebaños infectados (De Lisle *et al.*, 1980; Blood y Radostits, 1989; Robbe-Austerman *et al.*, 2006). Una de las causas de aparición de falsos positivos son las reacciones cruzadas que se pueden producir con otras micobacterias u otros actinomicetales, y también las que se producen en aquellos animales que están vacunados frente a *Map* (De Lisle *et al.*, 1980; Chiodini *et al.*, 1984a; Blood y Radostits, 1989).

En un estudio realizado en ovino se encontró una correlación significativa entre la existencia de una respuesta débil a la IDR y la presencia de bacilos de *Map* intactos dentro de los macrófagos, mientras que la aparición de una fuerte reacción a la IDR se asoció con niveles bajos de infección intestinal y presencia de macrófagos con bacilos degenerados en su interior (Gilmour *et al.*, 1977). Otro estudio realizado en vacuno describe evidencias histológicas de infección en animales vacunados que presentaban una respuesta negativa a la IDR (Wentink *et al.*, 1993). Todo esto parece indicar que los animales con una respuesta celular débil son más vulnerables a la infección, lo que está en concordancia con el papel protector que se atribuye a la respuesta inmune celular. Teniendo esto en cuenta, se plantea la duda de si es adecuada la utilización de la IDR como método de diagnóstico para la eliminación de animales positivos, puesto que tal vez se esté realizando una selección a favor de los animales menos resistentes a la enfermedad.

#### I.6.4.2. Prueba de detección del interferón gamma (IFN- $\gamma$ )

A diferencia de la IDR, esta prueba se realiza *in vitro* y consiste en la cuantificación mediante un ELISA sándwich de los niveles de IFN- $\gamma$  producido por las células mononucleares de la sangre en respuesta a un antígeno micobacteriano, y la comparación con los niveles de IFN- $\gamma$  producido por células sin estimular. Esta prueba se considera una herramienta útil para la detección de animales con infección subclínica en las que predomina una respuesta inmune de tipo celular (Stabel, 1996).

Al igual que la IDR, esta prueba fue desarrollada inicialmente para el diagnóstico de la tuberculosis bovina (Rothel *et al.*, 1990), y posteriormente se adaptó para su empleo en el diagnóstico de la paratuberculosis (Billman-Jacobe *et al.*, 1992). En este trabajo se empleó como antígeno un PPD de *Map*, obteniendo una especificidad de 97,6% y una sensibilidad entre 71,8-100%. No obstante, trabajos más recientes describen una especificidad de 88,7-97,6% y una sensibilidad del 40,7% al emplear sonicados de células completas de *Map*, mientras que empleando PPD de *Map* se obtuvo una especificidad de 93,5-98,3% y una sensibilidad de 66,7% (Robbe-Austerman *et al.*, 2006c). En el ganado bovino, la prueba del IFN- $\gamma$  permite la detección de animales infectados de manera subclínica antes de que estos sean positivos al cultivo fecal (Jungersen *et al.*, 2002), mientras que en ganado ovino parece que ser la técnica más precoz capaz de detectar la infección (Gwozdz *et al.*, 2000b; Stewart *et al.*, 2004). No obstante, en esta especie se han descrito diferencias significativas en el nivel de IFN- $\gamma$  en animales infectados experimentalmente en función de la edad y dosis infectiva (Delgado *et al.*, 2012), así como de la cepa implicada (Fernández *et al.*, 2014).

Como limitación de la técnica, y al igual que sucede con la IDR, existen reacciones cruzadas con otras micobacterias ambientales, lo que genera falsos resultados positivos (McDonald *et al.*, 1999; Gwozdz *et al.*, 2000). También se ha descrito una elevada producción innata inespecífica de IFN- $\gamma$  en terneros jóvenes, lo que podría confundirse también con resultados positivos (McDonald *et al.*, 1999; Olsen *et al.*, 2005; Stewart *et al.*, 2007). En lo que respecta a la sensibilidad, hay que tener en cuenta que animales en fases avanzadas de la infección presentan una capacidad limitada para desarrollar una respuesta inmune celular, lo que puede conducir a falsos resultados negativos (Jungersen *et al.*, 2002; Aranaz *et al.*, 2006). También es crítica la manipulación de las muestras, debiendo mantenerse a una temperatura entre 15,6-21,1°C y realizarse la estimulación dentro de las 12h posteriores a la extracción (Robbe-Austerman *et al.*, 2006b). La aparición de estos falsos negativos ha intentado solventarse mediante la adición de IL-12 bovina recombinante (Jungersen *et al.*, 2006) o el empleo de mitógenos como la concavalina A (Stabel y Whitlock, 2001; Robbe-Austerman *et al.*, 2006b).



De manera similar a lo que se ha comentado en el apartado anterior, se ha observado una asociación entre la magnitud de la producción sistémica de IFN- $\gamma$  y cierta capacidad para controlar la infección en ovino infectado tanto natural como experimentalmente (Burrells *et al.*, 1999; Gwozdz *et al.*, 2000a; Begg y Griffin, 2005). Por tanto, estas observaciones cuestionan si este test es adecuado para los programas basados en diagnóstico y sacrificio, ya que si la respuesta inmune protectora tuviese una base genética, se estarían eliminando los animales más resistentes a la infección (Gwozdz *et al.*, 2000a).

#### **I.6.4.3. Inmunodifusión en gel de agar (IDGA)**

Se trata de un test de inmunidad humoral que consiste en la confrontación en un gel de agarosa entre un suero problema y un antígeno de *Map*, generalmente PPA-3. En el caso de que el suero contenga anticuerpos específicos frente a *Map*, se produce una precipitación visible de los complejos antígeno-anticuerpo (Juste y Aduriz, 1990).

Esta técnica no presenta una gran sensibilidad en ganado vacuno (Sherman *et al.*, 1984; Sockett *et al.*, 1992; Ferreira *et al.*, 2003) ni tampoco en los pequeños rumiantes (Sergeant *et al.*, 2003; Gumber *et al.*, 2006). Este hecho responde a la incapacidad de la prueba para detectar animales con infección subclínica, mientras que en casos clínicos su sensibilidad es aceptable (Sherman *et al.*, 1984; Dubash *et al.*, 1996). Por el contrario, su especificidad está próxima al 100% en las distintas especies (Dubash *et al.*, 1996; Sergeant *et al.*, 2003; Gumber *et al.*, 2006; Robbe-Austerman *et al.*, 2006a).

#### **I.6.4.4. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)**

El test ELISA puede ser diseñado para detectar un antígeno concreto por medio de anticuerpos (ELISA directo), o bien para detectar anticuerpos frente a un determinado antígeno (ELISA indirecto). El ELISA indirecto, objeto de este apartado, es con mucho la técnica serológica más ampliamente utilizada para el diagnóstico de la paratuberculosis (Harris y Barletta, 2001), y fue introducida en el diagnóstico de esta enfermedad en 1978 (Jørgensen y Jensen, 1978).

Las principales ventajas del ELISA, responsables de su éxito, son su bajo coste, rapidez, simplicidad, repetibilidad y la capacidad de poder analizar a la vez grandes cantidades de muestras, unido a la facilidad y objetividad a la hora de discriminar entre resultados positivos/negativos. Otra ventaja es que el punto de corte empleado puede variarse, aumentando la sensibilidad o la especificidad de la prueba en función de los objetivos que se persigan (Collins y Sockett, 1993; Hope *et al.*, 2000).

En general, la mayoría de tests ELISA para el diagnóstico de paratuberculosis emplean como antígeno el PPA-3 (Lyle y Merkal, 1983; Yokomizo *et al.*, 1983) o el LAM (Sugden *et al.*, 1989). También se han probado muchos otros antígenos candidatos, como los antígenos A y D (Nielsen *et al.*, 1988; Sugden *et al.*, 1988), AhpC y AhpD (Olsen *et al.*, 2001) o diferentes proteínas de choque térmico (Stevenson *et al.*, 1991; Colston *et al.*, 1994; Koets *et al.*, 2001). Relacionado con esto, uno de los inconvenientes más importantes de esta técnica son las reacciones cruzadas que se producen por el empleo de estos preparados antigénicos. Este problema se solucionó en parte gracias a la preadsorción de los sueros problema con antígenos de *Mycobacterium phlei* (Yokomizo *et al.*, 1985), y los tests que incluyen este paso presentan una especificidad que generalmente no baja del 90% (Harris y Barletta, 2001), aunque esto no impide que se puedan producir todavía ciertas reacciones cruzadas (Osterstock *et al.*, 2007).

La sensibilidad del ELISA se ha valorado en numerosos estudios, y en la tabla 19 puede verse un resumen con las estimaciones obtenidas para ganado bovino. No obstante, la sensibilidad de la técnica es diferente en función de la fase clínica de los animales. En un estudio donde los animales fueron clasificados en base al cuadro clínico (subclínicos no eliminadores, subclínicos eliminadores y casos clínicos), las sensibilidades obtenidas fueron de 24,6%, 56,5% y 88,2% respectivamente, mientras que si se tomaban los datos en conjunto la sensibilidad era de 45,5% (Collins y Sockett, 1993). Por tanto, la sensibilidad de la técnica es mayor cuanto más avanzado se encuentre el proceso y exista una mayor excreción de *Map* (Whitlock *et al.*, 2000; Sweeney *et al.*, 2006c). En la especie ovina también se ha descrito una mayor sensibilidad en ovejas que presentan lesiones multibacilares (Clarke *et al.*, 1995; Sergeant *et al.*, 2003). En general, se considera que la respuesta humoral detectable mediante ELISA sólo se desarrolla cuando la carga bacteriana alcanza un determinado umbral, lo que explica la falta de sensibilidad de este método.

La técnica ELISA puede aplicarse también en muestras de leche individuales (Sweeney *et al.*, 1994) o incluso sobre muestras de leche de tanque como una estimación de la prevalencia del rebaño (Nielsen *et al.*, 2000; Beyersbach *et al.*, 2004; Nielsen y Toft, 2014). La sensibilidad de esta técnica en relación al ELISA de suero sanguíneo es menor para muchos estudios, aunque la concordancia entre ambas parece aceptable (Sweeney *et al.*, 1994; Munjal *et al.*, 2004; Lombard *et al.*, 2006a); sin embargo, otros autores no han encontrado una correlación adecuada entre ambos métodos sobre muestras de animales individuales (Hardin y Thorne, 1996). Una observación muy interesante es que parece que la probabilidad de obtener un resultado positivo en suero aumenta hacia el final de lactación, mientras que en leche aumenta al principio de la misma y tanto en suero como en leche a partir del segundo parto (Nielsen *et al.*, 2002a, 2002b; Kudahl *et al.*, 2004).

Tabla 19. Sensibilidad y especificidad estimadas para diferentes tests de ELISA indirecto sobre muestras de suero (adaptado de Nielsen y Toft, 2008).

ELISA	Antígeno	Tamaño muestral <sup>a</sup>		Resultado ELISA <sup>b</sup>		Se	Sp	Referencia
		C+	C-	E+/C+	E-/C-			
ND <sup>c</sup>	Varios <sup>d</sup>	60	44	37	18	0,62	0,41	Abbas <i>et al.</i> , 1983
ND <sup>c</sup>	Varios <sup>d</sup>	60	44	50	39	0,83	0,89	
ND <sup>c</sup>	Varios <sup>d</sup>	36	156	34	129	0,94	0,83	Colgrove <i>et al.</i> , 1989
Parachek	VRI316	126	196	71	194	0,56	0,99	Collins <i>et al.</i> , 1991
ND <sup>c</sup>	LAM	22	378	4	363	0,18	0,96	McNab <i>et al.</i> , 1991
ND <sup>c</sup>	Varios <sup>d</sup>	156	200	126	200	0,81	1	Yokomizo <i>et al.</i> , 1991
ND <sup>c</sup>	ATCC 19698	134	62	64	62	0,48	1	Bech-Nielsen <i>et al.</i> , 1992
Parachek	PPA3	177	196	71	187	0,40	0,95	Sockett <i>et al.</i> , 1992
ND <sup>c</sup>	Varios <sup>d</sup>	14	210	10	174	0,71	0,83	Spangler <i>et al.</i> , 1992
ND <sup>c</sup>	LAM	102	65	61	54	0,60	0,83	Sweeney <i>et al.</i> , 1994
HerdChek	IDEXX	62		54		0,87		Sweeney <i>et al.</i> , 1995
HerdChek	IDEXX	174		62		0,36		
HerdChek	IDEXX	41	263	13	258	0,32	0,98	Egan <i>et al.</i> , 1999
Parachek	VRI316	56		43		0,77		
ND <sup>c</sup>	Varios <sup>d</sup>	106	341	50	340	0,47	0,99	Reichel <i>et al.</i> , 1999
Parachek	VRI316	106	341	33	334	0,31	0,98	
ND <sup>c</sup>	VRI316	60	304	22	287	0,37	0,94	Eamens <i>et al.</i> , 2000
ND <sup>c</sup>	PPA3	64	68	51	61	0,80	0,90	Nielsen <i>et al.</i> , 2001a
HerdChek	IDEXX	198	346	48	345	0,24	0,99	Kalis <i>et al.</i> , 2002
IDEXX	Varios <sup>d</sup>	198	346	66	322	0,33	0,93	
Scand								
IDEXX	Varios <sup>d</sup>	198	346	51	335	0,26	0,97	
Parachek	VRI316		1049		1028		0,98	Pitt <i>et al.</i> , 2002
HerdChek	IDEXX	44	607	11	569	0,25	0,94	Stabel <i>et al.</i> , 2002
ND <sup>c</sup>	PPA3	67	513	42	460	0,63	0,90	Klausen <i>et al.</i> , 2003
ND <sup>c</sup>	PPA3	8	16	5	11	0,63	0,69	Paolicchi <i>et al.</i> , 2003
SVANOVA	LAM	15	100	6	91	0,40	0,91	Glanemann <i>et al.</i> , 2004
Parachek	VRI316		15566		15467		0,99	Holmes <i>et al.</i> , 2004
Parachek	VRI316		5588		5579		0,99	Jubb y Galvin, 2004
Parachek	VRI316	1188		265		0,22		Jubb <i>et al.</i> , 2004
HerdChek	IDEXX	415	359	127	342	0,31	0,95	Collins <i>et al.</i> , 2005
Pourquier	Varios <sup>d</sup>	415	359	116	359	0,28	1	
SERELISA	Varios <sup>d</sup>	301	359	134	304	0,45	0,85	
Parachek	VRI316	415	359	118	358	0,28	0,99	
HerdChek	IDEXX	72	617	53	540	0,74	0,88	Hendrick <i>et al.</i> , 2005a
HerdChek	IDEXX	160	834	14	814	0,09	0,98	McKenna <i>et al.</i> , 2005
SVANOVA	Varios <sup>d</sup>	160	834	27	757	0,17	0,91	
Parachek	VRI316	160	834	11	801	0,07	0,96	Lombard <i>et al.</i> , 2006a
Parachek	VRI316	170	1751	40	1719	0,24	0,98	

Abreviaturas: ND, no disponible; LAM, lipoarabinomano; PPA3, antígeno protoplasmático 3; Se, sensibilidad; Sp, especificidad.

a. Tamaño de muestra para animales con condición (C+) y sin condición (C-).

b. Número de animales ELISA positivo (E+) o ELISA negativo (E-) dada la condición (C).

c. No disponible: pruebas ELISA de diseño propio que no tienen un nombre específico.

d. Varios: preparaciones antigénicas no especificadas o que no tienen un nombre específico.

## I.7. TRATAMIENTO Y CONTROL

### I.7.1. TRATAMIENTO

El tratamiento de la paratuberculosis con fármacos antimicrobianos ha sido probado en diversos estudios, tanto con evaluaciones *in vivo* como *in vitro*. Algunos de los fármacos empleados han sido la clofazimina, isoniazida, rifabutina, rifampicina o la estreptomina, logrando en algunos casos una mejoría de los signos clínicos pero sin conseguir frenar la eliminación fecal de *Map* (Larsen y Vardaman, 1953; Gilmour y Angus, 1971; Merkal y Larsen, 1973; Stabel, 1998). Otros autores aseguran haber logrado cultivos negativos empleando combinaciones de dos o más fármacos (Das *et al.*, 1992; Belloli *et al.*, 1995). El tratamiento de elección sería isoniazida con rifabutina y/o ethambutol (Gezon *et al.*, 1988; St Jean, 1996), aunque un estudio experimental sugiere que la combinación de amikacina, claritromicina y rifabutina podría ser un tratamiento más eficaz (Williams *et al.*, 1999). En lo que respecta al empleo de antiinflamatorios como tratamiento sintomático, su empleo está desaconsejado debido a la depresión del sistema inmune que provocarían en el animal (Allen *et al.*, 1968).

En resumen, y en vista de la ineficacia de los tratamientos disponibles, el elevado coste y tiempo de tratamiento, el uso de tratamientos farmacológicos contra la paratuberculosis sólo estaría justificado para la recuperación temporal de animales de alto valor genético, y teniendo en cuenta que estos animales seguirían suponiendo una fuente de infección para el resto del rebaño (Stabel, 1998; Harris y Barletta, 2001).

### I.7.2. CONTROL

#### I.7.2.1. Control sanitario basado en detección y eliminación ("*test-and-cull*")

El objetivo de los programas de control basados en este método es lograr la erradicación de una enfermedad mediante el sacrificio de los animales con resultado positivo a una o varias pruebas diagnósticas. El éxito de estos programas está directamente relacionado con la sensibilidad de la técnica que se emplee. En el caso de la paratuberculosis es aquí donde aparece la primera limitación de estos planes, puesto que las pruebas diagnósticas de que se dispone distan de ser suficientemente eficaces como para poder detectar todos los animales infectados, además de clasificar erróneamente animales sanos como infectados en algunos casos (Whitlock *et al.*, 2000).

Existen diversos países que han implantado programas de control de este tipo, generalmente utilizando como base el cultivo fecal (Whitlock *et al.*, 1995; Ridge *et al.*, 1995b; Benedictus *et al.*, 1999; Kalis *et al.*, 1999a; Sternberg y Viske, 2002; Pavlik *et al.*, 2003), pero en la mayoría de ellos no se ha logrado una reducción significativa en la prevalencia y en la aparición de nuevos casos. En el mejor de los escenarios el cultivo fecal puede llegar a detectar hasta un 50% de los animales infectados de manera subclínica, lo que da lugar a que en ocasiones se produzcan resultados positivos después de varios muestreos negativos con la consiguiente frustración de productores y veterinarios implicados (Whitlock, 1998). Además, hay que sumar el elevado coste económico que supone la realización de estos cultivos y la demora en la obtención de resultados. Algunos autores proponen el uso de lotes de muestras como método para abaratar el diagnóstico, aunque el problema de la falta de sensibilidad inherente a la técnica seguiría presente. También se ha propuesto el empleo de PCR en sustitución del cultivo fecal, fundamentalmente para solventar el retraso en la obtención de los resultados (Thoen y Haagsma, 1996; Bögli-Stuber *et al.*, 2005). Otra alternativa sería el empleo del ELISA, pero debido a que presenta menor sensibilidad que el cultivo, debe ser empleado en combinación con este último (Ridge *et al.*, 1995b; Whitlock *et al.*, 1995; Aduriz *et al.*, 2000). Otra desventaja que presentaría el ELISA es que puede llegar a clasificar erróneamente como positivos hasta un 4% de los animales (Whitlock *et al.*, 2000; Collins *et al.*, 2005). Por estos motivos, la eliminación de animales positivos sin sintomatología clínica puede llegar a ser contraproducente, ya que se puede estar eliminando animales que no están realmente infectados. Aunque se sabe que en las explotaciones infectadas los casos clínicos se corresponden únicamente con la punta del iceberg (Whitlock y Buergelt, 1996), hay que tener en cuenta que estos animales clínicamente afectados pueden eliminar ingentes cantidades de *Map* al ambiente, hasta el punto de que existen animales “supereliminadores” que pueden llegar a excretar más micobacterias en las heces que 20000 animales con eliminación baja (Whitlock *et al.*, 2005). Por lo tanto, la eliminación de estos animales con clínica está justificada ya que conduce a una reducción de la carga de *Map* en el ambiente y, de esta forma, se disminuye la posibilidad de contaminación de alimento y agua y se previene una mayor diseminación de la enfermedad (Baumgartner y Khol, 2008).

El desarrollo de este tipo de programas supone un gran desembolso económico por parte de los productores y/o las autoridades implicadas, y su éxito depende de la situación específica de cada explotación, aunque de modo general puede decirse que aquellos programas que se apoyan en técnicas como los ELISA´s actualmente disponibles no resultan económicamente rentables (Groenendaal y Galligan, 2003). Por ello, y a pesar de que existe algún caso en el que se ha logrado la erradicación de la paratuberculosis mediante detección y eliminación de casos positivos, la mayoría

de estos programas han fracasado (Fridriksdottir *et al.*, 2000; Benedictus y Kalis, 2002; Bakker y Willemsen, 2006). Para lograr una reducción de la prevalencia es necesario implementar unas adecuadas pautas de manejo y bioseguridad en combinación con dichos programas, lo que requiere de la concienciación e implicación de productores y veterinarios (Benedictus y Kalis, 2002; Kalis *et al.*, 2003).

### **1.7.2.2. Control basado en vacunación**

La primera vacuna para el control de la paratuberculosis fue utilizada en ganado vacuno en Francia en 1926, y estaba compuesta por una mezcla de bacilos atenuados, parafina, aceite de oliva y polvo de pumita (Vallée y Rinjard, 1926). Tras el seguimiento (Vallée *et al.*, 1934), se demostró la reducción en el número de animales excretores así como la disminución de la prevalencia de animales con sintomatología clínica, lo que extendió su empleo a otros países (Sigurdsson, 1960; Wilesmith, 1982; Jørgensen, 1983b; Benedictus *et al.*, 1988).

La reducción en el número de animales con sintomatología clínica y/o excretores es variable según los diferentes autores y también difícil de comparar, debido a las diferentes metodologías y periodos de aplicación, pero en programas de 5 o más años esta reducción puede estar entre el 89-99% (Sigurdsson, 1960; Wilesmith, 1982; Jørgensen, 1983b; Benedictus *et al.*, 1988). Sin embargo, los animales eliminadores nunca desaparecen completamente (Kalis *et al.*, 1992), lo que provoca la necesidad de combinar la vacunación con la implantación de medidas higiénico-sanitarias y la detección/eliminación de animales excretores (Kalis *et al.*, 1999b). La vacunación no previene la infección de los animales, sino que modifica la respuesta inflamatoria de tal manera que se limita la progresión de las lesiones granulomatosas en los animales infectados, logrando a su vez una reducción de la excreción de *Map* en las heces. En los individuos vacunados las lesiones están constituidas por granulomas de tipo tuberculoide (formas regresivas) localizados únicamente en el tejido linfoide asociado al intestino, mientras que en animales infectados y no vacunados las lesiones pueden extenderse a diversas áreas del intestino provocando una enteritis severa (Juste *et al.*, 1994; García-Marín *et al.*, 1997).

Por lo tanto, la vacunación no reduce el número de animales infectados pero su efecto es económicamente beneficioso, ya que aunque el número de animales infectados de manera latente en la explotación sea elevado, se reduce la incidencia de nuevos casos clínicos, que son los responsables finales de gran parte de las pérdidas económicas que produce la enfermedad (Juste *et al.*, 2002).

En lo que respecta a los inconvenientes que han restringido el uso de la vacunación como medida de control de la enfermedad debe citarse en primer lugar la existencia de reacciones positivas en los animales vacunados a las pruebas diagnósticas de inmunidad tanto humoral como celular frente tanto a la paratuberculosis como a la tuberculosis (Wentink *et al.*, 1988; Köhler *et al.*, 2001; Muskens *et al.*, 2002). Esto supone un problema de interferencia entre las diferentes pruebas diagnósticas de una y otra enfermedad y, en especial, en países como España que mantienen programas de erradicación de tuberculosis bovina y caprina. En la mayoría de casos de animales vacunados la reacción positiva a la prueba de intradermorreacción con tuberculina bovina es inferior a la producida por la tuberculina aviar, por lo que el empleo de la intradermorreacción comparada permitiría diferenciar si la positividad es debida o no a la vacunación (García-Marín *et al.*, 1999; Nedrow *et al.*, 2007). De cualquier forma, sería necesario realizar un registro correcto de los animales vacunados, así como una estandarización de los PPDs empleados en las pruebas de intradermorreacción (Muskens *et al.*, 2002). De manera análoga a como ocurre con la tuberculosis, el resultado de un diagnóstico de paratuberculosis por medio de ELISA o test de IFN- $\gamma$  es indistinguible entre un animal vacunado y uno infectado, por lo que la realización de este tipo de pruebas en el marco de un programa de control de paratuberculosis sería inviable (Muskens *et al.*, 2002).

Los resultados obtenidos con vacunas vivas atenuadas o inactivadas son similares (Wilesmith, 1982; Marly *et al.*, 1988; García-Marín *et al.*, 1999), aunque actualmente se encuentra más extendido el uso de las inactivadas por el grado de seguridad que confieren en relación a una posible reactivación de las vacunas vivas (Aduriz *et al.*, 2000). También se han desarrollado vacunas compuestas de fracciones de microorganismos (Larsen *et al.*, 1978; Hurley y Ewing, 1983), antígenos purificados de *Map* (Mullerad *et al.*, 2003; Koets *et al.*, 2006) y también vacunas de ADN (Bannantine y Stabel, 2001; Sechi *et al.*, 2006), y aunque algunas de ellas permiten incluso distinguir entre animales infectados y vacunados, o bien no son tan efectivas como las celulares completas o bien no se demostró su eficacia. En lo concerniente a la realización de revacunación, la administración de dos dosis no ha mostrado una mayor protección, por lo que la vacuna se administra una única vez en la vida del animal (Aduriz *et al.*, 2000). Normalmente se recomienda aplicar la vacuna durante el primer mes de vida, ya que son éstos los animales que poseen un mayor riesgo de infección (Larsen *et al.*, 1964; Sherman, 1985). Según otro estudio, los corderos y cabritos vacunados con 4-5 meses de vida desarrollan una respuesta inmune más intensa que aquellos vacunados en los primeros 15 días de vida, debido al desarrollo incompleto del sistema inmune de éstos últimos (Corpa *et al.*, 2000b). La vacunación de animales adultos también ha mostrado ser efectiva, incluso en casos de animales previamente infectados (Corpa *et al.*, 2000b; García-Pariente *et al.*, 2003, 2006). La vía de

administración más eficiente es la subcutánea (Vallée *et al.*, 1926; Larsen *et al.*, 1978; Marly *et al.*, 1988), y preferiblemente en el pliegue del pecho (Aduriz, 1993). Otras vías como la oral (Brotherston *et al.*, 1961), la conjuntival (Marly *et al.*, 1988) o la intradérmica (Saint-Marc *et al.*, 1992) no han obtenido mejores resultados (Aduriz *et al.*, 2000). Tras varios días desde la aplicación, se forma un nódulo fibrocáseo en el lugar de inoculación, debido en parte a la composición oleica de los adyuvantes (Aduriz *et al.*, 2000; Reyes *et al.*, 2003). Este nódulo puede llegar a fistulizar al exterior, y en el caso del ganado bovino puede llegar a medir más de 15cm en los días posteriores a la administración (Benedictus *et al.*, 1988), aunque generalmente va reduciendo su tamaño e incluso llega a desaparecer en algunos casos (Windsor *et al.*, 2002; Reddacliff *et al.*, 2006). En otros casos el nódulo persiste toda la vida, y por ello se recomienda realizar la inoculación en la zona de piel laxa del área pectoral (Aduriz *et al.*, 2000).

### **I.7.3. MEDIDAS HIGIOSANITARIAS Y DE BIOSEGURIDAD**

La implantación de medidas de bioseguridad y prácticas de manejo higiénicas está encaminada a prevenir la introducción de la paratuberculosis en el rebaño y evitar la transmisión de la infección entre los animales. Independientemente de que se realicen otras acciones como la eliminación de animales positivos o programas de vacunación, el establecimiento de estas pautas es esencial para lograr reducir de manera efectiva la prevalencia de la enfermedad (Benedictus, 1984; Sweeney, 1996; Kalis *et al.*, 2001).

La ruta más destacada de transmisión de la enfermedad entre rebaños es el comercio de animales (Sweeney, 1996). El elemento clave para la prevención de la introducción de *Map* en un rebaño es el mantenimiento de una cabaña cerrada, y esto es factible si la reposición del ganado se realiza mediante cría propia (Velthuis, 2004). Sin embargo, en ocasiones los productores precisan de la introducción inmediata de animales para lograr alcanzar sus objetivos productivos, por lo que resulta imprescindible conocer el estatus sanitario frente a la infección de las granjas de origen del ganado que se desea adquirir. Las pruebas diagnósticas individuales por sí solas carecen de la sensibilidad adecuada como para evitar la introducción de *Map* en el rebaño, por lo que sería indispensable el establecimiento de programas de certificación de explotaciones libres de paratuberculosis de cara a conocer cuál es la situación sanitaria real de las granjas (Weber, 2006). Este tipo de programas han sido desarrollados en diversos países como Holanda, donde se otorgaba una certificación de “libre de *Map*” a aquellas explotaciones que permanecían negativas después de un programa de 5 años mediante testajes anuales, utilizando el primer año el test ELISA en paralelo



con cultivo fecal de los animales seropositivos y los cuatro siguientes mediante cultivo fecal de lotes de animales (Benedictus *et al*, 1999; Weber *et al.*, 2004).

Además del manejo “cerrado”, en los establos infectados es crucial reducir el riesgo de infección de los animales susceptibles. Debido a que la mayoría de infecciones se producen durante los primeros 6-12 meses de vida, deben implantarse soluciones destinadas a reducir la presión infectiva sobre la reposición. Uno de los modos de establecer cuáles son los puntos más críticos en cada explotación es el empleo de cuestionarios o “checklists”, enfocados a valorar el riesgo particular de determinadas rutinas o manejos. Posteriormente estos cuestionarios deben ser analizados y revisados en cada caso, y los ganaderos deben ser aconsejados acerca de cómo y qué rutinas deben ser modificadas. En la tabla 20 puede verse un listado de las principales medidas preventivas que deberían establecerse para reducir la transmisión de la enfermedad en el rebaño (Weber, 2006).

Tabla 20. Principales medidas para reducir la transmisión de paratuberculosis del ganado adulto a la cría.

<b>Medidas preventivas de manejo en el momento del parto:</b>
• Sala de partos separada del resto de instalaciones de ganado adulto
• Sala de partos no contaminada con heces de ganado que no ocupa dicha sala
• Ganado próximo al parto debe ser alojado en la sala de partos pero de manera individual, separados de tal manera que no pueda haber contaminación fecal cruzada
• Sala de partos completamente limpia, desinfectada y libre de heces antes de cada parto
• Las crías deben nacer sobre una capa fina de paja limpia
• Sala de partos usada exclusivamente para partos
• Al menos el 90% del ganado debe parir en la sala de partos o en un pasto “limpio” (donde no se haya esparcido purín o haya pastado ganado adulto recientemente)
• Las crías deben separarse de sus madres inmediatamente tras el parto
• Todas las crías nacidas en ambientes no higiénicos deben ser eliminadas de la explotación antes del primer mes de vida
<b>Medidas preventivas de manejo desde el nacimiento hasta el destete del ganado de cría:</b>
• El ganado de cría sólo deben alimentarse con calostro de la propia madre
• El ganado de cría deben alimentarse con lactoreemplazante (salvo la toma de calostro)
• Después de cada amamantamiento los cubos de la leche deben lavarse bien (agua 40°C), o bien tener cada animal su propio cubo
• El suministro de agua del ganado de cría no debe cruzarse con el del ganado adulto
• El ganado de cría no deben pastar nunca en pastos o alimentarse con hierba fresca o silo de hierba que proceda de terrenos en los que ha pastado ganado adulto o se ha esparcido purín en un periodo inferior a un año
• El ganado de cría alimentado con forrajes debe poseer un comedero que impida la contaminación del forraje con heces del ganado adulto
• El ganado de cría debe alojarse en una dependencia separada que impida el contacto con ganado adulto o sus heces

- En las dependencias separadas donde se aloja el ganado de recría debe utilizarse ropa y calzado distinto del utilizado en el manejo del ganado adulto
- El ganado de recría nunca debe estar en contacto con (heces de) ovejas y/o cabras, y nunca debe pastar en pastos donde hayan pastado pequeños rumiantes o se haya esparcido estiércol en un periodo inferior a un año

**Medidas preventivas de manejo desde el destete hasta el primer año de vida del ganado de recría:**

- El ganado de recría debe alojarse en una dependencia separada que impida el contacto con ganado adulto o sus heces
- En las dependencias separadas donde se aloja el ganado de recría debe utilizarse ropa y calzado distinto del utilizado en el manejo del ganado adulto
- El suministro de agua del ganado de recría no debe cruzarse con el del ganado adulto
- El ganado de recría no deben compartir nunca pastos con ganado adulto, o pastar en un pasto o alimentarse con hierba fresca o silo de hierba que proceda de terrenos en los que ha pastado ganado adulto o se ha esparcido purín en un periodo inferior a un año
- El ganado de recría alimentado con forrajes debe poseer un comedero que impida la contaminación del forraje con heces del ganado adulto
- El ganado de recría nunca debe estar en contacto con (heces de) ovejas y/o cabras, y nunca debe pastar en pastos donde hayan pastado pequeños rumiantes o se haya esparcido estiércol en un periodo inferior a un año

De entre todas estas medidas, las prácticas consideradas como más importantes serían (Kalis *et al.*, 2001):

- Zona de partos aislada del resto de la explotación y empleada únicamente para este fin. Debe mantenerse limpia y seca y desinfectarse después de cada uso, no ser utilizada por más de un animal al mismo tiempo y separar inmediatamente la cría de su madre tras el parto.
- Manejo de la alimentación láctea. Empleo exclusivo del calostro de su propia madre, y posteriormente utilización de lactorreemplazantes.
- Alojamiento de la recría completamente separada del ganado adulto.
- En sistemas extensivos se debe alimentar a las terneras de reposición en pastos separados, no utilizados por vacas adultas y fertilizados únicamente con fertilizantes sintéticos.

El empleo y adopción de estas medidas preventivas juega un papel fundamental en la reducción de la prevalencia del rebaño. Como ya se ha comentado, la eliminación de animales infectados por sí misma no garantiza la eliminación de enfermedad si no se realiza además un adecuado manejo higiénico. La mayoría de estas medidas son económicamente sostenibles y rentables, y si bien no siempre funcionan, es principalmente por el incumplimiento de las mismas (Groenendaal *et al.*, 2003).

## **I.7.4. EJEMPLOS DE PROGRAMAS DE CONTROL Y CLASIFICACIÓN DE EXPLOTACIONES FRENTE A LA PARATUBERCULOSIS DESARROLLADOS EN LA ACTUALIDAD**

### **I.7.4.1. Estados Unidos de América**

En EE.UU. se han implementado diferentes programas de control voluntarios contra la paratuberculosis a lo largo de la última década. En 2006, el gobierno publicó unos estándares de uniformidad para dichos programas en vacuno, que se apoyan en tres pilares fundamentales: educación, manejo y testaje de los rebaños. El elemento de educación sirve por una parte para proveer a los productores con la información básica de la enfermedad que deben conocer, así como el asesoramiento sobre medidas de manejo y estrategias de control y, por otro lado, funciona a su vez como una “invitación” a formar parte del programa. En lo que respecta al segundo pilar y antes de comenzar con el testaje del rebaño y su clasificación sanitaria, el productor debe desarrollar, en conjunto con un veterinario oficial o certificado por el estado, un adecuado plan de manejo enfocado a prevenir la introducción y/o reducir la transmisión de la enfermedad. Una vez entran al programa, los rebaños son analizados mediante cultivo fecal o de tejidos, PCR o estudio histológico, que son las únicas pruebas que se reconocen en los estándares como confirmatorias. Adicionalmente, se pueden emplear también las técnicas de ELISA, *pools* fecales o muestras ambientales como métodos de *screening*.

Las explotaciones se clasifican desde el nivel A (ningún animal positivo) hasta el nivel D (al menos un animal positivo confirmado o más del 15% de animales seropositivos). Para que una explotación pueda mejorar su clasificación, deben repetirse los análisis en un plazo de 14 meses y debe revisarse y actualizarse el plan de manejo vigente (USDA-APHIS, 2010).

### **I.7.4.2. Dinamarca**

Dinamarca estableció también en el año 2006 un plan de control voluntario contra la paratuberculosis. El programa se basa en el testaje mediante ELISA en leche 4 veces al año de todas las vacas en producción presentes en la explotación. Los resultados que se obtienen se emplean fundamentalmente para realizar planes de manejo en base al riesgo, en vez de realizarse una clasificación sanitaria de rebaños como en otros países. Uno de los puntos críticos del programa es el entrenamiento del personal encargado de instruir a los productores acerca de la interpretación de resultados, elaboración de planes de manejo y evaluación del riesgo. Ya que la eliminación de animales positivos es voluntaria, los resultados de ELISA se usan en combinación con los datos de producción para asesorar al productor acerca de la rentabilidad de la eliminación de los animales. A

pesar de que todos los costes (diagnóstico y asesoramiento) deben ser asumidos por los ganaderos, el porcentaje de participación se ha ido incrementando desde su comienzo, con un 29% de los rebaños de leche que representan sobre un 40% de la población de vacuno lechero de todo el país. Entre las razones de los productores para unirse al programa, además de la mejora de la salud del rebaño y la prevención de pérdidas asociadas a la producción, hay que resaltar la obtención de certificaciones para la venta de animales para vida (Bakker, 2010).

### **I.7.4.3. Holanda**

El programa nacional voluntario de control de paratuberculosis comenzó en Holanda en 1998. Éste consiste a su vez en dos líneas bien diferenciadas: por un lado, el plan de “estatus no sospechoso”, que tiene el objetivo de prevenir la entrada de la enfermedad en los rebaños libres, y el plan de “asistencia a rebaños infectados” que pretende la erradicación de la paratuberculosis en las explotaciones positivas.

El programa de control contempla una clasificación en 10 niveles. Los niveles 6-10 indican, con diferente grado de certeza, que a mayor nivel de clasificación existe mayor probabilidad de que la granja esté libre de paratuberculosis. Los niveles 1-4 representan los rebaños de estatus desconocido y los rebaños infectados en diferente grado, reservando el nivel 5 como intermedio para aquellos rebaños que están libres de paratuberculosis clínica. Para que una granja de nivel 5 pueda llegar al 6, todos los animales mayores de 3 años presentes en el establo deben ser ELISA negativos. Posteriormente, un rebaño puede ir subiendo desde el nivel 6 al 10 en un periodo mínimo de 4 años si las muestras fecales de todos los animales mayores de 2 años dan resultado negativo. La adquisición de animales desde una explotación con menor calificación provoca inmediatamente la pérdida del nivel alcanzado, clasificándola a partir de ese momento con el nivel de la granja de origen si el animal no es eliminado del rebaño en los 7 días posteriores (Benedictus *et al.*, 2000).

Sobre el año 2007, este programa fue modificado y en la actualidad únicamente se distinguen 3 niveles: el estatus A para explotaciones sin animales seropositivos a ELISA, el estatus B para granjas con animales positivos confirmados que eliminan dichos positivos en un plazo de 6 semanas y el estatus C si dichos animales se mantienen en el rebaño. Las explotaciones con estatus A tienen que retestarse mediante ELISA en suero o leche cada 2 años, mientras que en los estatus B y C el retestaje debe ser anual (Baumgartner y Khol, 2008).

#### **I.7.4.4. Alemania**

En Alemania se han implantado programas de control voluntarios en distintos estados federales, y los costes derivados de la participación en algunos de ellos son asumidos en parte por el gobierno. Por ese motivo, el Ministerio de Alimentación, Agricultura y Protección de Consumidor publicó en 2005 una guía para el manejo de la paratuberculosis en las especies rumiantes. Los objetivos de esta guía son la estandarización de los programas de control, la reducción de los casos clínicos, la prevención de la transmisión a los rebaños libres y la reducción de la seroprevalencia existente (Bundesministerium für Verbraucherschutz Ernährung und Landwirtschaft, 2005).

De acuerdo con esta guía, las explotaciones positivas se clasifican como estatus 1 si se implementan las medidas higiosanitarias recogidas en el documento y se aplican inspecciones regulares por parte de los servicios veterinarios oficiales. Las granjas pueden alcanzar el status 2 si adicionalmente a lo comentado para el estatus 1 se analizan anualmente todos los animales mediante ELISA o PCR. Para el estatus 3, todos los animales seropositivos deben ser analizados por cultivo o PCR 3 veces en un intervalo de 6 meses. Todos los animales que se confirmen como positivos deben ser sacrificados, mientras que los negativos deben ser analizados anualmente a partir de ese momento para comprobar si eliminan *Map*. En este nivel se recomienda separar la descendencia de los animales confirmados y comenzar su testaje a partir de los 2 años de edad. Finalmente, cuando un rebaño se ha analizado durante 5 años sin obtener ningún resultado positivo puede alcanzar el estatus 4, que se denomina "*Map* - no sospechoso".

#### **I.7.4.5. Austria**

Debido al incremento de la paratuberculosis en Austria (Baumgartner *et al.*, 2005) y el debate existente sobre la posible implicación de *Map* en la etiología de la enfermedad de Crohn, el gobierno austríaco decidió en 2006 aprobar la Regulación del Ministerio Federal Austríaco de Salud y Mujer sobre la monitorización y reducción de la paratuberculosis clínica en rumiantes (Khol *et al.*, 2007b).

Esta regulación afecta al ganado vacuno, ovino y caprino así como también a cérvidos criados en cautividad. La legislación establece una lista de los principales síntomas clínicos de la enfermedad que pueden conducir a la sospecha. Los animales sospechosos deben ser separados y el caso debe comunicarse a los servicios veterinarios oficiales, que toman muestras de sangre y heces que se remiten al Laboratorio Nacional de Referencia en Paratuberculosis de la Agencia Austríaca de Salud y Seguridad Alimentaria. Desde este momento y hasta la obtención de los resultados, el animal no puede ser enviado a sacrificio y su leche no puede ser empleada con ningún fin. Las muestras de estos animales se analizan por ELISA, y si el resultado es dudoso se analizan también mediante PCR.

De manera similar, si existen sospechas compatibles con paratuberculosis en algún animal, muerto en explotación o durante su sacrificio en matadero, se toman también muestras de tejido que se envían al laboratorio de referencia y se analizan mediante PCR.

Los animales clínicamente enfermos y con resultado positivo deben ser eliminados del rebaño en un plazo de 3 días, y la explotación debe implantar las medidas higiosanitarias recogidas en la legislación. Además, la explotación permanece bajo vigilancia por parte de los servicios veterinarios oficiales. El gobierno es el encargado de asumir la indemnización al productor en función de la edad y valor del animal. La carne de los animales sacrificados por este motivo se considera no apta para consumo y debe ser destruida.

Por último, y debido a las dificultades en el diagnóstico de los animales subclínicamente infectados, los animales con resultados positivos a ELISA y/o PCR que no muestren sintomatología compatible con paratuberculosis no están afectados por esta regulación.





## II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS





La paratuberculosis bovina, producida por *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, es una enfermedad crónica intestinal de distribución mundial que provoca importantes pérdidas económicas para el sector ganadero tanto directa como indirectamente. Para minimizar dicho impacto económico, resulta fundamental la implantación de programas de control que reduzcan la diseminación del agente en las granjas infectadas e impidan la entrada de la enfermedad en las explotaciones libres.

Actualmente, los planes de control establecidos en Galicia así como en otras zonas de España, son llevados a cabo por las Agrupaciones de Defensa Sanitaria Ganadera (ADSG's). Estos planes se encuentran recogidos en normativas autonómicas que fijan las pautas a seguir para la vigilancia y control de la enfermedad, y que son generalmente un análisis anual mediante serología de una parte representativa de los animales presentes en las explotaciones, realización de pruebas confirmatorias y clasificación de las mismas en función de los resultados obtenidos. Sin embargo, desde el punto de vista diagnóstico, actualmente no se dispone de técnicas que permitan identificar a todos los animales infectados en una población. El cultivo fecal, a pesar de ser la técnica de referencia y presentar mayor sensibilidad y especificidad que las técnicas inmunológicas, sólo se emplea como prueba confirmatoria debido a su elevado coste y el tiempo necesario para la obtención de resultados. Los tests ELISA empleados para el *screening* de las explotaciones, además de presentar una baja sensibilidad, también muestran problemas de especificidad (Osterstock *et al.*, 2007), lo que puede conducir a una clasificación errónea de las granjas, y especialmente en zonas donde el tamaño de explotación es pequeño (Greiner y Dekker, 2005), tal y como sucede en Galicia. Partiendo de estas limitaciones, queda patente la enorme dificultad que supone llevar a cabo un plan de erradicación de la enfermedad, ya que aunque se eliminen todos los animales positivos a las pruebas de diagnóstico siempre permanecen animales infectados no detectados, y que son los responsables del mantenimiento de la infección.

Existen dos cuestiones fundamentales en el desarrollo de un plan de control de la enfermedad, que son por un lado la identificación de los animales infectados, y por otro, la clasificación de las granjas como infectadas o no, lo que es necesario de cara al establecimiento de las medidas de control correspondientes. Dada la mencionada problemática del diagnóstico a nivel individual y que las estrategias higiénicas de manejo representan la medida más eficaz para la disminución de la prevalencia (Kalis *et al.*, 2001), parece que el modelo más eficiente desde el punto de vista económico es determinar la existencia o no de la paratuberculosis en las explotaciones, para a continuación establecer medidas adecuadas de manejo higiénico en las granjas infectadas y

protocolos estrictos de bioseguridad en las que se encuentren libres de la enfermedad. Además de permitir la implantación de pautas específicas, una clasificación sanitaria precisa de las granjas facilitaría también el control de movimiento de animales entre las explotaciones. Como alternativa a las pruebas serológicas en que se basan los programas actuales, se ha propuesto la utilización del cultivo fecal de *pools* o mezclas de muestras de varios animales (Kalis *et al.*, 2004; van Schaik *et al.* 2007), lo que reduciría su coste en gran medida y permitiría una clasificación, sobre el papel, más exacta que la obtenida mediante pruebas serológicas. Otras alternativas incluirían a las nuevas técnicas de biología molecular como la PCR, que aceleran en gran medida la obtención del diagnóstico y cada vez son más accesibles desde un punto de vista económico.

Dentro de este contexto, los objetivos planteados para este trabajo de investigación fueron los siguientes:

- 1º. Comparar la clasificación sanitaria obtenida frente a la paratuberculosis en las ganaderías participantes mediante técnicas serológicas y cultivo microbiológico de *pools* fecales.
- 2º. Estudiar la concordancia existente entre los resultados de serología y cultivo fecal de *pools* teniendo en cuenta la edad de los animales analizados.
- 3º. Evaluar la aplicación y utilidad del cultivo microbiológico de *pools* fecales para la clasificación sanitaria y monitorización de los rebaños mediante muestreos anuales a lo largo de tres años de estudio.
- 4º. Comparar la utilización del cultivo fecal de *pools* y del cultivo fecal individual en la clasificación sanitaria de las ganaderías.
- 5º. Comparar las frecuencias de muestreo semestral y anual en cuanto a la clasificación sanitaria de las explotaciones obtenida mediante el empleo de cultivo fecal de *pools*.
- 6º. Estudiar la utilidad del cultivo fecal de *pools* para evaluar la reducción de la prevalencia a nivel individual tras la aplicación de medidas de bioseguridad y manejo higiénico.
- 7º. Analizar la asociación entre la existencia de infección y diferentes factores de riesgo a nivel de rebaño.
- 8º. Comparar la validez de las nuevas técnicas de diagnóstico molecular en relación a las técnicas tradicionales de cultivo microbiológico.



### III. MATERIALES Y MÉTODOS



### III.1. POBLACIÓN EN ESTUDIO

El sector de vacuno de leche, objeto de este trabajo, presenta una gran importancia en España, situándose ésta en el séptimo puesto de la Unión Europea a nivel de producción y ocupando la cuarta plaza en lo que se refiere a número de cabezas (figura 13).

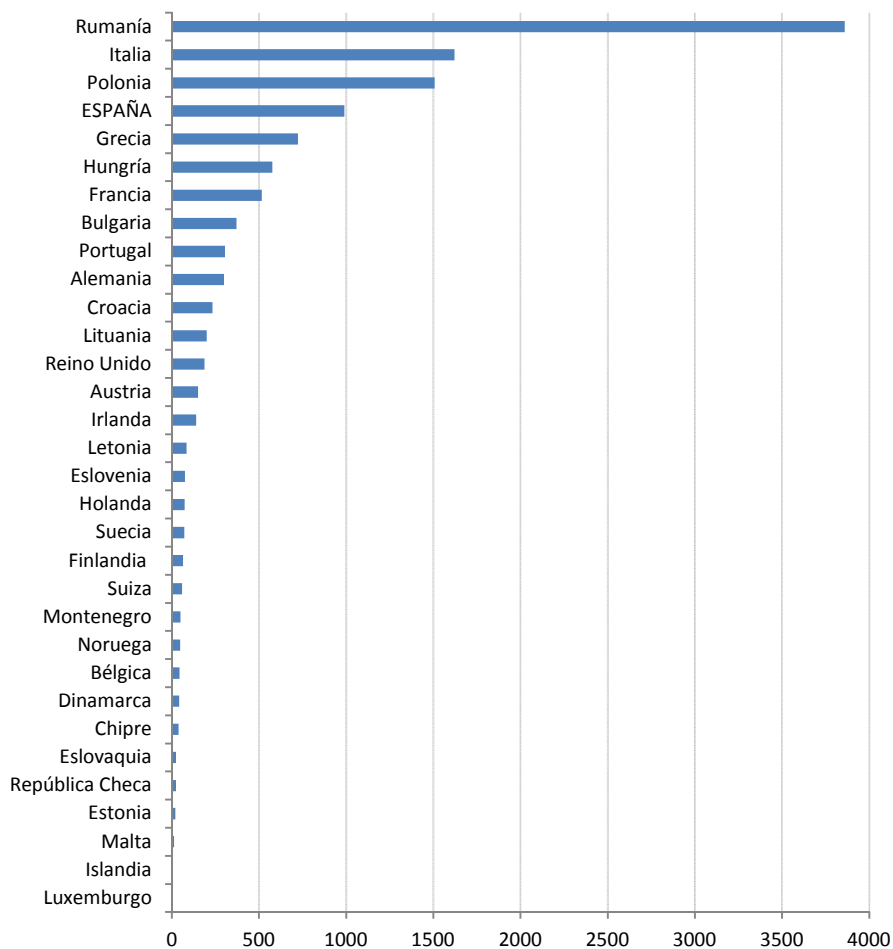


Figura 13. Censo de cabezas de vacuno lechero en la Unión Europea (en miles de animales) (Instituto Nacional de Estadística, 2009).

En lo que respecta al volumen económico, el sector del ganado vacuno lechero aporta aproximadamente el 17% de la producción ganadera total española. Dentro de nuestro país, Galicia es la comunidad autónoma con mayor número tanto de animales de aptitud lechera como de explotaciones de esta orientación, muy por delante del resto de Comunidades Autónomas (figura 14). De la misma forma, es la Comunidad Autónoma que más aporta a la producción nacional de

leche de vacuno, representando el 37% del total del estado. Este sector es de suma importancia en Galicia, ya que constituye el motor económico y el medio de vida de muchas familias gallegas.

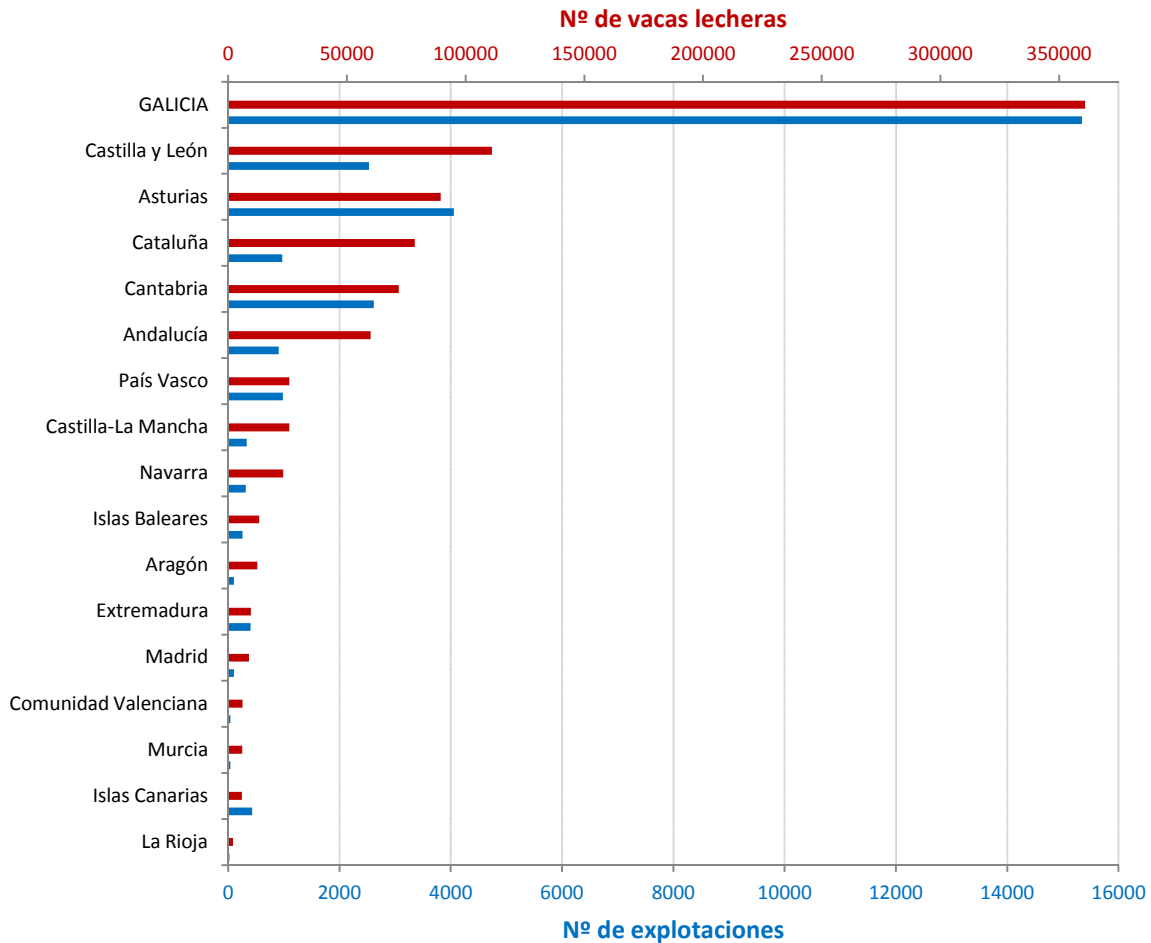


Figura 14. Censo de vacuno lechero (rojo) y explotaciones de aptitud láctea (azul) según cada Comunidad Autónoma (Instituto Nacional de Estadística, 2009).

En la figura 15 pueden verse el número de animales y explotaciones según cada provincia. Entre ellas, La Coruña y Lugo son las que poseen mayor número tanto de animales como de explotaciones, siendo Lugo la de mayor número medio de animales por explotación (27,7 vacas/explotación). El mapa de la figura 16 muestra también como se reparte el número de cabezas de vacuno lechero según cada ayuntamiento de nuestra Comunidad Autónoma.

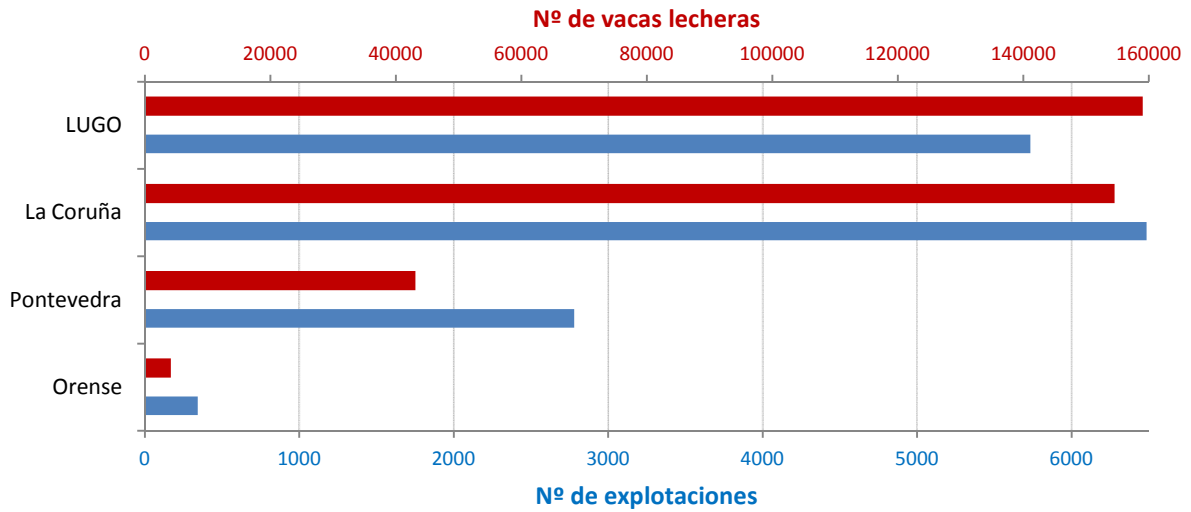


Figura 15. Censo de vacuno lechero (rojo) y explotaciones de aptitud láctea (azul) según cada provincia de Galicia (Instituto Nacional de Estadística, 2009).

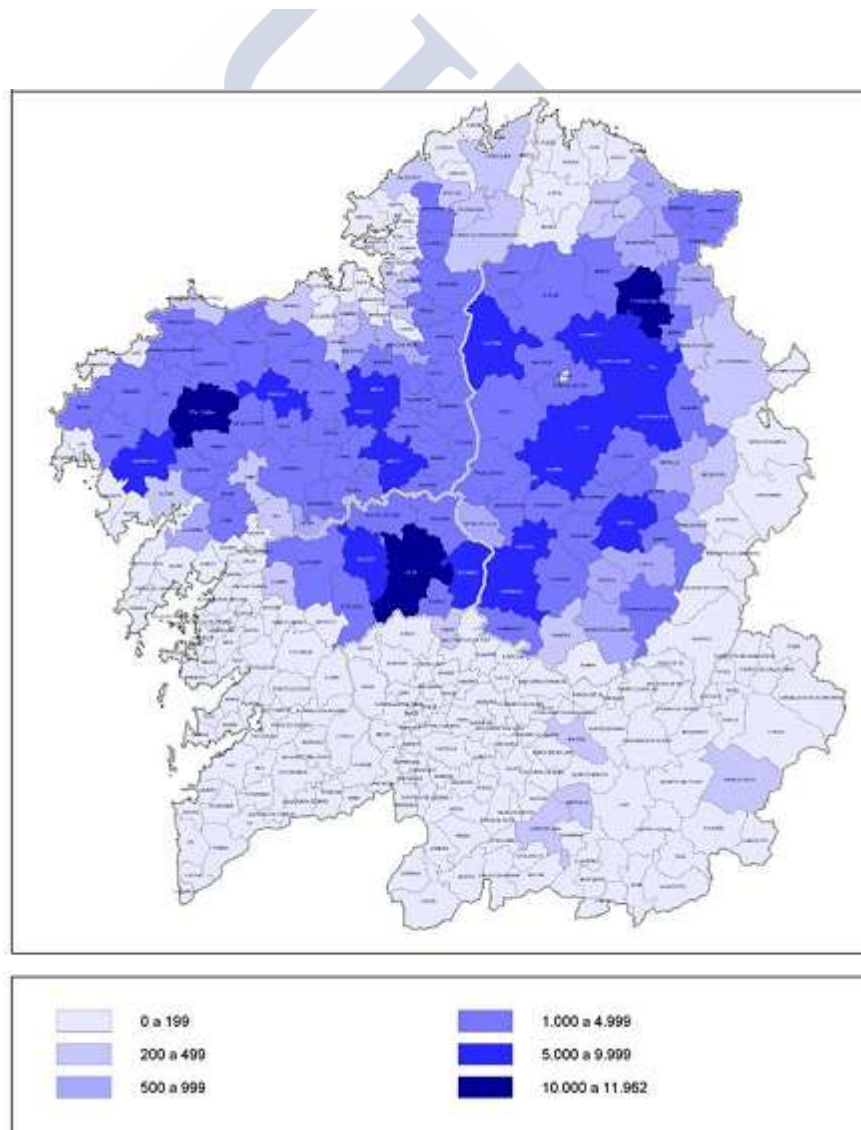


Figura 16. Mapa de distribución del ganado vacuno lechero en Galicia (Consellería de Medio Rural e do Mar, 2012).

En la figura 17 se muestra la distribución del número de explotaciones según el tamaño de las mismas. Como se puede ver, alrededor de un 40% de los rebaños gallegos son de pequeño tamaño. Estos rebaños se corresponden casi en su totalidad con granjas familiares con escasa profesionalización, y en su mayoría se trata de explotaciones sin recambio generacional que paulatinamente van reduciendo su actividad por falta de mano de obra y envejecimiento de los titulares. Sin embargo, en el lado opuesto de la balanza, el número de explotaciones de mediano y gran tamaño (más de 50 cabezas) va aumentando año tras año, debido fundamentalmente a una mayor profesionalización de los ganaderos y a la constitución de sociedades de producción. En concordancia con esto, puede verse en la figura 18 como se ha ido produciendo una disminución en el número de cabezas de vacuno y número de explotaciones, mientras que al mismo tiempo se ha producido un aumento del tamaño medio de explotación.

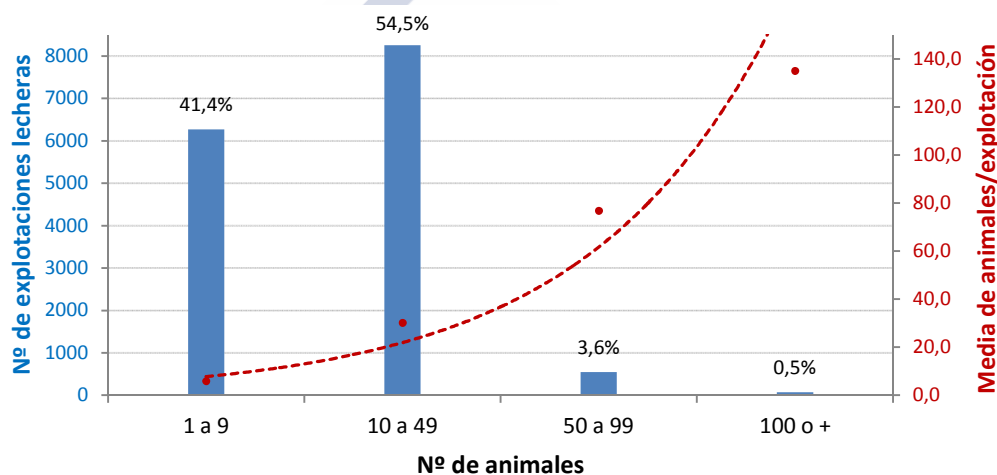


Figura 17. Estructura productiva del sector de ganado lechero en Galicia según tamaño de explotación (Instituto Nacional de Estadística, 2009).

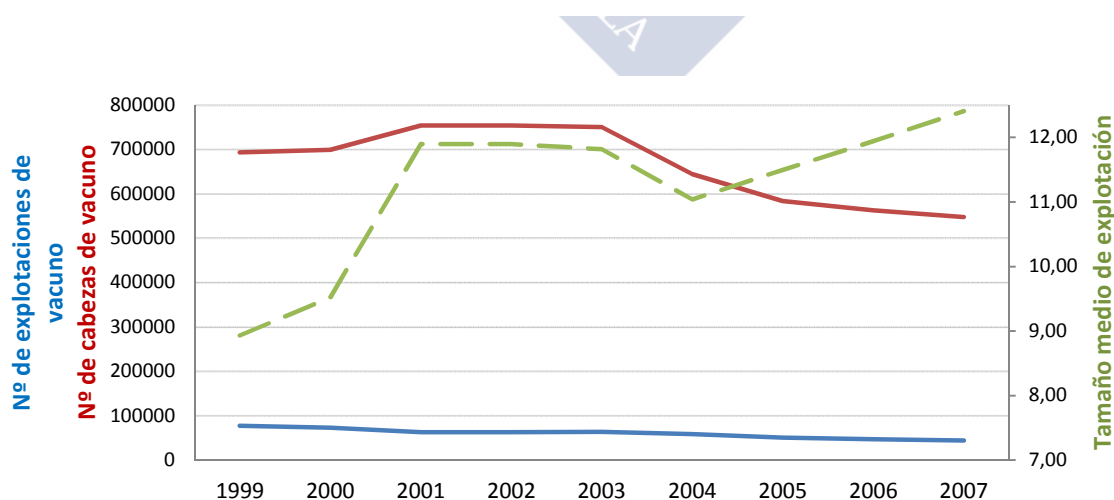


Figura 18. Evolución temporal del nº de explotaciones, cabezas de vacuno y tamaño medio de explotación en Galicia entre 1999 y 2007 (Consellería do Medio Rural e do Mar, 2012).



## III.2. ASPECTOS GENERALES DEL ESTUDIO

### III.2.1. EXPLOTACIONES INCLUIDAS EN EL ESTUDIO

Los estudios 1 y 2 se realizaron entre los años 2009 y 2011, con un total de 36 explotaciones intensivas de vacuno lechero pertenecientes todas ellas a la Sociedad Cooperativa Ganadera AGRIS, la cual agrupa aproximadamente alrededor de 700 socios en diferentes ayuntamientos de la provincia de Lugo (Friol, Lugo, Palas de Rei, Guntín, Páramo, O Corgo, Sarria, Begonte y Outeiro de Rei). La selección de estos rebaños no fue, por lo tanto, aleatoria, aunque las ganaderías incluidas finalmente se repartieron entre tres de los ayuntamientos con mayor número de vacas lecheras: Lugo, Guntín y Friol (figura 19). Cabe mencionar que en junio de 2010 el número de explotaciones descendió a 35 a causa de la baja voluntaria de una de las ganaderías por cese de actividad. De manera análoga, en diciembre de 2011 una de las explotaciones seleccionadas para el estudio 2 también causó baja en el estudio por el mismo motivo.

El estudio 3 se realizó entre 2011 y 2012 con un total de 15 explotaciones, siete de las cuales ya habían sido incluidas en el estudio 1, y ocho nuevas explotaciones pertenecientes a tres Agrupaciones de Defensa Sanitaria Ganadera (ADSG): ADSG Vacasán (ayuntamientos de Chantada, Carballedo y Taboada; cinco explotaciones), ADSG Gandeiros do Corgo (ayuntamiento de O Corgo; dos explotaciones) y ADSG Terras da Ulloa (ayuntamiento de Portomarín, una explotación) (figura 19).

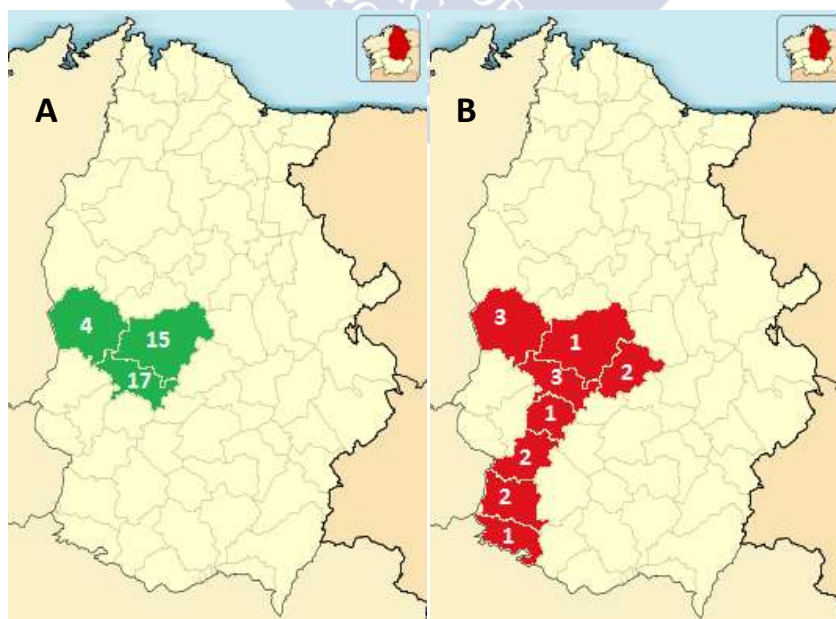


Figura 19. Localización geográfica de las explotaciones incluidas en los estudios 1 y 2 (A) y en el estudio 3 (B).

El tamaño de las ganaderías participantes osciló entre 26 y 240 animales adultos mayores de 2 años, con una media de 56,3 animales/explotación. Todas estas explotaciones son de aptitud láctea y están compuestas por ganado de raza Frisón en el 100% de los casos. La reposición de animales se realiza mediante recría y/o compra de animales, con un 20% de explotaciones cerradas que únicamente realizan reposición a través de recría propia. En lo que a aspectos sanitarios se refiere, todas las ganaderías eran explotaciones calificadas oficialmente como indemnes de tuberculosis y brucelosis en los últimos cinco años. En lo tocante a la paratuberculosis, cabe destacar que ninguna de las 36 explotaciones incluidas en el estudio 1 pertenecían a Agrupaciones de Defensa Sanitaria Ganadera ni tampoco habían realizado nunca ningún tipo de prueba diagnóstica para determinar la presencia de esta enfermedad en sus rebaños por lo que no fueron seleccionadas previamente por su estado sanitario en relación a la paratuberculosis bovina. Sin embargo, las ocho nuevas explotaciones incluidas en el estudio 3 sí pertenecían a diferentes AD SG y realizaban el programa autonómico de control para esta enfermedad establecido por la Xunta de Galicia. Estas ocho explotaciones eran granjas infectadas confirmadas mediante cultivo fecal, y fueron incluidas en el estudio como fuente de animales positivos.

### III.2.2. CRONOLOGÍA Y METODOLOGÍA DEL ESTUDIO

El estudio 1 se realizó durante el año 2009, para el que se tomaron muestras de sangre y heces de todos los animales mayores de dos años presentes en las 36 explotaciones con un total de 1962 animales muestreados. Las muestras de sangre se emplearon para la realización de dos tests ELISA indirecto comerciales, mientras que las muestras de heces se emplearon para la composición de *pools* de diez animales agrupados en lotes de edad y su posterior análisis mediante cultivo fecal.

El estudio 2 se realizó entre 2009 y 2011. Para este trabajo se tomaron una vez al año muestras de heces de todos los animales mayores de dos años presentes en las 35 explotaciones que completaron el estudio. De manera similar al estudio 1, las muestras fecales se emplearon para la composición de *pools* de diez animales agrupados en lotes de edad que se analizaron a continuación mediante cultivo fecal. Además, se seleccionaron cinco explotaciones de las 35 incluidas en base a los resultados del estudio 1, esto es, cinco rebaños que hubiesen sido negativos al cultivo fecal pero a su vez hubiesen presentado las mayores seroprevalencias. En estas cinco explotaciones, además de los muestreos anuales ya mencionados, se recogieron muestras fecales de todos los animales mayores de 2 años de edad a los seis meses del segundo y tercer muestreo anual, con el fin de analizarlas mediante cultivo fecal individual así como mediante cultivo fecal de *pools* de diez animales. En la

figura 20 puede verse un diagrama que recoge la cronología de la toma de muestras del estudio 2, el número de muestras recogidas y la finalidad para la que se emplearon.

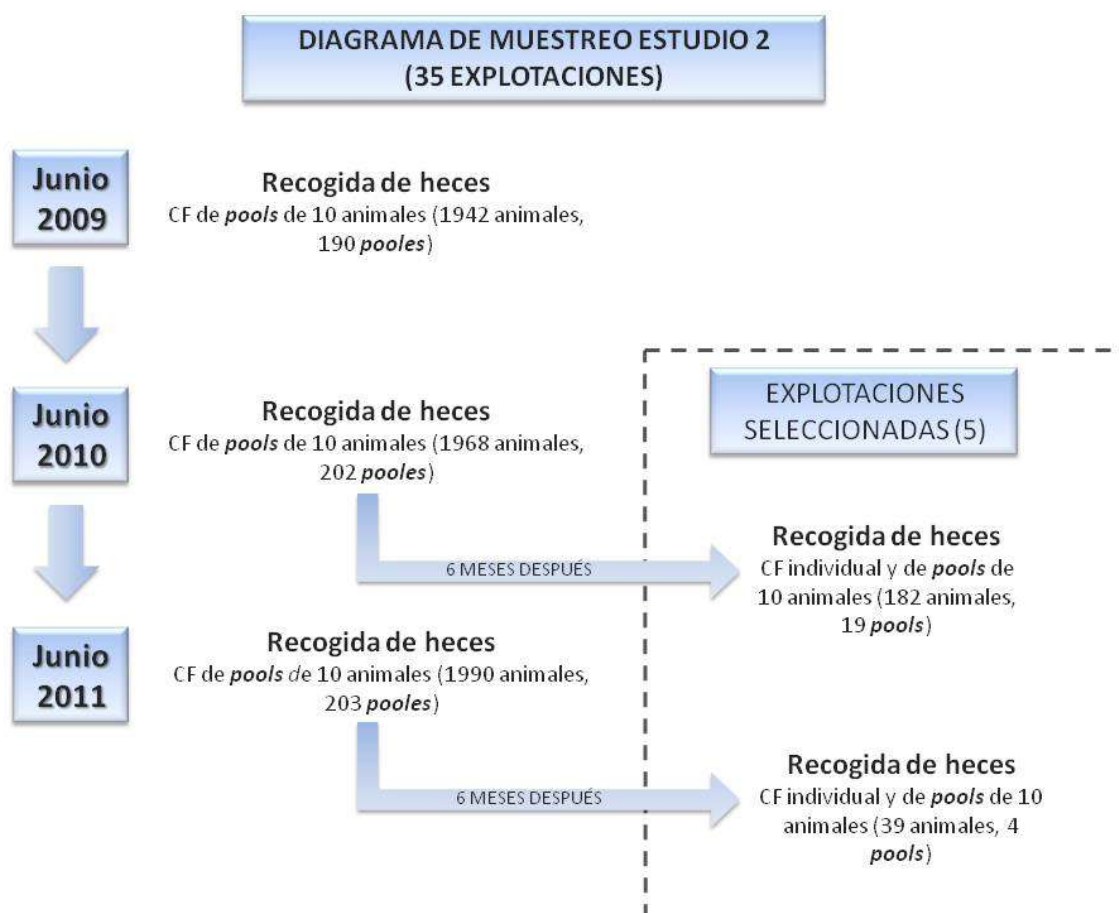


Figura 20. Cronología del estudio 2 (CF = Cultivo fecal).

La toma de muestras para el estudio 3 se realizó entre diciembre de 2011 y febrero de 2012. Para este trabajo se recogieron muestras de heces de 91 animales pertenecientes a 15 explotaciones, todos ellos mayores de 2 años de edad, con el fin de realizar cultivo fecal y qPCR directa sobre cada una de las muestras fecales y comparar entre sí los resultados de ambas pruebas diagnósticas. El tamaño de muestra se calculó considerando unos valores de sensibilidad y especificidad esperados en relación al cultivo fecal de 95% y 99%, y una precisión absoluta máxima de 9% y 2,5% respectivamente (EPIDAT 3.1, Dirección Xeral de Saúde Pública, Xunta de Galicia, España). Del total de 91 animales seleccionados para el estudio, 67 procedieron de dos rebaños incluidos en el estudio 2 que habían presentado resultados negativos en todos los muestreos anteriores (todos los animales mayores de 2 años presentes en las explotaciones). Los 24 animales restantes procedían de los otros

13 rebaños, habiéndose seleccionado aquellos animales del rebaño mayores de 2 años que hubiesen presentado un cultivo fecal positivo con anterioridad.

### III.2.3. TOMA DE MUESTRAS

#### III.2.3.1. Muestras de sangre

Las muestras de sangre se obtuvieron mediante extracción por vacío en la vena coccígea, empleando tubos BD Vacutainer® de 10 ml sin anticoagulante y previamente numerados (Becton Dickinson®, Nueva Jersey, Estados Unidos) (figura 21), manteniéndose en refrigeración desde su extracción hasta la llegada al laboratorio. Una vez allí los tubos se destaparon para favorecer la retracción del coágulo, y se mantuvieron también en refrigeración hasta su desuerado, siempre dentro de las 24 h siguientes a su recogida. Antes de proceder a la obtención del suero, los tubos se centrifugaron a  $2500 \times g$  durante 10 min en una centrífuga Mixtasel (JP SELECTA®, Barcelona, España). A continuación, se procedió al desuerado mediante el empleo de pipetas Pasteur, recogiendo el suero en una placa de microtitulación no antigenada que se empleó como placa madre (figura 22). Una vez obtenidas las placas madre, éstas fueron congeladas a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su posterior análisis.



Figura 21. Extracción de sangre mediante vacío.

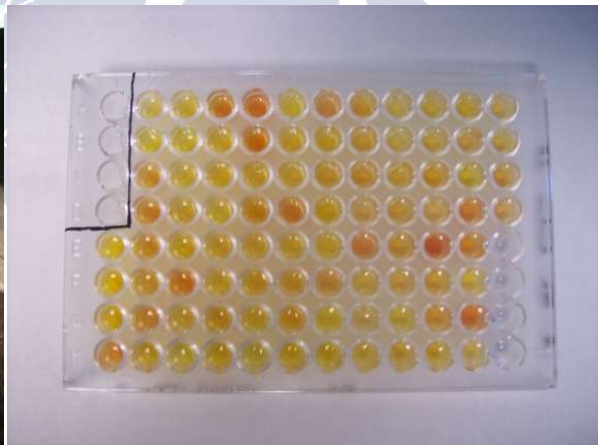


Figura 22. Placa madre.

#### III.2.3.2. Muestras de heces

Las muestras de heces (5-10 g) se recogieron directamente del recto de cada animal utilizando guantes de plástico desechables y sin ningún tipo de lubricante. Una vez recogida la muestra, el

guante se revertió de modo que la muestra quedara en el interior del mismo, y se cerraba con un nudo para evitar la salida de material fecal. Para identificar los guantes, se emplearon etiquetas adhesivas previamente numeradas. Todas las muestras fueron procesadas el mismo día de su recolección.

#### III.2.4. RECOGIDA DE DATOS

El mismo día de la toma de las muestras se recogieron diferentes datos de cada animal incluido en el estudio. Esta información fue obtenida a partir de la propia Documentación Oficial de los animales, generando un listado en el que se relacionaba cada res con sus muestras correspondientes. Los datos recogidos para cada animal fueron los siguientes:

- Nº de identificación oficial (crotal)
- Fecha de nacimiento
- Sexo
- Procedencia (nacido en explotación/adquirido)

De manera similar, en cada explotación incluida en el estudio se procedió a realizar una breve encuesta epidemiológica que constaba, entre otros, de los siguientes apartados:

- Datos generales de la explotación: datos del titular, código de explotación agraria, localización, censo, proximidad de otras explotaciones y presencia/ausencia de otros rumiantes en la granja.
- Incorporación de animales en los últimos cinco años: se recogió la información referente a todas las incorporaciones realizadas en los 5 años anteriores al estudio, especificando el año, el origen y el número de animales incorporados, así como las medidas de cuarentena aplicadas.
  - Uso compartido de carro mezclador.
  - Manejo general: régimen de estabulación (recría, novillas, vacas secas y animales en producción), alimentación de la recría, manejo de pastos y purines.

#### III.2.5. COMUNICACIÓN DE RESULTADOS

Una vez obtenidos los resultados de las pruebas diagnósticas realizadas tras cada muestreo, se elaboró un informe de resultados que se entregó en cada explotación junto con un documento que

recogía medidas generales de manejo y bioseguridad frente a la paratuberculosis (ANEXO I), aprovechando también el mismo momento de la comunicación de resultados para asesorar a cada propietario individualmente sobre su caso particular. En términos generales, los ganaderos fueron advertidos de no eliminar ningún animal en base a resultados salvo que éstos comenzasen a desarrollar sintomatología clínica, y se les instó a implantar medidas sobre el manejo de la cría y su alimentación, protocolo de partos y manejo de purines. También se les recomendó evitar en la medida de lo posible la adquisición de animales procedentes de otras explotaciones, y especialmente si se desconocía el estado sanitario de las mismas en relación a la enfermedad.



### III.3. PRUEBAS DIAGNÓSTICAS UTILIZADAS

#### III.3.1. ELISA INDIRECTO

Las muestras de suero correspondientes a los 1962 animales muestreados en 2009 (estudio 1) se analizaron mediante dos kits comerciales de formato ELISA indirecto:

- ELISA A: ID Screen® Paratuberculosis Indirect ELISA kit-screening, ID Vet®, Montpellier, Francia.
- ELISA B: Pourquoi® ELISA Paratuberculosis Screening/Paratub. Serum-S, Institut Pourquoi®, Montpellier, Francia.

En cuanto a los antígenos utilizados por cada kit, en ambos casos se trata de antígenos protoplasmáticos purificados (PPA), aunque ninguno de los dos fabricantes especifican su composición ni modo de preparación, refiriéndose al antígeno empleado en el caso del test de ID Vet® (ELISA A) como “extracto celular de *Mycobacterium paratuberculosis*” y “extracto protoplasmático de *Mycobacterium paratuberculosis*” en el caso del ELISA de Pourquoi® (ELISA B). Ambos tests incluyen un paso previo de predilución, cuyo objetivo es neutralizar la posible presencia en la muestra de anticuerpos contra *Mycobacterium phlei*, una micobacteria ambiental no patógena (Yokomizo *et al.*, 1985).

La lectura de ambos test ELISA se realizó en un espectrofotómetro de microplacas Multiskan Ascent, de Thermo Scientific® (Massachusetts, Estados Unidos). El protocolo e interpretación de cada uno de ellos se detalla a continuación:

#### A. ID Screen® Paratuberculosis Indirect ELISA kit-screening

**1. Preparación de los reactivos:** permitir que todos los reactivos alcancen temperatura ambiente (21°C +/- 5°C) una hora antes de ser utilizados, con excepción de la solución de sustrato o de revelado. Homogenizar los reactivos por inversión o mediante el empleo de un agitador.

- Solución de lavado (1x): dilución al 1:20 del concentrado de lavado (20x) en agua destilada/desionizada.
- Solución de conjugado (1x): dilución al 1:10 del conjugado concentrado (10x) con el diluyente 3.

**2. Pre-dilución:** en una placa de microtitulación no antigenada, diluir los controles y las muestras al 1:12 con el diluyente 6 suministrado con el kit. Distribuir de la siguiente manera:

- 10 µl del control negativo en los pocillos A1 y B1.
- 10 µl del control positivo en los pocillos C1 y D1.
- 10 µl de cada suero de la placa madre en los pocillos restantes.
- 110 µl de diluyente 6 en todos los pocillos.

Una vez preparada la placa, cubrir con adhesivo e incubar durante 40 min a 21°C (+/- 5°C).

**3. Incubación de las muestras neutralizadas:** transferir 100 µl de los controles y los sueros neutralizados en el paso anterior a la placa ELISA sensibilizada con el antígeno y suministrada con el kit. Tras este paso, cubrir de nuevo la placa con adhesivo e incubar durante 45 min +/- 4 min a 21°C (+/- 5°C).

**4. Primer lavado:**

- Vaciar el contenido de las placas.
- Dispensar aproximadamente 300 µl de solución de lavado (1x) a cada pocillo y vaciar de nuevo.
- Repetir el paso anterior dos veces más (hasta tres).
- En el último lavado, golpear la placa sobre un papel secante para vaciar bien los pocillos.

**5. Incubación del conjugado:** dispensar 100 µl de la solución de conjugado (1x) a cada pocillo. Cubrir la placa con adhesivo e incubar durante 30 min +/- 3 min a 21°C (+/- 5°C).

**6. Segundo lavado** (realizar del mismo modo que el primer lavado).

**7. Incubación del sustrato:** añadir 100 µl de la solución de revelado (solución de sustrato). Es importante preservar esta solución de la luz hasta el momento de su utilización. Cubrir la placa con adhesivo e incubar en oscuridad durante 15 min +/- 2 min a 21°C (+/- 5°C).

**8. Lectura:**

- Calibrar el espectrofotómetro en blanco.
- Proceder a la lectura de la densidad óptica (D.O.) de los pocillos a 450nm.

**9. Validación:** el ensayo queda validado si se cumple que:



- La densidad óptica media del control positivo ( $DO_{CP}$ ) es superior a 0,35.

$$DO_{CP} > 0,35$$

- El ratio de las densidades ópticas medias de los controles positivos y negativos ( $DO_{CP}$  y  $DO_{CN}$ ) es superior a 3.

$$DO_{CP}/DO_{CN} > 3$$

**10. Interpretación:** calcular el porcentaje S/P (S/P = sample/positive) para cada muestra aplicando la fórmula siguiente, e interpretar el valor resultante según la tabla 21:

$$S/P = ((DO_{muestra} - DO_{CN}) / (DO_{CP} - DO_{CN})) \times 100$$

Tabla 21. Interpretación de los resultados del test ELISA de IDVet®.

RESULTADOS	INTERPRETACIÓN
$S/P \leq 60\%$	Negativo
$60\% < S/P < 70\%$	Dudoso
$S/P \geq 70\%$	Positivo

## B. Pourquoi® ELISA Paratuberculosis Screening/Paratub. Serum-S

**1. Preparación de los reactivos:** permitir que todos los reactivos alcancen temperatura ambiente (18-26°C) antes de su empleo. Homogenizar los reactivos por inversión o mediante el empleo de un agitador.

- Solución de lavado (1x): dilución al 1:20 de la Solución de Lavado Concentrada (20x) en agua destilada.
- Solución de conjugado (1x): dilución al 1:100 del Conjugado anti-rumiante peroxidasa HRPO concentrado con la Solución Tampón de Dilución 1 (incubación corta).

**2. Pre-dilución:** en una placa de microtitulación no antigenada diluir las muestras y los controles al 1:20 con la Solución Tampón de Dilución 12 suministrado con el kit. Distribuir de la siguiente manera:

- 10 µl del control negativo en los pocillos A1 y B1.
- 10 µl del control positivo en los pocillos C1 y D1.
- 10 µl de cada suero de la placa madre en los pocillos restantes.
- 190 µl de Solución Tampón de Dilución 12 en todos los pocillos.

Una vez preparada la placa, cubrir con adhesivo e incubar entre 15 min y 2 h a temperatura ambiente (18-26°C) (tiempo de incubación utilizado en este estudio: 1 h).

**3. Incubación de las muestras neutralizadas:** dispensar 100 µl de los controles y los sueros neutralizados en el paso anterior a la placa ELISA tapizada con el antígeno. Tras este paso, cubrir de nuevo la placa con adhesivo e incubar durante 45 min +/- 5 min a temperatura ambiente (18-26°C).

**4. Primer lavado:**

- Vaciar el contenido de las placas.
- Dispensar 300 µl de solución de lavado (1x) a cada pocillo y vaciar de nuevo.
- Repetir el paso anterior dos veces más (hasta tres).
- En el último lavado, golpear la placa sobre un papel secante para vaciar bien los pocillos.

**5. Incubación del conjugado:** dispensar 100 µl del Conjugado anti-rumiante peroxidasa HRPO diluido a cada pocillo. Cubrir la placa con adhesivo e incubar durante 30 min +/- 3 min a temperatura ambiente (18-26°C).

**6. Segundo lavado** (realizar del mismo modo que el primer lavado).

**7. Incubación del sustrato:** dispensar 100 µl de Sustrato TMB 9. Cubrir la placa con adhesivo e incubar durante 10 min +/- 3 min a temperatura ambiente (18-26°C) protegiéndola de la luz.

**8. Lectura:**

- Calibrar el espectrofotómetro en blanco al aire.
- Proceder a la lectura de la densidad óptica (D.O.) de los pocillos a 450nm.

**9. Validación:** el ensayo queda validado si se cumple que:

- La densidad óptica media del control positivo ( $DO_{CP}$ ) es superior a 0,35.

$$DO_{CP} > 0,35$$

- El ratio de las densidades ópticas medias de los controles positivos y negativos ( $DO_{CP}$  y  $DO_{CN}$ ) es superior a 3.

$$DO_{CP}/DO_{CN} > 3$$

**10. Interpretación:** calcular el porcentaje S/P para cada muestra aplicando la fórmula siguiente, e interpretar el valor obtenido según la tabla 22:

$$\% S/P = ((DO_{\text{muestra}} - DO_{\text{CN}})/(DO_{\text{CP}} - DO_{\text{CN}})) \times 100$$

Tabla 22. Interpretación de los resultados del test ELISA de Pourquier®.

RESULTADOS	INTERPRETACIÓN
$S/P \leq 45\%$	Negativo
$45\% < S/P < 55\%$	Dudoso
$S/P \geq 55\%$	Positivo

### III.3.2. COMPOSICIÓN DE LOS *POOLS* FECALES

Para la composición de los *pools* fecales y ya en el laboratorio, las muestras se ordenaron en grupos de 10 atendiendo a la edad de los animales, es decir, en el primer *pool* de cada explotación se encontraban los 10 animales de mayor edad, en el segundo los 10 siguientes y así sucesivamente (figura 23). Se tomaron 2 g de heces de cada muestra utilizando una espátula desechable de madera, y se depositaron en una placa Petri. Posteriormente se realizó un mezclado a fondo de las muestras, hasta conseguir un aspecto homogéneo (figura 24), y 2 g de este *pool* se transfirieron a un tubo Falcon estéril. En explotaciones en las cuales no era posible conseguir un número exacto de *pools*, se optó por realizar el descarte de las muestras de animales más jóvenes hasta un máximo igual al 10% del censo de la granja (p. ej. en una explotación de 43 animales se realizaron 4 *pools* de 10 y se descartaron las 3 muestras de los animales más jóvenes. Sin embargo, si el censo era de 48 animales, se realizaron 4 *pools* de 10 animales y 1 *pool* de 8).

Figura 23. Grupos de 10 muestras fecales para la composición de *pools* fecales.Figura 24. *Pool* fecal de 10 muestras después de la homogenización.

El esquema de trabajo que siguió a partir de la composición de los *pools* fecales se muestra en la figura 25:



Figura 25. Procedimiento de análisis empleado para los *pools* fecales.

### III.3.3. CULTIVO FECAL

La técnica de cultivo fecal se empleó tanto para el análisis de los *pools* fecales de cada año (estudio 1 y 2) como para las muestras individuales analizadas en los estudios 2 y 3. El método empleado para su realización fue el procedimiento descrito por el National Animal Disease Center de Estados Unidos (Stabel, 1997). Dicho protocolo de aislamiento se describe a continuación:

1. Suspender 2 g de *pool* o muestra individual recogidos en un tubo Falcon de 50 ml en 35 ml de agua destilada estéril.
2. Agitar los tubos en posición horizontal durante 30 min, y posteriormente dejar reposar en posición vertical también durante 30 min.
3. Transferir el sobrenadante de cada tubo (25 ml) a otro tubo Falcon estéril y centrifugar a 1700 x g durante 20 min.
4. Eliminar el sobrenadante y resuspender el pellet resultante en 30 ml de una solución al 0,9% de cloruro de hexadecilpiridinio (HPC, Hexadecylpyridinium Chloride Monohydrate, minimum 99%, de Sigma-Aldrich®, Missouri, Estados Unidos) preparada sobre un caldo infusión de

cerebro corazón al 1,9% (BHI, Brain Heart Infusion, de Becton Dickinson®, Nueva Jersey, Estados Unidos). Una vez añadida la solución de HPC-BHI, incubar los tubos en estufa a 37°C durante 16-24 h.

5. Después de la incubación de las muestras, centrifugar de nuevo a 1700 x *g* durante 20 min, eliminar el sobrenadante y resuspender el pellet en 1 ml de una solución antibiótica que contiene 100 µg/ml de ácido nalidíxico (Nalidixic acid ≥ 98%, de Sigma-Aldrich®, Missouri, Estados Unidos), 100 µg/ml de vancomicina (Vancomycin hydrochloride from *Streptomyces orientalis* ≥ 80%, de Sigma-Aldrich®, Missouri, Estados Unidos) y 50 µg/ml de anfotericina B (Amphotericin B from *Streptomyces* sp. ≈ 80%, de Sigma-Aldrich®, Missouri, Estados Unidos). A continuación, incubar los tubos de nuevo a 37°C durante 16-24 h.
6. A partir de la suspensión resultante, inocular tres tubos de medio sólido Herrold's con micobactina J (HEYM, BBL™ Herrold's Egg Yolk Agar with Mycobactin J and ANV, de Becton Dickinson®, Nueva Jersey, Estados Unidos) y un tubo de medio sólido Herrold's sin micobactina J (HEYM, BBL™ Herrold's Egg Yolk Agar without Mycobactin J with ANV, de Becton Dickinson®, Nueva Jersey, Estados Unidos) con 200 µl/tubo.
7. Trasladar los tubos a una estufa a 37°C, donde deben permanecer en posición inclinada y con los tapones de rosca aflojados aproximadamente una semana para favorecer la evaporación de la humedad de la superficie. Una vez pasado este tiempo, cerrar bien los tapones de rosca y continuar con la incubación en posición vertical. Los tubos deben permanecer en la estufa hasta las 16 semanas, examinándose en busca de crecimiento una vez cada semana.

La lectura de los crecimientos observados se llevó a cabo utilizando una tabla diseñada a tal efecto. En aquellos casos en los que hubo algún crecimiento compatible con *Map*, esto es, presencia de crecimiento en tubos HEYM con micobactina J (colonias pequeñas ≈ 1 mm, de color blanco-amarillento, con márgenes redondeados y superficie lisa y brillante) (figura 26) y ausencia de crecimiento en tubos HEYM sin micobactina J, se procedió a realizar una tinción específica para microorganismos ácido-alcohol resistentes (tinción de Ziehl-Neelsen). Los aislamientos que presentaron las características morfológicas descritas y que resultaron positivas a la tinción de Ziehl-Neelsen se consideraron compatibles con *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, y se procedió a su confirmación mediante una técnica de PCR a tiempo real.

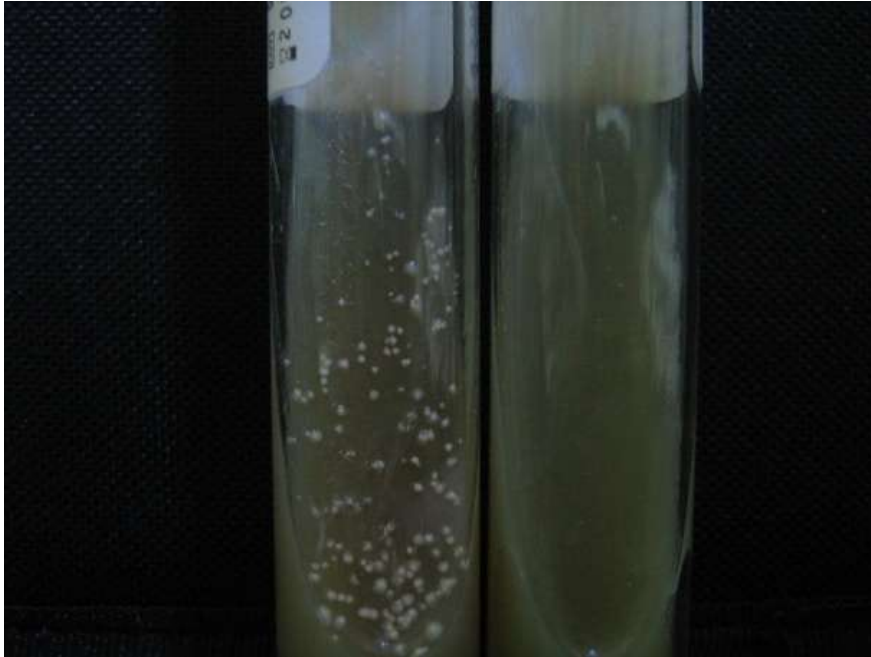


Figura 26. Izquierda: tubo de medio Herrold's con colonias compatibles con *Mycobacterium* spp. Derecha: tubo de medio Herrold's negativo.

### III.3.4. TINCIÓN DE ZIEHL-NEELSEN

La tinción de Ziehl-Neelsen se realizó sobre los crecimientos compatibles obtenidos en el cultivo fecal, y se realizó con un kit comercial diseñado para su empleo en frío (Ziehl-Neelsen FITE®, de Bio-Optica®, Milán, Italia). El protocolo se describe a continuación:

1. Colocar una gota de agua destilada estéril en el portaobjetos.
2. Con un asa de siembra de 10  $\mu$ l, retirar una o dos colonias del medio de cultivo.
3. Extender la colonia sobre la gota colocada en el portaobjetos.
4. Dejar secar al aire y flamear el portaobjetos.
5. Depositar sobre el portaobjetos 10 gotas de solución de ácido periódico: dejar actuar 10 min.
6. Lavar en agua destilada.
7. Depositar sobre el portaobjetos 10 gotas de solución de carbolfuschina: dejar actuar 30 min.
8. Lavar en agua destilada y secar con papel de filtro.
9. Depositar sobre el portaobjetos 10 gotas de solución de alcohol-ácido: dejar actuar 1 min.

10. Lavar 3 min en agua.
11. Depositar sobre el portaobjetos 10 gotas de solución de azul de metileno: dejar actuar 1 min.
12. Lavar en agua destilada.
13. No secar directamente, dejar que seque al aire. Aclarar en xileno.
14. Montar en el microscopio óptico con objetivo de 100x y con aceite de inmersión.

En el caso de que la tinción resulte positiva, las micobacterias se evidencian como pequeños bacilos teñidos de color rojo (figura 27).

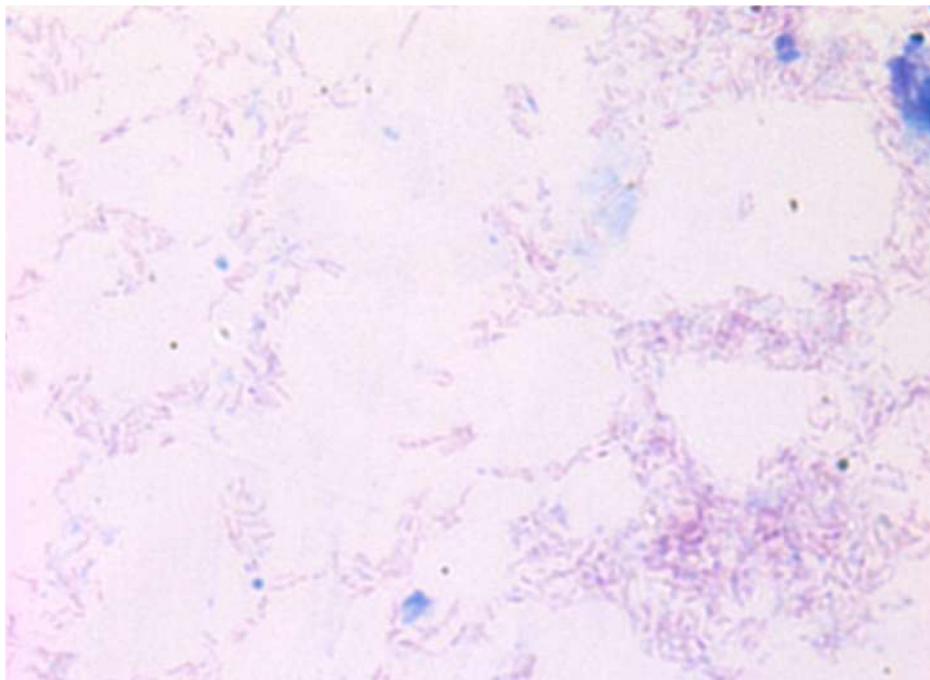


Figura 27. Tinción de Ziehl-Neelsen realizada sobre cultivo puro.

### III.3.5. PCR A TIEMPO REAL

Las técnicas de diagnóstico molecular basadas en la reacción en cadena de la polimerasa se dividen en dos procesos: extracción del ADN problema y PCR propiamente dicha. En este trabajo, la técnica de PCR a tiempo real se empleó tanto para la confirmación última de los aislamientos obtenidos en los cultivos fecales como para el diagnóstico directo a partir de muestras fecales.

#### III.3.5.1. Extracción de ADN

Para la realización de este estudio se emplearon dos procedimientos de extracción diferentes en función de la naturaleza de la muestra (cultivos puros o muestras fecales):

## A. EXTRACCIÓN DE ADN A PARTIR DE CULTIVOS FECALES

Para este procedimiento se empleó el kit de extracción QIAamp® DNA MiniKit (Qiagen®, Hilden, Alemania). Además de los productos suministrados por el kit, también fue necesario preparar los siguientes reactivos:

- Reactivo TE: 19,6 ml de agua bidestilada estéril + 0,4 ml de Tris-EDTA Buffer (Sigma-Aldrich®, Missouri, Estados Unidos).
- Reactivo TET: 20 ml de reactivo TE + 0,2 ml de Triton® X-100 (Sigma-Aldrich®, Missouri, Estados Unidos).
- Preparado de lisozima (100 mg/ml): 20 ml de reactivo TE + 2 g de Lysozyme chicken egg White ≥ 90% (Sigma-Aldrich®, Missouri, Estados Unidos).

### **Protocolo de la técnica:**

1. Preparar y rotular los tubos eppendorf necesarios según el nº de muestras, y uno más que se empleará como Blanco de Extracción (BE).
2. Abrir todos los tubos y dispensar en cada uno 180 µl de reactivo TET y 36 µl de preparado de lisozima.
3. Añadir con un asa de siembra una porción de colonias sospechosas. En el caso del tubo BE, añadir 36 µl de agua destilada estéril.
4. Trasladar las muestras al termobloque con agitación (37°C, 1100 rpm, mínimo 30 min).
5. Sacar los tubos del termobloque y darles un pulso de centrifuga para que cualquier posible gota que haya quedado en el tapón baje hacia el fondo.
6. Añadir a cada tubo 20 µl de Proteinasa K y 200 µl de buffer AL.
7. Trasladar las muestras al termobloque con agitación (56°C, 1100 rpm, mínimo 30 min).
8. Dar a los tubos un pulso de centrifuga.
9. Trasladar los tubos al termobloque sin agitación (95°C, 15 min).
10. Dar a los tubos un pulso de centrifuga.
11. Añadir a cada tubo 200 µl de etanol 96% y vortear durante 15 segundos.
12. Dar a los tubos un pulso de centrifuga.
13. Transferir todo el contenido de cada tubo eppendorf con una pipeta a sendas columnas colocadas sobre tubos de recogida.
14. Centrifugar a 8000 rpm durante un min.
15. Desechar cada tubo de recogida y colocar cada columna sobre nuevos tubos.
16. Añadir 500 µl de buffer AW1.



17. Centrifugar a 8000 rpm durante un min.
18. Desechar cada tubo de recogida y colocar cada columna sobre nuevos tubos.
19. Añadir 500 µl de buffer AW2.
20. Centrifugar a 14000 rpm durante 3 min.
21. Vaciar cada tubo de recogida.
22. Centrifugar a 14000 rpm durante 1 min.
23. Desechar los tubos de recogida y colocar cada columna sobre un tubo eppendorf que será el recipiente final.
24. Añadir 200 µl de buffer AE.
25. Centrifugar a 8000 rpm durante 1 min.
26. Mantener el ADN extraído a 4°C si se va a utilizar en las siguientes 24 h. Para conservación a largo plazo mantener el DNA a -20°C.

#### B. EXTRACCIÓN DE ADN A PARTIR DE MUESTRAS FECALES

Para la realización de esta extracción se empleó el kit DNAExtract-VK® (Vacunek®, Derio, España).

##### **Protocolo de la técnica:**

1. Pesar 1 g de heces y disolverlo en 5 ml de agua destilada estéril. Vortear durante al menos 15 s.
2. Incubar a temperatura ambiente durante 15 min.
3. Tomar 500 µl del sobrenadante y centrifugar a 11000 x g durante 5 min.
4. Desechar el sobrenadante y resuspender el pellet en 250 µl de agua destilada estéril.
5. Añadir 250 µl de Sample Lysis Buffer VK-SB.
6. Transferir la mezcla anterior a un tubo al que previamente se le han añadido 300 mg de Extraction Beads-VK.
7. Homogenizar la muestra mediante un equipo de disrupción celular durante 10 min a 30 Hz.
8. Centrifugar a 7000 x g durante 5 min.
9. En un nuevo tubo de 1,5 ml, tomar 200 µl del sobrenadante y añadir 25 µl de Proteinase K reconstituida. Mezclar mediante vórtex e incubar 15 min a 56°C.
10. Añadir 200 µl de Lysis Buffer VK-LB3. Mezclar mediante vórtex e incubar 10 min a 70°C.
11. Añadir 210 µl de etanol 96-100%. Mezclar vigorosamente mediante vórtex.

12. Por cada muestra, colocar una columna VK-DNA Binding en un tubo colector. Añadir el contenido del tubo del paso anterior a la columna y centrifugar a 11000 x *g* durante 1 min. Eliminar el filtrado y colocar de nuevo la columna en el tubo colector.
13. Añadir 500 µl de Wash Buffer VK-WB1 a la columna. Centrifugar a 11000 x *g* durante 1 min. Eliminar el filtrado y colocar de nuevo la columna en el tubo colector.
14. Añadir 600 µl de Wash Buffer VK-WB2 a la columna. Centrifugar a 11000 x *g* durante 1 min. Eliminar el filtrado y colocar de nuevo la columna en el tubo colector.
15. Centrifugar la columna vacía a 11000 x *g* durante 1 min para el secado de la membrana. Eliminar el tubo colector y colocar la columna sobre un nuevo tubo de 1,5 ml al que previamente se le han añadido 100 µl de Elution Buffer VK-EB.
16. Añadir al centro de la columna 100 µl de Elution Buffer VK-EB precalentado a 70°C. Incubar a temperatura ambiente durante 1 min.
17. Mantener el ADN extraído a 4°C si se va a utilizar en las siguientes 24 h. Para conservación a largo plazo mantener el DNA a -20°C.

### III.3.5.2. PCR a tiempo real

Para la realización de esta técnica se empleó el kit ParaTB Kuantí-VK® (Vacunek®, Derio, España). Este kit posee todos los reactivos y enzimas necesarios para detectar *Map*, amplificando una región del gen F57 de copia única y específica del patógeno. El kit emplea una sonda Taqman® marcada con FAM-BHQ1®, y además cada master mix proporciona un control interno positivo (también denominado IAC) con cebadores y sonda Taqman® marcada con JOE-BHQ1®, permitiendo detectar los posibles problemas de inhibición de la PCR que pudieran producirse.

#### **Protocolo de la técnica:**

1. Preparar el reactivo ME a partir de los reactivos M1 y M2. Homogenizar, alicuotar y mantener en congelación hasta su uso.
2. Dispensar 15 µl de reactivo ME por muestra en cada uno de los pocillos de la placa de PCR.
3. Añadir 10 µl de ADN de cada muestra problema, de los blancos de extracción y del control positivo y negativo de PCR.
4. Trasladar la placa al termociclador a tiempo real (ABI PRISM® 7500 Real-Time PCR System, de Applied Biosystems®, California, Estados Unidos). El programa empleado para el termociclador se describe en la tabla 23:

Tabla 23. Programa de tiempos y temperaturas empleado para la PCR a tiempo real (kit ParaTB-Kuanti de Vacunek®, Derio, España).

TEMPERATURA °C	TIEMPO	Nº CICLOS
95	10 min	1
95	15 s	45
60	60 s	

### Interpretación:

Para cada muestra se obtiene una curva de amplificación que representa el incremento de fluorescencia que se va registrando en cada ciclo de amplificación. Una curva de amplificación típica posee una zona denominada *background* o señal de base, y que se corresponde a la parte de la curva de amplificación no característica observada durante los 10 ó 15 primeros ciclos de amplificación. A continuación, aparece una zona de crecimiento exponencial de la fluorescencia y finalmente una zona estacionaria.

Para cada curva, el ciclo en el que el lector empieza a detectar un incremento de fluorescencia significativo con respecto a la señal de base se denomina ciclo umbral (Ct), y es inversamente proporcional a la concentración inicial de ADN diana presente en la muestra (figura 28).

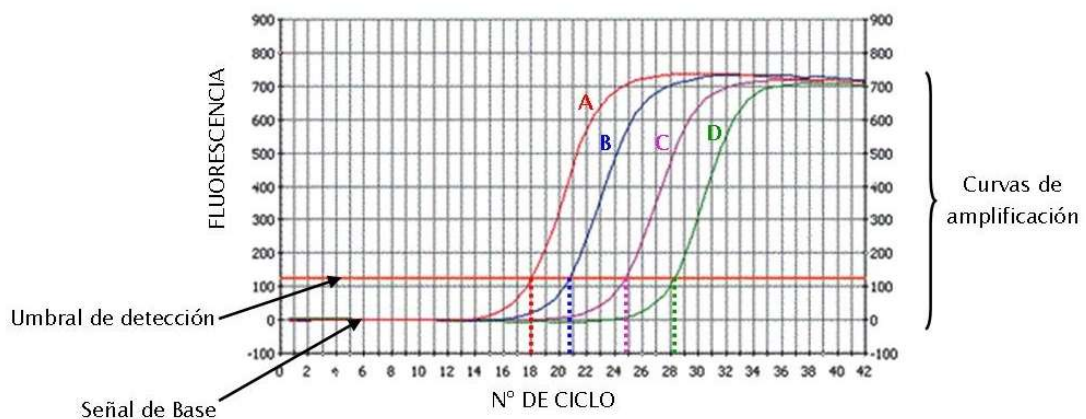


Figura 28. Esquema de los componentes e interpretación de los ciclos umbrales de la PCR a tiempo real.

De cada muestra problema analizada se obtienen datos relativos a la fluorescencia (amplificación) proveniente de dos canales, FAM (detección del patógeno) y JOE (detección del control interno positivo):

- Canal FAM: detección del patógeno.

Un resultado positivo en la amplificación implica la obtención de una curva de fluorescencia típica con un valor del Ct < 38. Se considerarán muestras dudosas aquellas con Ct's que se encuentren entre 38-40.

- Canal JOE: detección del control interno positivo.

Un resultado positivo en la amplificación implica la obtención de una curva de fluorescencia típica con un valor del Ct < 45. Normalmente los valores registrados son  $30 < Ct < 45$ .

Todas las combinaciones posibles de resultados que pueden darse están recogidas en la tabla 24.

Tabla 24. Combinaciones de todos los posibles resultados de la PCR a tiempo real.

CASO	Canal FAM	Canal JOE	RESULTADO
A	+	+	Positivo
B	+	-	Positivo
C	-	+	Negativo
D	-	-	Nulo

En el caso B (tabla 24), este resultado puede darse cuando una muestra positiva contiene un número muy elevado de ADN específico, el cual compite con la producción del control interno positivo. Si se trata de un control positivo, el resultado es positivo. Si se trata de una muestra problema, debe repetirse el ensayo con varias diluciones de la muestra problema antes de asignar un resultado positivo.

### **Cuantificación:**

En los casos en que se realizó cuantificación de la diana F57 (estudio 3), se utilizaron siete diluciones decimales de concentración conocida del control positivo ( $1 - 10^6$  copias de F57/ $\mu$ l). Los valores de Ct obtenidos para cada dilución se emplearon para construir una recta del tipo  $y = ax + b$ , donde "y" representa el Ct obtenido y "x" representa el logaritmo decimal de la concentración de ADN, siendo "a" la pendiente de la recta y "b" la ordenada en origen. Con esta ecuación y conociendo el valor de Ct obtenido para cada muestra, se procedió a calcular la cantidad inicial de copias de F57 de cada una de ellas.

### III.4. DESCRIPCIÓN DE VARIABLES Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO

#### III.4.1. ESTUDIO 1: PREVALENCIA DE LA PARATUBERCULOSIS BOVINA EN GRANJAS DE VACUNO DE LECHE MEDIANTE SEROLOGÍA Y CULTIVO MICROBIOLÓGICO A PARTIR DE POOLS DE HECES.

##### Análisis serológicos:

A nivel individual, la seroprevalencia aparente obtenida para cada uno de los dos ELISA's empleados fue transformada a seroprevalencia real mediante la fórmula recomendada por Noordhuizen *et al.* (1997), empleando para ello valores de  $Se = 0,11$  y  $Sp = 0,985$  descritos para esta clase de ensayos que se basan en antígeno de tipo PPA (Nielsen y Toft, 2009). Debido a la escasa sensibilidad a nivel individual de las técnicas ELISA para esta enfermedad, se decidió considerar los resultados dudosos como negativos a efectos de simplificar el análisis estadístico.

Se construyeron diferentes variables obtenidas a partir de la información recogida en cada granja participante. Estas variables fueron consideradas como factores de riesgo a nivel individual. La categorización de estos factores de riesgo se muestra en la tabla 25.

Tabla 25. Categorización de los factores de riesgo considerados a nivel individual.

Factor de riesgo	Categorías	Criterio
Grupo de edad	2 años 3 años 4 y 5 años > 5 años	Grupos con el mismo nº de animales
Tamaño de granja	Pequeña (20 - 43 animales) Grande (44 - 236 animales)	Grupos con el mismo nº de granjas
Política de reposición	Granja cerrada, sin compra de animales (n = 9) Granja con compra de animales (n = 27)	Compra de animales en los últimos 5 años

Los resultados serológicos obtenidos para cada animal mediante ambos ELISA's fueron estudiados en relación a cada uno de los factores de riesgo descritos a través del programa estadístico R (R v.3.1.1; R Development Core Team, 2014). En primer lugar, se estudió la seropositividad frente a cada uno de los factores de riesgo mediante test Chi-cuadrado y, en los casos en que fue posible, obtención del Odds Ratio con su correspondiente intervalo de confianza al 95%. Para ello se empleó la función `cc()` del paquete "epicalc" (Chongsuvivatwong, 2012) y, en aquellos casos donde la frecuencia de alguna casilla de las tablas de contingencia era inferior a 5, se aplicó la prueba exacta de Fisher. En segundo lugar, se realizó una regresión logística para efectos mixtos,

considerando la explotación de pertenencia como “factor aleatorio”. La variable dependiente empleada fue la seropositividad (0-1) a nivel individual. Los tres factores indicados antes se introdujeron en el modelo, y fueron descartándose uno a uno en base al mayor p-valor resultante hasta la obtención del modelo más adecuado. Este análisis fue realizado con la función `glmer()` del paquete “lme4” (Bates *et al.*, 2014).

La concordancia de los resultados obtenidos por medio de cada ELISA (positivo/negativo) se analizó mediante el empleo del estadístico *kappa* y el test de McNemar para muestras pareadas. Además, se estudió la relación entre los ratios S/P calculados con cada ELISA mediante regresión lineal. Estos tres tratamientos estadísticos fueron realizados con el programa estadístico SPSS v.18.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, Estados Unidos).

**A nivel de explotación**, se procedió a comprobar la normalidad de los valores de seroprevalencia obtenidos para cada explotación mediante ambos ELISA’s. Para ello se emplearon las pruebas de normalidad de Kolmogorov-Smirnov y Shapiro-Wilk. Tras verificar la no normalidad de los datos, se compararon las seroprevalencias intra-rebaño obtenidas con cada ELISA mediante el test de Wilcoxon para comparación de medianas en muestras pareadas (test no paramétrico).

De manera similar al análisis realizado a nivel individual, se elaboraron tres variables consideradas como factores de riesgo a partir de la información recogida durante los muestreos. En la tabla 26 se puede ver la categorización de dichas variables.

Tabla 26. Categorización de los factores de riesgo considerados a nivel de explotación.

<b>Factor de riesgo</b>	<b>Categorías</b>	<b>Criterio</b>
<b>Tamaño de granja</b>	Pequeña (20 - 43 animales) Grande (44 - 236 animales)	Grupos con el mismo nº de granjas
<b>Política de reposición</b>	Granja cerrada, sin compra de animales (n = 9) Granja con compra de animales (n = 27)	Compra de animales en los últimos 5 años
<b>Carro mezclador</b>	Sin empleo de carro mezclador (n = 5) Con empleo de carro mezclador 1 (n = 15) Con empleo de carro mezclador 2 (n = 16)	Uso de carro mezclador compartido (cooperativa)

Una vez construidas estas variables, se compararon una a una con la presencia/ausencia de animales seropositivos obtenidos para cada ELISA. Para esto se realizaron test Chi-cuadrado junto con la obtención del Odds Ratio correspondiente y su intervalo de confianza al 95%.

También se procedió a estudiar la concordancia existente entre ambos tests ELISA para clasificar sanitariamente las granjas, empleando para ello el estadístico *kappa* y el test de McNemar para muestras pareadas.

### **Cultivo fecal de *pools* de heces:**

Los cultivos fecales de *pools* se categorizaron en relación a su resultado (positivo/negativo), y posteriormente los cultivos positivos fueron clasificados en tres grupos en función del crecimiento observado: 1-10 UFC/tubo, 11-50 UFC/tubo y >50 UFC/tubo (Whitlock *et al.*, 2000; Crossley *et al.*, 2005). Debido al reducido número de aislamientos positivos obtenidos, estas tres categorías se redujeron a dos para la realización de los análisis estadísticos posteriores: recuentos bajos (1-10 UFC/tubo) y recuentos medio-altos (>10 UFC/tubo).

De igual modo al apartado de análisis serológicos, se estudió el resultado obtenido para los cultivos de *pools* fecales en relación a los factores de riesgo recogidos en la tabla 25. El resultado del cultivo se enfrentó individualmente con cada uno de los factores de riesgo mediante test Chi-cuadrado, calculando el valor de Odds Ratio en todos los casos posibles. Posteriormente se realizó también una regresión logística para efectos mixtos considerando como “factor aleatorio” la explotación de origen. A continuación, se estudió la distribución de los cultivos fecales positivos en relación al grupo de edad de los animales que conformaban el *pool* mediante test Chi-cuadrado, realizando primero un análisis global con las cuatro categorías y posteriormente mediante comparaciones dos a dos.

**A nivel de explotación**, se valoró el resultado obtenido en los cultivos fecales frente a los mismos factores de riesgo mencionados en el apartado anterior (tabla 26). Para ello se utilizó el test Chi-cuadrado junto con la obtención de los Odds Ratio correspondientes.

### **Comparación entre los análisis serológicos y los cultivos de *pools* de heces:**

En primer lugar se procedió a la comparación entre el resultado de los cultivos de *pools* fecales y la presencia/ausencia de al menos un animal seropositivo entre los que conformaban el *pool* de cultivo, tanto para el ELISA A como para el ELISA B. Para ello se realizó un análisis de concordancia mediante el empleo del estadístico *kappa*. A continuación, se realizó este mismo análisis pero estratificando los datos según el grupo de edad de los animales que formaban dichos *pools*.

En lo que respecta a la clasificación de granjas como infectadas/no infectadas, primeramente se valoró la seroprevalencia obtenida mediante cada ELISA y la presencia/ausencia de cultivos positivos para cada explotación. Al no adecuarse los datos de seroprevalencia a una distribución normal, se optó por realizar la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney. A continuación se evaluó la concordancia existente entre el cultivo de *pools* fecales y ambos tests ELISA a la hora de clasificar

sanitariamente las granjas. Para ello, y al igual que en el apartado de análisis serológicos, se utilizaron el estadístico *kappa* y el test de McNemar para muestras pareadas.

### III.4.2. ESTUDIO 2: EMPLEO DE CULTIVO FECAL DE *POOLS* DE HECES PARA LA MONITORIZACIÓN DE LA PARATUBERCULOSIS EN EXPLOTACIONES DE VACUNO DE LECHE.

#### Monitorización anual entre 2009-2010:

Para este estudio se calcularon estimaciones de la prevalencia individual de la población para cada año a partir de los resultados obtenidos en los cultivos fecales de *pools* de heces. Para ello se empleó la herramienta on-line “EpiTools Epidemiological Calculators” del AusVet Health Animal Services de Australia, disponible en <http://epitools.ausvet.com.au> (Sergeant, 2015). En primer lugar se realizó una estimación mediante aproximación frecuentista para un tamaño de *pool* determinado y una sensibilidad y especificidad desconocidas o inciertas para el test diagnóstico empleado (Cowling *et al.*, 1999; Messam *et al.*, 2008). Para este método sólo es necesario disponer de estimaciones de sensibilidad y especificidad anteriormente descritas para dicho test, ya que el sistema asume que los verdaderos valores de sensibilidad y especificidad no se conocen exactamente y/o han sido estimados en un número limitado de muestras. En este caso, se empleó un valor de sensibilidad de la técnica de 48% (van Schaik *et al.*, 2007), mientras que para la especificidad se consideró un valor del 100% en base a la posterior confirmación molecular. A continuación, se realizó una segunda estimación de la prevalencia individual mediante una aproximación bayesiana que se basa en el esquema de muestreo de Gibbs o “Gibbs sampler” (Casella y George, 1992; Tanner, 1993). Este modelo asume que aunque los verdaderos valores de sensibilidad y especificidad no se conocen exactamente, pueden ser estimados a través de distribuciones Beta de probabilidad, que se construyen a partir del conocimiento previo y/o opinión experta (Cowling *et al.*, 1999; Messam *et al.*, 2008). De esta manera, se emplearon las mismas estimaciones de sensibilidad y especificidad que para la aproximación frecuentista, de cara a poder comparar ambos resultados. Las Beta-distribuciones calculadas para la realización de la estimación bayesiana se recogen en la tabla 27.

Tabla 27. Distribuciones Beta de probabilidad empleadas en el cálculo de la estimación bayesiana de la prevalencia individual de la población mediante esquema de muestreo de Gibbs.

Parámetro	Distribución ( $\alpha$ ; $\beta$ )
Prevalencia	Beta (1; 1)
Sensibilidad	Beta (25; 27)
Especificidad	Beta (10001; 1)



Tras establecer la clasificación final de granjas infectadas y no infectadas, se procedió a valorar su concordancia con las tres clasificaciones obtenidas el primer año. Para ello se empleó el estadístico *kappa* y el test de McNemar. A continuación, esta clasificación final se enfrentó con los factores de riesgo descritos en el apartado anterior (tabla 26), mediante test Chi-cuadrado y obtención del Odds Ratio relativo a cada factor.

### **Explotaciones seleccionadas para seguimiento:**

A partir del resultado de los cultivos fecales individuales y de los cultivos fecales de *pools* se calcularon las estimaciones de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo de la técnica de cultivo fecal de *pools*, tomando la referencia del cultivo fecal individual como *gold standard*. A continuación, se valoró también la concordancia del resultado de los cultivos fecales de *pools* frente a la presencia/ausencia de animales con cultivo individual positivo, empleando el estadístico *kappa* y el test de McNemar.

### **III.4.3. ESTUDIO 3: COMPARACIÓN ENTRE CULTIVO FECAL Y qPCR DIRECTA SOBRE MUESTRAS FCALES INDIVIDUALES PARA LA DETECCIÓN DE *MYCOBACTERIUM AVIUM* SUBSP. *PARATUBERCULOSIS*.**

Los resultados obtenidos mediante cultivo y qPCR a partir de muestras individuales se emplearon para estimar la sensibilidad, especificidad y valor predictivo positivo y negativo de la técnica de qPCR en relación al cultivo fecal. Estas estimaciones fueron empleadas para la realización de un análisis de curva COR (Característica Operativa de Receptor). A continuación se analizó la concordancia entre ambas técnicas mediante el estadístico *kappa* y el test de McNemar para muestras pareadas.

Para la comparación entre las categorías de crecimiento obtenidas mediante cultivo fecal (recuento bajo: 1-10 UFC/tubo; recuento medio-alto: >10 UFC/tubo) y el número de copias de la diana F57 obtenido mediante qPCR se realizó un test *t* de Student. Para ello, el recuento de copias obtenidas en la qPCR se sometió primero a las pruebas de normalidad de Kolmogorov-Smirnov y Shapiro-Wilk. Debido a la no normalidad de los datos, se procedió al cálculo de una nueva variable a partir de ésta mediante transformación logarítmica decimal que sí cumplía la condición de

pertenecer a una distribución normal. Esta nueva variable se enfrentó con las categorías de crecimiento obtenidas en los cultivos fecales mediante el mencionado test *t* de Student.





## IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN



## IV.1. ESTUDIO 1: PREVALENCIA DE LA PARATUBERCULOSIS BOVINA EN GRANJAS DE VACUNO DE LECHE MEDIANTE SEROLOGÍA Y CULTIVO MICROBIOLÓGICO A PARTIR DE *POOLS* DE HECES

### ANÁLISIS SEROLÓGICOS

Los resultados obtenidos a partir de los sueros de los **1962 animales analizados** pertenientes a las 36 granjas estudiadas muestran que la **seroprevalencia** aparente frente a *Map* se sitúa entre el 2,7% y el 4,1% para los tests ELISA A y B respectivamente. Al transformar los resultados obtenidos a seroprevalencia real, se obtuvieron valores del 12,6% para el ELISA A y 27,3% para el ELISA B. Los resultados obtenidos en este estudio indican que la seropositividad a la paratuberculosis bovina es moderada/alta en el vacuno lechero de la zona de estudio. Nuestros resultados son ligeramente superiores a los obtenidos en otros países donde se describieron seroprevalencias individuales aparentes: Canadá (2,6%), Holanda (2,5%) o Italia (2,4% y 2,6% para las regiones de Lazio y Lombardía respectivamente) (Hendrick *et al.*, 2005a, Muskens *et al.*, 2000, Lillini *et al.*, 2005, Arrigoni *et al.*, 2007). Otro trabajo realizado en 2004 en Galicia describe porcentajes de seroprevalencia real individual de 3,02-4,03% para este tipo de ganado (Diéguez *et al.*, 2007), valores más bajos que los obtenidos en este trabajo. En Asturias, otra zona con características similares a la zona de estudio, se obtuvo una seroprevalencia media individual aparente de 1,23% sobre muestras obtenidas entre los años 1995 y 2001, también más baja que las reportadas en nuestro estudio (Balseiro *et al.*, 2004). El hecho de la obtención de valores más elevados en este trabajo puede estar influenciado por las diferencias existentes entre los tests ELISA empleados en cada trabajo, aunque también puede responder a un aumento real de la seroprevalencia individual como consecuencia de una mayor propagación de la enfermedad.

En relación a los **factores de riesgo**, no se observaron diferencias significativas en el resultado serológico entre los grupos de edad en ninguno de los dos tests ELISA ( $p = 0,459$  para el ELISA A y  $p = 0,438$  para el ELISA B). La figura 29 muestra la distribución de los animales seropositivos según el grupo de edad para cada uno de los test ELISA empleados. Tampoco se encontraron asociaciones estadísticas entre la seropositividad de los animales y el tamaño de granja ( $p = 0,549$ , OR = 0,84; IC95% = 0,46-1,59 para el ELISA A y  $p = 0,869$ , OR = 1,04; IC95% = 0,63-1,78 para el ELISA B) o la política de reposición de la explotación (granjas cerradas/granjas que adquieren animales) ( $p = 0,995$ , OR = 1; IC95% = 0,51-2,11 para el ELISA A y  $p = 0,486$ , OR = 0,83; IC95% = 0,49-1,46 para el ELISA B). La regresión logística para efectos mixtos tampoco demostró la existencia de asociación estadística

entre el resultado a ambos tests ELISA y los tres factores de riesgo mencionados (edad, tamaño de granja y política de reposición de la explotación).

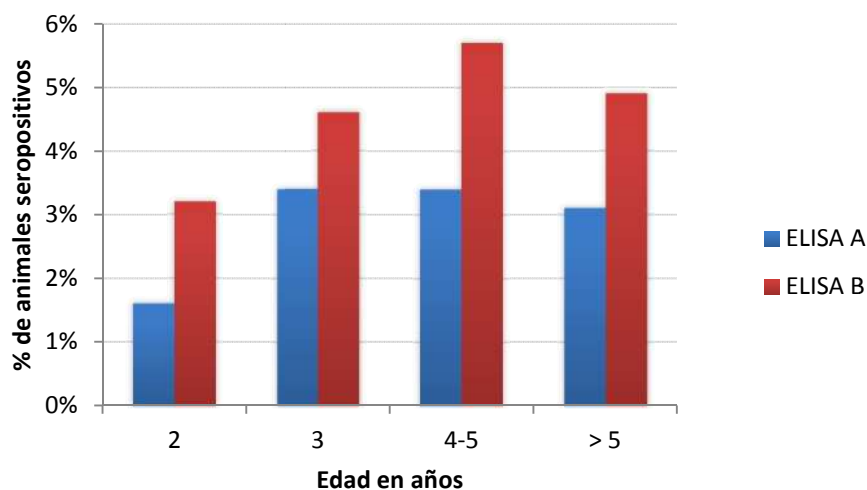


Figura 29. Porcentaje de animales seropositivos obtenidos mediante los tests ELISA A y B según grupo de edad.

En la tabla 28 puede verse la clasificación de los animales según el resultado obtenido en cada ELISA. El estudio de la concordancia entre ambas pruebas mediante el empleo del estadístico *kappa* determinó un valor de  $\kappa = 0,67$  ( $p < 0,05$ ; IC95% = 0,58 - 0,76), lo que se corresponde con una concordancia “buena” según la clasificación de Landis y Koch, (1977). Por otro lado, en el test McNemar para muestras pareadas se obtuvo una  $p < 0,05$ , lo que rechaza la hipótesis nula e indica la existencia de diferencias significativas entre la distribución de los resultados de ambos ELISA’s. En la regresión lineal aplicada sobre los ratios S/P obtenidos con ambos tests ELISA se obtuvo un coeficiente de determinación  $r^2$  de 0,778 (figura 30).

Tabla 28. Clasificación de los animales incluidos en el estudio según el resultado serológico de los tests ELISA A y B.

		ELISA B		TOTAL
		NEGATIVO	POSITIVO	
ELISA A	NEGATIVO	1875	35	1910
	POSITIVO	7	45	52
TOTAL		1882	80	1962

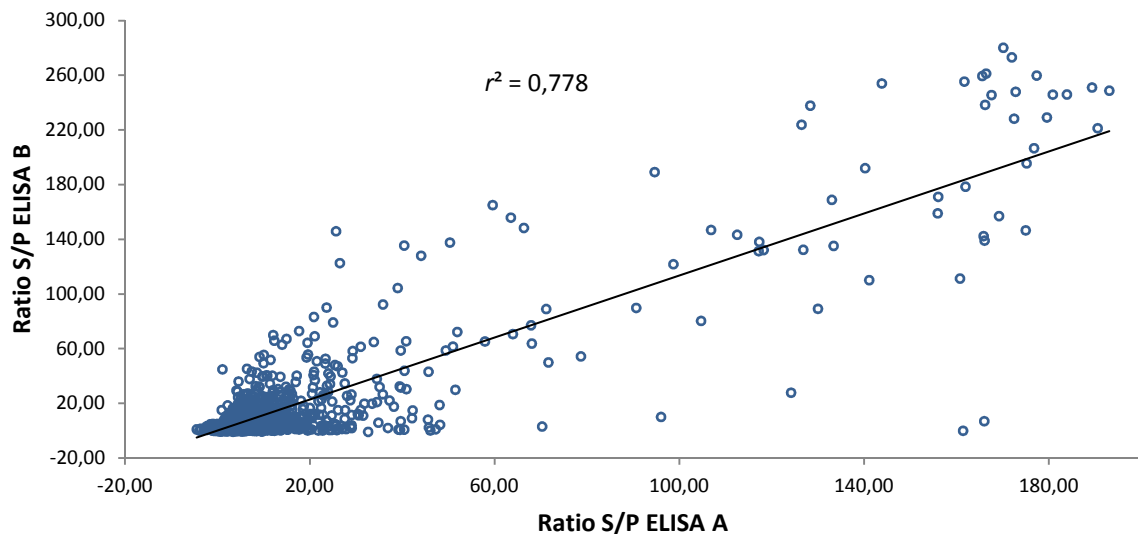


Figura 30. Regresión lineal calculada a partir de los ratios S/P obtenidos mediante los tests ELISA A y B ( $r^2 =$  coeficiente de determinación).

A pesar de haberse obtenido una buena concordancia ( $\kappa = 0,67$ ), el resultado del test McNemar muestra la existencia de diferencias entre ambos tests a la hora de clasificar animales como infectados/no infectados. El índice *kappa* obtenido es similar a los presentados por Collins *et al.* (2005) en un estudio que comparaba cinco tests ELISA diferentes ( $\kappa = 0,66 - 0,85$ ), aunque en dicho trabajo se obtuvieron coeficientes de determinación ligeramente inferiores ( $r^2 = 0,40 - 0,68$ ) al obtenido en este estudio. Otros trabajos similares describieron índices *kappa* más bajos, como un estudio realizado también en Galicia con cuatro ELISA's, con un valor *kappa* entre 0,09 y 0,22 (Diéguez *et al.*, 2009), o un estudio canadiense que obtuvo valores entre 0,18 y 0,33 empleando tres tests ELISA diferentes (McKenna *et al.*, 2006). Uno de los motivos por los que estos trabajos reportan tan escasa concordancia en los resultados de diferentes ELISAs, incluyendo los resultados aquí mostrados, puede ser las diferencias inherentes entre los antígenos empleados por las diferentes casas comerciales que suministran los propios tests, que en ningún caso ofrecen información sobre su obtención y purificación, limitándose generalmente a términos como “extracto purificado de *Map*”, con excepción de aquellos basados en el antígeno LAM. Parte de las diferencias pueden deberse también a características como el empleo de predilución con antígeno de *M. phlei* (Yokomizo *et al.*, 1985). Sin embargo, en los dos tests empleados en este estudio se realiza dicha predilución, y según los fabricantes ambos emplean extractos proteicos purificados. El bajo coeficiente de determinación obtenido obedece al hecho de que para ciertos animales se obtiene una densidad óptica elevada en uno de los ELISA pero no en el otro y viceversa, lo que provoca un descenso de

dicho coeficiente. Por último, la reducida sensibilidad de estas pruebas diagnósticas a nivel individual y especialmente en casos subclínicos también ayuda a que la concordancia obtenida no sea óptima. Todo esto pone de manifiesto la escasa utilidad de este tipo de técnicas para el diagnóstico individual de la paratuberculosis en ganado bovino, tal y como se ha observado en otros estudios (Dargatz *et al.*, 2001; McKenna *et al.*, 2006; Diéguez *et al.*, 2009).

**A nivel de granja**, el porcentaje de explotaciones seropositivas fue de 58,3% y 66,7% para los ELISAS A y B respectivamente, considerando una granja como seropositiva a partir de que presentase al menos un animal seropositivo. La prevalencia aparente intra-rebaño en aquellas explotaciones seropositivas osciló entre el 1,30-15,52% para el ELISA A y 1,47-20,69% para el ELISA B. En la tabla 29 y figura 31 se muestran los valores de seroprevalencia obtenidos para cada explotación. Cuatro explotaciones fueron clasificadas como positivas por el ELISA B y negativas según el ELISA A, y solamente ocurrió lo contrario en una granja. Además, el test de Wilcoxon para comparación de medianas en muestras pareadas demostró la existencia de diferencias significativas ( $p = 0,01$ ) en la distribución de la seroprevalencia intra-rebaños detectada con cada ELISA.

Tabla 29. Seroprevalencia a nivel de rebaño obtenida mediante los tests ELISA A y B.

Nº explotación	Nº animales	Prevalencia ELISA A	Prevalencia ELISA B
1	45	6,67	8,89
2	31	3,23	3,23
3	34	2,94	8,82
4	42	0	0
5	70	0	2,86
6	44	2,27	4,55
7	39	12,82	12,82
8	40	5	5
9	72	1,39	2,78
10	53	9,43	18,87
11	34	0	0
12	30	0	0
13	77	1,3	0
14	35	11,43	11,43
15	53	0	0
16	201	0	0
17	59	1,69	1,69
18	52	3,85	3,85
19	51	3,92	5,88
20	68	1,47	1,47
21	31	0	0
22	43	2,33	6,98
23	236	2,12	4,66
24	30	0	3,33
25	26	0	3,85
26	56	0	3,57
27	25	0	0



28	33	3,03	6,06
29	20	0	0
30	49	0	0
31	32	0	0
32	37	8,11	5,41
33	58	15,52	20,69
34	53	3,77	3,77
35	60	1,67	3,33
36	43	0	0

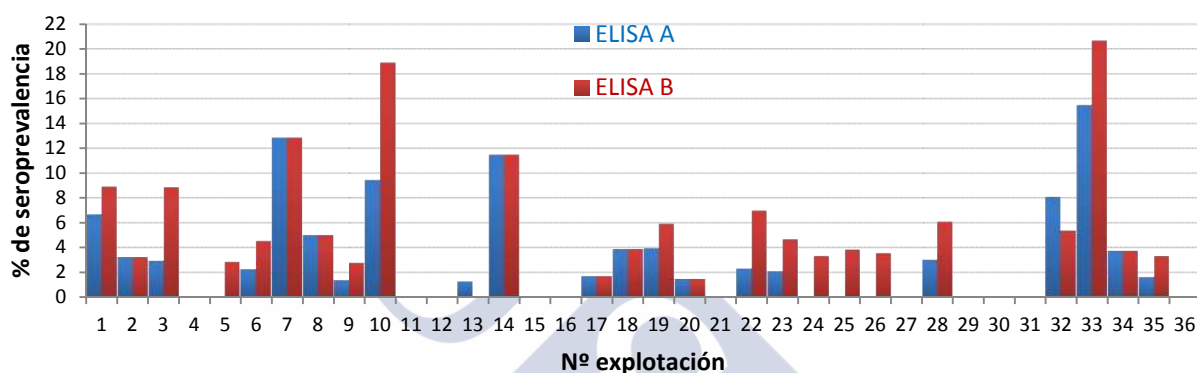


Figura 31. Porcentaje de seroprevalencia mediante los ELISA's A y B a nivel de rebaño para cada explotación en estudio.

En lo correspondiente al porcentaje de rebaños infectados, los resultados muestran valores elevados, siendo similares a los descritos por otros países de producción de leche en intensivo, como Canadá (59%; Scott *et al.*, 2006), Holanda (55%; Muskens *et al.*, 2000) o Italia (64,9%; Robbi *et al.*, 2002). Un estudio realizado en Galicia en 2004 describe una prevalencia de 27,8% para rebaños de leche, porcentaje bastante inferior al obtenido en este trabajo, lo que puede indicar diferencias de sensibilidad y especificidad en los ELISA's utilizados, y/o incluso un aumento del número de explotaciones infectadas en nuestra comunidad o, al menos, en la región de estudio (Diéguez *et al.*, 2007). A pesar de que el plan autonómico de las ADSG's contempla la prohibición de venta de animales positivos con otro destino diferente a sacrificio, lo cierto es que la práctica habitual de compra de animales de aproximadamente 12-20 meses dificulta la interpretación de las pruebas de diagnóstico individuales que se realizan en origen (generalmente un test ELISA), unido al hecho de que tampoco todas las explotaciones pertenecen a este tipo de asociaciones. En lo que respecta a las prevalencias intra-rebaño obtenidas, la existencia de diferencias significativas entre los dos ELISA's

utilizados pone de manifiesto la poca idoneidad de este tipo de ensayos para la estimación de la prevalencia dentro del propio rebaño.

En relación con los **factores estudiados a nivel de explotación**, no se encontraron diferencias significativas en la presencia de animales seropositivos entre los diferentes tamaños de granja estudiados, tanto al considerar los resultados del ELISA A ( $p = 0,091$ ; OR = 3,25, IC95% = 0,67 - 16,58) o el ELISA B ( $p = 0,157$ ; OR = 2,8; IC95% = 0,54 - 16,03). Tampoco se encontraron diferencias significativas en la presencia de animales seropositivos entre las explotaciones cerradas y las que adquirieron animales en los últimos 5 años ( $p = 0,900$ , con OR = 0,91 e IC95% = 0,15 - 5 para el ELISA A;  $p = 0,792$ , con OR = 0,81 e IC95% = 0,11 - 4,78 para el ELISA B), ni tampoco entre la presencia de animales seropositivos y el empleo de carro mezclador compartido, es decir, entre las ganaderías que empleaban el carro mezclador 1, el carro mezclador 2 o directamente no empleaban carro mezclador compartido ( $p = 0,109$  para el ELISA A;  $p = 0,477$  para el ELISA B). El hecho de que en el presente estudio no se haya encontrado ninguna asociación con el tamaño de granja puede estar influenciado por el reducido tamaño, en general, de las explotaciones lecheras gallegas. Aunque en este análisis (considerando un único muestreo) no se ha encontrado ninguna asociación entre los factores de riesgo estudiados y la seropositividad tanto a nivel individual como a nivel de rebaño, existen abundantes estudios que sí describen dicha asociación. Hirst *et al.* (2004) establecen un odds ratio de 3,12 veces más probabilidad de un resultado seropositivo en aquellos establos con más de 600 vacas en lactación. En el mismo estudio se establece también que los animales de granjas que poseen al menos un 8% de ganado comprado a otras explotaciones tienen 3,28 veces más probabilidad de ser seropositivos. Otro estudio similar reconoce también como factores de riesgo el tamaño de granja y el porcentaje de animales nacidos en otras explotaciones, entre otros (Wells y Wagner, 2000). Por último, un estudio más reciente realizado en Canadá en 315 rebaños lecheros encontró asociación estadística entre la seropositividad a nivel de rebaño y la adquisición de novillas en los últimos doce meses, así como con el préstamo entre ganaderos de utensilios/maquinaria en contacto con heces/estiércol (Tiwari *et al.*, 2009).

En el estudio de la concordancia entre ambos ELISA's para la clasificación de explotaciones como infectadas/no infectadas se obtuvo un valor *kappa* de 0,71 ( $p < 0,05$ ; IC95% = 0,47 - 0,94), lo que se traduce en una concordancia "buena" (Landis y Koch, 1977). El test de McNemar resultó no significativo ( $p = 0,375$ ), por lo que no se encontraron diferencias significativas en la clasificación de las granjas mediante el empleo de uno u otro ELISA. A pesar de la concordancia obtenida y de la inexistencia de diferencias significativas en lo referente a la clasificación de las granjas, es llamativo el hecho de que un total de cinco explotaciones en estudio (aproximadamente un 14%) fueron

clasificadas como positivas mediante uno de los ELISA's y negativas mediante el otro, especialmente cuando ambos tests emplean predilución con *M. phlei* y antígeno completo purificado. Todo esto puede poner de manifiesto la existencia de diferencias no sólo en la sensibilidad, sino también en la especificidad de este tipo de técnicas (Osterstock *et al.*, 2007). Estos datos ilustran la dificultad de interpretación de resultados de este tipo de ensayos a nivel de granja, haciéndolos poco adecuados incluso para la clasificación de las explotaciones. Este hecho es muy importante ya que en la realización de los diferentes programas sanitarios, como el desarrollado en Galicia, se utilizan los resultados serológicos para la clasificación sanitaria de las granjas en relación a esta enfermedad. La baja sensibilidad de un ELISA utilizado para clasificar granjas puede tener especial importancia a la hora de detectar la infección en explotaciones con baja prevalencia. De manera similar, los problemas de especificidad de este tipo de técnicas pueden provocar la clasificación de granjas como positivas cuando en realidad no lo son.

#### **CULTIVO FECAL DE POOLS DE HECES**

De los 192 cultivos realizados de *pools* de heces de 10 animales obtenidos en las 36 granjas en estudio se obtuvo crecimiento confirmado de *Map* en 26 (13,5%). La figura 32 ilustra la clasificación de los cultivos positivos según los recuentos obtenidos. Atendiendo a los recuentos observados, puede verse como los resultados de este estudio son similares a los obtenidos por otros autores, como Whitlock *et al.* (2000), que describen un 71% de cultivos positivos en la categoría de 1-10 UFC/tubo, 10% en la categoría de 11-50 UFC/tubo y 19% en la categoría de >50 UFC/tubo, o Crossley *et al.* (2005), con 51,3% en la categoría de 1-10 UFC/tubo, 17,9% en la categoría de 11-50 UFC/tubo y 30,8% en la categoría de >50 UFC/tubo. Este hecho es también consistente con el cuadro de la enfermedad, donde existe una mayoría de animales infectados subclínicamente que eliminan cantidades bajas de *Map*, mientras que los que presentan recuentos mayores van comenzando a desarrollar sintomatología clínica y van siendo eliminados de los rebaños paulatinamente (Fecteau y Whiltlock, 2010).

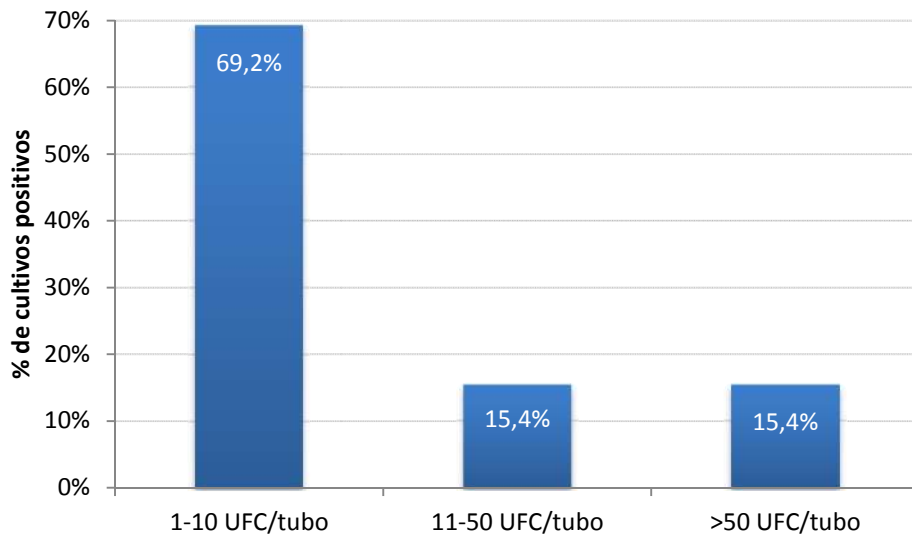


Figura 32. Clasificación de los cultivos de *pools* fecales positivos en relación a la categoría de recuento bacteriano (UFC/tubo).

El porcentaje de cultivos fecales positivos y negativos según el grupo de edad de los animales que conformaban el *pool* puede observarse en la figura 33. No se observaron diferencias significativas entre el resultado del cultivo fecal y el grupo de edad de los animales que forman el *pool* ( $p = 0,947$ ). Tampoco hubo asociación estadística entre el resultado de cada cultivo y el tamaño de granja ( $p = 0,061$ ; OR = 2,8, IC95% = 0,89 - 11,67), o la política de reposición de la explotación ( $p = 0,356$ ; OR = 1,69, IC95% = 0,53-7,13). El resultado de la regresión logística para efectos mixtos tampoco demostró la existencia de diferencias significativas entre el resultado de los cultivos fecales y los tres factores de riesgo mencionados (edad, tamaño de granja y política de reposición de la explotación).

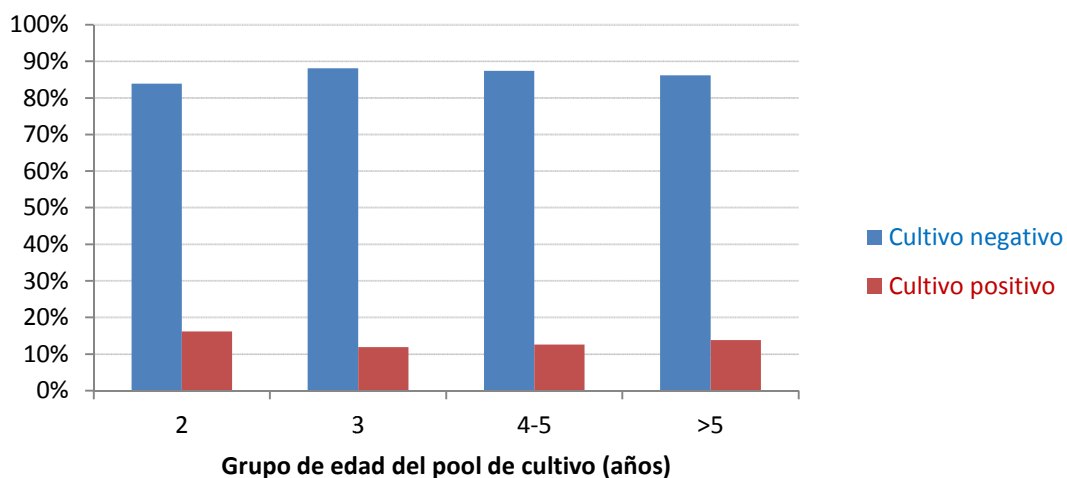


Figura 33. Porcentaje de cultivos fecales positivos y negativos obtenidos según el grupo de edad de los animales que conforman el *pool* de cultivo.

La distribución de los recuentos observados en los cultivos positivos en relación al grupo de edad de los animales del *pool* puede verse en la figura 34. Cabe destacar que todos los cultivos positivos en el tramo de edad de 2 años se correspondieron exclusivamente con recuentos bajos, mientras que los recuentos medio-altos empezaron a aparecer a partir del tramo de edad de 3 años. En el análisis de asociación estadística entre estas dos variables tampoco se encontraron diferencias, aunque el valor de  $p$  fue en este caso muy cercano a la significación ( $p = 0,053$ ) (tabla 30). Al hacer las comparaciones entre estos tramos de edad dos a dos, las mayores diferencias se encontraron entre los grupos de edad de 2 y 3 años ( $p = 0,014$ ). Esta observación es coherente con el cuadro clínico de la enfermedad, en el que la mayoría de animales infectados se encuentran en una fase de sintomatología inaparente pero sí pueden eliminar *Map* en sus heces en cantidades detectables por el método de cultivo fecal. Posteriormente, los animales suelen evolucionar hacia un estado clínico con mayor eliminación de la micobacteria en un periodo de 1-3 años, lo que condiciona la aparición de resultados positivos con mayores recuentos al cultivo fecal (Fecteau y Whitlock, 2010).

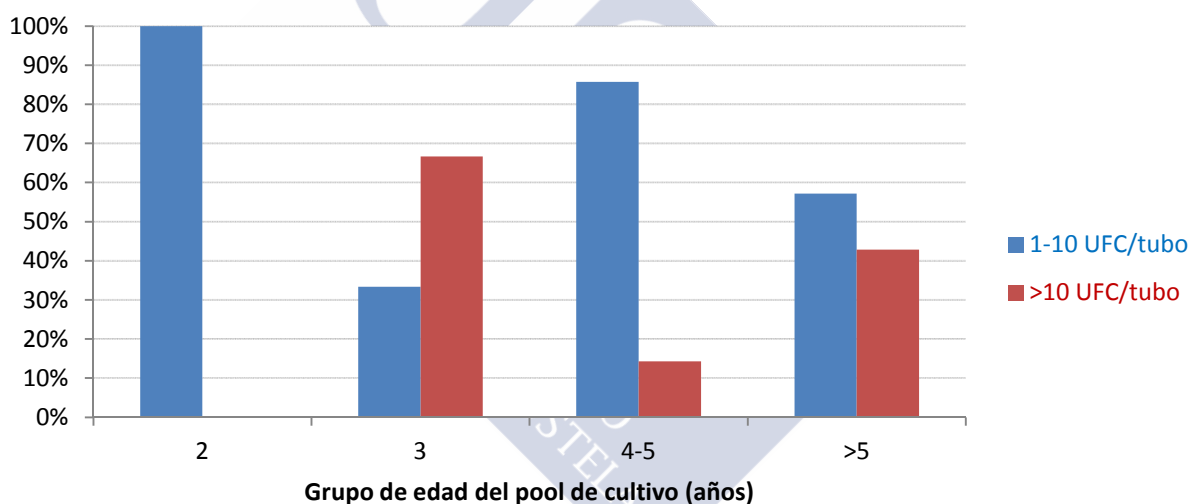


Figura 34. Porcentaje de recuentos bacterianos bajos (1-10 UFC/tubo) y medio-altos (>10 UFC/tubo) obtenidos en relación al grupo de edad de los animales que forman el *pool*.

Tabla 30. Clasificación de los recuentos bacterianos obtenidos según el grupo de edad de los animales del *pool* de cultivo.

		GRUPO DE EDAD DEL POOL DE CULTIVO				TOTAL
		2	3	4-5	>5	
RECuento BACTERIANO	1-10 UFC/tubo	6	2	6	4	18
	>10 UFC/tubo	0	4	1	3	8
TOTAL		6	6	7	7	26

En lo que respecta a la **clasificación sanitaria de las explotaciones mediante el uso de cultivo fecal de *pools***, 9 explotaciones de las 36 en estudio resultaron positivas en alguno de los cultivos fecales realizados, es decir, un 25% de las explotaciones presentaron como mínimo un cultivo positivo.

En relación a los **factores de riesgo a nivel de granja** mencionados en el apartado anterior, no se encontró asociación estadística entre la existencia de granjas infectadas y el tamaño de explotación ( $p = 0,054$ ; OR = 5,09, IC95% = 0,74 - 56,6). De manera similar, tampoco se hallaron diferencias significativas entre la presencia de enfermedad en las granjas y la política de reposición ( $p = 0,667$ ; OR = 1,47, IC95% = 0,21 - 17,4), ni tampoco con el empleo de carro mezclador compartido ( $p = 0,670$ ). A pesar de no haberse identificado ninguna asociación estadística entre los factores de riesgo y el resultado de la granja mediante cultivo fecal, el  $p$ -valor obtenido en el análisis del tamaño de explotación estuvo en este caso muy cercano a la significación. De esta manera, los resultados obtenidos coincidirían con lo descrito por otros autores que sí identifican este factor como un riesgo para el padecimiento de la enfermedad (Wells *et al.*, 2000; Hirst *et al.*, 2004, Pillars *et al.*, 2009; Elliott *et al.*, 2014).

### COMPARACIÓN ENTRE LOS ANÁLISIS SEROLÓGICOS Y LOS CULTIVOS DE *POOLS* DE HECES

En la comparación entre el resultado de los cultivos fecales de *pools* y la presencia/ausencia de al menos un animal seropositivo entre los que conformaban cada *pool* se obtuvo un valor *kappa* de 0,43 ( $p < 0,05$ ; IC95% = 0,27 - 0,60) para el ELISA A y un valor *kappa* de 0,30 ( $p < 0,05$ ; IC95% = 0,15 - 0,44) para el ELISA B, lo que se corresponde con una concordancia “moderada” y “débil” respectivamente (tabla 31). Al estructurar este análisis según el grupo de edad de los animales que formaban el *pool*, se obtuvieron los resultados que muestra la tabla 32.

Tabla 31. Clasificación de los *pools* fecales según su resultado a cultivo y la presencia de animales seropositivos en dicho *pool* mediante el ELISA A y B.

		CULTIVO FECAL DE <i>POOLS</i>		TOTAL
		NEGATIVO	POSITIVO	
ELISA A	Ausencia de seropositivos	144	9	153
	Presencia de seropositivos	22	17	39
	TOTAL	166	26	192
		NEGATIVO	POSITIVO	TOTAL
ELISA B	Ausencia de seropositivos	129	9	138
	Presencia de seropositivos	37	17	54
	TOTAL	166	26	192

Tabla 32. Clasificación y análisis de concordancia de los resultados de cultivo de *pools* fecales y la presencia de animales seropositivos en dichos *pools* mediante el ELISA A y B, estratificado según el grupo de edad de los animales que conforman cada *pool*.

<b>ELISA A</b>	<b>CF+ con seropositivos</b>	<b>CF+ sin seropositivos</b>	<b>CF- con seropositivos</b>	<b>CF- sin seropositivos</b>	<b>Kappa (IC95%)</b>
<b>2 años</b>	10,8%	5,4%	2,7%	81,1%	<b>0,68</b> (0,34-1,00)
<b>3 años</b>	8,0%	4,0%	8,0%	80,0%	<b>0,50</b> (0,16-0,85)
<b>4-5 años</b>	9,1%	3,6%	20,0%	67,3%	<b>0,31</b> (0,05-0,58)
<b>&gt;5 años</b>	8,0%	6,0%	12,0%	74,0%	<b>0,37</b> (0,04-0,69)
<b>ELISA B</b>	<b>CF+ con seropositivos</b>	<b>CF+ sin seropositivos</b>	<b>CF- Con seropositivos</b>	<b>CF- sin seropositivos</b>	<b>Kappa (IC95%)</b>
<b>2 años</b>	10,8%	5,4%	10,8%	73%	<b>0,47</b> (0,12-0,83)
<b>3 años</b>	8%	4%	20%	68%	<b>0,28</b> (-0,01-0,56)
<b>4-5 años</b>	10,9%	1,8%	23,6%	63,6%	<b>0,34</b> (0,10-0,58)
<b>&gt;5 años</b>	6%	8%	20%	66%	<b>0,14</b> (-0,15-0,43)

CF+: cultivo fecal positivo; CF-: cultivo fecal negativo.

Según puede observarse en la tabla 31, la mayor parte de los resultados no concordantes se corresponden con *pools* de cultivo negativo pero que contienen al menos un animal seropositivo entre los diez que forman el *pool*, siendo este efecto mayor para el ELISA B que para el ELISA A. Estos resultados pueden deberse a una falta de especificidad de las técnicas ELISA, a una falta de sensibilidad por parte del cultivo fecal de *pools* de heces, o bien a un efecto combinado de ambas. Al estratificar estos resultados según el tramo de edad de los animales que conforman el *pool* de cultivo, se observa para ambos ELISA's como la concordancia alcanza el valor más alto en el grupo de edad de dos años, para luego ir descendiendo a medida que aumenta la categoría de edad (tabla 32). Se ha señalado que la exposición natural del ganado a micobacterias ambientales puede ser una causa de aparición de falsos positivos en reacciones serológicas (Osterstock *et al.*, 2007). Este hecho se vería favorecido por el empleo de ELISA's que utilizan PPD's, puesto que los componentes antigénicos de estos extractos crudos están altamente conservados entre las diferentes especies de micobacterias. Esta exposición a micobacterias ambientales podría explicar el elevado porcentaje de animales seropositivos en algunos rebaños que presentan porcentajes de aislamiento de *Map* significativamente menores o nulos (Roussel *et al.*, 2007), y especialmente en los cultivos de grupos

de edad de 4-5 años y >5 años, ya que de estar verdaderamente infectados serían los grupos más probables en los que se obtendría un cultivo positivo debido a la lenta evolución que presenta la enfermedad. Por lo que respecta al cultivo fecal, es posible que el efecto de dilución que se produce al hacer el *pool* sea suficiente como para impedir la detección de *Map* (Wells *et al.*, 2002) o que, debido a la eliminación intermitente del agente, algunas vacas infectadas no estén eliminando *Map* en el momento del muestreo, o lo hagan en cantidad inferior al límite de detección de la técnica (Sweeney *et al.*, 2006a).

Aunque no se ha podido demostrar la relación entre la edad y la obtención de un resultado positivo tanto mediante cultivo de *pools* fecales como mediante ELISA, gráficamente sí se observa cierta diferencia entre ambas técnicas. En el caso de los tests serológicos (figura 29), puede observarse cómo el grupo de animales de 2 años es el que menos seropositividad presenta. Sin embargo, en el caso de los cultivos de *pools*, puede verse cómo todos los grupos de edad presentan un porcentaje similar de resultados positivos (figura 33). Este hecho puede estar relacionado con la propia patogenia de la enfermedad, donde la respuesta humoral está retrasada con respecto al desarrollo de la enfermedad, habiendo casos donde un animal que comienza a eliminar *Map* en heces puede todavía no presentar dicha respuesta humoral, y por tanto resultar positivo a una técnica directa como el cultivo fecal pero negativo a las técnicas serológicas (Pradenas *et al.*, 2008).

**En lo relativo a la clasificación de granjas como infectadas/no infectadas**, la tabla 33 recoge el número de *pools* realizados por explotación, el porcentaje de cultivos positivos obtenidos y la categorización de sus recuentos, así como los resultados de los dos ELISA's utilizados. 8 explotaciones fueron clasificadas como positivas mediante las tres técnicas (cultivo fecal, ELISA A y ELISA B) mientras, por el contrario, 10 resultaron negativas a las tres pruebas diagnósticas. El número de rebaños positivos a sólo dos de las tres técnicas fue de 12, y en todos los casos la combinación fue cultivo fecal negativo y ambos test ELISA positivos. Cabe también mencionar que se dio un caso en el que se obtuvo cultivo fecal positivo con resultados negativos a ambos ELISA's. En la tabla 34 pueden observarse todas las combinaciones obtenidas mediante el empleo de las tres pruebas diagnósticas. Para las explotaciones que presentaban al menos un cultivo fecal positivo se obtuvo una seroprevalencia media de 5,60% y 7,17% para los ELISA's A y B respectivamente, mientras que en las explotaciones con todos los cultivos fecales negativos se obtuvieron seroprevalencias medias de 1,98% y 3,30% para los ELISA's A y B respectivamente. En relación a estos datos, la prueba U de Mann-Whitney mostró la existencia de asociación estadística entre la seroprevalencia observada mediante cada ELISA y la presencia de cultivos fecales positivos para cada explotación ( $p = 0,008$  para el ELISA A;  $p = 0,029$  para el ELISA B). Sin embargo, al categorizar las explotaciones con cultivo



positivo según el recuento bacteriano observado en los cultivos fecales (granjas con recuento bajo/granjas con recuento medio-alto) no se encontró asociación estadística con la seroprevalencia observada mediante ELISA (prueba U de Mann-Whitney;  $p = 0,462$  para el ELISA A y  $p = 0,327$  para el ELISA B).

Tabla 33. Número de cultivos de *pools* realizados por explotación, porcentaje de cultivos positivos, categorización de los recuentos bacterianos obtenidos y seroprevalencia de los ELISA's A y B para cada explotación en estudio.

Nº explotación	Nº animales	Nº <i>pools</i> fecales realizados	Nº cultivos positivos (%)	Recuento bacteriano		Prevalencia ELISA A	Prevalencia ELISA B
				1-10 UFC/tubo	>10 UFC/tubo		
1	45	5	5 (100)	3	2	6,67	8,89
2	31	3	1 (33,33)	1	0	3,23	3,23
3	34	4	0 (0)	-	-	2,94	8,82
4	42	4	0 (0)	-	-	0	0
5	70	7	0 (0)	-	-	0	2,86
6	44	4	1 (25)	1	0	2,27	4,55
7	39	4	3 (75)	3	0	12,82	12,82
8	40	4	0 (0)	-	-	5	5
9	72	7	0 (0)	-	-	1,39	2,78
10	53	5	0 (0)	-	-	9,43	18,87
11	34	3	0 (0)	-	-	0	0
12	30	3	0 (0)	-	-	0	0
13	77	7	0 (0)	-	-	1,3	0
14	35	3	0 (0)	-	-	11,43	11,43
15	53	5	0 (0)	-	-	0	0
16	201	20	1 (5)	1	0	0	0
17	59	6	0 (0)	-	-	1,69	1,69
18	52	5	3 (60)	2	1	3,85	3,85
19	51	5	3 (60)	3	0	3,92	5,88
20	68	7	0 (0)	-	-	1,47	1,47
21	31	3	0 (0)	-	-	0	0
22	43	4	0 (0)	-	-	2,33	6,98
23	236	22	6 (27,27)	3	3	2,12	4,66
24	30	3	0 (0)	-	-	0	3,33
25	26	3	0 (0)	-	-	0	3,85
26	56	5	0 (0)	-	-	0	3,57
27	25	3	0 (0)	-	-	0	0
28	33	3	0 (0)	-	-	3,03	6,06
29	20	2	0 (0)	-	-	0	0
30	49	5	0 (0)	-	-	0	0
31	32	3	0 (0)	-	-	0	0
32	37	4	0 (0)	-	-	8,11	5,41
33	58	6	3 (50)	1	2	15,52	20,69
34	53	5	0 (0)	-	-	3,77	3,77
35	60	6	0 (0)	-	-	1,67	3,33
36	43	4	0 (0)	-	-	0	0
<b>TOTAL</b>	<b>1962</b>	<b>192</b>	<b>26 (13,54)</b>	<b>18</b>	<b>8</b>		

Tabla 34. Clasificación y frecuencia de explotaciones según la combinación de resultados obtenidos mediante cultivo fecal de *pools*, ELISA A y ELISA B.

CULTIVO FECAL	ELISA A	ELISA B	Nº DE EXPLOTACIONES (%)
+	+	+	8 (22,22)
-	-	-	10 (27,77)
+	+	-	0 (0)
+	-	+	0 (0)
-	+	+	12 (33,33)
+	-	-	1 (2,77)
-	+	-	1 (2,77)
-	-	+	4 (11,11)

En el análisis de la concordancia entre el empleo de cultivo fecal de *pools* y el empleo de serología para la clasificación sanitaria de las explotaciones en relación a la enfermedad se obtuvieron valores *kappa* de 0,28 ( $p < 0,05$ ; IC95% = 0,05 - 0,52) y 0,19 ( $p < 0,05$ ; IC95% = -0,01 - 0,40) para el ELISA A y el ELISA B respectivamente (tabla 35). Estos valores se corresponden con una concordancia “débil” y “pobre” respectivamente (Landis y Koch, 1977). En el test de McNemar se encontró asociación estadística para ambas clasificaciones ( $p < 0,05$  para el ELISA A;  $p < 0,05$  para el ELISA B), por lo que existen diferencias significativas en la clasificación de las granjas mediante el empleo del cultivo fecal de *pools* de heces o el empleo de uno u otro ELISA.

Tabla 35. Clasificación de las explotaciones incluidas en estudio según el resultado del cultivo fecal de *pools* y de cada ELISA (A y B).

		CULTIVO FECAL DE <i>POOLS</i>		
		NEGATIVO	POSITIVO	TOTAL
ELISA A	NEGATIVO	<b>14</b>	<b>1</b>	15
	POSITIVO	<b>13</b>	<b>8</b>	21
	TOTAL	27	9	36
		NEGATIVO	POSITIVO	TOTAL
ELISA B	NEGATIVO	<b>11</b>	<b>1</b>	12
	POSITIVO	<b>16</b>	<b>8</b>	24
	TOTAL	27	9	36

Estos resultados ponen de manifiesto la poca idoneidad de clasificar sanitariamente las explotaciones mediante el empleo de tests serológicos como el ELISA, puesto que además de presentar una sensibilidad baja, también muestran fallos relativos a la especificidad. Por el contrario, el método de cultivo de *pools* fecales, aunque también dista de presentar una sensibilidad perfecta, sí presenta una elevada especificidad, considerándose incluso del 100% en aquellos casos en los que

los aislamientos se confirman mediante métodos moleculares (Whitlock *et al.*, 2000; Nielsen y Toft, 2008). De este modo se evitaría la clasificación errónea de granjas no infectadas como infectadas, solucionando la aparición de falsos positivos y mejorando por tanto el resultado final de dicha clasificación sanitaria. Además, como puede verse en las tablas 33 y 34, también se observó una explotación con resultado negativo a ambos ELISA's y que sin embargo fue positiva mediante el método de *pools*. Estos resultados falsos negativos tienen importantes implicaciones en el control de la enfermedad y el mantenimiento de la infección en la población, puesto que en las granjas negativas no se aplican restricciones de movimiento pecuario. En la bibliografía es posible encontrar numerosos estudios que describen el empleo de cultivo fecal de *pools* de heces como una buena herramienta a la hora de ordenar sanitariamente las explotaciones (Kalis *et al.*, 2000; Wells *et al.*, 2002a, 2003; Tavoranpanich *et al.*, 2004; van Schaik *et al.*, 2007; Pradenas *et al.*, 2008). Algunos autores sugieren incluso su inclusión como *screening* a nivel de rebaño en los programas sanitarios de sus respectivos países, puesto que la sensibilidad que se describe a nivel de rebaño para estos *pools* fecales es muy similar a la del cultivo fecal individual, pero significativamente más económica (Kalis *et al.*, 2000; Wells *et al.*, 2002a; van Schaik *et al.*, 2007; Geraghty *et al.*, 2014).

En general, los planes de control frente a la paratuberculosis llevados a cabo por las AD SG en España se basan en realizar un análisis del rebaño mediante ELISA, ya sea a toda la cabaña de la explotación o mediante muestreo significativo. En el caso de resultado positivo, se realiza un cultivo fecal individual del animal sospechoso, generalmente con posterior eliminación del mismo si el resultado del cultivo resulta ser también positivo. Este método es similar al aplicado en otros países como Estados Unidos, en su *Voluntary Bovine National Johne's Disease Program*. Sin embargo, uno de los principales inconvenientes de este sistema de análisis en serie es el enorme gasto que supone. De esta manera, el actual plan de control realizado por las AD SG en Galicia ha sido modificado de forma que no contempla la realización de otra prueba de confirmación diferente al test ELISA en aquellas explotaciones que presenten una seroprevalencia mayor o igual al 8% (DOG N°73, Orden del 7 de abril de 2015). Hay que tener en cuenta que el tamaño medio de las explotaciones norteamericanas de vacuno lechero es, con mucho, muy superior al tamaño de granja que existe en nuestra comunidad. En relación al diagnóstico de una enfermedad en el que la sensibilidad es baja, una explotación de tamaño grande que esté infectada será detectable con una probabilidad mayor que una explotación de pequeño tamaño, aunque la prevalencia sea idéntica en ambas (Greiner y Dekker, 2005). Es por este motivo que en una zona como puede ser Galicia donde el tamaño medio de explotación es bajo, el método de diagnóstico mediante cultivo fecal de *pools* puede ofrecer una mayor sensibilidad y especificidad que los actuales métodos serológicos a la hora de clasificar las

granjas antes de establecer un plan de control y bioseguridad, si bien es cierto que la rapidez en el resultado es menor y, en el caso de querer diagnosticar a los animales individualmente, será necesario realizar tantos cultivos individuales como muestras incluya el *pool*. En este estudio se ha estimado el precio de cada muestra serológica en aproximadamente 3€, mientras que el coste del cultivo de un *pool* de 10 animales no llega a los 30€ (menos de 3€/animal). Teniendo en cuenta que el tamaño medio de explotación en este estudio es de aproximadamente 56 animales, el coste de un testaje serológico de todo el rebaño sería de 168€, mientras que por el método de *pools* de 10 animales supondría un coste de alrededor de 180€, ligeramente más elevado pero en principio con mayor probabilidad de clasificar correctamente la explotación.



## IV.2. ESTUDIO 2: EMPLEO DE CULTIVO FECAL DE *POOLS* DE HECES PARA LA MONITORIZACIÓN DE LA PARATUBERCULOSIS EN EXPLOTACIONES DE VACUNO DE LECHE

### MONITORIZACIÓN ANUAL ENTRE 2009 Y 2011

El estudio de monitorización fue realizado durante tres años (2009-2011) sobre un total de 35 explotaciones de vacuno lechero, con muestreos anuales sobre toda la cabaña presente mayor de dos años de edad. **Durante el primer año** de monitorización, se realizaron un total de 190 cultivos de *pools* de heces procedentes de las 35 explotaciones incluidas en el estudio. En 26 de estos cultivos se obtuvieron aislamientos positivos (13,7%), que se categorizaron según su recuento de UFC/tubo: 1-10 UFC/tubo (18 cultivos; 69,2%), 11-50 UFC/tubo (4 cultivos; 15,4%) y >50 UFC/tubo (4 cultivos; 15,4%). Del total de 35 explotaciones, se obtuvieron aislamientos positivos en 9 de ellas (25,7%). La estimación de la prevalencia individual mediante aproximación frecuentista para muestras de *pools* resultó en un 3,30% de prevalencia individual de paratuberculosis (IC95% = 1,81% - 4,78%). La prevalencia individual calculada mediante aproximación bayesiana con esquema de muestreo de Gibbs fue de 3,65% (IC95% = 2,25% - 5,87%), ligeramente más alta que con el método frecuentista.

**Durante el segundo año**, se realizaron 202 cultivos fecales de *pools* de heces de las 35 explotaciones en estudio. 21 de estos cultivos resultaron positivos (10,4%), que se categorizaron según su recuento en 1-10 UFC/tubo (10 cultivos; 47,6%), 11-50 UFC/tubo (7 cultivos; 33,3%) y >50 UFC/tubo (4 cultivos; 19,1%). En este segundo año se obtuvieron aislamientos positivos en 10 de las 35 explotaciones (28,6%), de las cuales cinco fueron explotaciones en las que se detectaba la infección por primera vez. Por tanto, cuatro explotaciones detectadas como positivas el año anterior resultaron negativas en este segundo muestreo anual. La prevalencia individual obtenida mediante estimación frecuentista a partir de los resultados de los *pools* fue de 2,41% (IC95% = 1,28% - 3,54%). Mediante aproximación bayesiana, esta prevalencia se situó en un 2,66% (IC95% = 1,64% - 4,22%). Al igual que el primer año, la estimación bayesiana fue ligeramente superior a la obtenida mediante aproximación frecuentista.

**En el tercer año** de estudio se realizaron un total de 203 cultivos fecales de *pools* de heces de las 35 explotaciones incluidas. En 15 de estos cultivos se obtuvieron aislamientos positivos (7,4%), categorizándolos según su recuento en 1-10 UFC/tubo (13 cultivos; 86,7%) y 11-50 UFC/tubo (2 cultivos; 13,3%). En este tercer año de estudio no se encontró ningún cultivo perteneciente a la

categoría de recuento alto (>50 UFC/tubo). De manera similar al segundo año, se obtuvieron aislamientos positivos en 10 de las 35 explotaciones (28,6%), aunque en dos de ellas era la primera vez que se detectaba la enfermedad. De esta forma, hubo seis explotaciones con resultados positivos en alguno de los dos muestreos anteriores que resultaron negativas en este control. Para este tercer año, la estimación de la prevalencia individual a partir de muestras de *pools* mediante aproximación frecuentista fue de 1,66% (IC95% = 0,80% - 2,51%), mientras que por el método de aproximación bayesiano se obtuvo una prevalencia individual estimada de 1,86% (IC95% = 1,08% - 3,00%).

La figura 35 muestra el porcentaje de prevalencia individual de la población estimada a partir del resultado del cultivo fecal de los *pools* realizados en cada año, tanto mediante aproximación frecuentista como bayesiana. Como se puede ver, la prevalencia individual desciende cada año hasta situarse en el último en aproximadamente la mitad de la prevalencia obtenida en el primer control. Cabe mencionar que en este trabajo se recomendó a todos los ganaderos participantes que no eliminasen animales en base al resultado de las pruebas, salvo aquellos que presentasen sintomatología clínica. Teniendo en cuenta esto, la implantación de un plan de control basado en el cultivo de *pools* fecales junto con la adopción de medidas adecuadas de manejo y bioseguridad ha demostrado ser un método válido para evaluar la eficacia de dichas medidas mediante la estimación de la prevalencia individual anual. Además, con este sistema el ganadero se implica más fácilmente en los protocolos de manejo/bioseguridad, ya que conoce la situación de su ganadería año a año y aumenta su conocimiento acerca de la enfermedad.

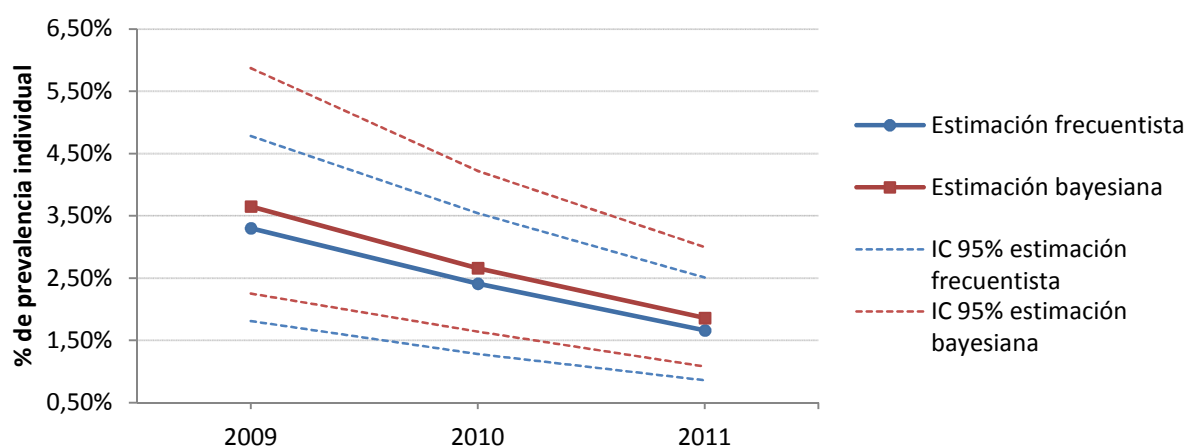


Figura 35. Porcentaje de prevalencia individual anual estimado mediante aproximación frecuentista y bayesiana a partir de los resultados obtenidos en los cultivos de *pools* de heces realizados. En líneas de puntos se representan los intervalos de confianza al 95% para cada estimación.

La tabla 36 recoge el número de cultivos fecales de *pools* de heces realizados cada año en cada explotación, así como el resultado de los mismos y el número de controles anuales positivos que se obtuvo para cada una de ellas. De las 35 explotaciones incluidas, 16 (45,7%) presentaron al menos un control positivo a lo largo de los tres años de estudio. Como puede observarse, la prevalencia de paratuberculosis a nivel de rebaño fue elevada, aunque es inferior a la obtenida mediante ELISA (58,3% - 66,7%). Suponiendo que el tercer año de estudio se hubiese logrado detectar todas las explotaciones infectadas, en el año 2009 se habrían detectado el 56,25% (9 explotaciones), en el 2010 se habrían detectado el 87,5% acumulado (5 nuevas explotaciones detectadas) hasta alcanzar el supuesto 100% en el año 2011 (2 nuevas explotaciones detectadas) (figura 36). En lo referente al número de controles positivos obtenidos para cada una de las explotaciones infectadas, 5 de ellas tuvieron todos los controles anuales positivos (31,25% del total de explotaciones detectadas), 3 explotaciones tuvieron 2 controles positivos (18,75%) y las 8 restantes tuvieron únicamente un control positivo (50%). Estos resultados son muy similares a los de un estudio danés realizado sobre 90 explotaciones cerradas sin historial previo de paratuberculosis, donde se realizaron 9 controles mediante *pools* de heces con una cadencia de 6 meses (Kalis *et al.*, 2004). En dicho trabajo, asumiendo también que tras el último control se habían detectado todas las granjas infectadas, el porcentaje de granjas detectadas fue de 51% el primer año, 70% el segundo, 90% el tercero y 97% el cuarto. Cabe destacar que en este trabajo se detectó una última granja en el noveno muestreo realizado a los 4,5 años del comienzo del estudio, obteniendo un porcentaje de granjas infectadas al final del mismo del 61% (55/90). De esta forma, tanto los resultados del mencionado estudio como los presentados en este trabajo ponen de manifiesto la utilidad del cultivo de *pools* fecales para la clasificación sanitaria de las explotaciones, así como la importante necesidad de mantener los controles de diagnóstico frente a la paratuberculosis a lo largo del tiempo y durante un periodo mínimo de varios años.

Tabla 36. Número de cultivos fecales de *pools* y porcentaje de cultivos positivos obtenidos por año y explotación, y número de controles anuales positivos para cada explotación.

Nº Explotación	2009		2010		2011		Nº controles anuales positivos
	Nº <i>pools</i>	Nº <i>pools</i> + (%)	Nº <i>pools</i>	Nº <i>pools</i> + (%)	Nº <i>pools</i>	Nº <i>pools</i> + (%)	
1	5	5 (100)	5	3 (60)	5	1 (20)	3
2	3	1 (33,33)	4	0 (0)	4	0 (0)	1
3	4	0 (0)	4	0 (0)	4	0 (0)	0
4	4	0 (0)	4	0 (0)	4	0 (0)	0
5	7	0 (0)	7	0 (0)	7	0 (0)	0
6	4	1 (25)	4	0 (0)	5	0 (0)	1
7	4	3 (75)	4	0 (0)	4	0 (0)	1
8	4	0 (0)	5	0 (0)	6	0 (0)	0
9	7	0 (0)	7	4 (57,14)	7	2 (28,57)	2
10	5	0 (0)	5	1 (20)	5	0 (0)	1
11	3	0 (0)	4	0 (0)	4	0 (0)	0
12	3	0 (0)	3	0 (0)	3	0 (0)	0
13	7	0 (0)	7	0 (0)	7	1 (14,29)	1
14	3	0 (0)	3	1 (33,33)	3	0 (0)	1
15	5	0 (0)	5	0 (0)	4	0 (0)	0
16	20	1 (5)	22	2 (9,09)	22	1 (4,55)	3
17	6	0 (0)	6	0 (0)	6	0 (0)	0
18	5	3 (60)	5	0 (0)	6	1 (16,67)	2
19	5	3 (60)	5	2 (40)	5	1 (20)	3
20	7	0 (0)	8	0 (0)	8	0 (0)	0
21	3	0 (0)	3	0 (0)	3	0 (0)	0
22	4	0 (0)	5	0 (0)	4	0 (0)	0
23	22	6 (27,27)	24	3 (12,50)	24	2 (8,33)	3
24	3	0 (0)	3	0 (0)	3	0 (0)	0
25	3	0 (0)	3	0 (0)	3	0 (0)	0
26	5	0 (0)	5	0 (0)	6	0 (0)	0
27	3	0 (0)	3	0 (0)	3	0 (0)	0
28	3	0 (0)	4	0 (0)	3	0 (0)	0
30	5	0 (0)	5	0 (0)	4	0 (0)	0
31	3	0 (0)	4	0 (0)	5	0 (0)	0
32	4	0 (0)	4	1 (25)	4	2 (50)	2
33	6	3 (50)	7	3 (42,86)	6	3 (50)	3
34	5	0 (0)	5	0 (0)	6	1 (16,67)	1
35	6	0 (0)	6	1 (16,67)	6	0 (0)	1
36	4	0 (0)	4	0 (0)	4	0 (0)	0
<b>TOTAL</b>	<b>190</b>	<b>26 (13,7)</b>	<b>202</b>	<b>21 (10,4)</b>	<b>203</b>	<b>15 (7,4)</b>	



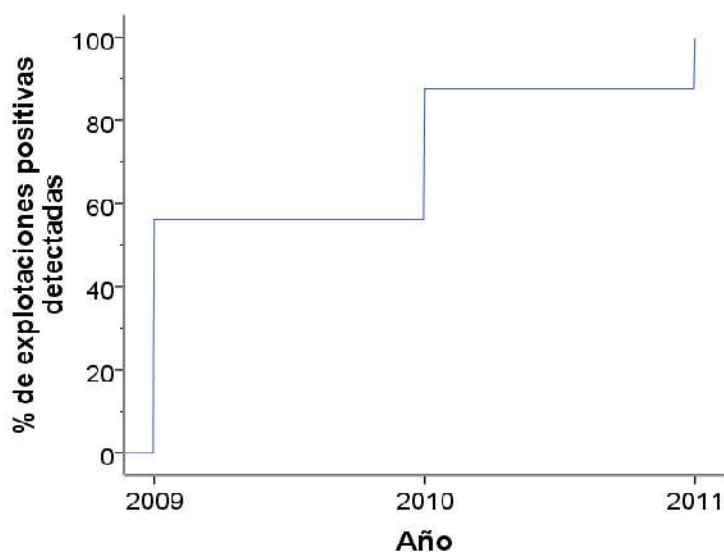


Figura 36. Porcentaje acumulado de explotaciones positivas detectadas cada año mediante cultivo fecal de *pools*, suponiendo que al tercer año (2011) se hubiesen detectado el 100% de las explotaciones infectadas.

Por tanto, tras los últimos resultados obtenidos en 2011 se logró establecer una clasificación final de explotaciones infectadas y no infectadas. Al enfrentar esta clasificación con las tres clasificaciones obtenidas el primer año (mediante el ELISA A, ELISA B y cultivo de *pools* fecales) se obtuvieron los resultados que se muestran en la tabla 37. Como se puede apreciar, la clasificación realizada mediante el ELISA A en el año 2009 es la única para la cual no existen diferencias significativas ( $p = 0,125$ ) con la clasificación final de 2011 según el test de McNemar, además de ser la que obtiene el mejor valor de *kappa* (0,61). Los resultados obtenidos para el ELISA B, por el contrario, muestran el peor valor de *kappa* (0,34) además de presentar diferencias estadísticas en el test de McNemar ( $p = 0,039$ ). Estos resultados no dejan de ser llamativos, dado que ambos ELISA's emplean antígeno completo purificado y preabsorción con antígeno de *M. phlei* y por lo tanto la clasificación de explotaciones mediante uno u otro test debería ser similar. Lo que sí se hace evidente, tanto para el ELISA A como para el ELISA B, es la existencia de granjas clasificadas como positivas mediante esta técnica cuando la clasificación final establecida mediante cultivo fecal refleja lo contrario (17% de explotaciones negativas clasificadas como positivas para el ELISA A, 28% para el ELISA B). En lo referente a la clasificación de granjas mediante cultivo de *pools* en 2009, el test McNemar sí evidencia diferencias significativas en relación a los resultados finales aunque el valor de *kappa* es muy similar al obtenido para el ELISA A, puesto que los únicos casos discordantes se correspondieron

con granjas clasificadas como negativas que posteriormente fueron detectadas, al contrario que con los tests ELISA donde prácticamente todos los casos discordantes se debieron a falsos resultados positivos. Una limitación que presenta esta comparación de clasificaciones es el hecho de que la mayoría de granjas de este estudio no son explotaciones cerradas, por lo que es posible que explotaciones verdaderamente negativas el primer año adquiriesen después animales infectados. Sin embargo, este hecho no afecta a la clasificación errónea de granjas negativas como positivas que se produjo mediante el empleo de pruebas serológicas el primer año de estudio. De nuevo y como ya se ha mencionado anteriormente, se hace evidente la necesidad de realizar controles periódicos rutinarios frente a esta enfermedad de cara a conseguir una clasificación de granjas lo más precisa posible.

Tabla 37. Clasificación de las explotaciones y concordancia entre los diferentes tests diagnósticos (valor *kappa* y p-valor del test de McNemar) según el resultado final obtenido mediante cultivo fecal de *pools* tras 3 años de monitorización y el resultado obtenido mediante ELISA A, ELISA B y cultivo fecal de *pools* realizados el primer año de monitorización.

		CLASIFICACIÓN FINAL CULTIVO <i>POOLS</i> 2011			<i>Kappa</i>	p-valor McNemar
		NEGATIVO	POSITIVO	TOTAL		
CLASIFICACIÓN ELISA A 2009	NEGATIVO	13	1	14	0,61	0,125
	POSITIVO	6	15	21		
	TOTAL	19	16	35		
CLASIFICACIÓN ELISA B 2009	NEGATIVO	9	2	11	0,34	0,039
	POSITIVO	10	14	24		
	TOTAL	19	16	35		
CLASIFICACIÓN CULTIVO <i>POOLS</i> 2009	NEGATIVO	19	7	26	0,58	0,016
	POSITIVO	0	9	9		
	TOTAL	19	16	35		

En la comparación de la clasificación final de explotaciones mediante cultivo de *pools* fecales con los factores de riesgo ya considerados a nivel de granja en el estudio 1 (tamaño de explotación, política de reposición y empleo de carro mezclador compartido) se obtuvieron asociaciones estadísticas significativas para el factor tamaño de explotación ( $p = 0,026$ ) y el factor empleo de carro mezclador compartido ( $p = 0,031$ ). En el caso del tamaño de explotación, se obtuvo un valor de odds ratio de 6,5 a favor de las granjas de mayor tamaño (IC95% = 1,21 – 38,26). De esta forma, la identificación del tamaño de granja como factor de riesgo coincide con los publicado con otros autores, como un trabajo reciente (Pillars et al., 2009) que describe para este factor un odds ratio de 2,24 por cada 100 animales presentes en la explotación. El empleo de maquinaria compartida que pueda tener contacto con las heces, como puede ser un carro mezclador, ha sido también asociado

estadísticamente con la presencia de animales infectados por *Map* (Tiwari et al., 2009). La aparición de asociaciones significativas entre la clasificación final de las granjas con factores de riesgo ya descritos en la bibliografía apoya el hecho de que la clasificación final se aproxima más a la realidad que la clasificación de granjas realizada en un único control, independientemente de la técnica diagnóstica empleada. Como se observa en el estudio 1, dichas asociaciones con los factores de riesgo no aparecen con la clasificación de explotaciones realizada de manera transversal en un único muestreo, ya fuese mediante empleo de serología como mediante cultivo de *pools* de heces. De esta manera, los resultados aquí presentados refuerzan la necesidad de emplear explotaciones con un mínimo de tres años de seguimiento para la realización de estudios de factores de riesgo.

### EXPLOTACIONES SELECCIONADAS PARA SEGUIMIENTO

Tras los resultados obtenidos en el año 2009 y seis meses después del control anual de 2010, se procedió a realizar el primer control de seguimiento (cultivo fecal individual y mediante *pools* de heces) en las 5 explotaciones seleccionadas con un total de 182 cultivos fecales individuales y 19 cultivos fecales de *pools*. El objetivo principal de este seguimiento era evaluar si dichas explotaciones, negativas mediante cultivo fecal de *pools* pero con serología positiva, serían detectadas en controles sucesivos, ya fuese con una cadencia anual o cada seis meses. Del total de las 5 explotaciones, 3 fueron detectadas como positivas durante el año 2010 tanto mediante cultivo fecal de *pools* como mediante cultivo individual. De esta manera, en el seguimiento del año 2011 debían muestrearse las dos explotaciones que permanecían como negativas, pero debido a la baja de una de ellas por cese de actividad sólo pudo realizarse el seguimiento en una de ellas (explotación nº 3). Por tanto, en el seguimiento del año 2011 sólo se realizaron 39 cultivos fecales individuales y los correspondientes 4 cultivos fecales de *pools*. El resumen de los resultados obtenidos para estas 5 explotaciones durante todo el seguimiento se refleja en la tabla 38. Al final del estudio, 3 de las 5 explotaciones habían sido detectadas como positivas en controles sucesivos. El control mediante cultivo de *pools* anual fue capaz en todos los casos de detectar la enfermedad, mientras que el muestreo de seguimiento a los seis meses del anual sólo detectó la enfermedad en 2 de ellas, ya fuese mediante cultivo individual o cultivo de *pools*. Así, en este trabajo no parece que el aumento de la cadencia de los controles periódicos mejore la efectividad de la monitorización, teniendo en cuenta que el fin último era la correcta clasificación de las granjas. Además, los resultados de este seguimiento confirman la existencia de granjas clasificadas como positivas mediante serología en el

estudio 1 cuando en realidad no lo eran, poniendo de manifiesto la escasa idoneidad de la serología para la clasificación de granjas en una zona ganadera como Galicia.

Tabla 38. Resultados obtenidos en las cinco explotaciones seleccionadas para cada año de estudio (ELISA A, ELISA B y cultivo fecal de *pools* anual en 2009; cultivo fecal de *pools* anual, cultivo fecal individual de seguimiento y cultivo fecal de *pools* de seguimiento en 2010 y 2011).

Nº explotación	<b>2009</b>		
	ELISA A	ELISA B	CF <i>POOLS</i> anual
<b>3</b>	2,94%	8,82%	0/4 (0%)
<b>10</b>	9,43%	18,87%	0/5 (0%)
<b>14</b>	11,43%	11,43%	0/3 (0%)
<b>22</b>	2,33%	6,98%	0/4 (0%)
<b>32</b>	8,11%	5,41%	0/4 (0%)
	<b>2010</b>		
	CF <i>POOLS</i> anual	CF individual seguimiento	CF <i>POOLS</i> seguimiento
<b>3</b>	0/4 (0%)	0/36 (0%)	0/4 (0%)
<b>10</b>	1/5 (20%)	0/40 (0%)	0/4 (0%)
<b>14</b>	1/3 (33,3%)	2/27 (7,4%)	2/3 (66,7%)
<b>22</b>	0/5 (0%)	0/40 (0%)	0/4 (0%)
<b>32</b>	1/4 (25%)	2/39 (5,1%)	1/4 (25%)
	<b>2011</b>		
	CF <i>POOLS</i> anual	CF individual seguimiento	CF <i>POOLS</i> seguimiento
<b>3</b>	0/4 (0%)	0/39 (0%)	0/4 (0%)
<b>10</b>	0/5 (0%)	Retirada del seguimiento (positiva en 2010)	
<b>14</b>	0/3 (0%)	Retirada del seguimiento (positiva en 2010)	
<b>22</b>	0/4 (0%)	Baja <sup>a</sup>	
<b>32</b>	2/4 (50%)	Retirada del seguimiento (positiva en 2010)	

a. Explotación que cursó baja en el estudio por cese de actividad.

Por otro lado, con los resultados obtenidos para cada *pool* fecal y los correspondientes cultivos individuales de las muestras que lo formaban se procedió a establecer la sensibilidad y especificidad de esta técnica, así como la concordancia entre ambas pruebas diagnósticas (tabla 39). Las estimaciones de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo obtenidas para el cultivo fecal de *pools* en relación al cultivo fecal individual fueron de 75%, 100%, 100% y 95% respectivamente. El valor de *kappa* obtenido para el análisis de la concordancia fue  $\kappa = 0,83$  ( $p < 0,05$ ; IC95% = 0,52 - 1), que se corresponde con la categoría de “concordancia muy buena” según Landis y Koch (1977). En el test de McNemar se obtuvo una  $p = 1$ , lo que implica que no existen diferencias significativas entre los resultados de ambas pruebas.

Tabla 39. Clasificación de los resultados de cultivos de *pools* fecales realizados durante la fase de seguimiento y de los cultivos fecales individuales de los animales que formaban cada *pool*.

		CULTIVO FECAL INDIVIDUAL		TOTAL
		NEGATIVO	POSITIVO	
CULTIVO FECAL DE POOLS	NEGATIVO	19	1	20
	POSITIVO	0	3	3
	TOTAL	19	4	23

La sensibilidad del cultivo fecal de *pools* de heces ha sido valorada por diferentes trabajos, aunque las estimaciones obtenidas son variables. Pradenas *et al.* (2008) describen una sensibilidad de 46,4% para los *pools* fecales de diez muestras. Un estudio similar estima la sensibilidad media de estos *pools* en 48%, obteniendo una sensibilidad de 24% para los *pools* que presentan un eliminador débil entre los animales que forman la muestra, y más de 75% para los *pools* con al menos un animal eliminador moderado-alto (van Schaik *et al.*, 2007). Otros estudios realizados en Estados Unidos contemplan estimaciones más altas, como Wells *et al.* (2002) que obtuvieron una sensibilidad de 44% para los *pools* con baja concentración de *Map* en la muestra inicial y 94% para los *pools* con concentración media-alta, u otro trabajo similar al aquí presentado que describe una sensibilidad de 69% (Tavornpanich *et al.*, 2004). Teniendo en cuenta los resultados de presente trabajo, las estimaciones obtenidas serían comparables a las reportadas por estos dos autores.

En lo relativo al efecto de dilución que puede presentar la técnica del cultivo fecal de *pools* de heces en comparación con los cultivos individuales que lo forman, sólo un *pool* que contenía una muestra positiva resultó negativo (tabla 39), si bien el recuento del cultivo individual de dicha muestra fue bajo (1-10 UFC/tubo). Sin embargo, otro *pool* que contenía una muestra con bajo recuento sí resultó positivo, también con un recuento de 1-10 UFC/tubo. Los otros dos *pools* positivos presentaron también recuentos bajos (1-10 UFC/tubo), siendo el recuento de la muestra individual positiva que contenían cada uno de 11-50 UFC/tubo en un caso y >50 UFC/tubo en el otro. Por tanto, el efecto dilución sí se ha observado en este trabajo, si bien este hecho no impidió, en ninguno de los casos, la detección de la infección en dichas explotaciones. Este efecto de dilución también se ha descrito en otros estudios que emplearon el cultivo fecal de *pools* (Kalis *et al.*, 2000; Wells *et al.*, 2002; Tavornpanich *et al.*, 2004). Sin embargo, estos trabajos también describen el efecto contrario, es decir, la obtención de resultados positivos en cultivos fecales de *pools* mientras el resultado de los cultivos individuales de las muestras que lo conforman era negativo para todas ellas, aunque este suceso no se ha visto en el presente estudio. Por ejemplo, Kalis *et al.* (2000) describen este fenómeno en un 5,9% de los *pools* positivos obtenidos en dicho estudio, mientras que

en otro trabajo el porcentaje alcanza un 16% de los *pools* positivos detectados (Wells *et al.*, 2002). La explicación que ofrecen estos equipos de investigación a este suceso tiene que ver con la homogenización de la muestra: durante la composición de los *pools* fecales, todas las muestras deben homogeneizarse juntas para la obtención de la muestra de *pool*, lo que provoca cierto efecto de concentración que puede resultar, como se ha visto, en la obtención de cultivos de *pools* positivos mientras los cultivos individuales de las muestras que lo forman puedan resultar negativos.



### IV.3. ESTUDIO 3: COMPARACIÓN ENTRE CULTIVO FECAL Y qPCR DIRECTA SOBRE MUESTRAS FECALES INDIVIDUALES PARA LA DETECCIÓN DE *Mycobacterium avium* SUBSP. *paratuberculosis*

La clasificación de las muestras fecales según los resultados obtenidos mediante el cultivo y qPCR de muestras de heces individuales puede verse en la tabla 40. Las 67 muestras procedentes de granjas con estatus negativo durante tres años resultaron negativas al cultivo fecal individual, siendo 62 de ellas negativas también a la qPCR. Cabe destacar que las 5 muestras con resultado discordante presentaron todas un bajo número de copias de F57, cercano al límite de detección de la técnica descrito por el fabricante. De manera análoga, en las 24 muestras de heces procedentes de animales con cultivo positivo el año anterior se obtuvo crecimiento de *Map* en todas ellas, mientras en la qPCR resultaron positivas un total de 23. Las estimaciones de sensibilidad, especificidad y valores predictivos positivo y negativo de la qPCR directa en relación al cultivo fecal individual fueron 95,83%, 92,54%, 82,14% y 98,41% respectivamente (tabla 41), y el área bajo la curva obtenida mediante análisis COR fue de 0,94 ( $p < 0,05$ , IC95% = 0,88 - 1,00) (figura 37). En el estudio de la concordancia entre ambas técnicas se obtuvo un valor *kappa* de 0,84 ( $p < 0,05$ , IC95% = 0,72 - 0,96), que se corresponde con una concordancia “muy buena” (Landis y Koch, 1977). El test de McNemar realizado entre ambas pruebas resultó no significativo ( $p = 0,219$ ), por lo que no se encontraron diferencias significativas en la clasificación de las muestras mediante una u otra técnica.

Tabla 40. Clasificación de los resultados obtenidos mediante cultivo fecal y qPCR directa sobre heces realizados sobre muestras individuales.

		qPCR		TOTAL
		NEGATIVO	POSITIVO	
CULTIVO FECAL INDIVIDUAL	NEGATIVO	62	5	67
	POSITIVO	1	23	24
	TOTAL	63	28	91

Tabla 41. Valores de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo de la qPCR directa sobre heces en relación al cultivo fecal individual.

		CI 95%
Sensibilidad	95,83	(85,76-100,00)
Especificidad	92,54	(85,50-99,58)
Valor predictivo +	82,14	(66,17-98,11)
Valor predictivo -	98,41	(94,53-100,00)

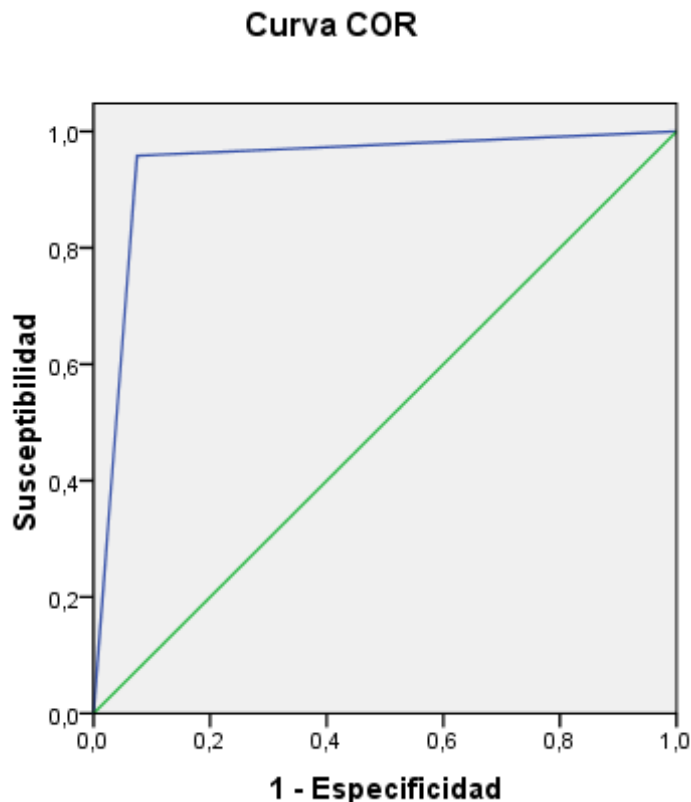


Figura 37. Curva COR (Característica Operativa de Receptor) obtenida a partir de los valores de sensibilidad y especificidad calculados para la técnica de qPCR directa sobre heces.

El cultivo fecal ha sido comparado con técnicas de PCR en diversos estudios, pero resulta difícil establecer relaciones entre ellos debido a las diferencias en el diseño del estudio y a la metodología empleada, como diferentes métodos de cultivo, métodos de extracción de ADN o dianas moleculares utilizadas. Algunos de los trabajos disponibles en la bibliografía que más se parecen en diseño al aquí presentado encontraron estimaciones de sensibilidad y especificidad bastante diferentes entre sí, si bien es cierto que la diana molecular empleada es distinta en cada uno de ellos. Wells *et al.* (2006) obtuvieron una sensibilidad y especificidad en relación al cultivo fecal de 23% y 99,7% respectivamente empleando el elemento de inserción *ISMav2*, mientras Alinovi *et al.* (2009) describen una sensibilidad del 60% y especificidad del 97% para la diana *hspX* que, al igual que la diana F57 utilizada en el presente trabajo, se trata de un gen de copia única. Christopher-Hennings *et al.* (2003) calcularon una sensibilidad del 93% y una especificidad del 100% para la qPCR en relación al cultivo, aunque la diana molecular empleada en este caso fue el elemento de inserción *IS900*, que se encuentra en el genoma de *Map* en un número entre 15 y 20 copias. Tal y como cabría esperar, el uso de dianas moleculares de copia múltiple se traduce generalmente en diseños de PCR con mayor sensibilidad que aquellos diseñados a partir de dianas de copia única (Stabel *et al.*, 2004; Herthnek y



Bölske, 2006). Sin embargo, aunque la diana IS900 se considera específica de *Map*, puede presentar problemas de especificidad debido a la existencia de elementos de inserción muy similares (“IS900-like”) en otras micobacterias (Cousins *et al.*, 1999). Logar *et al.* (2012) obtuvieron estimaciones muy similares a estas últimas empleando también la diana IS900 sobre muestras procedentes de animales subclínicos (89% de sensibilidad y 100% de especificidad), aunque en este estudio los propios autores aseguran que los *primers* y sonda empleados fueron específicamente seleccionados para evitar la homología con la secuencias “IS900-like” que ya han sido descritas en otras especies del género. Sin embargo, la diana F57 utilizada en el presente trabajo se considera 100% específica de *Map* y hasta la fecha no se han encontrado secuencias similares en otros microorganismos (Vansnick *et al.*, 2004; Herthnek and Bölske, 2006). En uno de los escasos estudios que emplearon la diana F57 se analizaron mediante PCR un total de 47 muestras clínicas de heces que habían sido confirmadas como positivas anteriormente mediante cultivo, identificando el 100% de las mismas como positivas a través de este método (Herthnek and Bölske, 2006). En este mismo trabajo, los ensayos de especificidad realizados enfrentaron este sistema de PCR contra 112 cepas de *Map* y 149 cepas de otras especies de *Mycobacterium* spp., no obteniendo ningún resultado falso positivo y demostrando por tanto la elevada especificidad de esta diana.

Así, los resultados aquí presentados muestran que la qPCR de F57 es una buena alternativa al empleo del cultivo fecal, presentando una sensibilidad y especificidad relativas muy buenas y una concordancia elevada entre ambas ( $\kappa = 0,84$ ). Además, el empleo de este tipo de técnicas moleculares disminuye el tiempo de procesado de las muestras y acelera en gran medida la obtención de resultados, un hecho muy valorado por los productores y veterinarios de campo y de suma importancia para la toma de decisiones en granja.

En relación a las categorías de crecimiento obtenidas en el cultivo fecal, 14 muestras se clasificaron como 1-10 UFC/tubo y las 10 restantes como >10 UFC/tubo. En lo que respecta a la qPCR, el número de copias de F57 se calculó mediante la ecuación obtenida a partir de la curva estándar ( $y = 39,1209 - 3,4925 \log x$ ;  $R^2 = 0,9989$ ) (figura 38). El rango de copias de F57 detectadas varió entre  $4,16 \times 10^2$  copias/g and  $2,05 \times 10^8$  copias/g.

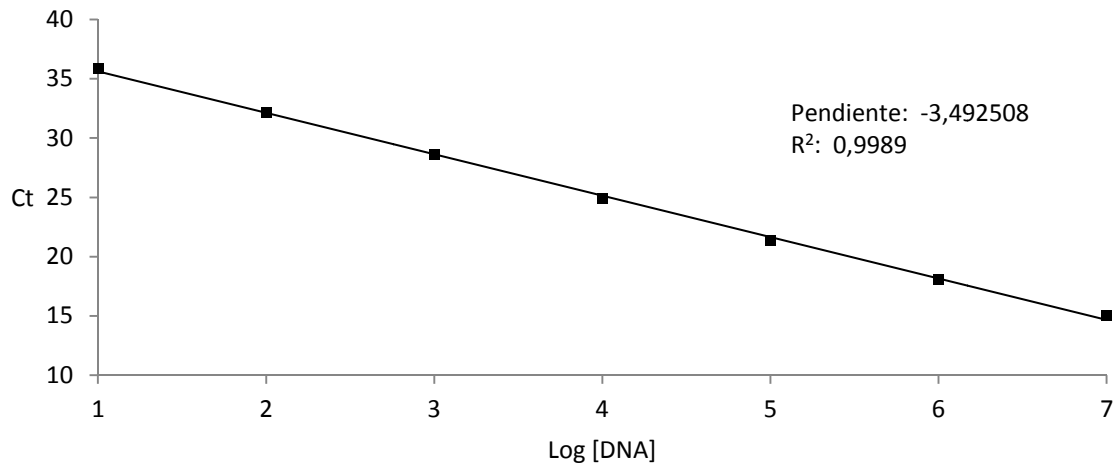


Figura 38. Curva estándar construida a partir de controles de concentración conocida de la diana F57, empleada para el cálculo del número de copias obtenidas mediante qPCR directa sobre heces.

Al comparar el número de copias de F57 detectado mediante qPCR con las categorías de recuentos observados en los cultivos fecales, se encontró un número de copias significativamente mayor ( $t = 3,35$ ;  $p = 0,003$ ) para la categoría de  $>10$  UFC/tubo ( $\bar{x} = 3,93 \times 10^5 \pm 9$  copias/g) que para la categoría de  $1-10$  UFC/tubo ( $\bar{x} = 1,41 \times 10^4 \pm 3$  copias/g) (figura 39).

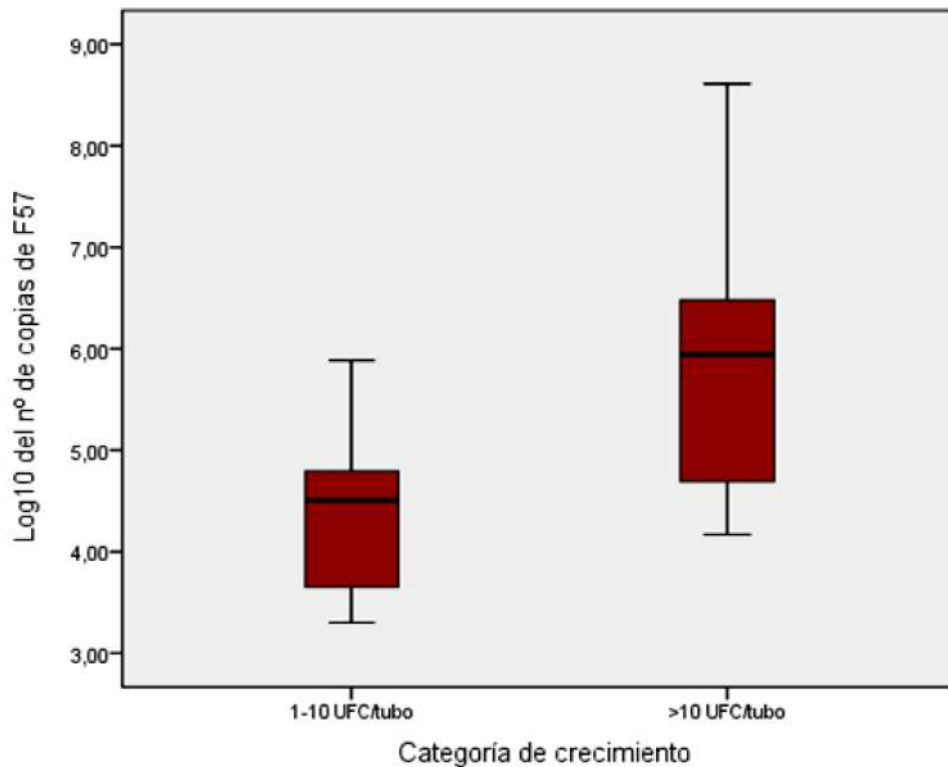


Figura 39. Diagrama de cajas representando el log10 del número de copias de la diana F57 para cada una de las categorías de crecimiento contempladas en el cultivo fecal.

En este estudio se encontraron cinco muestras positivas a la qPCR que resultaron negativas a cultivo fecal en las dos granjas con seguimiento negativo durante tres años, aunque el número de copias de *Map* detectado fue bajo para todas ellas ( $\bar{x} = 639$  copias/g). Se ha descrito que explotaciones cerradas con resultados negativos a cultivo fecal durante 3 años mostraron resultados positivos en controles posteriores (Kalis *et al.*, 2004), por lo que existe la probabilidad de que las dos granjas de este estudio de las que procedían dichas muestras fuesen en realidad explotaciones infectadas. Este hecho, unido a la alta especificidad de la diana empleada, podría indicar una mayor sensibilidad de la qPCR en muestras con baja carga de *Map*, más que un verdadero problema de especificidad de la técnica.

Entre los argumentos que pueden explicar las diferencias obtenidas en relación a las cinco muestras mencionadas hay que destacar el hecho de que las técnicas moleculares son capaces de detectar ADN mientras se encuentre íntegro, independientemente de si el microorganismo es viable o no. Por otro lado, hay que considerar el hecho de que los procesos de descontaminación empleados para la realización de los cultivos reducen de manera notable la viabilidad de las micobacterias (Whipple and Merkal, 1983; Reddacliff *et al.*, 2003b), por lo que no es difícil que muestras con un bajo número de *Map* puedan resultar negativas al cultivo fecal aún tratándose de animales que eliminan el agente activamente en sus heces. Hay estudios en los que se han descrito recuentos de eliminación bajos en animales sanos de granjas infectadas como consecuencia de un fenómeno de “*pass-through*”, es decir, animales adultos no infectados que ingieren *Map* debido a la alta contaminación del ambiente, y en los que se puede detectar el microorganismo en heces durante varios días sin que dichos animales hayan desarrollado la infección (Sweeney *et al.*, 1992a; Hines *et al.*, 2007). Este hecho puede ser frecuente en granjas infectadas en las que hay animales “*supershedders*” o “*supereliminadores*”, que contribuyen en gran medida al aumento de la contaminación del ambiente (Fecteau y Whitlock, 2010). Sin embargo, estos resultados no parecen ser consecuencia de un fenómeno de “*pass-through*”, ya que las explotaciones de origen habían resultado negativas en los años previos y por tanto no parece existir ninguna fuente posible de contaminación de *Map* que permitiese el desarrollo de este suceso.

En general, puede decirse que la concordancia entre ambos métodos es muy buena, y los resultados discordantes obtenidos entre el cultivo fecal y la qPCR directa no parecen ser consecuencia de un problema de especificidad de la técnica de qPCR, sino más bien de una mayor sensibilidad de la misma en relación al cultivo fecal en animales con bajos niveles de eliminación de

*Map.* Estos resultados obtenidos sobre muestras de campo indican que la técnica de qPCR podría detectar la eliminación de micobacterias en heces de forma más precoz que las técnicas tradicionales de cultivo fecal, argumento de gran interés en el desarrollo de programas sanitarios de control frente a esta enfermedad.





## V. CONCLUSIONES



**En relación a la clasificación sanitaria de las explotaciones mediante serología y cultivo fecal de *pools*:**

1ª. La paratuberculosis es una enfermedad con una amplia distribución en las explotaciones de vacuno de leche de la zona de estudio, presentando una elevada prevalencia a nivel de rebaño calculada tanto mediante los resultados del cultivo microbiológico de *pools* fecales (45,7%) como mediante los resultados serológicos (58,3-66,7%).

2ª. El empleo de la serología para la clasificación sanitaria de las explotaciones presenta problemas de sensibilidad y especificidad, que se traduce en la aparición tanto de resultados falsos negativos como positivos al ser comparada con la clasificación obtenida mediante el empleo del cultivo fecal de *pools*.

3ª. El mayor grado de concordancia entre la serología y el cultivo fecal de *pools* se produce en el grupo de animales de menor edad, disminuyendo dicha concordancia a medida que la edad de los animales analizados aumenta. Este hecho se produce por la falta de especificidad de los tests ELISA, y está favorecido por la exposición más probable de los animales de mayor edad a otras micobacterias, lo que interfiere con las pruebas de diagnóstico serológico.

En relación a la **monitorización de explotaciones mediante cultivo microbiológico de *pools* fecales:**

4ª. El empleo del cultivo fecal individual para la clasificación de explotaciones no supone una mejora significativa sobre la realizada mediante cultivo fecal de *pools*, no habiendo encontrado ninguna explotación positiva mediante cultivo fecal individual que no lo hubiese sido también mediante cultivo fecal de *pools*.

5ª. El aumento de la frecuencia de los análisis periódicos (de un año a seis meses) no parece mejorar la clasificación sanitaria de las explotaciones, además de suponer un aumento del gasto destinado para el diagnóstico.

6ª. La aplicación del cultivo microbiológico de *pools* fecales con una cadencia anual durante un mínimo de tres años es un método eficaz para clasificar sanitariamente las explotaciones, y supone un coste significativamente menor que el análisis mediante cultivo fecal individual.

7ª. El control sanitario de las explotaciones mediante el cultivo fecal de *pools* realizados de manera anual durante un periodo mínimo de tres años es adecuado para la evaluación de la reducción de la

prevalencia a nivel individual tras la aplicación de medidas específicas de bioseguridad y manejo, disminuyendo desde un 3,30 - 3,65% el primer año hasta un 1,66 - 1,86% el tercero.

8ª. Considerando la clasificación sanitaria después de tres años de monitorización mediante cultivo fecal de *pools*, el tamaño de granja y el empleo de maquinaria compartida se han identificado como factores de riesgo en la infección por paratuberculosis a nivel de explotación. Estos factores no se identifican como tal empleando únicamente la clasificación sanitaria obtenida en un único muestreo, por lo que los estudios de factores de riesgo deberían ser realizados en explotaciones que tengan al menos tres años de seguimiento de la enfermedad.

En relación a la **validez de las técnicas moleculares con respecto al cultivo fecal**:

9ª. La técnica de qPCR para la diana F57 presenta unas estimaciones de sensibilidad, especificidad y valores predictivos positivo y negativo relativas al cultivo fecal individual de 95,83%, 92,54%, 82,14% y 98,41% respectivamente, con un valor de concordancia entre ambas de  $\kappa = 0,84$ . De esta forma, esta técnica presenta una buena validez para ser utilizada en sustitución del cultivo microbiológico tradicional, lo que se traduciría en una mejora sustancial en lo que respecta a la rapidez en la obtención de resultados.

10ª. Los resultados obtenidos indican que la técnica de qPCR para la diana F57 podría detectar la eliminación fecal de *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* de forma más precoz que las técnicas microbiológicas clásicas, especialmente en aquellos animales que presentan tasas de eliminación bajas.





## VI. RESUMEN - RESUMO - SUMMARY



## RESUMEN

La **paratuberculosis** es una enteritis crónica granulomatosa provocada por *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (*Map*) y que afecta fundamentalmente a rumiantes (Kalis *et al.*, 2004; Wells *et al.*, 2005). Esta enfermedad plantea un problema económico importante para los productores de vacuno de leche debido a que provoca reducción de la producción láctea, desvío prematuro de animales y disminución del peso al sacrificio (Benedictus *et al.*, 1987; Whittington y Sergeant, 2001). Desde un punto de vista clínico, la enfermedad no tiene tratamiento médico eficaz, por lo que el único modo de eliminarla de un rebaño pasa por establecer medidas como la vacunación y/o la realización de programas de control. Sin embargo, y debido a las reacciones cruzadas que se producen entre los integrantes del género *Mycobacterium*, existen limitaciones por parte de la Administración Pública en el empleo de la vacunación, ya que se producen problemas de interferencia con las pruebas oficiales de diagnóstico de la tuberculosis. Por tanto, la única solución posible al problema es el establecimiento de programas de control que contemplen la identificación de las granjas afectadas y la implantación de pautas apropiadas de bioseguridad y manejo higiénico que impidan o minimicen tanto el riesgo de entrada de la enfermedad como la transmisión de la misma dentro de los rebaños infectados.

Uno de los objetivos fundamentales de los planes de control frente a la paratuberculosis es establecer una correcta clasificación sanitaria de las explotaciones. Debido al carácter crónico de la enfermedad y la baja sensibilidad de las diferentes pruebas diagnósticas, numerosos autores consideran necesario monitorizar la explotación durante varios años para garantizar una mejor clasificación sanitaria del rebaño (Wells *et al.*, 2002; Kalis *et al.*, 2004). Para ello pueden emplearse técnicas serológicas (ELISA) o microbiológicas (cultivo fecal). A pesar de que el cultivo fecal es la técnica de referencia y presenta mayor sensibilidad y especificidad que el ELISA, su elevado coste y el tiempo necesario para la obtención de resultados condiciona su empleo únicamente como prueba confirmatoria. De esta forma, una gran mayoría de los planes de control desarrollados en diferentes países incluida España, se basan en muestreos anuales de una parte representativa de los animales que, de resultar positivos, son confirmados o no mediante cultivo fecal. Sin embargo, este sistema presenta varios inconvenientes derivados de las propias técnicas diagnósticas empleadas como el ELISA, que además de presentar una baja sensibilidad también muestra problemas de especificidad (Osterstock *et al.*, 2007), lo que puede conducir a una clasificación errónea de las explotaciones, y especialmente en zonas donde el tamaño de explotación es pequeño (Greiner y Dekker, 2005). Debido al alto coste que supondría analizar las explotaciones mediante cultivo fecal individual de

todos los animales, diferentes autores han propuesto como alternativa el cultivo de grupos de muestras fecales o *pools* fecales con el fin de abaratar el diagnóstico (Kalis *et al.*, 2000; Wells *et al.*, 2003; Tavornpanich *et al.*, 2004; van Schaik *et al.* 2007). Otras alternativas incluyen a las nuevas técnicas de biología molecular como la PCR, que empiezan a ser más accesibles desde un punto de vista económico, y que deben ser evaluadas para su inclusión en los mencionados programas de control.

Teniendo en cuenta todo lo expuesto, los **objetivos** principales de este trabajo fueron establecer un plan de control de la paratuberculosis de tres años de duración basado en el cultivo fecal de *pools* de todos los animales mayores de dos años presentes en las explotaciones incluidas, así como comparar la clasificación sanitaria obtenida mediante este método con respecto a los resultados serológicos obtenidos el primer año de estudio. También se comparó la utilidad del cultivo fecal de *pools* con el cultivo fecal individual para la monitorización del estatus sanitario de los rebaños, y se estudiaron dos frecuencias de muestreo para la realización de los cultivos fecales de *pools* (semestral/anual). Otro de los objetivos planteados fue la posible aplicación de este método para evaluar la reducción de la prevalencia individual tras la implantación en granja de medidas de bioseguridad y manejo higiénico. Por último, también se comparó la validez de una técnica de qPCR basada en la diana F57 en relación a los resultados obtenidos mediante cultivo fecal individual.

La **parte experimental** de este trabajo se dividió en **tres estudios**, el primero y el segundo relativos al empleo del cultivo fecal de *pools* para la monitorización de la paratuberculosis en explotaciones de ganado vacuno de leche, y el tercero enfocado a comparar los resultados obtenidos a nivel individual mediante la mencionada técnica de qPCR y mediante cultivo fecal individual. Los estudios 1 y 2 se realizaron durante los años 2009-2011 en 36 rebaños de vacuno lechero seleccionados al azar entre aquellos pertenecientes a la cooperativa AGRIS de la provincia de Lugo. Anualmente se recogieron muestras fecales de todos los animales mayores de 2 años, con una media de 1943 animales/año. Además, en el primer muestreo se recogieron también muestras de sangre a todos los animales mayores de 2 años para su análisis serológico mediante dos tests ELISA. Las muestras fecales se estratificaron según la edad de los animales y se agruparon en *pools* de 10 muestras, a partir de los cuales se realizó el cultivo microbiológico según el protocolo del *National Animal Disease Center* de EE.UU. (Stabel, 1997), habiéndose realizado una media de 198 cultivos fecales de *pools*/año. Tras la obtención de resultados del primer año, cada productor recibió un listado de pautas de bioseguridad y manejo higiénico en función de la situación de su ganadería, instándose a todos ellos a seguir dichas recomendaciones. Por otra parte, y en base a los resultados del primer muestreo, se seleccionaron entre todos los rebaños negativos al cultivo de *pools* aquellos

cinco que presentaban mayor porcentaje de seropositividad. A este grupo de explotaciones se realizó además cultivo fecal individual de todos los animales a los seis meses del segundo y tercer muestreo anual. Asumiendo que tras el último año de estudio se habían detectado todas las explotaciones infectadas, se procedió al cálculo del porcentaje de explotaciones positivas detectadas mediante el cultivo de *pools* fecales para los años 2009 y 2010, tomando como referencia los resultados obtenidos al final del estudio en 2011. También se obtuvieron estimaciones de la prevalencia individual de cada año para evaluar la evolución de la misma tras las recomendaciones de bioseguridad y manejo proporcionadas los productores. El estudio 3 se realizó entre los años 2011-2012, con un total de 91 muestras individuales procedentes de 15 explotaciones de estatus sanitario conocido y que fueron analizadas mediante una técnica de qPCR basada en la diana de copia única F57 y también mediante cultivo fecal individual, considerado *gold standard*.

Los resultados del **primer estudio** permitieron establecer una prevalencia a nivel de rebaño de 58,3-66,7% de explotaciones infectadas atendiendo a los resultados serológicos, mientras que mediante el empleo del cultivo fecal de *pools* ésta se situó en un 45,7%. A la hora de clasificar las granjas, el grado de concordancia existente entre ambas técnicas fue bajo ( $\kappa = 0,19-0,28$ ), encontrándose además diferencias estadísticamente significativas en el test de McNemar realizado entre ambas clasificaciones. Al estudiar el origen de las discrepancias, se observó que la mayoría de ellas se correspondían con explotaciones seropositivas que presentaban cultivos fecales negativos. Al comparar el resultado de los *pools* de cultivo con la presencia de animales seropositivos entre aquellos que conformaban cada *pool* tampoco se obtuvieron concordancias aceptables ( $\kappa = 0,30-0,43$ ). A continuación, se estratificó dicho análisis en función de la edad de los animales, lo que permitió observar que el mayor grado de concordancia se producía en el grupo de edad de 2 años, disminuyendo progresivamente a medida que aumentaba la edad de los animales. Este hecho, unido al anterior, hace sospechar de un problema de especificidad de las técnicas serológicas de tal manera que, a medida que aumenta la edad de los animales, también aumenta la probabilidad de contacto con otras especies de micobacterias y por tanto la probabilidad de obtener un resultado positivo a las pruebas serológicas a consecuencia de un problema de reacción cruzada (Osterstock *et al.*, 2007).

El **segundo estudio** permitió observar que el porcentaje de explotaciones positivas detectadas mediante cultivo fecal de *pools* aumentaba a cada año de muestreo, con un 56,25% de explotaciones positivas detectadas el primer año y que ascendió a un 87,50% el segundo, asumiendo que al tercer año se habían detectado el 100% de las explotaciones infectadas. Esto pone de manifiesto la utilidad de este sistema para la monitorización de los rebaños, además de la necesidad de que dicha monitorización se realice de manera continuada en el tiempo. Por otro lado, el resultado de los *pools*

de cultivo de cada año se utilizó para calcular la prevalencia individual anual mediante aproximación frecuentista y también bayesiana. De esta forma, las estimaciones de la prevalencia individual fueron de 3,30-3,65%, 2,41-2,66% y 1,66-1,86% respectivamente para cada año. Estos resultados ilustran que el cultivo microbiológico de *pools* fecales es una herramienta válida para evaluar la prevalencia individual y, por tanto, la efectividad de los protocolos de bioseguridad y manejo implantados. En relación al estudio de los factores de riesgo incluidos a nivel de explotación (tamaño de granja, política de reposición y uso de maquinaria compartida entre ganaderos), se comprobó que el tamaño de granja y el empleo de maquinaria compartida eran factores de riesgo identificados estadísticamente, pero sólo atendiendo a la clasificación sanitaria obtenida tras los tres años de estudio. Dichos factores, reconocidos ampliamente como tal en la bibliografía (Pillars *et al.*, 2009; Tiwari *et al.*, 2009), no fueron identificados en relación a las clasificaciones obtenidas en un único año, independientemente de la técnica empleada. De esto puede extraerse la conclusión de que, en el caso de estudios de factores de riesgo, éstos deben ser realizados en rebaños que presenten controles periódicos durante un mínimo de tres años. En relación a las cinco granjas seleccionadas en base al elevado porcentaje de seroprevalencia pero que habían presentado resultados negativos al cultivo fecal de *pools*, tres de ellas se confirmaron posteriormente como explotaciones positivas tanto mediante cultivo fecal de *pools* como mediante cultivo fecal individual, mientras en las dos restantes no se obtuvieron aislamientos por ninguno de los dos métodos. De manera similar, el aumento de la frecuencia del análisis de *pools* fecales de un año a seis meses tampoco mejoró la clasificación sanitaria de los rebaños, habiéndose detectado las granjas positivas de igual manera con un único muestreo anual. Por tanto, puede concluirse que, de cara a la clasificación sanitaria de las granjas, el cultivo fecal de *pools* realizado de manera anual demuestra ser una herramienta eficaz, y además resulta económicamente mucho más rentable que la realización de cultivos fecales individuales.

En el **tercer estudio**, la técnica de qPCR basada en la diana F57 presentó unas estimaciones de sensibilidad, especificidad y valores predictivos positivo y negativo relativas al cultivo fecal individual de 95,83%, 92,54%, 82,14% y 98,41% respectivamente, y con una concordancia muy buena entre ambas técnicas ( $\kappa = 0,84$ ). Por tanto, los resultados muestran que esta técnica es adecuada para sustituir al cultivo microbiológico convencional, reduciendo además en gran medida el tiempo de diagnóstico. En este estudio se encontraron cinco muestras pertenecientes a dos granjas con seguimiento negativo durante tres años que resultaron positivas a la qPCR pero que fueron negativas al cultivo fecal, aunque el número de copias de *Map* detectado fue bajo para todas ellas ( $\bar{x} = 639$  copias/g). Teniendo en cuenta que los protocolos de descontaminación utilizados para el cultivo fecal

reducen de manera significativa el número de microorganismos viables presentes en la muestra, y que hasta la fecha la diana empleada en esta qPCR se considera 100% específica de *Map*, es posible que dichas muestras fuesen realmente positivas, y que las granjas de procedencia de las mismas fuesen en realidad explotaciones con un nivel muy bajo de infección. De esta forma, esta técnica podría detectar la eliminación fecal más precozmente que las técnicas microbiológicas convencionales en aquellos casos en los que la eliminación fecal es muy baja.

## RESUMO

A **paratuberculose** é unha enterite crónica granulomatosa provocada por *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculose* (*Map*) e que afecta fundamentalmente a ruminantes (Kalis *et al.*, 2004; Wells *et al.*, 2005). Esta enfermidade formula un problema económico importante para os produtores de vacún de leite debido a que provoca redución da produción láctea, desvelle prematuro de animais e diminución do peso ao sacrificio (Benedictus *et al.*, 1987; Whittington e Sergeant, 2001). Dende un punto de vista clínico, a enfermidade non ten tratamento médico eficaz, polo que o único modo de eliminala dun rabaño pasa por establecer medidas como a vacinación e/ou a realización de programas de control. Non obstante, e debido ás reaccións cruzadas que se producen entre os integrantes do xénero *Mycobacterium*, existen limitacións por parte da Administración Pública no emprego da vacinación, xa que se producen problemas de interferencia coas probas oficiais de diagnóstico da tuberculose. Polo tanto, a única solución posible ao problema é o establecemento de programas de control que consideren a identificación das granxas afectadas e a implantación de pautas apropiadas de bioseguridade e manexo hixiénico que impidan ou minimicen tanto o risco de entrada da enfermidade coma a transmisión da mesma dentro dos rabaños infectados.

Un dos obxectivos fundamentais dos plans de control fronte á paratuberculose é establecer unha correcta clasificación sanitaria das explotacións. Debido ao carácter crónico da enfermidade e a baixa sensibilidade das diferentes probas diagnósticas, numerosos autores consideran necesario monitorizar a explotación durante varios anos para garantir unha mellor clasificación sanitaria do rabaño (Wells *et al.*, 2002; Kalis *et al.*, 2004). Para iso poden empregarse técnicas serolóxicas (ELISA) ou microbiolóxicas (cultivo fecal). A pesar de que o cultivo fecal é a técnica de referencia e presenta maior sensibilidade e especificidade que o ELISA, o seu elevado custo e o tempo necesario para a obtención de resultados condiciona o seu emprego unicamente como proba confirmatoria. Desta forma, unha gran maioría dos plans de control desenvolvidos en diferentes países incluído España, baséanse en mostraxes anuais dunha parte representativa dos animais que, de resultar positivos, son

confirmados ou non mediante cultivo fecal. Non obstante, este sistema presenta varios inconvenientes derivados das propias técnicas diagnósticas empregadas como o ELISA, que ademais de presentar unha baixa sensibilidade tamén mostra problemas de especificidade (Osterstock *et al.*, 2007), o que pode conducir a unha clasificación errónea das explotacións, e especialmente en zonas onde o tamaño de explotación é pequeno (Greiner e Dekker, 2005). Debido ao alto custo que supoñería analizar as explotacións mediante cultivo fecal individual de todos os animais, diferentes autores propuxeron como alternativa o cultivo de grupos de mostras fecais ou *pools* fecais co fin de abaratar o diagnóstico (Kalis *et al.*, 2000; Wells *et al.*, 2003; Tavornpanich *et al.*, 2004; van Schaik *et al.* 2007). Outras alternativas inclúen ás novas técnicas de bioloxía molecular como a PCR, que empezan a ser máis accesibles dende un punto de vista económico, e que se deben de avaliar para a súa inclusión nos mencionados programas de control.

Tendo en conta todo o exposto, os **obxectivos** principais deste traballo foron establecer un plan de control da paratuberculose de tres anos de duración baseado no cultivo fecal de *pools* de todos os animais maiores de dous anos presentes nas explotacións incluídas, así como comparar a clasificación sanitaria obtida mediante este método con respecto aos resultados serolóxicos obtidos o primeiro ano de estudo. Tamén se comparou a utilidade do cultivo fecal de *pools* co cultivo fecal individual para a monitorización do status sanitario dos rabaños, e estudáronse dúas frecuencias de mostraxe para a realización dos cultivos fecais de *pools* (semestral/anual). Outro dos obxectivos formulados foi a posible aplicación deste método para avaliar a redución da prevalencia individual tras a implantación en granxa de medidas de bioseguridade e manexo hixiénico. Por último, tamén se comparou a validez dunha técnica de qPCR baseada na diana F57 en relación aos resultados obtidos mediante cultivo fecal individual.

A **parte experimental** deste traballo dividiuse en **tres estudos**, o primeiro e o segundo relativos ao emprego do cultivo fecal de *pools* para a monitorización da paratuberculose en explotacións de gando vacún de leite, e o terceiro enfocado a comparar os resultados obtidos a nivel individual mediante a mencionada técnica de qPCR e mediante cultivo fecal individual. Os estudos 1 e 2 realizáronse durante os anos 2009-2011 en 36 rabaños de vacún leiteiro seleccionados ao azar entre aqueles pertencentes á cooperativa AGRIS da provincia de Lugo. Anualmente recolléronse mostras fecais de todos os animais maiores de 2 anos, cunha media de 1943 animais/ano. Ademais, na primeira mostraxe recolléronse tamén mostras de sangue a todos os animais maiores de 2 anos para a súa análise serolóxica mediante dous tests ELISA. As mostras fecais estratificáronse segundo a idade dos animais e agrupáronse en *pools* de 10 mostras, a partir dos cales se realizou o cultivo microbiolóxico segundo o protocolo do National Animal Disease Center de EUA (Stabel, 1997),



despois de realizarse unha media de 198 cultivos fecais de *pools*/ano. Tras a obtención de resultados do primeiro ano, cada produtor recibiu un listado de pautas de bioseguridade e manexo hixiénico en función da situación da súa gandaría, instándose a todos eles a seguir as devanditas recomendacións. Por outra parte, e sobre a base dos resultados da primeira mostraxe, seleccionáronse entre todos os rabaños negativos ao cultivo de *pools* aqueles cinco que presentaban maior porcentaxe de seropositividade. A este grupo de explotacións realizouse ademais cultivo fecal individual de todos os animais aos seis meses do segundo e terceira mostraxe anual. Asumindo que tras o último ano de estudo se detectaran todas as explotacións infectadas, procedeuse ao cálculo da porcentaxe de explotacións positivas detectadas mediante o cultivo de *pools* fecais para os anos 2009 e 2010, tomando como referencia os resultados obtidos ao final do estudo en 2011. Tamén se obtiveron estimacións da prevalencia individual de cada ano para avaliar a evolución desta tras as recomendacións de bioseguridade e manexo proporcionadas os produtores. O estudo 3 realizouse entre os anos 2011-2012, cun total de 91 mostras individuais procedentes de 15 explotacións de status sanitario coñecido e que foron analizadas mediante unha técnica de qPCR baseada na diana de copia única F57 e tamén mediante cultivo fecal individual, considerado gold estándar.

Os resultados do **primeiro estudo** permitiron establecer unha prevalencia a nivel de rabaño de 58,3 - 66,7% de explotacións infectadas atendendo aos resultados serolóxicos, mentres que mediante o emprego do cultivo fecal de *pools* esta se situou nun 45,7%. Á hora de clasificar as granxas, o grao de concordancia existente entre ambas as dúas técnicas foi baixo ( $\kappa = 0,19 - 0,28$ ), encontrándose ademais diferenzas estatisticamente significativas no test de McNemar realizado entre ambas as dúas clasificacións. Ao estudar a orixe das discrepancias, observouse que a maioría delas se correspondían con explotacións seropositivas que presentaban cultivos fecais negativos. Ao comparar o resultado dos *pools* de cultivo coa presenza de animais seropositivos entre aqueles que conformaban cada *pool* tampouco obtivéronse concordancias aceptables ( $\kappa = 0,30 - 0,43$ ). A continuación, estratificouse a devandita análise en función da idade dos animais, o que permitiu observar que o maior grao de concordancia se producía no grupo de idade de 2 anos, diminuindo progresivamente a medida que aumentaba a idade dos animais. Este feito, unido ao anterior, fai sospeitar dun problema de especificidade das técnicas serolóxicas de tal maneira que, a medida que aumenta a idade dos animais, tamén aumenta a probabilidade de contacto con outras especies de micobacterias e polo tanto a probabilidade de obter un resultado positivo ás probas serolóxicas a consecuencia dun problema de reacción cruzada (Osterstock *et al.*, 2007).

O **segundo estudo** permitiu observar que a porcentaxe de explotacións positivas detectadas mediante cultivo fecal de *pools* aumentaba a cada ano de mostraxe, cun 56,25% de explotacións

positivas detectadas o primeiro ano e que ascendeu a un 87,50% o segundo, asumindo que ao terceiro ano se detectaran o 100% das explotacións infectadas. Isto pon de manifesto a utilidade deste sistema para a monitorización dos rabaños, ademais da necesidade de que a devandita monitorización se realice de xeito continuado no tempo. Por outro lado, o resultado dos *pools* de cultivo de cada ano utilizouse para calcular a prevalencia individual anual mediante aproximación frecuentista e tamén bayesiana. Desta forma, as estimacións da prevalencia individual foron de 3,30-3,65%, 2,41-2,66% e 1,66-1,86% respectivamente para cada ano. Estes resultados ilustran que o cultivo microbiolóxico de *pools* fecais é unha ferramenta válida para avaliar a prevalencia individual e, polo tanto, a efectividade dos protocolos de bioseguridade e manexo implantados. En relación ao estudo dos factores de risco incluídos a nivel de explotación (tamaño de granxa, política de reposición e uso de maquinaria compartida entre gandeiros), comprobouse que o tamaño de granxa e o emprego de maquinaria compartida eran factores de risco identificados estatisticamente, pero só atendendo á clasificación sanitaria obtida tras os tres anos de estudo. Os devanditos factores, recoñecidos amplamente como tal na bibliografía (Pillars *et al.*, 2009; Tiwari *et al.*, 2009), non foron identificados en relación ás clasificacións obtidas nun único ano, independentemente da técnica empregada. Disto pode extraerse a conclusión de que, no caso de estudos de factores de risco, estes deben ser realizados en rabaños que presenten controis periódicos durante un mínimo de tres anos. En relación ás cinco granxas seleccionadas sobre a base da elevada porcentaxe de seroprevalencia pero que presentaran resultados negativos ao cultivo fecal de *pools*, tres delas confirmáronse posteriormente como explotacións positivas tanto mediante cultivo fecal de *pools* coma mediante cultivo fecal individual, mentres nas dúas restantes non se obtiveron illamentos por ningún dos dous métodos. De xeito similar, o aumento da frecuencia da análise de *pools* fecais dun ano a seis meses tampouco mellorou a clasificación sanitaria dos rabaños, despois de detectarse as granxas positivas de igual xeito cunha única mostraxe anual. Polo tanto, pode concluírse que, de cara á clasificación sanitaria das granxas, o cultivo fecal de *pools* realizado de xeito anual demostra ser unha ferramenta eficaz, e ademais resulta economicamente moito máis rendible que a realización de cultivos fecais individuais.

No **terceiro estudo**, a técnica de qPCR baseada na diana F57 presentou unhas estimacións de sensibilidade, especificidade e valores predictivos positivo e negativo relativas ao cultivo fecal individual de 95,83%, 92,54%, 82,14% e 98,41% respectivamente, e cunha concordancia moi boa entre ambas as dúas técnicas ( $\kappa = 0,84$ ). Polo tanto, os resultados mostran que esta técnica é adecuada para substituír ao cultivo microbiolóxico convencional, reducindo ademais en boa medida o tempo de diagnóstico. Neste estudo encontráronse cinco mostras pertencentes a dúas granxas con

seguimento negativo durante tres anos que resultaron positivas á qPCR pero que foron negativas ao cultivo fecal, aínda que o número de copias de *Map* detectado foi baixo para todas elas ( $\bar{x}$  = 639 copias/g). Tendo en conta que os protocolos de descontaminación utilizados para o cultivo fecal reducen de xeito significativo o número de microorganismos viables presentes na mostra, e que ata a data a diana empregada nesta qPCR se considera 100% específica de *Map*, é posible que as devanditas mostradas fosen realmente positivas, e que as granxas de procedencia destas fosen en realidade explotacións cun nivel moi baixo de infección. Deste xeito, esta técnica podería detectar a eliminación fecal máis precozmente que as técnicas microbiolóxicas convencionais naqueles casos nos que a eliminación fecal é moi baixa.

## SUMMARY

**Paratuberculosis** is a chronic granulomatous enteritis caused by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (*Map*), which mainly affects ruminants (Kalis *et al.*, 2004; Wells *et al.*, 2005). This disease sets out a major economic problem for dairy cattle producers because it causes reduction of milk production, premature culling of animals and decreased slaughter weight (Benedictus *et al.*, 1987; Whittington and Sergeant, 2001). From a clinical perspective, the disease has no effective medical treatment, so the only way to eradicate it from a herd is the establishment of measures such as vaccination and/or conducting monitoring programs. However, due to cross-reactions occurred between members of the Genus *Mycobacterium*, there are limitations on the part of the Public Administration in the use of vaccination, because interference problems occur with the official tests for diagnosis of tuberculosis. Therefore, the only possible solution to the problem is to start up control programs that include the identification of the affected farms and the implementation of appropriate biosecurity and hygiene management guidelines to prevent or minimize both the risk of disease entry and its transmission within infected herds.

One of the main objectives of the control programs against paratuberculosis is to establish a proper sanitary classification of farms. Due to the chronic nature of the disease and the low sensitivity of the available diagnostic tests, many authors consider necessary to monitor the farms for several years to ensure a better herd classification (Wells *et al.*, 2002; Kalis *et al.*, 2004). For this, serological (ELISA) or microbiological techniques (fecal culture) can be employed. Although faecal culture is considered the gold standard and has greater sensitivity and specificity than ELISA tests, the high expenses and time required to obtain results determine its use only as a confirmatory test. Thus, the vast majority of control programs developed in different countries including Spain, are

based on annual samplings of a representative number of animals, and subsequently those positive animals are confirmed or not by fecal culture. However, this system has several disadvantages derived from the employed diagnostic techniques as ELISA tests, which have a low sensitivity and also show specificity problems (Osterstock *et al.*, 2007). These failures can lead to misclassified farms, especially in areas where farm size is small (Greiner and Dekker, 2005). Because of the high cost of analyzing the herds by faecal culture of all animals, different authors have proposed alternatives like the analysis of pools of fecal samples in order to decrease the diagnosis expenses (Kalis *et al.*, 2000; Wells *et al.*, 2003; Tavoranpanich *et al.*, 2004; van Schaik *et al.*, 2007). Other alternatives include the new molecular techniques such as PCR, which are becoming more accessible from an economic point of view, and should be evaluated for their inclusion in these control programs.

Considering the above arguments, the main **objectives** of this study were to establish a control program of paratuberculosis through three years, based on the culture of fecal pools of all animals over two years present on the included herds and compare the sanitary classification obtained by this method with respect to the serological results yielded in the first year of study. The usefulness of pooled fecal culture with respect to individual faecal culture are also compared for monitoring the health status of the herds, and two frequencies of sampling (once or twice/year) for performing pooled fecal cultures were also studied. Another objective was the possible application of this method to evaluate the reduction of individual prevalence after the establishment of biosecurity and hygienic management guidelines. Finally, the validity of a qPCR technique based on the F57 target was also compared in relation to the results obtained by individual faecal culture.

The **experimental part** of this work was divided into three studies, the first and the second concerning to the use of pooled fecal culture for monitoring paratuberculosis in dairy cattle farms, and the third focused on comparing the results obtained by the mentioned qPCR technique and by faecal culture at the individual level. Studies 1 and 2 were conducted during 2009-2011 in 36 herds of dairy cattle randomly selected among those belonging to the AGRIS cooperative in the area of Lugo. Yearly, fecal samples from all animals over two years were collected, with an average of 1943 animals/year. In addition, in the first sampling blood samples were also collected from all animals over two years in order to perform a serological analysis by two ELISA tests. Fecal samples were stratified by age and grouped in pools of 10 samples, and then microbiological culture was performed according to the protocol of the National Animal Disease Center of USA (Stabel, 1997), with an average of 198 pooled fecal cultures/year. After obtaining the results from the first year, each producer received a list of biosecurity and hygienic management guidelines regarding to the

situation of their farms, and suggesting them to follow those recommendations. Additionally, and based on the results of the first sample, the five herds with the highest percentage of seropositivity from all culture-negative herds were selected. In this group of farms, pooled faecal culture and individual fecal culture was also carried out after six months of the second and third annual sampling. Assuming that after the last year of study all infected farms were detected, the percentage of positive farms detected by pooled fecal culture was calculated for the years 2009 and 2010, with reference to the results obtained at the end of the study in 2011. Estimates of individual prevalence for each year were also obtained, in order to assess the evolution after the establishment of biosecurity and hygienic management recommendations. Study 3 was conducted among 2011-2012, with 91 individual samples from 15 known-status farms. These samples were analyzed by a F57 qPCR technique and also by individual faecal culture, which is considered the gold standard.

The results of the **first study** allowed us to establish a herd-level seroprevalence of 58.3- 66.7%, while through the use of fecal culture pools the obtained percentage of infected farms was 45.7%. When classifying farms, the degree of agreement between both techniques was low ( $\kappa = 0.19$  to  $0.28$ ), along with statistically significant differences in the McNemar test conducted between both classifications. By studying the origin of the discrepancies, we observed that most of them correspond to seropositive farms that had negative fecal cultures. By comparing the result of the pooled fecal cultures with the presence of seropositive animals among those that form each pool, a poor concordance ( $\kappa = 0.30$  to  $0.43$ ) were also obtained. Subsequently, the analysis was stratified depending on the age of the animals, resulting that the greatest degree of agreement occurred in the age group of 2 years, gradually decreasing with the age of the animals. This fact, coupled with the above, lead to the suspicion of a problem of specificity of serological techniques so that, while the age of the animals increase, also increases the probability of contact with other species of mycobacteria and therefore the probability of a positive serological result as a problem of cross-reaction (Osterstock et al., 2007).

The **second study** allowed us to observe that the percentage of positive farms detected by pooled fecal culture increased each year, with a 56.25% positive farms detected the first year and 87.50% in the second, assuming that the third year had been detected 100% of the infected herds. This demonstrates the usefulness of this system for monitoring herds, coupled with the need for monitoring continuously over time. Furthermore, the results of pooled fecal cultures obtained each year were used to calculate the individual prevalence by Frequentist and Bayesian approaches. Thus, estimates of the prevalence individually were 3.30 to 3.65%, 2.41 to 2.66% and 1.66 to 1.86% respectively for each year. These results illustrate that the pooled fecal culture is a valid tool to

assess the individual prevalence of a population, and therefore the effectiveness of the management and biosecurity protocols implemented. In relation to the study of the risk factors at farm level included (farm size, replacement policy and use of shared farm machinery among farmers), it was found that farm size and the use of shared equipment were identified statistically as risk factors but only with regard to the final farm classification obtained after three years of study. These factors, widely recognized in the literature (Pillars *et al.*, 2009; Tiwari *et al.*, 2009), were not identified with respect to the farm classification obtained for a unique sampling, regardless of the employed technique. From this, it can be concluded that in the case of risk factors studies, these should be made in herds that present periodic checks for at least the last three years. In relation to the five selected farms based on the high percentage of seroprevalence but with negative faecal cultures the first year, three of them were identified as positive farms in subsequent samplings either by pooled faecal culture and individual faecal culture, while the other two herds remained as negative by both methods. Similarly, the increase in the frequency of analysis by pooled faecal culture from once to twice a year did not improve the sanitary classification of the farms. Therefore, we can conclude that, with regard to the sanitary classification of farms, pooled faecal cultures performed annually seems to be an effective tool, and it is economically more profitable than using individual faecal cultures.

In the **third study**, the F57 qPCR technique presented estimates of sensitivity, specificity and positive predictive values and negative of 95.83%, 92.54%, 82.14% and 98, 41% respectively relating to individual faecal culture, and with a very good agreement between both techniques ( $\kappa = 0.84$ ). Therefore, the results show that this technique is suitable to replace conventional microbiological culture, also greatly reducing the delay of the diagnosis. In this study, five samples from two farms with negative results for three years were found positive by qPCR but negative by faecal culture, although the number of copies of *Map* detected was low for all of them ( $x = 639$  copies/g). Considering that decontamination protocols used for faecal culture significantly reduced the number of viable microorganisms present in the sample, and the target used in this qPCR is considered 100% specific *Map*, it is possible that these samples were really positive, and the farms of origin of these samples were, in fact, infected in a very low level. Thus, this technique could detect faecal elimination earlier than conventional microbiological techniques in those cases where the faecal shedding is very low.



## VII. BIBLIOGRAFÍA





- Abbas, B., Riemann, H., Lonnerdal, B., 1983. Isolation of specific peptides from *Mycobacterium paratuberculosis* protoplasm and their use in an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of paratuberculosis (Johne's disease) in cattle. *Am. J. Vet. Res.* 44, 2229-2236.
- Abubakar, I., Myhill, D., Aliyu, S., Hunter, P., 2008. Detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* from patients with Crohn's disease using nucleic acid-based techniques: a systematic review and meta-analysis. *Inflamm. Bowel Dis.* 14, 401-410.
- Adaska, J., Anderson, R., 2003. Seroprevalence of Johne's-disease infection in dairy cattle in California, USA. *Prev. Vet. Med.* 60, 255-261.
- Aduriz, G., Juste, R., Garrido, J., Geijo, M., 2000. Epidemiología y control de la paratuberculosis bovina. *Bovis* 93, 63-93.
- Aduriz, J., 1993. Epidemiología, diagnóstico y control de la paratuberculosis ovina en la Comunidad Autónoma del País Vasco. Universidad de Zaragoza, Aragón, España.
- Aduriz, J., Juste, R., Cortabarria, N., 1995. Lack of mycobactin dependence of mycobacteria isolated on Middlebrook 7H11 from clinical cases of ovine paratuberculosis. *Vet. Microbiol.* 45, 211-217.
- Alexejeff-Goloff, N., 1935. The pathogenesis and excretion of the bacilli in bovine paratuberculosis (Johne's disease). *J. Comp. Pathol. Ther.* 48, 81-82.
- Alinovi, C., Ward, M., Lin, T., Moore, G., Wu, C., 2009. Real-time PCR, compared to liquid and solid culture media and ELISA, for the detection of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*. *Vet. Microbiol.* 136, 177-9.
- Allen, W., Saba, N., Patterson, D., 1968. *Mycobacterium johnei* infection of cattle: the effect of corticotrophin and anabolic steroids. *Vet. Rec.* 82, 562-567.
- Alonso, S., Pethe, K., Russell, D., Purdy, G., 2007. Lysosomal killing of *Mycobacterium* mediated by ubiquitin-derived peptides is enhanced by autophagy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 6031-6036.
- Aly, S., Thurmond, M., 2005. Evaluation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection of dairy cows attributable to infection status of the dam. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 227, 450-454.
- Anderson, J., Meece, J., Koziczowski, J., Clark, D., Radcliff, R., Nolden, C., Samuel, M., Ellingson, J., 2007. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in scavenging mammals in Wisconsin. *J. Wildl. Dis.* 43, 302-8.
- Aranaz, A., de Juan, L., Bezos, J., Álvarez, J., Romero, B., Lozano, F., Paramio, J., López-Sánchez, J., Mateos, A., Domínguez, L., 2006. Assessment of diagnostic tools for eradication of bovine tuberculosis in cattle co-infected with *Mycobacterium bovis* and *M. avium* subsp. *paratuberculosis*. *Vet. Res.* 37, 593-606.
- Arrigoni, N., Belletti, G.L., Cammi, G., Losini, I., Taddei, R., Tamba, M., 2007. Survey on paratuberculosis prevalence in dairy herds of the Lombardia Region (Italy), en: Manning, E., Nielsen, S. (Eds.), Proceedings of the 8th International Colloquium on Paratuberculosis. International Association for Paratuberculosis, Copenhagen, Denmark, pp. 196-197.
- Arruda, S., Bomfim, G., Knights, R., Huima-Byron, T., Riley, L., 1993. Cloning of an *M. tuberculosis* DNA fragment associated with entry and survival inside cells. *Science* 261, 1454-1457.
- Autschbach, F., Eisold, S., Hinz, U., Zinser, S., Linnebacher, M., Giese, T., Löffler, T., Büchler, M., Schmidt, J., 2005. High prevalence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* IS900 DNA in gut tissues from individuals with Crohn's disease. *Gut* 54, 944-949.
- Ayele, W., Bartos, M., Svastova, P., Pavlik, I., 2004. Distribution of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in organs of naturally infected bull-calves and breeding bulls. *Vet. Microbiol.* 103, 209-217.

- Ayele, W., Svastova, P., Roubal, P., Bartos, M., Pavlik, I., 2005. *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* cultured from locally and commercially pasteurized cow's milk in the Czech Republic. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 1210-1214.
- Bach, S., Selinger, L., Stanford, K., McAllister, T., 2005. Effect of supplementing corn-or barley-based feedlot diets with canola oil on faecal shedding of *Escherichia coli* O157: H7 by steers. *J. Appl. Microbiol.* 98, 464-475.
- Badiola, J., García de Jalón, J., Cuervo, L., 1980. Paratuberculosis ovina. *An. Fac. Vet. Zaragoza XIV-XV*, 14-15.
- Bakker, D., 2010. Paratuberculosis control measures in Europe, en: Behr, M., Collins, D. (Eds.), *Paratuberculosis: Organism, Disease, Control*. CAB International, Preston, UK, pp. 306-318.
- Bakker, D., Willemsen, P., 2006. Evaluation of paratuberculosis vaccination studies in the Netherlands, en: VENoMYC (Ed.), *VENoMYC, Use of vaccines in the control of tuberculosis and paratuberculosis*. VENoMYC, Laguardia, Euskadi, España.
- Ballagi-Pordany, A., Belak, S., 1996. The use of mimics as internal standards to avoid false negatives in diagnostic PCR. *Mol. Cell. Probes* 10, 159-164.
- Balseiro, A., Espí, A., Prieto, J., 2004. Prevalencia de la paratuberculosis bovina en Asturias, en: IX Congreso Internacional de Medicina Bovina, ANEMBE. Gijón, Spain, pp. 26-27.
- Balseiro, A., Prieto, J., Espí, A., Pérez, V., García-Marín, J., 2003. Presence of focal and multifocal paratuberculosis lesions in mesenteric lymph nodes and the ileocaecal valve of cattle positive to the tuberculin skin test. *Vet. J.* 166, 210-212.
- Bang, D., Herlin, T., Stegger, M., Andersen, A., Torkko, P., Tortoli, E., Thomsen, V., 2008. *Mycobacterium arosiense* sp. nov., a slowly growing, scotochromogenic species causing osteomyelitis in an immunocompromised child. *J. Syst. Evol. Microbiol.* 58, 2398-2402.
- Bannantine, J., Bayles, D., Waters, W., Palmer, M., Stabel, J., Paustian, M., 2008. Early antibody response against *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* antigens in subclinical cattle. *Proteome Sci.* 6, 5.
- Bannantine, J., Huntley, J., Miltner, E., Stabel, J., Bermudez, L., 2003. The *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* 35 kDa protein plays a role in invasion of bovine epithelial cells. *Microbiology* 149, 2061-2069.
- Bannantine, J., Paustian, M., Kapur, V., Eda, S., 2010. Proteome and antigens of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, en: Behr, M., Collins, D. (Eds.), *Paratuberculosis: Organism, Disease, Control*. CAB International, Preston, UK, pp. 94-108.
- Bannantine, J., Stabel, J., 2001. Identification of two *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* gene products differentially recognised by sera from rabbits immunised with live mycobacteria but not heat-killed mycobacteria. *J. Med. Microbiol.* 50, 795-804.
- Bannantine, J., Stabel, J., 2000. *HspX* is present within *Mycobacterium paratuberculosis*-infected macrophages and is recognized by sera from some infected cattle. *Vet. Microbiol.* 76, 343-58.
- Bannantine, J.P., Baechler, E., Zhang, Q., Li, L., Kapur, V., 2002. Genome scale comparison of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* with *Mycobacterium avium* subsp. *avium* reveals potential diagnostic sequences. *J. Clin. Microbiol.* 40, 1303-10.
- Bannantine, J.P., Paulson, A.L., Chacon, O., Fenton, R.J., Zinniel, D.K., McVey, D.S., Smith, D.R., Czuprynski, C.J., Barletta, R.G., 2011. Immunogenicity and reactivity of novel *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* PPE MAP1152 and conserved MAP1156 proteins with sera from experimentally and naturally infected animals. *Clin. Vaccine Immunol.* 18, 105-12.
- Barclay, R., Ewing, D., Ratledge, C., 1985. Isolation, identification, and structural analysis of the mycobactins of *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, *Mycobacterium scrofulaceum*, and *Mycobacterium paratuberculosis*. *J. Bacteriol.* 164, 896-903.

- Bartos, M., Hložek, P., Svastova, P., Dvorska, L., Bull, T., Matlova, L., Parmova, I., Kuhn, I., Stubbs, J., Moravkova, M., Kintr, J., Beran, V., Melicharek, I., Ocepek, M., Pavlik, I., 2006. Identification of members of *Mycobacterium avium* species by Accu-Probes, serotyping, and single IS900, IS901, IS1245 and IS901-flanking region PCR with internal standards. *J. Microbiol. Methods* 64, 333-345.
- Basler, T., Geffers, R., Weiss, S., Valentin-Weigand, P., Goethe, R., 2008. *Mycobacterium avium* subspecies induce differential expression of pro-inflammatory mediators in a murine macrophage model: evidence for enhanced pathogenicity of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Immunobiology* 213, 879-888.
- Bassey, E., Collins, M., 1997. Study of T-lymphocyte subsets of healthy and *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*-infected cattle. *Infect. Immun.* 65, 4869-4872.
- Bates, D., Mächler, M., Bolker, B., Walker, S., 2014. Fitting linear mixed-effects models using lme4. *J. Stat. Softw.* In Press.
- Baumgartner, W., Damoser, J., Khol, J., 2005. Comparison of two studies concerning the prevalence of bovine paratuberculosis (Johne's disease) in Austrian cattle in the years 1995-97 and 2002/03. *Wien. Tierarztl. Monatsschr.* 92, 274-277.
- Baumgartner, W., Khol, J.L., 2008. Paratuberculosis – potentials and limits of control programs, en: World Association for Buiatrics (Ed.), XXV Jubilee World Buiatrics Congress. World Association for Buiatrics, Budapest, Hungría, pp. 7-10.
- Beam, R., Stottmeier, K., Kubica, G., 1969. Purified protoplasmic peptides of mycobacteria: isolation of species-specific peptides from protoplasm of mycobacteria. *J. Bacteriol.* 100, 195-200.
- Beard, P., Daniels, M., Henderson, D., Pirie, A., Rudge, K., Buxton, D., Rhind, S., Greig, A., Hutchings, M., McKendrick, I., Stevenson, K., Sharp, J., 2001a. Paratuberculosis infection of nonruminant wildlife in Scotland. *J. Clin. Microbiol.* 39, 1517-21.
- Beard, P., Henderson, D., Daniels, M., Pirie, A., Buxton, D., Greig, A., Hutchings, M., McKendrick, I., Rhind, S., Stevenson, K., Sharp, J., 1999. Evidence of paratuberculosis in fox (*Vulpes vulpes*) and stoat (*Mustela erminea*). *Vet. Rec.* 145, 612-613.
- Beard, P., Rhind, S., Buxton, D., Daniels, M., Henderson, D., Pirie, A., Rudge, K., Greig, A., Hutchings, M., Stevenson, K., Sharp, J., 2001b. Natural paratuberculosis infection in rabbits in Scotland. *J. Comp. Pathol.* 124, 290-9.
- Beard, P., Stevenson, K., Pirie, A., Rudge, K., Buxton, D., Rhind, S.M., Sinclair, M., Wildblood, L., Jones, D., Sharp, J.M., 2001c. Experimental paratuberculosis in calves following inoculation with a rabbit isolate of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.* 39, 3080-4.
- Bech-Nielsen, S., Jørgensen, J., Ahrens, P., Feld, N., 1992. Diagnostic accuracy of a *Mycobacterium phlei*-absorbed serum enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of bovine paratuberculosis in dairy cows. *J. Clin. Microbiol.* 30, 613-618.
- Begg, D., Griffin, J., 2005. Vaccination of sheep against *M. paratuberculosis*: immune parameters and protective efficacy. *Vaccine* 23, 4999-5008.
- Begg, D., Whittington, R., 2008. Experimental animal infection models for Johne's disease, an infectious enteropathy caused by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Vet. J.* 176, 129-145.
- Behr, M., 2010. Paratuberculosis and Crohn's disease, en: Behr, M., Collins, D. (Eds.), *Paratuberculosis: Organism, Disease, Control*. CAB International, Preston, UK, pp. 40-49.
- Behrens, H., 1955. Die paratuberkulöse des schafes. *Dtsch. Tierarztl. Wochenschrift* 13-14, 133-134.

- Belisle, J., Klaczkiewicz, K., Brennan, P., Jacobs, W.J., Inamine, J., 1993. Rough morphological variants of *Mycobacterium avium*. Characterization of genomic deletions resulting in the loss of glycopeptidolipid expression. *J. Biol. Chem.* 268, 10517-10523.
- Belknap, E., Getzy, D., Johnson, L., Ellis, R., Thompson, G., Shulaw, W., 1994. *Mycobacterium paratuberculosis* infection in two llamas. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 204, 1805-1808.
- Belloli, A., Arrigoni, N., Belletti, G., Proverbio, D., Greppi, G., Vacirca, G., 1995. First result of paratuberculosis therapy in calves intravenously infected with *Mycobacterium paratuberculosis*, en: Chiodini, R., Collins, M., Basse, E. (Eds.), *Proceedings of the 4th International Colloquium on Paratuberculosis*. International Association for Paratuberculosis, Cambridge, UK, pp. 144-146.
- Ben Salah, I., Adékambi, T., Raoult, D., Drancourt, M., 2008. *rpoB* sequence-based identification of *Mycobacterium avium* complex species. *Microbiology* 154, 3715-3723.
- Benedictus, G., 1984. Evaluation of the organized control of paratuberculosis in the province of Friesland. *Tijdschr. Diergeneesk.* 109, 905-916.
- Benedictus, G., Bosma, J., 1985. Paratuberculosis: A surgical method of diagnosis in practice. *Vet. Q.* 7, 217-221.
- Benedictus, G., Dijkhuizen, A., Stelwagen, J., 1987. Economic losses due to paratuberculosis in dairy cattle. *Vet. Rec.* 121, 142-146.
- Benedictus, G., Dijkhuizen, A., Stelwagen, J., 1985. Economic losses to farms due to paratuberculosis in cattle. *Tijdschr. Diergeneesk.* 110, 310-319.
- Benedictus, G., Dinkla, E., Wentink, G., 1988. Preliminary results of vaccination against paratuberculosis in adult dairy cattle, en: Thorel, M., Merkal, R. (Eds.), *Proceedings of the 2nd International Colloquium on Paratuberculosis*. LCRV, Maisons-Alfort, France, pp. 136-140.
- Benedictus, G., Kalis, C., 2002. Paratuberculosis: eradication, control and diagnostic methods. *Acta Vet. Scand.* 44, 231-241.
- Benedictus, G., Verhoeff, J., Schukken, Y., Hesselink, J., 2000. Dutch paratuberculosis programme history, principles and development. *Vet. Microbiol.* 77, 399-413.
- Benedictus, G., Verhoeff, J., Schukken, Y., Hesselink, J., 1999. Dutch paratuberculosis program: history, principles and development, en: Manning, E., Collins, D. (Eds.), *Proceedings of the 6th International Colloquium on Paratuberculosis*. International Association for Paratuberculosis, Melbourne, Australia, pp. 9-21.
- Bernstein, C., Blanchard, J., Rawsthorne, P., Collins, M., 2004. Population-based case control study of seroprevalence of *Mycobacterium paratuberculosis* in patients with Crohn's disease and ulcerative colitis. *J. Clin. Microbiol.* 42, 1129-1135.
- Beyerbach, M., Ortmann, G., Gerlach, G., Homuth, M., Strutzberg, K., Kreienbrock, L., 2004. Considerations concerning diagnostic certainties and cut-off values for a bulk milk ELISA for *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*. *Dtsch. Tierarztl. Wochenschrift* 111, 220-225.
- Biet, F., Bay, S., Thibault, V., Euphrasie, D., Grayon, M., Ganneau, C., Lanotte, P., Daffe, M., Gokhale, R., Etienne, G., Reyrat, J., 2008. Lipopentapeptide induces a strong host humoral response and distinguishes *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from *M. avium* subsp. *avium*. *Vaccine* 26, 257-268.
- Billman-Jacobe, H., Carrigan, M., Cockram, F., Corner, L., Gill, I., Hill, J., Jessep, T., Milner, A., Wood, P., 1992. A comparison of the interferon gamma assay with the absorbed ELISA for the diagnosis of Johne's disease in cattle. *Aust. Vet. J.* 69, 25-28.

- Blackmore, T., Manning, L., Taylor, W., Wallis, R., 2008. Therapeutic use of infliximab in tuberculosis to control severe paradoxical reaction of the brain and lymph nodes. *Clin. Infect. Dis.* 47, e83-e85.
- Blood, D., Radostits, O., 1989. Paratuberculosis (Johne's disease), en: Blood, D., Radostits, O. (Eds.), *Veterinary Medicine*. Baillière & Tindall, London, UK, pp. 722-729.
- Boelaert, F., Walravens, K., Biront, P., Vermeersch, J.P., Berkvens, D., Godfroid, J., 2000. Prevalence of paratuberculosis (Johne's disease) in the Belgian cattle population. *Vet. Microbiol.* 77, 269-281.
- Bögli-Stuber, K., Kohler, C., Seitert, G., Glanemann, B., Antognoli, M., Salman, M., Wittenbrink, M., Wittwer, M., Wassenaar, T., Jemmi, T., Bissig-Choisat, B., 2005. Detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in Swiss dairy cattle by real-time PCR and culture: a comparison of the two assays. *J. Appl. Microbiol.* 99, 587-97.
- Bohm, R., Ley, T., 1994. Disinfection of *Mycobacterium paratuberculosis* in cattle slurry, en: Proc. 8th. Internat. Congress on Animal Hygiene. St. Paul, Minnesota, pp. 12-16.
- Bölske, G., Herthnek, D., 2010. Diagnosis of paratuberculosis by PCR, en: Behr, M., Collins, D. (Eds.), *Paratuberculosis: Organism, Disease, Control*. CAB International, Preston, UK, pp. 267-283.
- Borody, T., Leis, S., Warren, E., Surace, R., 2002. Treatment of severe Crohn's disease using antimycobacterial triple therapy—approaching a cure? *Dig. Liver Dis.* 34, 29-38.
- Bosshard, C., Stephan, R., Tasara, T., 2006. Application of an F57 sequence-based real-time PCR assay for *Mycobacterium paratuberculosis* detection in bulk tank raw milk and slaughtered healthy dairy cows. *J. Food Prot.* 69, 1662-1667.
- Brennan, P., Goren, M., 1979. Structural studies on the type-specific antigens and lipids of the *Mycobacterium avium-Mycobacterium intracellulare-Mycobacterium scrofulaceum* serocomplex: *Mycobacterium intracellulare* serotype 9. *J. Biol. Chem.* 254, 4205-4211.
- Brey, B.J., Radcliff, R.P., Clark, D.L., Ellingson, J.L.E., 2006. Design and development of an internal control plasmid for the detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* using real-time PCR. *Mol. Cell. Probes* 20, 51-9.
- Brotherston, J., Gilmour, N., Samuel, J., 1961. Quantitative studies of *Mycobacterium johnei* in the tissues of sheep: II. Protection afforded by dead vaccines. *J. Comp. Pathol. Ther.* 71, 300-310.
- Buergelt, C., Hall, C., McEntee, K., Duncan, J., 1978. Pathological evaluation of paratuberculosis in naturally infected cattle. *Vet. Pathol.* 15, 196-207.
- Buergelt, C., Williams, E., 2003. In utero infection of pregnant cattle by *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* detected by nested polymerase chain reaction. *J. Appl. Res. Vet. Med.* 1, 279-284.
- Bull, T., Hermon-Taylor, J., Pavlik, I., El-Zaatari, F., Tizard, M., 2000. Characterization of IS900 loci in *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and development of multiplex PCR typing. *Microbiology* 146, 2185-2197.
- Bull, T., McMinn, E., Sidi-Boumedine, K., Skull, A., Durkin, D., Neild, P., Rhodes, G., Pickup, R., Hermon-Taylor, J., 2003. Detection and verification of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in fresh ileocolonic mucosal biopsy specimens from individuals with and without Crohn's disease. *J. Clin. Microbiol.* 41, 2915-2923.
- Bundesministerium für Verbraucherschutz Ernährung und Landwirtschaft, 2005. Leitlinien für den Umgang mit der Paratuberkulose in Wiederkäuerbeständen (Paratuberkuloseleitlinien).
- Burrells, C., Clarke, C., Colston, A., Kay, J., Porter, J., Little, D., Sharp, J., 1999. Interferon-gamma and interleukin-2 release by lymphocytes derived from the blood, mesenteric lymph nodes and intestines of normal sheep and those affected with paratuberculosis (Johne's disease). *Vet. Immunol. Immunopathol.* 68, 139-148.

- Burton, M., Olsen, J., Ball, R., Dumonceaux, G., 2001. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in an addax (*Addax nasomaculatus*). J. Zoo Wildl. Med. 32, 242-244.
- Butler, W., Thibert, L., Kilburn, J., 1992. Identification of *Mycobacterium avium* complex strains and some similar species by high-performance liquid chromatography. J. Clin. Microbiol. 30, 2698-2704.
- Cameron, J., 1956. Isolation of *Mycobacterium johnei* from faeces. J. Pathol. Bacteriol. 71, 223-225.
- Carrigan, M., Seaman, J., 1990. The pathology of Johne's disease in sheep. Aust. Vet. J. 67, 47-50.
- Carta, T., Álvarez, J., Pérez de la Lastra, J.M., Gortázar, C., 2013. Wildlife and paratuberculosis: a review. Res. Vet. Sci. 94, 191-197.
- Casali, N., Riley, L., 2007. A phylogenomic analysis of the *Actinomycetales mce* operons. BMC Genomics 8, 60.
- Casella, G., George, E., 1992. Explaining the Gibbs sampler. Am. Stat. 46, 167-174.
- Cernicchiaro, N., Wells, S., Janagama, H., Sreevatsan, S., 2008. Influence of type of culture medium on characterization of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* subtypes. J. Clin. Microbiol. 46, 145-149.
- Chacon, O., Bermudez, L., Barletta, R., 2004. Johne's disease, inflammatory bowel disease, and *Mycobacterium paratuberculosis*. Annu. Rev. Microbiol. 58, 329-363.
- Chamberlin, W., Naser, S., 2006. Integrating theories of the etiology of Crohn's disease: questioning the hypotheses. Med. Sci. Rev. 12, RA27-RA33.
- Chatterjee, D., Khoo, K., 2001. The surface glycopeptidolipids of mycobacteria: structures and biological properties. Cell. Mol. Life Sci. 58, 2018-2042.
- Chiodini, R., 1996. Immunology: resistance to paratuberculosis. Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract. 12, 313-343.
- Chiodini, R., 1989. Crohn's disease and the mycobacterioses: a review and comparison of two disease entities. Clin. Microbiol. Rev. 2, 90-117.
- Chiodini, R., van Kruijning, H., 1983. Eastern white-tailed deer as a reservoir of ruminant paratuberculosis. J. Am. Vet. Med. Assoc. 182, 168-169.
- Chiodini, R., Van Kruijning, H., Merkal, R., 1984a. Ruminant paratuberculosis (Johne's disease): the current status and future prospects. Cornell Vet. 74, 218-262.
- Chiodini, R., Van Kruijning, H., Merkal, R., Thayer, W., Coutu, J., 1984b. Characteristics of an unclassified *Mycobacterium* species isolated from patients with Crohn's disease. J. Clin. Microbiol. 20, 966-971.
- Chiodini, R., Van Kruijning, H., Thayer, W., Coutu, J., 1986. Spheroplastic phase of mycobacteria isolated from patients with Crohn's disease. J. Clin. Microbiol. 24, 357-363.
- Chiodini, R.J., Hermon-Taylor, J., 1993. The thermal resistance of *Mycobacterium paratuberculosis* in raw milk under conditions simulating pasteurization. J. Vet. Diagn. Invest. 5, 629-31.
- Cho, D., Collins, M., 2006. Comparison of the proteomes and antigenicities of secreted and cellular proteins produced by *Mycobacterium paratuberculosis*. Clin. Vaccine Immunol. 13, 1155-1161.
- Cho, D., Sung, N., Collins, M.T., 2006. Identification of proteins of potential diagnostic value for bovine paratuberculosis. Proteomics 6, 5785-94.

- Cho, J., 2008. The genetics and immunopathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 458-466.
- Chongsuvivatwong, V., 2012. Epicalc: Epidemiological Calculator. R package version 2.14.1.6.
- Christopher-Hennings, J., Dammen, M., Weeks, S., Epperson, W., Singh, S., Steinlicht, G., Fang, Y., Skaare, J., Larsen, J., Payeur, J., Nelson, E., 2003. Comparison of two DNA extractions and nested PCR, Real-Time PCR, a new commercial PCR assay, and bacterial culture for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in bovine feces. *J. Vet. Diagnostic Investig.* 15, 87-93.
- Chui, L., King, R., Lu, P., Manninen, K., Sim, J., 2004. Evaluation of four DNA extraction methods for the detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* by polymerase chain reaction. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 48, 39-45.
- Clark, D.L., Anderson, J.L., Koziczkowski, J.J., Ellingson, J.L.E., 2006. Detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* genetic components in retail cheese curds purchased in Wisconsin and Minnesota by PCR. *Mol. Cell. Probes* 20, 197-202.
- Clarke, C., 1997. The pathology and pathogenesis of paratuberculosis in ruminants and other species. *J. Comp. Pathol.* 116, 217-261.
- Clarke, C., Little, D., 1996. The pathology of ovine paratuberculosis: gross and histological changes in the intestine and other tissues. *J. Comp. Pathol.* 114, 419-437.
- Clarke, C., Patterson, I., Armstrong, K., Low, J., 1995. Comparison of the absorbed ELISA and agar gel immunodiffusion test with clinicopathological findings in ovine clinical paratuberculosis. *Vet. Rec.* 139, 618-621.
- Clarkston, W., Presti, M., Petersen, P., Zachary Jr, P., Fan, W., Leonardi, C., Vernava III, A., Longo, W., Kreeger, J., 1998. Role of *Mycobacterium paratuberculosis* in Crohn's disease. *Dis. colon rectum* 41, 195-199.
- Cocito, C., Gilot, P., Coene, M., de Kesel, M., Poupart, P., Vannuffel, P., 1994. Paratuberculosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 7, 328-45.
- Coetsier, C., Havaux, X., Mattelard, F., Sadatte, S., Cormont, F., Buergelt, K., Limbourg, B., Latinne, D., Bazin, H., Deneff, J., Cocito, C., 1998. Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in infected tissues by new species-specific immunohistological procedures. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 5, 446-451.
- Coetsier, C., Vannuffel, P., Blondeel, N., Deneff, J.-F., Cocito, C., Gala, J.-L., 2000. Duplex PCR for differential identification of *Mycobacterium bovis*, *M. avium*, and *M. avium* subsp. *paratuberculosis* in formalin-fixed paraffin-embedded tissues from cattle. *J. Clin. Microbiol.* 38, 3048-3054.
- Cole, S., Brosch, R., Parkhill, J., Garnier, T., Churcher, C., Harris, D., Gordon, S., Eiglmeier, K., Gas, S., Barry, C., Tekaia, F., Badcock, K., Basham, D., Brown, D., Chillingworth, T., Connor, R., Davies, R., Devlin, K., Feltwell, T., Gentles, S., Hamlin, N., Holroyd, S., Hornsby, T., Jagels, K., Krogh, A., McLean, J., Moule, S., Murphy, L., Oliver, K., Osborne, J., Quail, M., Rajandream, M., Rogers, J., Rutter, S., Seeger, K., Skelton, J., Squares, R., Squares, S., Sulston, J., Taylor, K., Whitehead, S., Barrell, B., 1998. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* 393, 537-544.
- Colgrove, G., Thoen, C., Blackburn, B., Murphy, C., 1989. Paratuberculosis in cattle: a comparison of three serologic tests with results of fecal culture. *Vet. Microbiol.* 19, 183-187.
- Collins, D., Gabric, D., De Lisle, G., 1989. Identification of a repetitive DNA sequence specific to *Mycobacterium paratuberculosis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 60, 175-178.
- Collins, D., Stephens, D., De Lisle, G., 1993. Comparison of polymerase chain reaction tests and faecal culture for detecting *Mycobacterium paratuberculosis* in bovine faeces. *Vet. Microbiol.* 36, 289-299.

- Collins, M., 2003. Update on paratuberculosis: 1. Epidemiology of Johne's disease and the biology of *Mycobacterium paratuberculosis*. Ir. Vet. J. 56, 565-574.
- Collins, M., 1996. Diagnosis of paratuberculosis. Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract. 12, 357-371.
- Collins, M., Kenefick, K., Sockett, D., Lambrecht, R., McDonald, J., Jørgensen, J., 1990. Enhanced radiometric detection of *Mycobacterium paratuberculosis* by using filter-concentrated bovine fecal specimens. J. Clin. Microbiol. 28, 2514-2519.
- Collins, M., Lisby, G., Moser, C., Chicks, D., Christensen, S., Reichelderfer, M., Høiby, N., Harms, B., Thomsen, O., Skibsted, U., Binder, V., 2000. Results of multiple diagnostic tests for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in patients with Inflammatory Bowel Disease and in controls. J. Clin. Microbiol. 38, 4373-4381.
- Collins, M., Sockett, D., 1993. Accuracy and economics of the USDA-licensed enzyme-linked immunosorbent assay for bovine paratuberculosis. J. Am. Vet. Med. Assoc. 203, 1456-1463.
- Collins, M., Sockett, D., Goodger, W., Conrad, T., Thomas, C., Carr, D., 1994. Herd prevalence and geographic distribution of, and risk factors for, bovine paratuberculosis in Wisconsin. J. Am. Vet. Med. Assoc.
- Collins, M., Sockett, D., Ridge, S., Cox, J., 1991. Evaluation of a commercial enzyme-linked immunosorbent assay for Johne's disease. J. Clin. Microbiol. 29, 272-276.
- Collins, M., Wells, S., Petrini, K., Collins, J., Schultz, R., Whitlock, R., 2005. Evaluation of five antibody detection tests for diagnosis of bovine paratuberculosis. Clin. Vaccine Immunol. 12, 685-692.
- Colston, A., McConnell, I., Bujdoso, R., 1994. Cloning and expression in *Escherichia coli* of DNA encoding a 60 kDa stress protein of *Mycobacterium paratuberculosis*, the causative agent of Johne's disease. Microbiology 140, 3329-3336.
- Consellería de Medio Rural e do Mar, 2012. Anuario de Estadística Agraria 2007. Xunta de Galicia. Consellería de Medio Rural e do Mar.
- Cook, K., Britt, J., 2007. Optimization of methods for detecting *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in environmental samples using quantitative, real-time PCR. J. Microbiol. Methods 69, 154-160.
- Corn, J., Manning, E., Sreevatsan, S., Fischer, J., 2005. Isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from free-ranging birds and mammals on livestock premises. Appl. Environ. Microbiol. 71, 6963-6967.
- Corpa, J., García-Marín, J., Pérez, V., 1998. Diagnóstico de paratuberculosis en ganado vacuno. Med. Vet. 15, 618-624.
- Corpa, J., Garrido, J., García-Marín, J., Pérez, V., 2000a. Classification of lesions observed in natural cases of paratuberculosis in goats. J. Comp. Pathol. 122, 255-65.
- Corpa, J., Pérez, V., Sánchez, M., García-Marín, J., 2000b. Control of paratuberculosis (Johne's disease) in goats by vaccination of adult animals. Vet. Rec. 146, 195-196.
- Cousins, D., Evans, R., Francis, B., 1995. Use of BACTEC radiometric culture method and polymerase chain reaction for the rapid screening of faeces and tissues for *Mycobacterium paratuberculosis*. Aust. Vet. J. 72, 458-462.
- Cousins, D., Whittington, R., Marsh, I., Masters, A., Evans, R., Kluver, P., 1999. Mycobacteria distinct from *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolated from the faeces of ruminants possess IS900-like sequences detectable by IS900 polymerase chain reaction: implications for diagnosis. Mol. Cell. Probes 13, 431-442.
- Coussens, P., 2004. Model for immune responses to *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in cattle. Infect. Immun. 72, 3089-3096.



- Coussens, P., Lamont, E., Kabara, E., Sreevatsan, S., 2010. Host-pathogen interactions and intracellular survival of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, en: Behr, M., Collins, D. (Eds.), *Paratuberculosis: Organism, Disease, Control*. CAB International, Preston, UK, pp. 109-125.
- Coussens, P., Verman, N., Coussens, M., Elftman, M., McNulty, A., 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. Immunity* 72, 1409-1422.
- Cowling, D., Gardner, I., Johnson, W., 1999. Comparison of methods for estimation of individual-level prevalence based on pooled samples. *Prev. Vet. Med.* 39, 211-25.
- Cray, W., Moon, H., 1995. Experimental infection of calves and adult cattle with *Escherichia coli* O157: H7. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 1586-1590.
- Crohn, B., Ginzburg, L., Oppenheimer, G., 1932. Regional ileitis: a pathologic and clinical entity. *J. Am. Med. Assoc.* 99, 1323-1329.
- Crossley, B., Zagmutt-Vergara, F., Fyock, T., Whitlock, R., Gardner, I., 2005. Fecal shedding of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* by dairy cows. *Vet. Microbiol.* 107, 257-263.
- Daffé, M., Draper, P., 1997. The envelope layers of mycobacteria with reference to their pathogenicity. *Adv. Microb. Physiol.* 39, 131-203.
- Dalziel, T., 1913. Chronic interstitial enteritis. *Br. Med. J.* 2, 1068-1070.
- Damato, J., Collins, M., 1990. Growth of *Mycobacterium paratuberculosis* in radiometric, Middlebrook and egg-based media. *Vet. Microbiol.* 22, 31-42.
- Daniels, M., Hutchings, M., Allcroft, D., McKendrick, J., Greig, A., 2002. Risk factors for Johne's disease in Scotland - the results of a survey of farmers. *Vet. Rec.* 150, 135-139.
- Daniels, M., Hutchings, M., Greig, A., 2003. The risk of disease transmission to livestock posed by contamination of farm stored feed by wildlife excreta. *Epidemiol. Infect.* 130, 561-568.
- Dargatz, D., Byrum, B., Hennager, S., Barber, L., Koprak, C., Wagner, B., Wells, S., 2001. Prevalence of antibodies against *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* among beef cow-calf herds. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 219, 497-501.
- Das, S., Sinha, R., Chauhan, H., 1992. Chemotherapy of paratuberculosis in goats: streptomycin, rifampicin and levamisole versus streptomycin, rifampicin and dapsone. *Indian J. Anim. Sci.* 62, 8-13.
- De Almeida, D., Colvin, C., Coussens, P., 2008. Antigen-specific regulatory T cells in bovine paratuberculosis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 125, 234-245.
- De Lisle, G., Seguin, P., Samagh, B., Corner, A., Duncan, J., 1980. Bovine paratuberculosis I. A herd study using complement fixation and intradermal tests. *Can. J. Comp. Med.* 44, 177-182.
- De Smet, K., Hellyer, T., Khan, A., Brown, I., Ivanyi, J., 1996. Genetic and serovar typing of clinical isolates of the *Mycobacterium avium-intracellulare* complex. *Tuber. Lung Dis.* 77, 71-76.
- Deb, R., Goswami, P.P., 2010. Expression of a Gene Encoding 34.9 kDa PPE Antigen of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in *E. coli*. *Mol. Biol. Int.* 2010, 628153.
- Dei, R., Tortoli, E., Bartoloni, A., Simonetti, M., Lillini, E., 1999. HPLC does not differentiate *Mycobacterium paratuberculosis* from *Mycobacterium avium*. *Vet. Microbiol.* 65, 209-213.

- 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., 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.
- Di Marzio, P., Mariani, R., Lui, R., Thomas, E., Landau, N., 2000. Soluble CD40 ligand induces  $\beta$ -chemokine production by macrophages and resistance to HIV-1 entry. *Cytokine* 12, 1489-1495.
- Diéguez, F., Arnaiz, I., Sanjuán, M., Vilar, M., López, M., Yus, E., 2007. Prevalence of serum antibodies to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in cattle in Galicia (northwest Spain). *Prev. Vet. Med.* 82, 321-6.
- Diéguez, F.J., González, A.M., Menéndez, S., Vilar, M.J., Sanjuán, M.L., Yus, E., Arnaiz, I., 2009. Evaluation of four commercial serum ELISAs for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in dairy cows. *Vet. J.* 180, 231-5.
- Dierckins, M., Sherman, D., Gendron-Fitzpatrick, A., 1990. Probable paratuberculosis in a Sicilian ass. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 196, 459-461.
- DOG N°73, 2015. ORDEN de 7 de abril de 2015 por la que se establecen las bases reguladoras de las ayudas a las entidades reconocidas como agrupaciones de defensa sanitaria ganaderas (ADSG) de Galicia y se convocan para el año 2015-2016, pp. 14978.
- Donaghy, J., Rowe, M., Rademaker, J., Hammer, P., Herman, L., De Jonghe, V., Blanchard, B., Duhem, K., Vindel, E., 2008. An inter-laboratory ring trial for the detection and isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from raw milk artificially contaminated with naturally infected faeces. *Food Microbiol.* 25, 128-135.
- Donat, K., Kube, J., Dressel, J., Einax, E., Pfeffer, M., Failing, K., 2014. Detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in environmental samples by faecal culture and real-time PCR in relation to apparent within-herd prevalence as determined by individual faecal culture. *Epidemiol. Infect.* 143, 875-985.
- Dorshorst, N., Collins, M., Lombard, J., 2006. Decision analysis model for paratuberculosis control in commercial dairy herds. *Prev. Vet. Med.* 75, 92-122.
- Doyle, T., 1958. Foetal infection in Johne's disease. *Vet. Rec.* 70, 238.
- Dubash, K., Shulaw, W., Bech-Nielsen, S., Stills Jr, H., Slemmons, R., 1996. Evaluation of an agar gel immunodiffusion test kit for detection of antibodies to *Mycobacterium paratuberculosis* in sheep. *J. Am. Med. Assoc.* 208, 401-403.
- Dukes, T.W., Glover, G.J., Brooks, B.W., Duncan, J.R., Swendrowski, M., 1992. Paratuberculosis in Saiga antelope (*Saiga tatarica*) and experimental transmission to domestic sheep. *J. Wildl. Dis.* 28, 161-170.
- Dunkin, G., 1934. Johne's disease. Its economic significance and early detection. *Vet. Rec.* 14, 55.
- Dunkin, G., 1928. A diagnostic agent for the detection of Johne's disease and its method of preparation. *J. Comp. Pathol. Ther.* 41, 94-108.
- Dunkin, G., Balfour-Jones, S., 1935. Preliminary investigation of a disease of sheep possessing certain characteristics simulating Johne's disease. *J. Comp. Pathol. Ther.* 48, 236-240.
- Eamens, G., Walker, D., Porter, N., Fell, S., 2007. Pooled faecal culture for the detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in goats. *Aust. Vet. J.* 85, 243-51.

- Eamens, G., Whittington, R., Marsh, I., Turner, M., Saunders, V., Kemsley, P., Rayward, D., 2000. Comparative sensitivity of various faecal culture methods and ELISA in dairy cattle herds with endemic Johne's disease. *Vet. Microbiol.* 77, 357-367.
- Eckstein, T., Chandrasekaran, S., Mahapatra, S., McNeil, M., Chatterjee, D., Rithner, C., Ryan, P., Belisle, J., Inamine, J., 2006. A major cell wall lipopeptide of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *J. Biol. Chem.* 281, 5209-5215.
- 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, 837-44.
- Eda, S., Elliott, B., Scott, M., Waters, W., Bannantine, J., Whitlock, R., Speer, C., 2005. New method of serological testing for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (Johne's disease) by flow cytometry. *Foodb. Pathog. Dis.* 2, 250-262.
- Egan, J., Weavers, E., O'Grady, D., 1999. An evaluation of diagnostic tests for Johne's disease in cattle. *Ir. Vet. J.* 52, 86-89.
- Eisenberg, T., Wolter, W., Lenz, M., Schlez, K., Zschöck, M., 2013. Boot swabs to collect environmental samples from common locations in dairy herds for *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP) detection. *J. Dairy Res.* 80, 485-489.
- Ellingson, J., Anderson, J., Kozickowski, J., Radcliff, R., Sloan, S., Allen, S., Sullivan, N., 2005. Detection of viable *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in retail pasteurized whole milk by two culture methods and PCR. *J. Food Prot.* 68, 966-972.
- Ellingson, J., Bolin, C., Stabel, J., 1998. Identification of a gene unique to *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* and application to diagnosis of paratuberculosis. *Mol. Cell. Probes* 12, 133-42.
- Ellingson, J., Stabel, J., Bishai, W., Frothingham, R., Miller, J., 2000. Evaluation of the accuracy and reproducibility of a practical PCR panel assay for rapid detection and differentiation of *Mycobacterium avium* subspecies. *Mol. Cell. Probes* 14, 153-161.
- Elliott, G.N., Hough, R.L., Avery, L.M., Maltin, C.A., Campbell, C.D., 2014. Environmental risk factors in the incidence of Johne's disease. *Crit. Rev. Microbiol.* 0, 1-20.
- 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, 1061-71.
- Englund, S., Ballagi-Pordany, A., Bölske, G., Johansson, K., 1999. Single PCR and nested PCR with a mimic molecule for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 33, 163-171.
- Englund, S., Bölske, G., Ballagi-Pordany, A., Johansson, K., 2001. Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in tissue samples by single, fluorescent and nested PCR based on the IS900 gene. *Vet. Microbiol.* 81, 257-271.
- Englund, S., Bölske, G., Johansson, K., 2002. An IS900-like sequence found in a *Mycobacterium* sp. other than *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 209, 267-271.
- Enosawa, M., Kageyama, S., Sawai, K., Watanabe, K., Notomi, T., Onoe, S., Mori, Y., Yokomizo, Y., 2003. Use of loop-mediated isothermal amplification of the IS900 sequence for rapid detection of cultured *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.* 41, 4359-4365.
- Evans, J., Smith, E., Banerjee, A., Smith, R., Dale, J., Innes, J., Hunt, D., Tweddell, A., Wood, A., Anderson, C., Hewingson, R., Smith, N., Hawkey, P., Sonnenberg, P., 2007. Cluster of human tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis*: evidence for person-to-person transmission in the UK. *Lancet* 369, 1270-1276.
- Faber, W., Jensema, A., Goldschmidt, W., 2006. Treatment of recurrent erythema nodosum leprosum with infliximab. *N. Engl. J. Med.* 355, 739-739.

- Fang, Y., Wu, W., Pepper, J., Larsen, J., Marras, S., Nelson, E., Epperson, W., 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., Whitlock, R., 2010. Paratuberculosis in cattle, en: Behr, M., Collins, D. (Eds.), *Paratuberculosis: Organism, Disease, Control*. CAB International, Preston, UK, pp. 144-156.
- Feller, M., Huwiler, K., Stephan, R., Altpeter, E., Shang, A., Furrer, H., Pfyff, G., Jemmi, T., Baumgartner, A., Egger, M., 2007. *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* and Crohn's disease: a systematic review and meta-analysis. *Lancet* 7, 607-613.
- 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.
- Fischer, O., Matlova, L., Bartl, J., Dvorska, L., Svastova, P., du Maine, R., Melicharek, I., Bartos, M., Pavlik, I., 2003a. Earthworms (*Oligochaeta, Lumbricidae*) and mycobacteria. *Vet. Microbiol.* 91, 325-38.
- Fischer, O., Matlova, L., Dvorská, L., Švástová, P., Bartl, J., Melichárek, I., Weston, R., Pavlík, I., 2001. Diptera as vectors of mycobacterial infections in cattle and pigs. *Med. Vet. Entomol.* 15, 208-211.
- Fischer, O., Matlova, L., Dvorska, L., Svastova, P., Bartl, J., Weston, R., Pavlik, I., 2004. Blowflies *Calliphora vicina* and *Lucilia sericata* as passive vectors of *Mycobacterium avium* subsp. *avium*, *M. a. paratuberculosis* and *M. a. hominissuis*. *Med. Vet. Entomol.* 18, 116-122.
- Fischer, O., Matlova, L., Dvorska, L., Svastova, P., Bartos, M., Weston, R., Kopečna, M., Trcka, I., Pavlik, I., 2005. Potential risk of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* spread by syrphid flies in infected cattle farms. *Med. Vet. Entomol.* 19, 360-6.
- Fischer, O., Matlova, L., Dvorska, L., Svastova, P., Pavlik, I., 2003b. Nymphs of the Oriental cockroach (*Blatta orientalis*) as passive vectors of causal agents of avian tuberculosis and paratuberculosis. *Med. Vet. Entomol.* 17, 145-150.
- Fisher Jr, C., Opal, S., Dhainaut, J., Stephens, S., Zimmerman, J., Nightingale, P., Harris, S., Schein, R., Panacek, E., Vincent, J., Foulke, G., Warren, E., Garrard, C., Park, G., Bodmer, M., Cohen, J., van der Linden, C., Cross, A., Sadoff, J., 1993. Influence of an anti-tumor necrosis factor monoclonal antibody on cytokine levels in patients with sepsis. The CB0006 Sepsis Syndrome Study Group. *Crit. Care Med.* 21, 318-327.
- Fleischmann, R., Alland, D., Eisen, J., Carpenter, L., White, O., Peterson, J., Fraser, C., 2002. Whole-genome comparison of *Mycobacterium tuberculosis* clinical and laboratory strains. *J. Bacteriol.* 184, 5479-5490.
- Florou, M., Leontides, L., Kostoulas, P., Billinis, C., Sofia, M., Kyriazakis, I., Lykotrafitis, F., 2008. Isolation of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* from non-ruminant wildlife living in the sheds and on the pastures of Greek sheep and goats. *Epidemiol. Infect.* 136, 644-52.
- Francis, J., Macturk, H., Madinaveitia, J., Snow, G., 1953. Mycobactin, a growth factor for *Mycobacterium johnei*. 1. Isolation from *Mycobacterium phlei*. *Biochem. J.* 55, 596.
- Fridriksdottir, V., Gunnarsson, E., Sigurdarson, S., Gudmundsdottir, K., 2000. Paratuberculosis in Iceland: epidemiology and control measures, past and present. *Vet. Microbiol.* 77, 263-267.
- Frothingham, R., Wilson, K., 1993. Sequence-based differentiation of strains in the *Mycobacterium avium* complex. *J. Bacteriol.* 175, 2818-2825.
- Fuentes, O., Cebrián, J., 1988. El conejo de monte ¿Reservorio de la partuberculosis ovina y caprina?, en: I Symposium de patología ovina y caprina. AIDA, Zaragoza, p. 32.

- Gao, A., Mutharia, L., Chen, S., Rahn, K., Odumeru, J., 2002. Effect of pasteurization on survival of *Mycobacterium paratuberculosis* in milk. *J. Dairy Sci.* 85, 3198-3205.
- Gao, A., Mutharia, L., Raymond, M., Odumeru, J., 2007. Improved template DNA preparation procedure for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk by PCR. *J. Microbiol. Methods* 69, 417-420.
- García-Marín, J., Benazzi, S., Pérez, V., Badiola, J., 1992a. Study of the entrance of *M. paratuberculosis* in the lamb intestinal mucosa using immunohistochemical methods for antigen detection., en: Chiodini, R., Kreeger, J. (Eds.), *Proceedings of the 3rd International Colloquium on Paratuberculosis*. CAB International, Orlando, Florida, USA, pp. 371-377.
- García-Marín, J., Chávez, G., Aduriz, J., Pérez, V., Juste, R., Badiola, J., 1992b. Prevalence of paratuberculosis in infected goats flocks and comparison of different methods of diagnosis, en: Chiodini, R., Kreeger, J. (Eds.), *Proceedings of the 3rd International Colloquium on Paratuberculosis*. International Association for Paratuberculosis, Orlando, Florida, USA, pp. 157-163.
- García-Marín, J., Pérez, V., García de Jalón, J., De las Heras, M., Barberá, M., Fernández de Luco, D Badiola, J., 1994. Diagnóstico de casos clínicos de paratuberculosis ovina y caprina. *Med. Vet.* 11, 491-502.
- García-Marín, J., Pérez, V., González, J., 2000. La interacción bovino-bacteria y los mecanismos de enfermedad. *Bovis* 98, 29-38.
- García-Marín, J., Tellechea, J., Gutiérrez, M., Corpa, J., Pérez, V., 1999. Evaluation of two vaccines (killed and attenuated) against small ruminant paratuberculosis, en: Manning, E., Collins, D. (Eds.), *Proceedings of the 6th International Colloquium on Paratuberculosis*. International Association for Paratuberculosis, Melbourne, Australia, pp. 234-241.
- García-Marín, J., Tellechea, J., Gutiérrez, M., Pérez, V., Juste, R., 1997. Paratuberculosis vaccination in sheep modifies and limits the development of lesions, en: Chiodini, R., Hines, M., Collins, M. (Eds.), *Proceedings of the 5th International Colloquium on Paratuberculosis*. International Association for Paratuberculosis, Madison, Wisconsin, USA, p. 223.
- García-Pariente, C., González, J., Ferreras, M., Fuertes, M., Benavides, J., Reyes, L., Moreno, O., García-Marín, J., Pérez, V., 2003. Paratuberculosis vaccination of adult animals in two flocks of dairy sheep, en: Juste, R., Geijo, M., Garrido, J. (Eds.), *Proceedings of the 7th International Colloquium on Paratuberculosis*. International Association for Paratuberculosis, Bilbao, Spain, pp. 507-510.
- García-Pariente, C., Pérez, V., Geijo, M., Moreno, O., Muñoz, M., Fuertes, M., Puentes, E., Doce, J., Ferreras, M., García-Marín, J., 2006. The efficacy of a killed vaccine against paratuberculosis (SILIRUM®) in cattle: a field study, en: Manning, E., Nielsen, S. (Eds.), *Proceedings of the 8th International Colloquium on Paratuberculosis*. International Association for Paratuberculosis, Copenhagen, Denmark, p. 260.
- Garrido, J., Aduriz, G., Juste, R., Geijo, M., 2000a. Los métodos de diagnóstico de la paratuberculosis en el ganado vacuno. *Bovis* 93, 49-61.
- Garrido, J., Cortabarria, N., Oguiza, J., Aduriz, G., Juste, R., 2000b. Use of a PCR method on fecal samples for diagnosis of sheep paratuberculosis. *Vet. Microbiol.* 77, 379-86.
- Gasteiner, J., Wenzl, H., Fuchs, K., Jark, U., Baumgartner, W., 1999. Serological cross-sectional study of paratuberculosis in cattle in Austria. *J. Vet. Med. Ser. B* 46, 457-466.
- Geraghty, T., Graham, D.A., Mullaney, P., More, S.J., 2014. A review of bovine Johne's disease control activities in 6 endemically infected countries. *Prev.Vet. Med.* 116, 1-11.
- Gezon, H., Bither, H., Gibbs, H., Acker, E., Hanson, L., Thompson, J., Jorgenson, R., 1988. Identification and control of paratuberculosis in a large goat herd. *Am. J. Vet. Res.* 49, 1817-1823.
- Gillespie, S., 1999. Microbiological diagnosis of granulomatous infections, en: James, D., Zumla, A. (Eds.), *The Granulomatous Disorders*. University Press, Cambridge, UK, pp. 122-131.

- Gilmour, N., Angus, K., 1991. Johne's disease, en: Martin, W., Aitken, I. (Eds.), Diseases of sheep. Blackwell Scientific Publications, Oxford, UK, pp. 95-99.
- Gilmour, N., Angus, K., 1973. Effect of revaccination on *Mycobacterium johnei* infection in sheep. J. Comp. Pathol. 83, 437-445.
- Gilmour, N., Angus, K., 1971. Effect of the rimino phenazine B663 (G30320) on *Mycobacterium johnei* infection and reinfection in sheep: I. Bacteriology and hypersensitivity. J. Comp. Pathol. 81, 221-226.
- Gilmour, N., Angus, K., Mitchell, B., 1977. Intestinal infection and host response to oral administration of *Mycobacterium johnei* in sheep. Vet. Microbiol. 2, 223-235.
- Gioffré, A., Infante, E., Aguilar, D., Santangelo, M., Klepp, L., Amadio, A., Meikle, V., Etchehoury, I., Romano, M., Cataldi, A., Hernández-Pando, R., Bigi, F., 2005. Mutation in *mce* operons attenuates *Mycobacterium tuberculosis* virulence. Microbes Infect. 7, 325-334.
- Gitnick, G., Collins, J., Beaman, B., Brooks, D., Arthur, M., Imaeda, T., Palieschesky, M., 1989. Preliminary report on isolation of mycobacteria from patients with Crohn's disease. Dig. Dis. Sci. 34, 925-932.
- Glanemann, B., Hoelzle, L., Bögli-Stuber, K., Jemmi, T., Wittenbrink, M., 2004. Detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in Swiss dairy cattle by culture and serology. Schweiz. Arch. Tierheilkd. 146, 409-415.
- Glanemann, B., Schönenbrücher, H., Bridger, N., Abdulmawjood, A., Neiger, R., Bülte, M., 2008. Detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*-specific DNA by PCR in intestinal biopsies of dogs. J. Vet. Intern. Med. 22, 1090-1094.
- González, J., Geijo, M., García-Pariente, C., Verna, A., Corpa, J., Reyes, L.E., Ferreras, M., Juste, R., García-Marín, J., Pérez, V., 2005. Histopathological classification of lesions associated with natural paratuberculosis infection in cattle. J. Comp. Pathol. 133, 184-96.
- Goodfellow, M., Magee, J., 1998. Taxonomy of mycobacteria, en: Gangadharam, P., Jenkins, P. (Eds.), Mycobacteria. Springer US, pp. 1-71.
- Grant, I., Ball, H., Neill, S., Rowe, M., 1996. Inactivation of *Mycobacterium paratuberculosis* in cows' milk at pasteurization temperatures. Annu. Rev. Microbiol. 62, 631-636.
- Grant, I., Ball, H., Rowe, M., 2002a. Incidence of *Mycobacterium paratuberculosis* in bulk raw and commercially pasteurized cows' milk from approved dairy processing establishments in the United Kingdom. Appl. Environ. Microbiol. 68, 2428-2435.
- Grant, I., Ball, H., Rowe, M., 1998a. Effect of high-temperature, short-time (HTST) pasteurization on milk containing low numbers of *Mycobacterium paratuberculosis*. Lett. Appl. Microbiol. 26, 166-70.
- Grant, I., Ball, H., Rowe, M., 1998b. Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from milk by immunomagnetic separation. Appl. Environ. Microbiol. 64, 3153-3158.
- Grant, I., Hitchings, E., McCartney, A., Ferguson, F., Rowe, M., 2002b. Effect of commercial-scale high-temperature, short-time pasteurization on the viability of *Mycobacterium paratuberculosis* in naturally infected cows' milk. Appl. Environ. Microbiol. 68, 602-607.
- Grant, I., Kirk, R., Hitchings, E., Rowe, M., 2003. Comparative evaluation of the MGIT and BACTEC culture systems for the recovery of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from milk. J. Appl. Microbiol. 95, 196-201.
- Grant, I., Rowe, M., 2001. Methods for detection and enumeration of viable *Mycobacterium paratuberculosis* from milk and milk products. Bull. Int. Dairy Fed. 362, 41-50.

- Grant, I., Williams, A., Rowe, M., Muir, D., 2005. Efficacy of various pasteurization time-temperature conditions in combination with homogenization on inactivation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 2853-2861.
- 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, 9063-9073.
- Greig, A., Stevenson, K., Henderson, D., Pérez, V., Hughes, V., Pavlik, I., Hines, M., Mckendrick, I., Sharp, J., Pavlik, I., Hines, M., Mckendrick, I., 1999. Epidemiological study of paratuberculosis in wild rabbits in Scotland. *J. Clin. Microbiol.* 37, 1746-1751.
- Greig, A., Stevenson, K., Pérez, V., Pirie, A., Grant, J., Sharp, J., 1997. Paratuberculosis in wild rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). *Vet. Rec.* 140, 141-3.
- Greiner, M., Dekker, A., 2005. On the surveillance for animal diseases in small herds. *Prev. Vet. Med.* 70, 223-234.
- Grewal, I., Borrow, P., Pamer, E., Oldstone, M., Flavell, R., 1997. The CD40-CD154 system in anti-infective host defense. *Curr. Opin. Immunol.* 9, 491-497.
- Griffiths, T. a, Rioux, K., De Buck, J., 2008. Sequence polymorphisms in a surface PPE protein distinguish types I, II, and III of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.* 46, 1207-12.
- Groenendaal, H., Galligan, D., 2003. Economic consequences of control programs for paratuberculosis in midsize dairy farms in the United States. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 223, 1757-63.
- Gumber, S., Eamens, G., Whittington, R., 2006. Evaluation of a Pourquier ELISA kit in relation to agar gel immunodiffusion (AGID) test for assessment of the humoral immune response in sheep and goats with and without *Mycobacterium paratuberculosis* infection. *Vet. Microbiol.* 115, 91-101.
- Gumber, S., Whittington, R., 2007. Comparison of BACTEC 460 and MGIT 960 systems for the culture of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* S strain and observations on the effect of inclusion of ampicillin in culture media to reduce contamination. *Vet. Microbiol.* 119, 42-52.
- Gunnarsson, E., 1979. Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from sheep and cattle in Iceland. *Acta Vet. Scand.* 20, 191-199.
- Gunnarsson, E., Fodstad, F., 1979. Cultural and biochemical characteristics of *Mycobacterium paratuberculosis* isolated from goats in Norway. *Acta Vet. Scand.* 20, 122-134.
- Gwozdz, J., Thompson, K., Manktelow, B., Murray, A., West, D., 2000a. Vaccination against paratuberculosis of lambs already infected experimentally with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Aust. Vet. J.* 78, 560-566.
- Gwozdz, J., Thompson, K., Murray, A., Reichel, M., Manktelow, B., West, D., 2000b. Comparison of three serological tests and an interferon-g assay for the diagnosis of paratuberculosis in experimentally infected sheep. *Aust. Vet. J.* 78, 779-783.
- Halldórsdóttir, S., Englund, S., Nilsen, S., Olsaker, I., 2002. Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* by buoyant density centrifugation, sequence capture PCR and dot blot hybridisation. *Vet. Microbiol.* 87, 327-340.
- Hallman, E., Witter, J., 1933. Some observations on the pathology of Johne's disease. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 83, 159-187.
- Hardin, L., Thorne, J., 1996. Comparison of milk with serum ELISA for the detection of paratuberculosis in dairy cows. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 209, 120-122.

- Harding, H., 1959. The histopathology of *Mycobacterium johnei* infection in small laboratory animals. J. Pathol. Bacteriol. 78, 157-169.
- Harris, N., Barletta, R., 2001. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in veterinary medicine. Clin. Microbiol. Rev. 14, 489-512.
- Harris, N., Feng, Z., Liu, X., Cirillo, S., Cirillo, J., Barletta, R., 1999. Development of a transposon mutagenesis system for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. FEMS Microbiol. Lett. 175, 21-26.
- Hendrick, S., Duffield, T., Kelton, D., Leslie, K., Lissemore, K., Archambault, M., 2005a. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays performed on milk and serum samples for detection of paratuberculosis in lactating dairy cows. J. Am. Med. Assoc. 226, 424-428.
- Hendrick, S., Duffield, T., Leslie, K., Lissemore, K., Archambault, M., Kelton, D., 2005b. The prevalence of milk and serum antibodies to *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in dairy herds in Ontario. Can. Vet. J. 46, 1126-1129.
- Hendrick, S., Kelton, D., Leslie, K., Lissemore, K., Archambault, M., Duffield, T., 2005c. Effect of paratuberculosis on culling, milk production, and milk quality in dairy herds. J. Am. Vet. Med. Assoc. 227, 1302-8.
- Herman, L., De Jonghe, V., Dumon, I., Grijspeerdt, K., Naydenski, H., D'Haese, E., 2005. Clumping of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk and feces and growth activation after milk heating, en: Manning, E., Nielsen, S. (Eds.), Proceedings of the 8th International Colloquium on Paratuberculosis. International Association for Paratuberculosis, Copenhagen, Denmark, pp. 304-310.
- Herrold, R., 1931. Egg yolk agar medium for the growth of tubercle bacilli. J. Infect. Dis. 48, 236-241.
- Herthnek, D., 2009. Molecular diagnostic methods for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden.
- Herthnek, D., Bölske, G., 2006. New PCR systems to confirm real-time PCR detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. BMC Microbiol. 6, 87.
- Herthnek, D., Englund, S., Willemsen, P., Bölske, G., 2006. Sensitive detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in bovine semen by real-time PCR. J. Appl. Microbiol. 100, 1095-102.
- Herthnek, D., Nielsen, S., Lindberg, A., Bölske, G., 2008. A robust method for bacterial lysis and DNA purification to be used with real-time PCR for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk. J. Microbiol. Methods 75, 335-40.
- Hett, E.C., Rubin, E.J., 2008. Bacterial growth and cell division: a mycobacterial perspective. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 72, 126-56.
- Hines, M., Stabel, J., Sweeney, R., Griffin, F., Talaat, A., Bakker, D., Benedictus, G., Davis, W., de Lisle, G., Gardner, I., Juste, R., Kapur, V., Koets, A., McNair, J., Pruitt, G., Whitlock, R., 2007. Experimental challenge models for Johne's disease: a review and proposed international guidelines. Vet. Microbiol. 122, 197-222.
- Hines, M., Styer, E., 2003. Preliminary characterization of chemically generated *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* cell wall deficient forms (spheroplasts). Vet. Microbiol. 95, 247-258.
- Hirst, H., Garry, F., Morley, P., Salman, M., Dinsmore, R., Wagner, B., McSweeney, K., Goodell, G., 2004. Seroprevalence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection among dairy cows in Colorado and herd-level risk factors for seropositivity. J. Am. Vet. Med. Assoc. 225, 97-101.
- Holmes, I., Jubb, T., Callinan, A., 2004. Infection rates in reactors to an absorbed ELISA used in a test and cull program for bovine Johne's disease. Aust. Vet. J. 82, 233-235.



- Hope, A., Kluver, P., Jones, S., Condrón, R., 2000. Sensitivity and specificity of two serological tests for the detection of ovine paratuberculosis. *Aust. Vet. J.* 78, 850-856.
- Hruska, K., Bartos, M., Kralik, P., Pavlik, I., 2005. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in powdered infant milk: paratuberculosis in cattle – the public health problem to be solved. *Vet. Med. - Czech* 50, 327-335.
- Hulten, K., El-Zimaity, H., Karttunen, T., Almashhrawi, A., Schwartz, M., Graham, D., El-Zaatari, F., 2001. Detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in Crohn's diseased tissues by *in situ* hybridization. *Am. J. Gastroenterol.* 96, 1529-1535.
- Hulten, K., Karttunen, T., El-Zimaity, H., Naser, S., Collins, M., Graham, D., El-Zaatari, F., 2000. Identification of cell wall deficient forms of *M. avium* subsp. *paratuberculosis* in paraffin embedded tissues from animals with Johne's disease by *in situ* hybridization. *J. Microbiol. Methods* 42, 185-195.
- Hurley, S., Ewing, E., 1983. Results of a field evaluation of a whole cell bacterin, en: Merkal, R. (Ed.), Proceedings of the 1st International Colloquium on Paratuberculosis. International Association for Paratuberculosis, Ames, IA, USA, pp. 244-248.
- Ikonomopoulos, J., Gazouli, M., Pavlik, I., Bartos, M., Zacharatos, P., Xylouria, E., Papalambros, E., Gorgoulis, V., 2004. Comparative evaluation of PCR assays for the robust molecular detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *J. Microbiol. Methods* 56, 315-321.
- Ikonomopoulos, J., Pavlik, I., Bartos, M., Svastova, P., Ayele, W., Roubal, P., Lukas, J., Cook, N., Gazouli, M., 2005. Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in retail cheeses from Greece and the Czech Republic. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 8934-8936.
- Instituto Nacional de Estadística, 2009. Censo Agrario [WWW Document]. URL <http://www.ine.es/dynt3/inebase/es/index.htm?padre=2156&capsel=2161>
- Irengé, L.M., Walravens, K., Govaerts, M., Godfroid, J., Rosseels, V., Huygen, K., Gala, J.-L., 2009. Development and validation of a triplex real-time PCR for rapid detection and specific identification of *M. avium* subsp. *paratuberculosis* in faecal samples. *Vet. Microbiol.* 136, 166-72.
- Jeyanathan, M., Boutros-Tadros, O., Radhi, J., Semret, M., Bitton, A., Behr, M.A., 2007. Visualization of *Mycobacterium avium* in Crohn's tissue by oil-in-mersion microscopy. *Microbes Infect.* 9, 1567-1573.
- Johansen, T., Djønné, B., Jensen, M., Olsen, I., 2005. Distribution of IS1311 and IS1245 in *Mycobacterium avium* subspecies revisited. *J. Clin. Microbiol.* 43, 2500-2502.
- Johansen, T., Olsen, I., Jensen, M., Dahle, U., Holstad, G., Djønné, B., 2007. New probes used for IS1245 and IS1311 restriction fragment length polymorphism of *Mycobacterium avium* subsp. *avium* and *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* isolates of human and animal origin in Norway. *BMC Microbiol.* 7, 14.
- Johne, H., Frothingham, L., 1895. Ein eigenthümlicher fall von tuberculose beim rind. *Dtsch. Z. Tiermed. Pathol.* 21, 438-454.
- Johnson, H., Larsen, A., Henley, A., Groth, A., 1949. Studies on johnin: the relationship of the allergens of *Mycobacterium paratuberculosis*, *Mycobacterium tuberculosis* var. *avium*, *bovis*, and *hominis*, and *Mycobacterium phlei*. *Am. J. Vet. Res.* 10, 138-141.
- Johnson, Y., Kaneene, J., Gardiner, J., Lloyd, J., Sprecher, D., Coe, P., 2001. The effect of subclinical *Mycobacterium paratuberculosis* infection on milk production in Michigan dairy cows. *J. Dairy Sci.* 84, 2188-2194.
- Johnson-Ifearulundu, Y., Kaneene, J., 1999. Distribution and environmental risk factors for paratuberculosis in dairy cattle herds in Michigan. *Am. J. Vet. Res.* 60, 589-596.

- Jørgensen, J., 1983a. Diagnosis of clinical and non-clinical paratuberculosis by immunological and bacteriological methods, en: Merkal, R. (Ed.), Proceedings of the International Colloquium on Research in Paratuberculosis. International Association for Paratuberculosis, Ames, IA, USA, pp. 136-141.
- Jørgensen, J., 1983b. The effect of vaccination on the excretion of *Mycobacterium paratuberculosis*, en: Merkal, R. (Ed.), Proceedings of the International Colloquium on Research in Paratuberculosis. International Association for Paratuberculosis, Ames, IA, USA, pp. 249-254.
- Jørgensen, J., 1982. An improved medium for culture of *Mycobacterium paratuberculosis* from bovine faeces. Acta Vet. Scand. 23, 325.
- Jørgensen, J., 1977. Survival of *Mycobacterium paratuberculosis* in slurry. Nord. Vet. Med. 29, 267-270.
- Jørgensen, J., 1969. Paratuberculosis in pigs. Experimental infection by oral administration of *Mycobacterium paratuberculosis*. Acta Vet. Scand. 10, 275-287.
- Jørgensen, J., Jensen, P., 1978. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of antibodies to *Mycobacterium paratuberculosis* in cattle. Acta Vet. Scand. 19, 310-312.
- Józefowski, S., Sobota, A., Kwiatkowska, K., 2008. How *Mycobacterium tuberculosis* subverts host immune responses. Bioessays 30, 943-954.
- Jubb, T., Galvin, J., 2004. Effect of a test and control program for bovine Johne's disease in Victorian dairy herds 1992-2002. Aust. Vet. J. 82, 228-232.
- Jubb, T., Sergeant, E., Callinan, A., Galvin, J., 2004. Estimate of the sensitivity of an ELISA used to detect Johne's disease in Victorian dairy cattle herds. Aust. Vet. J. 82, 569-573.
- Jungersen, G., Grell, S., Clemensen, A., Roust, T., Howard, C., 2006. Interleukin-12 potentiation of the interferon-gamma test rescues day-old blood samples for the diagnosis of paratuberculosis., en: Manning, E., Nielsen, S. (Eds.), Proceedings of the 8th International Colloquium on Paratuberculosis. International Association for Paratuberculosis, Copenhagen, Denmark, pp. 501-506.
- Jungersen, G., Huda, A., Hansen, J., Lind, P., 2002. Interpretation of the gamma interferon test for diagnosis of subclinical paratuberculosis in cattle. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 9, 453-460.
- Juste, R., Aduriz, G., 1990. Diagnóstico, en: Juste, R. (Ed.), Paratuberculosis. Ovis, Aula Veterinaria, Madrid, España, pp. 49-62.
- Juste, R., Aduriz, G., Bascones, M., Foley, E., Bargar, T., Barletta, R., 1993. Effect of iron on mycobactin production and dependence in Mycobacteria., en: 74th Annual meeting of CRWAD. Chicago, IL, USA, p. 64.
- Juste, R., García-Marín, J., Peris, B., de Ocariz, C., Badiola, J., 1994. Experimental infection of vaccinated and non-vaccinated lambs with *Mycobacterium paratuberculosis*. J. Comp. Pathol. 110, 185-194.
- Juste, R., Garrido, J., Aduriz, G., Moreno, B., Geijo, M., García-Goti, M., Oguiza, J., 2000. Prevalencia de la paratuberculosis bovina en España, en: Proceedings of sixth International Congress of Bovine Medicine. Santiago de Compostela, Spain, pp. 282-285.
- Juste, R., Garrido, J., Geijo, M., Elguezabal, N., Aduriz, G., Atxaerandio, R., Sevilla, I., 2005. Comparison of blood Polymerase Chain Reaction and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in cattle and sheep. J. Vet. Diagnostic Investig. 17, 354-359.
- Juste, R., Geijo, M., Sevilla, I., Aduriz, G., Garrido, J., 2002. Control of Paratuberculosis by vaccination, en: Juste, R., Geijo, M., Garrido, J. (Eds.), Proceedings of the 7th International Colloquium on Paratuberculosis. International Association for Paratuberculosis, Bilbao, Spain, p. 331.

- Juste, R., Marco, J., de Ocariz, C., Aduriz, J., 1991. Comparison of different media for the isolation of small ruminant strains of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Vet. Microbiol.* 28, 385-390.
- Kalis, C., Barkema, H., Hesselink, J., 1999a. Certification of dairy herds as free of paratuberculosis using culture of strategically pooled fecal samples, en: Manning, E., Collins, D. (Eds.), *Proceedings of the 6th International Colloquium on Paratuberculosis*. International Association for Paratuberculosis, Melbourne, Australia, pp. 55-58.
- Kalis, C., Barkema, H., Hesselink, J., van Maanen, C., Collins, M., 2002. Evaluation of two absorbed enzyme-linked immunosorbent assays and a complement fixation test as replacements for fecal culture in the detection of cows shedding *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *J. Vet. Diagnostic Investig.* 14, 219-224.
- Kalis, C., Benedictus, G., van Weering, H., Flamand, F., Haagsma, J., 1992. Experiences with the use of an experimental vaccine in the control of paratuberculosis in The Netherlands, en: Chiodini, R., Kreeger, J. (Eds.), *Proceedings of the 3rd International Colloquium on Paratuberculosis*. International Association for Paratuberculosis, Orlando, Florida, USA, pp. 484-494.
- Kalis, C., Collins, M., Hesselink, J., Barkema, H., 2003. Rapid eradication of Paratuberculosis, en: Juste, R., Geijo, M., Garrido, J. (Eds.), *Proceedings of the 7th International Colloquium on Paratuberculosis*. International Association for Paratuberculosis, Bilbao, Spain, pp. 413-416.
- Kalis, C., Hesselink, J., Barkema, H., 1999b. Vaccination does not prevent faecal shedding of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, en: Manning, E., Collins, D. (Eds.), *Proceedings of the 6th International Colloquium on Paratuberculosis*. International Association for Paratuberculosis, Melbourne, Australia, pp. 153-156.
- Kalis, C., Hesselink, J., Barkema, H., Collins, M., 2001. Use of long-term vaccination with a killed vaccine to prevent fecal shedding of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in dairy herds. *Am. J. Vet. Res.* 62, 270-274.
- Kalis, C., Hesselink, J., Barkema, H., Collins, M., 2000. Culture of strategically pooled bovine fecal samples as a method to screen herds for paratuberculosis. *J. Vet. Diagnostic Investig.* 12, 547-551.
- Kalis, C., Hesselink, J., Russchen, E., Barkema, H., Collins, M., Visser, I., 1999c. Factors influencing the isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from bovine fecal samples. *J. Vet. Diagnostic Investig.* 11, 345-351.
- Kalis, C., Collins, M.T., Barkema, H.W., Hesselink, J.W., 2004. Certification of herds as free of *Mycobacterium paratuberculosis* infection: actual pooled faecal results versus certification model predictions. *Prev. Vet. Med.* 65, 189-204.
- Kallinowski, F., Wassmer, A., Hofmann, M., Harmsen, D., Heesemann, J., Karch, H., Herfarth, C., Buhr, H., 1997. Prevalence of enteropathogenic bacteria in surgically treated chronic inflammatory bowel disease. *Hepatogastroenterology.* 45, 1552-1558.
- Karpinski, T., Zorawski, C., 1975. Experiential paratuberculosis of sheep. I. Clinical, allergical, bacteriological and postmortem examinations. *Bull. Vet. Inst. Pulawy* 19, 59-63.
- Katayama, N., Suzuki, T., Ootake, M., Totsuka, T., Kamata, S., Yokomizo, Y., 2003. Effects of ammonia treatment under various conditions on viability of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* inoculated in low moisture roughage, en: Juste, R., Geijo, M., Garrido, J. (Eds.), *Proceedings of the 7th International Colloquium on Paratuberculosis*. International Association for Paratuberculosis, Madison, Wisconsin, pp. 16-20.
- Kawaji, S., Taylor, D., Mori, Y., Whittington, R., 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.
- Kent, P., Kubica, G., 1985. *Public health mycobacteriology: a guide for the level III laboratory*. US Department of Health and Human Services, Public Health Service, Centers for Disease Control.

- Khare, S., Adams, L., Osterstock, J., Roussel, A., David, L., 2008. Effects of shipping and storage conditions of fecal samples on viability of *Mycobacterium paratuberculosis*. J. Clin. Microbiol. 46, 1561-2.
- Khare, S., Ficht, T., Santos, R., Romano, J., Ficht, A., Zhang, S., Grant, I., Libal, M., Hunter, D., Adams, L., 2004. Rapid and sensitive detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in bovine milk and feces by a combination of immunomagnetic bead separation-conventional PCR and Real-Time PCR. J. Clin. Microbiol. 42, 1075-1081.
- Khol, J., Beran, V., Kralik, P., Slana, I., Aurich, C., Pavlik, I., Baumgartner, W., 2007a. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) in semen and organs of a breeding bull., en: Nielsen, S. (Ed.), Proceedings of the 9th International Colloquium on Paratuberculosis. International Association for Paratuberculosis, Tsukuba, Japan, p. 269.
- Khol, J., Damoser, J., Dünser, M., Baumgartner, W., 2007b. Paratuberculosis, a notifiable disease in Austria--current status, compulsory measures and first experiences. Prev. Vet. Med. 82, 302-7.
- Kiener, P., Moran-Davis, P., Rankin, B., Wahl, A., Aruffo, A., Hollenbaugh, D., 1995. Stimulation of CD40 with purified soluble gp39 induces proinflammatory responses in human monocytes. J. Immunol. 155, 4917-4925.
- Kim, S., Kim, E., Lafferty, C., Miller, L., Koo, H., Stehman, S., Shin, S., 2004. Use of conventional and real-time polymerase chain reaction for confirmation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in a broth-based culture system ESP II. J. Vet. Diagnostic Investig. 16, 448-453.
- Kim, Y., Bech-Nielsen, S., Gordon, J., Slemmons, R., Spangler, E., 1989. Comparison of two methods for isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from bovine fecal samples. Am. J. Vet. Res. 50, 1110-1113.
- Kimberling, C., 1988. Paratuberculosis, en: Lea, Febiger (Eds.), Jensen & Swift's diseases of sheep. Lea & Febiger, Philadelphia, USA, pp. 235-238.
- Klausen, J., Huda, A., Ekeröth, L., Ahrens, P., 2003. Evaluation of serum and milk ELISAs for paratuberculosis in Danish dairy cattle. Prev. Vet. Med. 58, 171-178.
- Koenig, G., Hoffsis, G., Shulaw, W., Bech-Nielsen, S., Rings, D., St-Jean, G., 1993. Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from mononuclear cells in tissues, blood, and mammary glands of cows with advanced paratuberculosis. Am. J. Vet. Res. 54, 1441-1445.
- Koets, A., Adugna, G., Janss, L., van Weering, H., Kalis, C., Wentink, G., Rutten, V., Schukken, Y., 2000. Genetic variation of susceptibility to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in dairy cattle. J. Dairy Sci. 83, 2702-2708.
- Koets, A., Hoek, A., Langelaar, M., Overdijk, M., Santema, W., Franken, P., Eden, W., Rutten, V., 2006. Mycobacterial 70kD heat-shock protein is an effective subunit vaccine against bovine paratuberculosis. Vaccine 24, 2550-2559.
- Koets, A., Rutten, V., de Boer, M., Bakker, D., Valentin-Weigand, P., van Eden, W., 2001. Differential changes in Heat Shock Protein-, Lipoarabinomannan-, and Purified Protein Derivative-specific immunoglobulin G1 and G2 isotype responses during bovine *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection. Infect. Immunity 69, 1492-1498.
- 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. Immunity 70, 3856-3864.
- Köhler, H., Gyra, H., Zimmer, K., Dräger, K., Burkert, B., Lemser, B., Hausleithner, D., Cubler, K., Klawonn, W., Hess, R., 2001. Immune reactions in cattle after immunization with a *Mycobacterium paratuberculosis* vaccine and implications for the diagnosis of *M. paratuberculosis* and *M. bovis*. J. Vet. Med. Ser. B 48, 185-195.
- Koo, H., Park, Y., Hamilton, M., Barrington, G., Davies, C., Kim, J., Dahl, J., Waters, W., Davis, W., 2004. Analysis of the immune response to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in experimentally infected calves. Infect. Immunity 72, 6870-6883.

- 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.
- Kopecna, M., Trcka, I., Lamka, J., Moravkova, M., Koubek, P., Heroldova, M., Mrlik, V., Kralova, A., Pavlik, I., 2008. The wildlife hosts of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in the Czech Republic during the years 2002–2007. *Vet. Med. (Praha)*. 53, 420-426.
- Kostoulas, P., Leontides, L., Billinis, C., Amiridis, G., Florou, M., 2006. The association of sub-clinical paratuberculosis with the fertility of Greek dairy ewes and goats varies with parity. *Prev. Vet. Med.* 74, 226-238.
- Kralik, P., Slana, I., Kralova, A., Babak, V., Whitlock, R., Pavlik, I., 2011. Development of a predictive model for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in faeces by quantitative real time PCR. *Vet. Microbiol.* 149, 133-8.
- Kruij, T., Muskens, J., van Roermund, H., Bakker, D., Stockhofe-Zurwieden, N., 2003. Lack of association of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* with oocytes and embryos from moderate shedders of the pathogen. *Theriogenology* 59, 1651-60.
- Kudahl, A., Nielsen, S., Sørensen, J., 2004. Relationship between antibodies against *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk and shape of lactation curves. *Prev. Vet. Med.* 62, 119-134.
- Kuehnelt, M., Goethe, R., Habermann, A., Mueller, E., Rohde, M., Griffiths, G., Valentin-Weigand, P., 2001. Characterization of the intracellular survival of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*: phagosomal pH and fusogenicity in J774 macrophages compared. *Cell. Microbiol.* 3, 551-566.
- Kumar, S., Singh, S., Singh, A., Singh, P., Sohal, J., Maitra, A., 2010. Wildlife (*Boselaphus tragocamelus*)–small ruminant (goat and sheep) interface in the transmission of «Bison type» genotype of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in India. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 33, 145-159.
- Lachmann, P., 1988. Purified protein derivative (PPD). *Springer Semin. Immunopathol.* 10, 301-304.
- Lambrecht, R., Collins, M., 1992. *Mycobacterium paratuberculosis* factors that influence mycobactin dependence. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 15, 239-246.
- Lambrecht, R.S., Carriere, J.F., Collins, M.T., 1988. A model for analyzing growth kinetics of a slowly growing *Mycobacterium* sp. *Appl. Environ. Microbiol.* 54, 910-6.
- Landis, J., Koch, G., 1977. The Measurement of Observer Agreement for Categorical Data. *Biometrics* 33, 159-174.
- Larsen, A., 1972. Paratuberculosis: the status of our knowledge. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 161, 1539-1541.
- Larsen, A., Hawkins Jr, W., Merkal, R., 1964. Experimental vaccination of sheep against Johne's disease. *Am. J. Vet. Res.* 25, 974-976.
- Larsen, A., Kopecky, K., 1970. *Mycobacterium paratuberculosis* in reproductive organs and semen of bulls. *Am. J. Vet. Res.* 31, 255-258.
- Larsen, A., Merkal, R., Cutlip, R., 1975. Age of cattle as related to resistance to infection with *Mycobacterium paratuberculosis*. *Am. J. Vet. Res.* 36, 255-257.
- Larsen, A., Merkal, R., Vardaman, T., 1956. Survival time of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Am. J. Vet. Res.* 17, 549-551.
- Larsen, A., Moon, H., 1972. Experimental *Mycobacterium paratuberculosis* infection in chickens. *Am. J. Vet. Res.* 33, 1231-1235.

- Larsen, A., Moon, H., Merkal, R., 1972. Susceptibility of horses to *Mycobacterium paratuberculosis*. Am. J. Vet. Res. 33, 2185-2189.
- Larsen, A., Moyle, A., Himes, E., 1978. Experimental vaccination of cattle against paratuberculosis (Johne's disease) with killed bacterial vaccines: a controlled field study. Am. J. Vet. Res. 39, 65-69.
- Larsen, A., Stalheim, O., Hughes, D., Appell, L., Richards, W., Himes, E., 1981. *Mycobacterium paratuberculosis* in the semen and genital organs of a semen-donor bull. J. Am. Vet. Med. Assoc. 179, 169-171.
- Larsen, A., Vardaman, T., 1953. The effect of isonicotinic acid hydrazide on *Mycobacterium paratuberculosis*. J. Am. Vet. Med. Assoc. 122, 309-310.
- Leite, F.L., Stokes, K.D., Robbe-Austerman, S., Stabel, J.R., 2013. Comparison of fecal DNA extraction kits for the detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* by polymerase chain reaction. J. Vet. Diagn. Invest. 25, 27-34.
- Leroy, B., Roupie, V., Noël-Georis, I., Rosseels, V., Walravens, K., Govaerts, M., Huygen, K., Wattiez, R., 2007. Antigen discovery: a postgenomic approach to paratuberculosis diagnosis. Proteomics 7, 1164-76.
- Lévy-Frébault, V., Portaels, F., 1992. Proposed minimal standards for the genus *Mycobacterium* and for description of new slowly growing *Mycobacterium* species. Int. J. Syst. Bacteriol. 42, 315-323.
- Li, L., Bannantine, J.P., Zhang, Q., Amonsin, A., May, B.J., Alt, D., Banerji, N., Kanjilal, S., Kapur, V., 2005. The complete genome sequence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 102, 12344-9.
- Lillini, E., Bitonti, G., Gamberale, F., Cersini, A., 2005. Prevalence of bovine paratuberculosis in the Latium region (Italy), en: Manning, E., Nielsen, S. (Eds.), Proceedings of the 8th International Colloquium on Paratuberculosis. International Association for Paratuberculosis, Copenhagen, Denmark, pp. 638-644.
- Lillini, E., De Grossi, L., Bitonti, G., Cersini, A., 2007. MAP in retail pasteurised cows' milk: first report in Italy, en: Nielsen, S. (Ed.), Proceedings of the 9th International Colloquium on Paratuberculosis. International Association for Paratuberculosis, Madison, Wisconsin, pp. 333-335.
- Lillini, E., Gamberale, F., De Grossi, L., Cersini, A., Scherm, B., Fagiolo, A., 2003. Comparative study on detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* by PCR diagnosis and conventional culture on faeces of water-buffalo herds in the Latium region (Italy), en: Juste, R., Geijo, M., Garrido, J. (Eds.), Proceedings of the 7th International Colloquium on Paratuberculosis. International Association for Paratuberculosis, Bilbao, Spain, pp. 283-286.
- Lisby, G., Andersen, J., Engbaek, K., Binder, V., 1994. *Mycobacterium paratuberculosis* in intestinal tissue from patients with Crohn's disease demonstrated by a nested primer polymerase chain reaction. Scand. J. Gastroenterol. 29, 923-929.
- Lloyd, J., Whittington, R., Fitzgibbon, C., Dobson, R., 2001. Presence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in suspensions of ovine trichostrongylid larvae produced in faecal cultures artificially contaminated with the bacterium. Vet. Rec. 148, 261-263.
- Logar, K., Kopinč, R., Bandelj, P., Starič, J., Lapanje, A., Ocepek, M., 2012. Evaluation of combined high-efficiency DNA extraction and real-time PCR for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in subclinically infected dairy cattle: comparison with faecal culture, milk real-time PCR and milk ELISA. BMC Vet. Res. 8, 49.
- Lombard, J., Byrem, T., Wagner, B., McCluskey, B., 2006a. Comparison of milk and serum enzyme-linked immunosorbent assays for diagnosis of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection in dairy cattle. J. Vet. Diagnostic Investig. 18, 448-458.
- Lombard, J., Wagner, B., Smith, R., McCluskey, B., Harris, B., Payeur, J., Garry, F., Salman, M., 2006b. Evaluation of environmental sampling and culture to determine *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* distribution and herd infection status on US dairy operations. J. Dairy Sci. 89, 4163-71.

- Losinger, W., 2005. Economic impact of reduced milk production associated with Johne's disease on dairy operations in the USA. *J. Dairy Res.* 72, 425-432.
- Lovell, R., Levi, M., Francis, J., 1944. Studies on the survival of Johne's bacilli. *J. Comp. Pathol. Ther.* 54, 120-129.
- Lowe, A., Roy, P., B-Poulin, M., Michel, P., Bitton, A., St-Onge, L., Brassard, P., 2009. Epidemiology of Crohn's disease in Quebec, Canada. *Inflamm. Bowel Dis.* 15, 429-435.
- Lyle, P., Merkal, R., 1983. Comparison of ELISA and gel diffusion precipitin tests for paratuberculosis in cattle, sheep and goats., en: Merkal, R. (Ed.), *Proceedings of the 1st International Colloquium on Paratuberculosis*. International Association for Paratuberculosis, Ames, IA, USA, pp. 109-112.
- Machackova, M., Matlova, L., Lamka, J., Smolik, J., Melicharek, I., Hanzlikova, M., Docekal, J., Cvetnic, Z., Nagi, G., Lipiec, M., Ocepek, M., Pavlik, I., 2003. Wild boar (*Sus scrofa*) as a possible vector of mycobacterial infections: review of literature and critical analysis of data from Central Europe between 1983 to 2001. *Vet. Med. (Praha)*. 48, 51-65.
- Mackenzie, N., Alexander, D., Turenne, C., Behr, M., De Buck, J., 2009. Genomic comparison of PE and PPE genes in the *Mycobacterium avium* complex. *J. Clin. Microbiol.* 47, 1002-1011.
- Mackintosh, C., De Lisle, G., Collins, D., Griffin, J., 2004. Mycobacterial diseases of deer. *N. Z. Vet. J.* 52, 163-174.
- Manning, E., Collins, M., 2001. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: pathogen, pathogenesis and diagnosis. *Rev. Sci. Tech.* 20, 133-150.
- Manning, E., Steinberg, H., Rossow, K., Ruth, G., Collins, M., 1998. Epizootic of paratuberculosis in farmed elk. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*
- Marly, J., Thorel, M., Perrin, G., Pardon, P., Guerrault, P., 1988. Suivi de vaccination de chevrettes contre la paratuberculose: Consequences cliniques, serologiques et allergiques et epreuve virulente, en: Thorel, M., Merkal, R. (Eds.), *Proceedings of the 2nd International Colloquium on Paratuberculosis*. LCRV, Maisons-Alfort, France, pp. 99-109.
- Marsh, I., Whittington, R., Millar, D., 2000. Quality control and optimized procedure of hybridization capture-PCR for the identification of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in faeces. *Mol. Cell. Probes* 14, 219-232.
- Massone, A., Martin, A., Ibagoyen, G., Gimeno, E., 1990. Immunohistochemical methods for the visualization of *Mycobacterium paratuberculosis* in bovine tissues. *J. Vet. Med. Ser. B* 37, 251-253.
- Matthews, P., McDiarmid, A., Collins, P., Brown, A., 1978. The dependence of some strains of *Mycobacterium avium* on mycobactin for initial and subsequent growth. *J. Med. Microbiol.* 11, 53-57.
- McClure, H., Chiodini, R., Anderson, D., Swenson, R., Thayer, W., Coutu, J., 1987. *Mycobacterium paratuberculosis* infection in a colony of stump-tail macaques (*Macaca arctoides*). *J. Infect. Dis.* 155, 1011-1019.
- McDonald, W., Ridge, S., Hope, A., Condrón, R., 1999. Evaluation of diagnostic tests for Johne's disease in young cattle. *Aust. Vet. J.* 77, 113-119.
- McDonald, W.L., O'Riley, K.J., Schroen, C.J., Condrón, R.J., 2005. Heat inactivation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 1785-9.
- McEwen, A., 1939. Investigations on Johne's disease of sheep. *J. Comp. Pathol. Ther.* 52, 69-87.
- McFadden, J., Butcher, P., Chiodini, R., Hermon-Taylor, J., 1987a. Crohn's disease-isolated mycobacteria are identical to *Mycobacterium paratuberculosis*, as determined by DNA probes that distinguish between mycobacterial species. *J. Clin. Microbiol.* 25, 796-801.

- McFadden, J., Butcher, P., Thompson, J., Chiodini, R., Hermon-Taylor, J., 1987b. The use of DNA probes identifying restriction-fragment-length polymorphisms to examine the *Mycobacterium avium* complex. *Mol. Microbiol.* 1, 283-291.
- McKenna, S., Barkema, H., Keefe, G., Sockett, D., 2006. Agreement between three ELISAs for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in dairy cattle. *Vet. Microbiol.* 114, 285-91.
- McKenna, S., Keefe, G., Barkema, H., Sockett, D., 2005. Evaluation of three ELISAs for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* using tissue and fecal culture as comparison standards. *Vet. Microbiol.* 110, 105-111.
- McNab, W., Meek, A., Duncan, J., Brooks, B., Van Dreumel, A., Martin, S., Nielsen, K., Sugden, E., Turcotte, C., 1991. An evaluation of selected screening tests for bovine paratuberculosis. *Can. J. Vet. Res.* 55, 252-259.
- Merkal, R., 1984. Paratuberculosis: advances in cultural, serologic, and vaccination methods. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 184, 939-943.
- Merkal, R., Curran, B., 1974. Growth and metabolic characteristics of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 28, 276-279.
- Merkal, R., Kopecky, K., Larsen, A., Thurston, J., 1964. Improvements in the techniques for primary cultivation of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Am. J. Vet. Res.* 25, 1290-1294.
- Merkal, R., Larsen, A., 1973. Clofazimine treatment of cows naturally infected with *Mycobacterium paratuberculosis*. *Am. J. Vet. Res.* 34, 27-28.
- Merkal, R., Larsen, A., Booth, G., 1975. Analysis of the effect of inapparent bovine paratuberculosis. *Am. J. Vet. Res.* 36, 837-838.
- Merkal, R., Larsen, A., Kopecky, K., 1968. Comparison of examination and test methods for early detection of paratuberculous cattle. *Am. J. Vet. Res.* 29, 1533-1538.
- Merkal, R., Lyle, P., Whipple, D., 1982. Decontamination, media and culture methods for *Mycobacterium paratuberculosis*, en: Proc. Annual Meeting US Animal Health Association. US Animal Health Association, Richmond, Virginia, USA, pp. 519-523.
- Merkal, R., Whipple, D., 1982. Effectiveness of disinfectants on *Mycobacterium paratuberculosis*, en: Proc. 86th Annu. Meet. USAHA. pp. 514-518.
- Merkal, R.S., McCullough, W.G., 1982. A new mycobactin, mycobactin J, from *Mycobacterium paratuberculosis*. *Curr. Microbiol.* 7, 333-335.
- Messam, V., Branscum, A., Collins, M., Gardner, I., 2008. Frequentist and bayesian approaches to prevalence estimation using examples from John's disease. *Anim. Health Res. Rev.* 9, 1-23.
- Middlebrook, G., Reggiardo, Z., Tigertt, W., 1977. Automatable radiometric detection of growth of *Mycobacterium tuberculosis* in selective media. *Am. Rev. Respir. Dis.* 115, 1066-1069.
- Mijs, W., de Haas, P., Rossau, R., Van der Laan, T., Rigouts, L., Portaels, F., van Soolingen, D., 2002. Molecular evidence to support a proposal to reserve the designation *Mycobacterium avium* subsp. *avium* for bird-type isolates and '*M. avium* subsp. *hominissuis*' for the human/porcine type of *M. avium*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52, 1505-1518.
- Millar, D., Ford, J., Sanderson, J., Withey, S., Tizard, M., Doran, T., Hermon-Taylor, J., 1996. IS900 PCR to detect *Mycobacterium paratuberculosis* in retail supplies of whole pasteurized cows' milk in England and Wales. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 3446-3452.



- Miller, H., Zhang, J., Kuolee, R., Patel, G., Chen, W., 2007. Intestinal M cells: the fallible sentinels? *World J. Gastroenterol.* 13, 1477-1486.
- Miller, J., Jenny, A., Payeur, J., 2002. Polymerase chain reaction detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex and *Mycobacterium avium* organisms in formalin-fixed tissues from culture-negative ruminants. *Vet. Microbiol.* 87, 15-23.
- Minett, F., 1942. The diagnosis of Johne's disease of cattle by cultural methods. *J. Pathol. Bacteriol.* 54, 209-219.
- Möbius, P., Hotzel, H., Rassbach, A., Köhler, H., 2008. Comparison of 13 single-round and nested PCR assays targeting IS900, ISMav2, F57 and locus 255 for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Vet. Microbiol.* 126, 324-33.
- Mokresh, A., Butler, D., 1990. Granulomatous enteritis following oral inoculation of newborn rabbits with *Mycobacterium paratuberculosis* of bovine origin. *Can. J. Vet. Res.* 54, 313-319.
- Momotani, E., Whipple, D., Thiermann, A., Cheville, N., 1988. Role of M cells and macrophages in the entrance of *Mycobacterium paratuberculosis* into domes of ileal Peyer's patches in calves. *Vet. Pathol. Online* 25, 131-137.
- Moravkova, M., Hlozek, P., Beran, V., Pavlik, I., Preziuso, S., Cuteri, V., Bartos, M., 2008. Strategy for the detection and differentiation of *Mycobacterium avium* species in isolates and heavily infected tissues. *Res. Vet. Sci.* 85, 257-64.
- Morrison, N., 1965. Circumvention of the mycobactin requirement of *Mycobacterium paratuberculosis*. *J. Bacteriol.* 89, 762-767.
- Moss, M., Sanderson, J., Tizard, M., Hermon-Taylor, J., El-Zaatari, F., Markesich, D., Graham, D., 1992. Polymerase chain reaction detection of *Mycobacterium paratuberculosis* and *Mycobacterium avium* subsp. *silvaticum* in long term cultures from Crohn's disease and control tissues. *Gut* 33, 1209-1213.
- Motiwala, A., Amonsin, A., Strother, M., Manning, E., Kapur, V., Sreevatsan, S., 2004. Molecular epidemiology of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolates recovered from wild animal species. *J. Clin. Microbiol.* 42, 1703-1712.
- Motiwala, A., Strother, M., Amonsin, A., Byrum, B., Naser, S., Stabel, J., Shulaw, W., Bannantine, J., Kapur, V., Sreevatsan, S., 2003. Molecular epidemiology of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: evidence for limited strain diversity, strain sharing, and identification of unique targets for diagnosis. *J. Clin. Microbiol.* 41, 2015-2026.
- Motiwala, A., Strother, M., Theus, N., Stich, R., Byrum, B., Shulaw, W., Kapur, V., Sreevatsan, S., 2005. Rapid detection and typing of strains of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from broth cultures. *J. Clin. Microbiol.* 43, 2111-7.
- Mullerad, J., Hovav, A., Nahary, R., Fishman, Y., Bercovier, H., 2003. Immunogenicity of a 16.7 kDa *Mycobacterium paratuberculosis* antigen. *Microb. Pathog.* 34, 81-90.
- Mullis, K., 1990. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Sci. Am.* 262, 56-61.
- Mullis, K., Faloona, F., 1987. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 155, 335-350.
- Munjal, S., Boehmer, J., Beyerbach, M., Strutzberg-Minder, K., Homuth, M., 2004. Evaluation of a LAM ELISA for diagnosis of paratuberculosis in sheep and goats. *Vet. Microbiol.* 103, 107-114.
- Mura, M., Bull, T., Evans, H., Sidi-Boumedine, K., McMinn, L., Rhodes, G., Pickup, R., Hermon-Taylor, J., 2006. Replication and long-term persistence of bovine and human strains of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* within *Acanthamoeba polyphaga*. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 854-859.

- Murcia, M., Tortoli, E., Menendez, M., Palenque, E., Garcia, M., 2006. *Mycobacterium colombiense* sp. nov., a novel member of the *Mycobacterium avium* complex and description of MAC-X as a new ITS genetic variant. J. Syst. Evol. Microbiol. 56, 2049-2054.
- Murphy, J., Sommer, S., Kabara, E., Verman, N., Kuelbs, M., Saama, P., Halgren, R., Coussens, P., 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., Barkema, H.W., Russchen, E., van Maanen, K., Schukken, Y.H., Bakker, D., 2000. Prevalence and regional distribution of paratuberculosis in dairy herds in The Netherlands. Vet. Microbiol. 77, 253-61.
- Muskens, J., Van Zijderveld, F., Eger, A., Bakker, D., 2002. Evaluation of the long-term immune response in cattle after vaccination against paratuberculosis in two Dutch dairy herds. Vet. Microbiol. 86, 269-278.
- Naser, S., Ghobrial, G., Romero, C., Valentine, J., 2004. Culture of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* from the blood of patients with Crohn's disease. Lancet 364, 1039-1044.
- Naser, S., Schwartz, D., Shafran, I., 2000. Isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from breast milk of Crohn's disease patients. Am. J. Gastroenterol. 95, 1094-1095.
- Naser, S.A., 2005. *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* and Crohn's disease: is there a link?, en: Proceeding of the North American Veterinary Conference 2005. pp. 20-22.
- Nedrow, A., Gavalchin, J., Smith, M., Stehman, S., Maul, J., McDonough, S., Thonney, M., 2007. Antibody and skin-test responses of sheep vaccinated against Johne's disease. Vet. Immunol. Immunopathol. 116, 109-112.
- Nelli, R., Graham, E., Dunham, S., Taylor, D., 2008. Real-time PCR identification of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in ovine and bovine tissues. Vet. Rec. 163, 422-423.
- Newton, V., McKenna, S., De Buck, J., 2009. Presence of PPE proteins in *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolates and their immunogenicity in cattle. Vet. Microbiol. 135, 394-400.
- Nielsen, K., Brooks, B., Henning, M., Lopes, N., Duncan, J., Sugden, E., Turcotte, C., Corner, A., 1988. Antigen D enzyme immunoassay for diagnosis of bovine paratuberculosis, en: Thorel, M., Merkal, R. (Eds.), Proceedings of the 2nd International Colloquium on Paratuberculosis. LCRV, Maisons-Alfort, France, pp. 236-239.
- Nielsen, S., Bjerre, H., Toft, N., 2008. Colostrum and milk as risk factors for infection with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in dairy cattle. J. Dairy Sci. 91, 4610-4615.
- Nielsen, S., Enevoldsen, C., Gröhn, Y., 2002a. The *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* ELISA response by parity and stage of lactation. Prev. Vet. Med. 54, 1-10.
- Nielsen, S., Gröhn, Y., Enevoldsen, C., 2002b. Variation of the milk antibody response to paratuberculosis in naturally infected dairy cows. J. Dairy Sci. 85, 2795-2802.
- Nielsen, S., Houe, H., Thamsborg, S., Bitsch, V., 2001a. Comparison of two enzyme-linked immunosorbent assays for serologic diagnosis of paratuberculosis (Johne's disease) in cattle using different subspecies strains of *Mycobacterium avium*. J. Vet. Diagnostic Investig. 13, 164-166.
- Nielsen, S., Kolmos, B., Christoffersen, A., 2004. Comparison of contamination and growth of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* on two different media. J. Appl. Microbiol. 96, 149-153.
- Nielsen, S., Nielsen, K., Huda, A., Condrón, R., Collins, M., 2001b. Diagnosis techniques for paratuberculosis. Bull. Int. Dairy Fed. 362, 5-17.

- Nielsen, S., Thamsborg, S., Houe, H., Bitsch, V., 2000. Corrigendum to «Bulk-tank milk ELISA antibodies for estimating the prevalence of paratuberculosis in Danish dairy herds». *Prev. Vet. Med.* 46, 297.
- Nielsen, S.S., Toft, N., 2009. A review of prevalences of paratuberculosis in farmed animals in Europe. *Prev. Vet. Med.* 88, 1-14.
- Nielsen, S.S., Toft, N., 2008. Ante mortem diagnosis of paratuberculosis: a review of accuracies of ELISA, interferon-gamma assay and faecal culture techniques. *Vet. Microbiol.* 129, 217-35.
- Nielsen, S.S., Toft, N., 2014. Bulk tank milk ELISA for detection of antibodies to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: correlation between repeated tests and within-herd antibody-prevalence. *Prev. Vet. Med.* 113, 96-102.
- Nigou, J., Gilleron, M., Puzo, G., 2003. Lipoarabinomannans: from structure to biosynthesis. *Biochimie* 85, 153-166.
- Noordhuizen, J., Frankena, K., van der Hoofd, C., Graat, E., 1997. Application of quantitative methods in veterinary epidemiology. Wageningen Academic Publishers, Wageningen, Netherlands.
- Nordlund, K. V., Goodger, W.J., Pelletier, J., Collins, M.T., 1996. Associations between subclinical paratuberculosis and milk production, milk components, and somatic cell counts in dairy herds. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 208, 1872-6.
- O'Brien, R., Mackintosh, C.G., Bakker, D., Kopecna, M., Pavlik, I., Griffin, J.F.T., 2006. Immunological and molecular characterization of susceptibility in relationship to bacterial strain differences in *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in the red deer (*Cervus elaphus*). *Infect. Immun.* 74, 3530-7.
- O'Mahony, J., Hill, C., 2002. A real time PCR assay for the detection and quantitation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* using SYBR Green and the Light Cycler. *J. Microbiol. Methods* 51, 283-293.
- O'Reilly, C., O'Connor, L., Anderson, W., Harvey, P., Grant, I., Donaghy, J., Rowe, M., O'Mahony, P., 2004. Surveillance of bulk raw and commercially pasteurized cows' milk from approved Irish liquid-milk pasteurization plants to determine the incidence of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 5138-5144.
- Odumeru, J., Gao, A., Chen, S., Raymond, M., Mutharia, L., 2001. Use of the bead beater for preparation of *Mycobacterium paratuberculosis* template DNA in milk. *Can. J. Vet. Res.* 65, 201-205.
- Olsen, I., Boysen, P., Kulberg, S., Hope, J., Jungersen, G., Storset, A., 2005. Bovine NK cells can produce gamma interferon in response to the secreted mycobacterial proteins ESAT-6 and MPP14 but not in response to MPB70. *Infect. Immunity* 73, 5628-5635.
- Olsen, I., Johansen, T., Billman-Jacobe, H., Nilsen, S., Djønn, B., 2004. A novel IS element, ISMpa1, in *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Vet. Microbiol.* 98, 297-306.
- Olsen, I., Tryland, M., Wiker, H., Reitan, L., 2001. AhpC, AhpD, and a secreted 14-kilodalton antigen from *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* distinguish between paratuberculosis and bovine tuberculosis in an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 8, 797-801.
- Osterstock, J., Fosgate, G., Norby, B., Manning, E., Collins, M., Roussel, A., 2007. Contribution of environmental mycobacteria to false-positive serum ELISA results for paratuberculosis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 230, 896-901.
- Ott, S., Wells, S., Wagner, B., 1999. Herd-level economic losses associated with Johne's disease on US dairy operations. *Prev. Vet. Med.* 40, 179-192.
- Paling, R., Waghela, S., Macowan, K., Heath, B., 1988. The occurrence of infectious diseases in mixed farming of domesticated wild herbivores and livestock in Kenya. II. Bacterial diseases. *J. Wildl. Dis.* 24, 308-316.

- Paolicchi, F., Cirone, K., Morsella, C., Gioffré, A., Cataldi, A., Romano, M., 2005. Isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from commercial pasteurized milk, en: Manning, E., Nielsen, S. (Eds.), Proceedings of the 8th International Colloquium on Paratuberculosis. International Association for Paratuberculosis, Madison, Wisconsin.
- Paolicchi, F., Zumárraga, M., Gioffre, A., Zamorano, P., Morsella, C., Verna, A., Cataldi, A., Alito, A., Romano, M., 2003. Application of different methods for the diagnosis of paratuberculosis in a dairy cattle herd in Argentina. J. Vet. Med. Ser. B 50, 20-26.
- Park, K., Dahl, J., Bannantine, J., Barletta, R., Ahn, J., Allen, A., Hamilton, M., Davis, W., 2008. Demonstration of allelic exchange in the slow-growing bacterium *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, and generation of mutants with deletions at the *pknG*, *relA*, and *lsr2* loci. Appl. Environ. Microbiol. 74, 1687-1695.
- Park, S., Bendelac, A., 2000. CD1-restricted T-cell responses and microbial infection. Nature 406, 788-792.
- Parrish, N., Ko, C., Dick, J., Jones, P., Ellingson, J., 2004. Growth, Congo Red agar colony morphotypes and antibiotic susceptibility testing of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. Clin. Med. Res. 2, 107-114.
- Parrish, N., Radcliff, R., Brey, B., Anderson, J., Clark, D., Koziczkowski, J., Ko, C., Goldberg, N., Brinker, D., Carlson, R., Dick, J., Ellingson, J.L., 2009. Absence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Crohn's patients. Inflamm. Bowel Dis. 15, 558-565.
- Pato, F., Vázquez, L., Dacal, V., López, C., Panadero, R., Lago, N., Morrondo, P., Fernández, G., 2010. Prevalencia de brucelosis, tuberculosis y paratuberculosis en corzos cazados en Galicia (NO de España) en 2007-2008. Galemys 22, 295-308.
- Paustian, M., Bannantine, J., Kapur, V., 2010. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* genome, en: Behr, M., Collins, D. (Eds.), Paratuberculosis: Organism, Disease, Control. CAB International, Preston, UK, pp. 73-82.
- Paustian, M., Zhu, X., Sreevatsan, S., Robbe-Austerman, S., Kapur, V., Bannantine, J., 2008. Comparative genomic analysis of *Mycobacterium avium* subspecies obtained from multiple host species. BMC Genomics 9, 135.
- 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, 231-51.
- Pavlik, I., Parmova, I., Ayele, W., Machackova, M., Lamka, J., Svoboda, J., Pokorny, J., Bazant, J., Vitasek, J., 2003. Paratuberculosis control programme in cattle in 1992-2001 by faecal culture and associated economic losses, en: Juste, R., Geijo, M., Garrido, J. (Eds.), Proceedings of the 7th International Colloquium on Paratuberculosis. International Association for Paratuberculosis, Bilbao, Spain, p. 514.
- Payne, J., Rankin, J., 1961. A comparison of the pathogenesis of experimental Johne's disease in calves and cows. Res. Vet. Sci. 2, 175-179.
- Pérez, V., Benazzi, S., García-Marín, J., 1991. Causas de desecho en ganado ovino. ITEA 11, 665-667.
- Pérez, V., Corpa, J., García-Marín, J., 2000. El cuadro clínico y lesional de la paratuberculosis bovina. Bovis 93, 39-47.
- Pérez, V., García-Marín, J., Badiola, J., 1996. Description and classification of different types of lesion associated with natural paratuberculosis infection in sheep. J. Comp. Pathol. 114, 107-122.
- Perry, G., Vivanco, H., Holmes, I., Gwozdz, J., Bourne, J., 2006. No evidence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in *in vitro* produced cryopreserved embryos derived from subclinically infected cows. Theriogenology 66, 1267-1273.
- Pickup, R., Rhodes, G., Arnott, S., Sidi-Boumedine, K., Bull, T., Weightman, A., Hurley, M., Hermon-Taylor, J., 2005. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in the catchment area and water of the River Taff in South Wales,

- United Kingdom, and its potential relationship to clustering of Crohn's disease cases in the city of Cardiff. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 2130-2139.
- Pierce, E., 2009. Where are all the *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in patients with Crohn's disease? *PLoS Pathog.* 5, e1000234.
- Pieters, J., 2001. Entry and survival of pathogenic mycobacteria in macrophages. *Microbes Infect.* 3, 249-255.
- Pillars, R., Grooms, D., Woltanski, J., Blair, E., 2009. Prevalence of Michigan dairy herds infected with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* as determined by environmental sampling. *Prev. Vet. Med.* 89, 191-196.
- Pinedo, P., Buergelt, C., Donovan, G., Melendez, P., Morel, L., Wu, R., Langae, T., Rae, D., 2009. Association between CARD15/NOD2 gene polymorphisms and paratuberculosis infection in cattle. *Vet. Microbiol.* 134, 346-352.
- Pinedo, P., Rae, D., Williams, J., Donovan, G., Melendez, P., Buergelt, C., 2008. Association among results of serum ELISA, faecal culture and nested PCR on milk, blood and faeces for the detection of paratuberculosis in dairy cows. *Transbound. Emerg. Dis.* 55, 125-33.
- Pitt, D., Pinch, D., Janmaat, A., Condrón, R., 2002. An estimate of specificity for a Johne's disease absorbed ELISA in northern Australian cattle. *Aust. Vet. J.* 80, 57-60.
- 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.
- Poupart, P., Coene, M., Van Heuverswyn, H., Cocitol, C., 1993. Preparation of a specific RNA probe for detection of *Mycobacterium paratuberculosis* and diagnosis of Johne's disease. *J. Clin. Microbiol.* 31, 1601-1605.
- Pradenas, M., Kruze, J., Schaik, G. Van, 2008. Sensibilidad del cultivo de pool fecal para detectar infección por *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* en rebaños bovinos de leche y su relación con la prueba de ELISA. *Arch. Med. Vet.* 37, 31-37.
- Quadri, L., Sello, J., Keating, T., Weinreb, P., Walsh, C., 1998. Identification of a *Mycobacterium tuberculosis* gene cluster encoding the biosynthetic enzymes for assembly of the virulence-conferring siderophore mycobactin. *Chem. Biol.* 5, 631-645.
- Quinn, P., Carter, M., Markey, B., Carter, G., 1994. *Mycobacterium* species, en: Elsevier Health Sciences (Ed.), *Clinical Veterinary Microbiology*. Wolfe Publishing, London, England, pp. 167-169.
- Rademaker, J.L.W., Vissers, M.M.M., te Giffel, M.C., 2007. Effective heat inactivation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in raw milk contaminated with naturally infected feces. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 4185-90.
- Raizman, E., Wells, S., Jordan, P., DelGiudice, G., Bey, R., 2005. *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* from free-ranging deer and rabbits surrounding Minnesota dairy herds. *Can. J. Vet. Res.* 69, 32-38.
- Ratledge, C., 1982. Nutrition, growth and metabolism., en: Ratledge, C., Stanford, J. (Eds.), *Physiology, Identification and Classification. The Biology of the Mycobacteria*. Academic Press, London, pp. 185-271.
- Reddacliff, L., Eppleston, J., Windsor, P., Whittington, R., Jones, S., 2006. Efficacy of a killed vaccine for the control of paratuberculosis in Australian sheep flocks. *Vet. Microbiol.* 115, 77-90.
- Reddacliff, L., Nicholls, P., Vadali, A., Whittington, R., 2003a. Use of growth indices from radiometric culture for quantification of sheep strains of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 3510-3516.

- Reddacliff, L., Vadali, A., Whittington, R., 2003b. The effect of decontamination protocols on the numbers of sheep strain *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolated from tissues and faeces. *Vet. Microbiol.* 95, 271-282.
- Reddy, K., Sriraman, P., Naidu, N., Rao, P., 1984. Pathology of Johne's disease in sheep. *Indian Vet. J.* 61, 179-184.
- Reichel, M., Kittelberger, R., Penrose, M., Meynell, R., Cousins, D., Ellis, T., Mutharia, L., Sugden, E., Johns, A., de Lisle, G., 1999. Comparison of serological tests and faecal culture for the detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in cattle and analysis of the antigens involved. *Vet. Microbiol.* 66, 135-150.
- Reyes, L., González, J., Ferreras, M., García-Pariente, C Benavides, J., Fuertes, M., García-Marín, J., Pérez, V., 2003. Evaluation of different adjuvants in the vaccination against paratuberculosis in sheep, en: Juste, R., Geijo, M., Garrido, J. (Eds.), *Proceedings of the 7th International Colloquium on Paratuberculosis*. International Association for Paratuberculosis, Bilbao, Spain, p. 526.
- 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.
- Richards, W.D., Thoen, C.O., 1977. Effect of freezing on the viability of *Mycobacterium paratuberculosis* in bovine feces. *J. Clin. Microbiol.* 6, 392-395.
- Ridge, S., Harkin, J., Badman, R., Mellor, A., Larsen, J., 1995a. Johne's disease in alpacas (*Lama pacos*) in Australia. *Aust. Vet. J.* 72, 150-153.
- Ridge, S., Hope, A., Condrón, R., 1995b. Johne's disease control in 25 victorian dairy herds 1990-1993., en: Chiodini, R., Collins, M., Basse, E. (Eds.), *Proceedings of the 4th International Colloquium on Paratuberculosis*. International Association for Paratuberculosis, Cambridge, UK, pp. 111-124.
- Riemann, H., Zaman, M., Ruppanner, R., Aalund, O., Jørgensen, J., Worsaae, H., Behymer, D., 1979. Paratuberculosis in cattle and free-living exotic deer. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 174, 841-843.
- Robbe-Austerman, S., Gardner, I., Thomsen, B., Morrical, D., Martin, B., Palmer, M., Thoen, C., Ewing, C., 2006a. Sensitivity and specificity of the agar-gel-immunodiffusion test, ELISA and the skin test for detection of paratuberculosis in United States Midwest sheep populations. *Vet. Res.* 37, 553-564.
- Robbe-Austerman, S., Krull, A., Stabel, J., 2006b. Time delay, temperature effects and assessment of positive controls on whole blood for the gamma interferon ELISA to detect paratuberculosis. *J. Vet. Med. Ser. B* 53, 213-217.
- Robbe-Austerman, S., Stabel, J., Morrical, D., 2007. Skin test and gamma interferon enzyme-linked immunosorbent assay results in sheep exposed to dead *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* organisms. *J. Vet. Diagnostic Investig.* 19, 88-90.
- Robbe-Austerman, S., Stabel, J., Palmer, M., 2006c. Evaluation of the gamma interferon ELISA in sheep subclinically infected with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* using a whole-cell sonicate or a johnin purified-protein derivative. *J. Vet. Diagnostic Investig.* 18, 189-194.
- Robbi, C., Rossi, I., Nardelli, S., Marangon, S., Vincenzi, G., Vincenzi, G., 2002. Prevalence of paratuberculosis (Johne's disease) in dairy farms in northeastern Italy, en: Juste, R., Geijo, M., Garrido, J. (Eds.), *Proceedings of the 7th International Colloquium on Paratuberculosis*. International Association for Paratuberculosis, Bilbao, Spain, pp. 457-461.
- Rodríguez-Lázaro, D., D'Agostino, M., Pla, M., Cook, N., 2004. Construction strategy for an internal amplification control for real-time diagnostic assays using nucleic acid sequence-based amplification: development and clinical application. *J. Clin. Microbiol.* 42, 5832-5836.
- Rogall, T., Flohr, T., Böttger, E., 1990. Differentiation of *Mycobacterium* species by direct sequencing of amplified DNA. *J. Gen. Microbiol.* 136, 1915-1920.

- Rohde, R., Shulaw, W., 1990. Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from the uterine flush fluids of cows with clinical paratuberculosis. J. Am. Vet. Med. Assoc. 197, 1482-1483.
- Romero, C., Hamdi, A., Valentine, J., Naser, S., 2005. Evaluation of surgical tissue from patients with Crohn's disease for the presence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* DNA by *in situ* hybridization and nested Polymerase Chain Reaction. Inflamm. Bowel Dis. 11, 116-125.
- Rothel, J., Jones, S., Corner, L., Cox, J., Wood, P., 1990. A sandwich enzyme immunoassay for bovine interferon- $\gamma$  and its use for the detection of tuberculosis in cattle. Aust. Vet. J. 67, 134-137.
- Roussel, A., Fosgate, G., Manning, E., Collins, M., 2007. Association of fecal shedding of mycobacteria with high ELISA-determined seroprevalence for paratuberculosis in beef herds. J. Am. Vet. Med. Assoc. 230, 890-5.
- Roussel, A., Libal, M., Whitlock, R., Hairgrove, T., Barling, K., Thompson, J., 2005. Prevalence of and risk factors for paratuberculosis in purebred beef cattle. J. Am. Vet. Med. Assoc. 226, 773-778.
- Rowe, M., Grant, I., 2006. *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* and its potential survival tactics. Lett. Appl. Microbiol. 42, 305-11.
- Runyon, E., 1959. Anonymous mycobacteria in pulmonary disease. Med. Clin. North Am. 43, 273-290.
- Russell, D., Mwandumba, H., Rhoades, E., 2002. *Mycobacterium* and the coat of many lipids. J. Cell Biol. 158, 421-426.
- Sacks, J., Bolin, S., Crowder, S., 1989. Prevalence estimation from pooled samples. Am. J. Vet. Res. 50, 205-206.
- Saint-Marc, B., Guillemin, F., Milward, F., Reynaud, G., Lacoste, F., Brun, A., 1992. Vaccination against paratuberculosis: new perspectives, en: Chiodini, R., Kreeger, J. (Eds.), Proceedings of the 3rd International Colloquium on Paratuberculosis. International Association for Paratuberculosis, Orlando, Florida, USA, pp. 469-474.
- Sanderson, J., Moss, M., Tizard, M., Hermon-Taylor, J., 1992. *Mycobacterium paratuberculosis* DNA in Crohn's disease tissue. Gut 33, 890-896.
- Saxegaard, F., Baess, I., 1988. Relationship between *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium paratuberculosis* and «wood pigeon mycobacteria». APMIS Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand. 96, 37-42.
- Schleig, P., Buergelt, C., Davis, J., Williams, E., Monif, G., Davidson, M., 2005. Attachment of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* to bovine intestinal organ cultures: method development and strain differences. Vet. Microbiol. 108, 271-279.
- Schönenbrücher, H., Abdulmawjood, a, Failing, K., Bülte, M., 2008. New triplex real-time PCR assay for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in bovine feces. Appl. Environ. Microbiol. 74, 2751-8.
- Schwartz, D., Shafran, I., Romero, C., Piomalli, C., Biggerstaff, J., Naser, N., Chamberlin, W., Naser, S., 2000. Use of short-term culture for identification of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in tissue from Crohn's disease patients. Clin. Microbiol. Infect. 6, 303-307.
- Scott, H., Sorensen, O., Wu, J., Chow, E., Manninen, K., van Leeuwen, J., 2006. Seroprevalence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*, *Neospora caninum*, Bovine Leukemia Virus, and Bovine Viral Diarrhea Virus infection among dairy cattle and herds in Alberta and agroecological risk factors associated with seropositivity. Can. Vet. J. 47, 981-991.
- Sechi, L., 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.

- Sechi, L., Mura, M., Tanda, E., 2004. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in tissue samples of Crohn's disease patients. *New Microbiol.* 27, 75-77.
- Secott, T., Lin, T., Wu, 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.
- Secott, T., Lin, T., Wu, C., 2002. Fibronectin attachment protein is necessary for efficient attachment and invasion of epithelial cells by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Infect. Immun.* 70, 2670-2675.
- Secott, T., Lin, T., Wu, C., 2001. Fibronectin attachment protein homologue mediates fibronectin binding by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Infect. Immun.* 69, 2075-2082.
- Secott, T., Ohme, A., Barton, K., Wu, C., Rommel, F., 1999. *Mycobacterium paratuberculosis* detection in bovine feces is improved by coupling agar culture enrichment to an IS900-specific polymerase chain reaction assay. *J. Vet. Diagnostic Investig.* 11, 441-447.
- Semret, M., Bakker, D., Smart, N., 2006. Genetic analysis of *Mycobacterium avium* complex strains used for producing purified protein derivatives. *Clin. Vaccine Immunol.* 13, 991-996.
- Sergeant, E., 2015. Epitools epidemiological calculators [WWW Document]. AusVet Anim. Heal. Serv. Aust. Biosecurity Coop. Res. Cent. Emerg. Infect. Dis. URL <http://epitools.ausvet.com.au>
- Sergeant, E., Marshall, D., Eamens, G., Kearns, C., Whittington, R., 2003. Evaluation of an absorbed ELISA and an agar-gel immuno-diffusion test for ovine paratuberculosis in sheep in Australia. *Prev. Vet. Med.* 61, 235-248.
- Sergeant, E., Whittington, R., More, S., 2002. Sensitivity and specificity of pooled faecal culture and serology as flock-screening tests for detection of ovine paratuberculosis in Australia. *Prev. Vet. Med.* 52, 199-211.
- Sevilla, I., Aduriz, G., Garrido, J., Geijo, M., Juste, R., 2003. A preliminary survey on the prevalence of paratuberculosis in dairy cattle in Spain by bulk milk PCR, en: Juste, R., Geijo, M., Garrido, J. (Eds.), *Proceedings of the 7th International Colloquium on Paratuberculosis*. International Association for Paratuberculosis, Bilbao, Spain, pp. 332-336.
- 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.
- Shafraan, I., Kugler, L., El-Zaatari, F., Naser, S., Sandoval, J., 2002. Open clinical trial of rifabutin and clarithromycin therapy in Crohn's disease. *Dig. Liver Dis.* 34, 22-28.
- Shanahan, F., O'Mahony, J., 2005. The mycobacteria story in Crohn's disease. *Am. J. Gastroenterol.* 100, 1537-1538.
- Sherman, D., 1985. Current concepts in Johne's disease. *Vet. Med.* 80, 77-84.
- Sherman, D., Markham, R., Bates, F., 1984. Agar gel immunodiffusion test for diagnosis of clinical paratuberculosis in cattle. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 185, 179-182.
- Shih, D., Targan, S., McGovern, D., 2008. Recent advances in IBD pathogenesis: genetics and immunobiology. *Curr. Gastroenterol. Rep.* 10, 568-575.
- Shin, S., Chang, Y., Huang, C., Zhu, J., Huang, L., Yoo, H., Shin, K., Stehman, S., Torres, A., 2004. Development of a polymerase chain reaction test to confirm *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in culture. *J. Vet. Diagnostic Investig.* 16, 116-120.
- Shin, S., Cho, D., Collins, M., 2008. Diagnosis of bovine paratuberculosis by a novel enzyme-linked immunosorbent assay based on early secreted antigens of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Clin. Vaccine Immunol.* 15, 1277-1281.



- Shin, S., Han, J., Manning, E., Collins, M., 2007. Rapid and reliable method for quantification of *Mycobacterium paratuberculosis* by use of the BACTEC MGIT 960 system. *J. Clin. Microbiol.* 45, 1941-1948.
- Shinnick, T., Good, R., 1994. Mycobacterial taxonomy. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 13, 884-901.
- Sibley, J., Woodbury, M., Appleyard, G., Elkin, B., 2007. *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in Bison (*Bison bison*) from Northern Canada. *J. Wildl. Dis.* 43, 775-779.
- Sigurdardottir, O., Bakke-McKellep, A., Djønne, B., Evensen, Ø., 2005. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* enters the small intestinal mucosa of goat kids in areas with and without Peyer's patches as demonstrated with the everted sleeve method. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 28, 223-230.
- Sigurdardottir, O., Press, C., Evensen, Ø., 2001. Uptake of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* through the distal small intestinal mucosa in goats: an ultrastructural study. *Vet. Pathol. Online* 38, 184-189.
- Sigurdardottir, O., Press, C., 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. Online* 36, 542-550.
- Sigurdsson, B., 1960. A killed vaccine against paratuberculosis (Johne's disease) in sheep. *Am. J. Vet. Res.* 21, 54-67.
- Singh, S., Sohal, J., Singh, P., Singh, A., 2009. Genotype profiles of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* isolates recovered from animals, commercial milk, and human beings in North India. *Int. J. Infect. Dis.* 13, 221-227.
- Skerman, V., 1980. Approved lists of bacterial names. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 30, 225-230.
- Slana, I., Kralik, P., Kralova, A., Pavlik, I., 2008a. On-farm spread of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in raw milk studied by IS900 and F57 competitive real time quantitative PCR and culture examination. *Int. J. Food Microbiol.* 128, 250-7.
- Slana, I., Liapi, M., Moravkova, M., Kralova, a, Pavlik, I., 2009. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in cow bulk tank milk in Cyprus detected by culture and quantitative IS900 and F57 real-time PCR. *Prev. Vet. Med.* 89, 223-6.
- Slana, I., Paolicchi, F., Janstova, B., Navratilova, P., Pavlik, I., 2008b. Detection methods for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk and milk products : a review. *Vet. Med. (Praha)*. 53, 283-306.
- Sockett, D., Conrad, T., Thomas, C., Collins, M., 1992. Evaluation of four serological tests for bovine paratuberculosis. *J. Clin. Microbiol.* 30, 1134-1139.
- Sommer, S., Pudrith, C., Colvin, C., Coussens, P., 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.
- Sorensen, O., Rawluk, S., Wu, J., Manninen, K., Ollis, G., 2003. *Mycobacterium paratuberculosis* in dairy herds in Alberta. *Can. Vet. J.* 44, 221-226.
- Souza, C., Evanson, O., Sreevatsan, S., Weiss, D., 2007. Cell membrane receptors on bovine mononuclear phagocytes involved in phagocytosis of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Am. J. Vet. Res.* 68, 975-980.
- Spangler, E., Bech-Nielsen, S., Heider, L., 1992. Diagnostic performance of two serologic tests and fecal culture for subclinical paratuberculosis, and associations with production. *Prev. Vet. Med.* 13, 185-195.
- St Jean, G., 1996. Treatment of clinical paratuberculosis in cattle. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 12, 417-430.
- Stabel, J., 2000. Transitions in immune responses to *Mycobacterium paratuberculosis*. *Vet. Microbiol.* 77, 465-73.

- Stabel, J., 1998. Johne's disease: a hidden threat. *J. Dairy Sci.* 81, 283-288.
- Stabel, J., 1997. An improved method for cultivation of *Mycobacterium paratuberculosis* from bovine fecal samples and comparison to three other methods. *J. Vet. Diagnostic Investig.* 9, 375-380.
- Stabel, J., 1996. Production of  $\gamma$ -interferon by peripheral blood mononuclear cells: an important diagnostic tool for detection of subclinical paratuberculosis. *J. Vet. Diagnostic Investig.* 8, 345-350.
- Stabel, J., Bannantine, J., 2005. Development of a nested PCR method targeting a unique multicopy element, ISMap02, for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in fecal samples. *J. Clin. Microbiol.* 43, 4744-4750.
- Stabel, J., Bosworth, T., Kirkbride, T., Forde, R., Whitlock, R., 2004. A simple, rapid, and effective method for the extraction of *Mycobacterium paratuberculosis* DNA from fecal samples for polymerase chain reaction. *J. Vet. Diagnostic Investig.* 16, 22-30.
- Stabel, J., Kimura, K., Robbe-Austerman, S., 2007. Augmentation of secreted and intracellular gamma interferon following johnin purified protein derivative sensitization of cows naturally infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *J. Vet. Diagnostic Investig.* 19, 43-51.
- Stabel, J., Palmer, M., Harris, B., Plattner, B., Hostetter, J., Robbe-Austerman, S., 2009. Pathogenesis of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in neonatal calves after oral or intraperitoneal experimental infection. *Vet. Microbiol.* 136, 306-313.
- Stabel, J., Steadham, E., Bolin, C., 1997. Heat inactivation of *Mycobacterium paratuberculosis* in raw milk: are current pasteurization conditions effective? *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 4975-4977.
- Stabel, J., Wells, S., Wagner, B., 2002. Relationships between fecal culture, ELISA, and bulk tank milk test results for Johne's disease in US dairy herds. *J. Dairy Sci.* 85, 525-531.
- Stabel, J., Whitlock, R., 2001. An evaluation of a modified interferon- $\gamma$  assay for the detection of paratuberculosis in dairy herds. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 79, 69-81.
- Stackebrandt, E., Rainey, F., Ward-Rainey, N., 1997. Proposal for a new hierarchic classification system, Actinobacteria classis nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47, 479-491.
- Stamp, J., Watt, J., 1954. Johne's disease in sheep. *J. Comp. Pathol. Ther.* 64, 26-38.
- Stanley, E., Mole, R., Smith, R., Glenn, S., Barer, M., McGowan, M., Rees, C., 2007. Development of a new, combined rapid method using phage and PCR for detection and identification of viable *Mycobacterium paratuberculosis* bacteria within 48 hours. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 1851-1857.
- Stehman, S.M., 1996. Paratuberculosis in small ruminants, deer, and South American camelids. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.*
- Stephan, R., Schumacher, S., Tasara, T., Grant, I., 2007. Prevalence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in Swiss raw milk cheeses collected at the retail level. *J. Dairy Sci.* 90, 3590-5.
- Sternberg, S., Viske, D., 2002. Control strategies for paratuberculosis in Sweden. *Acta Vet. Scand.* 44, 247-249.
- Stevenson, K., Hughes, V., de Juan, L., Inglis, N., Wright, F., Sharp, J., 2002. Molecular characterization of pigmented and nonpigmented isolates of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.* 40, 1798-1804.
- Stevenson, K., Inglis, N., Rae, B., Donachie, W., Sharp, J., 1991. Complete nucleotide sequence of a gene encoding the 70 kd heat shock protein of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Nucleic Acids Res.* 19, 4552.

- Stevenson, K., Sharp, J., 1997. The contribution of molecular biology to *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* research. *Vet. J.* 39, 1517-1521.
- Stewart, D., Vaughan, J., Stiles, P., Noske, P., Tizard, M., Prowse, S., Michalski, W., Butler, K., Jones, S., 2004. A long-term study in Merino sheep experimentally infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: clinical disease, faecal culture and immunological studies. *Vet. Microbiol.* 104, 165-178.
- Stewart, D., Vaughan, J., Stiles, P., Noske, P., Tizard, M., Prowse, S., Michalski, W., Butler, K., Jones, S., 2007. A long-term bacteriological and immunological study in Holstein-Friesian cattle experimentally infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and necropsy culture results for Holstein-Friesian cattle, Merino sheep and Angora goats. *Vet. Microbiol.* 122, 83-96.
- Stewart, D., Vaughan, J., Stiles, P., Noske, P., Tizard, M., Prowse, S., Michalski, W., Butler, K., Jones, S., 2006. A long-term study in Angora goats experimentally infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: clinical disease, faecal culture and immunological studies. *Vet. Microbiol.* 113, 13-24.
- Stich, R., Byrum, B., Love, B., Theus, N., Barber, L., Shulaw, W., 2004. Evaluation of an automated system for non-radiometric detection of *Mycobacterium avium paratuberculosis* in bovine feces. *J. Microbiol. Methods* 56, 267-275.
- Sting, R., Hrubenja, M., Mandlb, J., Seemann, G., Salditt, A., Waibel, S., 2014. Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in faeces using different procedures of pre-treatment for real-time PCR in comparison to culture. *Vet. J.* 199, 138-142.
- Storset, A., Hasvold, H., Valheim, M., Brun-Hansen, H., Berntsen, G., Whist, S., Djønne, B., Press, C., Holstad, G., Larsen, H., 2001. Subclinical paratuberculosis in goats following experimental infection. An immunological and microbiological study. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 80, 271-87.
- Stout, R., Suttles, J., 1996. The many roles of CD40 in cell-mediated inflammatory responses. *Immunol. Today* 17, 487-492.
- Stratmann, J., Dohmann, K., Heinzmann, J., Gerlach, G., 2006. Peptide aMptD-mediated capture PCR for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in bulk milk samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 5150-5158.
- Stratmann, J., Strommenger, B., Stevenson, K., Gerlach, G., 2002. Development of a peptide-mediated capture PCR for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk. *J. Clin. Microbiol.* 40, 4244-4250.
- Streeter, R., Hoffsis, G., Bech-Nielsen, S., Shulaw, W., Rings, D., 1995. Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from colostrum and milk of subclinically infected cows. *Am. J. Vet. Res.* 56, 1322-1324.
- Strommenger, B., Stevenson, K., Gerlach, G., 2001. Isolation and diagnostic potential of ISMav2, a novel insertion sequence-like element from *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 196, 31-37.
- Stuart, P., 1962. The diagnosis of Johne's disease in cattle and the effect of vaccination on tuberculin and Johnin tests. *Bull. Off. Int. Epizoot.* 58, 33-50.
- Sugden, E., Brooks, B., Corner, A., Nielsen, K., Turcotte, C., Shapiro, J., Duncan, J., 1988. A study of indirect enzyme immunoassay for ovine paratuberculosis using A and D protein antigens and lipoarabinomannan polysaccharide antigen., en: Thorel, M., Merkal, R. (Eds.), *Proceedings of the 2nd International Colloquium on Paratuberculosis*. LCRV, Maisons-Alfort, France, pp. 231-235.
- Sugden, E., Corner, A., Samagh, B., Brooks, B., Turcotte, C., Nielsen, K., Steward, R., 1989. Serodiagnosis of ovine paratuberculosis, using lipoarabinomannan in an enzyme-linked immunosorbent assay. *Am. J. Vet. Res.* 50, 850-854.
- Sung, N., Collins, M.T., 1998. Thermal tolerance of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 999-1005.
- Sung, N., Takayama, K., Collins, M.T., 2004. Possible association of GroES and antigen 85 proteins with heat resistance of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 1688-1697.

- Sweeney, R., 1996. Transmission of paratuberculosis. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 12, 305-312.
- Sweeney, R., Uzonna, J., Whitlock, R., Habecker, P., Chilton, P., Scott, P., 2006a. Tissue predilection sites and effect of dose on *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* organism recovery in a short-term bovine experimental oral infection model. *Res. Vet. Sci.* 80, 253-259.
- Sweeney, R., Whitlock, R., Buckley, C., Spencer, P., 1995. Evaluation of a commercial enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of paratuberculosis in dairy cattle. *J. Vet. Diagnostic Investig.* 7, 488-493.
- Sweeney, R., Whitlock, R., Buckley, C., Spencer, P., Rosenberger, A., Hutchinson, L., 1994. Diagnosis of paratuberculosis in dairy cattle, using enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies against *Mycobacterium paratuberculosis* in milk. *Am. J. Vet. Res.* 55, 905-909.
- Sweeney, R., Whitlock, R., Hamir, A., Rosenberger, A., Herr, S., 1992a. Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* after oral inoculation in uninfected cattle. *Am. J. Vet. Res.* 53, 1312-1314.
- Sweeney, R., Whitlock, R., McAdams, S., 2006b. Comparison of three DNA preparation methods for real-time polymerase chain reaction confirmation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* growth in an automated broth culture system. *J. Vet. Diagnostic Investig.* 18, 587-590.
- Sweeney, R., Whitlock, R., McAdams, S., Fyock, T., 2006c. Longitudinal study of ELISA seroreactivity to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in infected cattle and culture-negative herd mates. *J. Vet. Diagnostic Investig.* 18, 2-6.
- Sweeney, R., Whitlock, R., Rosenberger, A., 1992b. *Mycobacterium paratuberculosis* Cultured from Milk and Supramammary Lymph Nodes of Infected Asymptomatic Cows. *J. Clin. Microbiol.* 30, 166-171.
- Sweeney, R., Whitlock, R., Rosenberger, A., 1992c. *Mycobacterium paratuberculosis* isolated from fetuses of infected cows not manifesting signs of the disease. *Am. J. Vet. Res.* 53, 477-480.
- Taddei, R., Barbieri, I., Pacciarini, M., Fallacara, F., Belletti, G., Arrigoni, N., 2008. *Mycobacterium porcinum* strains isolated from bovine bulk milk: implications for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* detection by PCR and culture. *Vet. Microbiol.* 130, 338-347.
- Taddei, S., Robbi, C., Cesena, C., Rossi, I., Schiano, E., Arrigoni, N., Vicenzoni, G., Cavarani, S., 2004. Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in bovine fecal samples: comparison of three Polymerase Chain Reaction-based diagnostic tests with a conventional culture method. *J. Vet. Diagnostic Investig.* 16, 503-508.
- Tanner, M., 1993. Introduction, en: Tanner, M. (Ed.), *Tools for Statistical Inference*. Springer US, pp. 1-8.
- Tasara, T., Hoelzle, L., Stephan, R., 2005. Development and evaluation of a *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (MAP) specific multiplex PCR assay. *Int. J. Food Microbiol.* 104, 279-87.
- Tasara, T., Stephan, R., 2005. Development of an F57 sequence-based real-time PCR assay for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 5957-68.
- Tavornpanich, S., Gardner, I., Anderson, R., Shin, S., Whitlock, R., Fyock, T., Adaska, J., Walker, R., Hietala, S., 2004. Evaluation of microbial culture of pooled fecal samples for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in large dairy herds. *Am. J. Vet. Res.* 65, 1061-70.
- Tavornpanich, S., Muñoz-Zanzi, C., Wells, S., Raizman, E., Carpenter, T., Johnson, W., Gardner, I., 2008. Simulation model for evaluation of testing strategies for detection of paratuberculosis in midwestern US dairy herds. *Prev. Vet. Med.* 83, 65-82.
- Taylor, A., 1951. Varieties of *Mycobacterium johnei* isolated from sheep. *J. Pathol. Bacteriol.* 63, 333-336.
- Taylor, A., 1950. Observations on the isolation of *Mycobacterium johnei* in primary culture. *J. Pathol. Bacteriol.* 62, 647-650.

- Taylor, A., 1945. Ovine paratuberculosis (Johne's disease of sheep). *J. Comp. Pathol. Ther.* 55, 41-44.
- Taylor, T., Wilks, C., McQueen, D., 1981. Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from the milk of a cow with Johne's disease. *Vet. Rec.* 109, 532-533.
- Telenti, A., Marchesi, F., Balz, M., Bally, F., Böttger, E., Bodmer, T., 1993. Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. *J. Clin. Microbiol.* 31, 175-178.
- Thoen, C., Haagsma, J., 1996. Molecular techniques in the diagnosis and control of paratuberculosis in cattle. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 209, 734-737.
- Thoen, C., Muscoplat, C., 1979. Recent developments in diagnosis of paratuberculosis (Johne's disease). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 174, 838.
- Thorel, M., 1984. Review of the occurrence of mycobactin dependence among mycobacteria species. *Ann. Rech. Vétérinaires* 15, 405-409.
- Thorel, M.-F., Krichevsky, M., Lévy-Frébault, V.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. Bacteriol.* 40, 254-260.
- Thorne, J., Hardin, L., 1997. Estimated prevalence of paratuberculosis in Missouri, USA cattle. *Prev. Vet. Med.* 31, 51-57.
- Thornton, C., MacLellan, K., Stabel, J., Carothers, C., Whitlock, R., Passen, S., 2002. Application of the C18-carboxypropylbetaine specimen processing method to recovery of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from ruminant tissue specimens. *J. Clin. Microbiol.* 40, 1783-1790.
- Tiwari, A., van Leeuwen, J., Dohoo, I., Stryhn, H., Keefe, G., Haddad, J., 2005. Effects of seropositivity for bovine leukemia virus, bovine viral diarrhoea virus, *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*, and *Neospora caninum* on culling in dairy cattle in four Canadian provinces. *Vet. Microbiol.* 109, 147-158.
- Tiwari, A., van Leeuwen, J., Dohoo, I.R., Keefe, G.P., Haddad, J.P., Scott, H.M., Whiting, T., 2009. Risk factors associated with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* seropositivity in Canadian dairy cows and herds. *Prev. Vet. Med.* 88, 32-41.
- Tiwari, A., van Leeuwen, J., McKenna, S., Keefe, G., Barkema, H., 2006. Johne's disease in Canada Part 1: clinical symptoms, pathophysiology, diagnosis, and prevalence in dairy herds. *Can. Vet. J.* 47, 874-882.
- Tooker, B., Burton, J., Coussens, P., 2002. Survival tactics of *M. paratuberculosis* in bovine macrophage cells. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 87, 429-437.
- Toribio, J., Sergeant, E., 2007. A comparison of methods to estimate the prevalence of ovine Johne's infection from pooled faecal samples. *Aust. Vet. J.* 85, 317-24.
- Tortoli, E., 2003. Impact of genotypic studies on mycobacterial taxonomy: the new mycobacteria of the 1990s. *Clin. Microbiol. Rev.* 16, 319-354.
- Tortoli, E., Rindi, L., Garcia, M., Chiaradonna, P., Dei, R., Garzelli, C., Kroppenstedt, R., Lari, N., Mattei, R., Mariottini, A., Mazzarelli, G., Murcia, M., Nanetti, A., Piccoli, P., Scarparo, C., 2004. Proposal to elevate the genetic variant MAC-A, included in the *Mycobacterium avium* complex, to species rank as *Mycobacterium chimaera* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54, 1277-1285.
- Turenne, C., Alexander, D., 2010. *Mycobacterium avium* complex, en: Behr, M., Collins, D. (Eds.), *Paratuberculosis: Organism, Disease, Control*. CAB International, Preston, UK, pp. 60-72.

- Turenne, C., Collins, D., Alexander, D., Behr, M., 2008. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and *M. avium* subsp. *avium* are independently evolved pathogenic clones of a much broader group of *M. avium* organisms. J. Bacteriol. 190, 2479-2487.
- Turenne, C., Semret, M., Cousins, D., Collins, D., Behr, M., 2006. Sequencing of *hsp65* distinguishes among subsets of the *Mycobacterium avium* complex. J. Clin. Microbiol. 44, 433-440.
- Twort, F., Ingram, G., 1912. A method for isolating and cultivating the *Mycobacterium enteritidis chronicae pseudotuberculosis bovis johne*, and some experiments on the preparation of a diagnostic vaccine for pseudotuberculous enteritis of bovines, en: Proceedings of the Royal Society of London, Series B, Containing Papers of a Biological Character, pp. 517-542.
- USDA-APHIS, 2010. Uniform program standards for the Voluntary Bovine Johne's Disease Control Program.
- Vallée, H., Rinjard, P., 1926. Etudes sur l'enterite paratuberculeuse des bovides (note preliminaire). Rev. Générale Médecine Vétérinaire 35, 1-9.
- Vallée, H., Rinjard, P., Vallée, M., 1934. Sur la prémunition de l'enterite paratuberculeuse des bovides. Rev. Générale Médecine Vétérinaire 43, 777-779.
- Van Boxtel, R., Lambrecht, R., Collins, M., 1990. Effect of polyoxyethylene sorbate compounds (Tweens) on colonial morphology, growth, and ultrastructure of *Mycobacterium paratuberculosis*. Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand. 98, 901-908.
- Van der Giessen, J., van Dijk, L., Bleumink-Pluym, N., Eger, T., Haagsma, J., van der Zeijst, B., 1995. The spatial distribution of *Mycobacterium paratuberculosis* in infected cattle. Implications for pathogenesis and diagnosis, en: Chiodini, R., Collins, M., Basse, E. (Eds.), Proceedings of the 4th International Colloquium on Paratuberculosis. International Association for Paratuberculosis, Cambridge, UK, pp. 61-66.
- Van Ingen, J., Boeree, M., Kusters, K., Wieland, A., Tortoli, E., Dekhuijzen, R., van Soolingen, D., 2009. Proposal to elevate *Mycobacterium avium* complex ITS sequevar MAC-Q to *Mycobacterium vulneris* sp. nov. J. Syst. Evol. Microbiol. 59, 2277-2282.
- Van Kooten, G., Banchereau, J., 1996. CD40-CD40 ligand: a multifunctional receptor-ligand pair. Adv. Immunol. 61, 1-78.
- Van Kruiningen, H., Chiodini, R., Thayer, W., Coutu, J., Merkal, R., Runnels, P., 1986. Experimental disease in infant goats induced by a *Mycobacterium* isolated from a patient with Crohn's disease. Dig. Dis. Sci. 31, 1351-1360.
- Van Pittius, N., Sampson, S., Lee, H., Kim, Y., van Helden, P., Warren, R., 2006. Evolution and expansion of the *Mycobacterium tuberculosis* PE and PPE multigene families and their association with the duplication of the ESAT-6 (*esx*) gene cluster regions. BMC Evol. Biol. 6, 95.
- Van Roermund, H., Bakker, D., Willemsen, P., de Jong, M., 2007. Horizontal transmission of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in cattle in an experimental setting: calves can transmit the infection to other calves. Vet. Microbiol. 122, 270-279.
- Van Schaik, G., Pradenas, M., Mella, A., Kruze, J., 2007. Diagnostic validity and costs of pooled fecal samples and individual blood or fecal samples to determine the cow- and herd-status for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. Prev. Vet. Med. 82, 159-65.
- Van Schaik, G., Stehman, S., Schukken, Y., Rossiter, C., Shin, S., 2003. Pooled fecal culture sampling for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* at different herd sizes and prevalence. J. Vet. Diagnostic Investig. 15, 233-241.
- Vance, H., 1961. Johne's disease in a european red deer. Can. Vet. J. 2, 305-307.

- Vansnick, E., De Rijk, P., Vercammen, F., Geysen, D., Rigouts, L., Portaels, F., 2004. Newly developed *primers* for the detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Vet. Microbiol.* 100, 197-204.
- Vansnick, E., De Rijk, P., Vercammen, F., Rigouts, L., Portaels, F., Geysen, D., 2007. A DNA sequence capture extraction method for detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in feces and tissue samples. *Vet. Microbiol.* 122, 166-171.
- Vary, P., Andersen, P., Green, E., Hermon-Taylor, J., McFadden, J., 1990. Use of highly specific DNA probes and the polymerase chain reaction to detect *Mycobacterium paratuberculosis* in Johne's disease. *J. Clin. Microbiol.* 28, 933-937.
- Velthuis, A., 2004. The effect of regulations on the contact structure of the Dutch cattle sector., en: Reid, S., Menzies, F., Russell, A. (Eds.), *Proceedings of Society for Veterinary Epidemiology and Preventive Medicine. Society for Veterinary Epidemiology and Preventive Medicine, Martigny, Switzerland*, pp. 200-215.
- Vialard, J., Lacheretz, A., Thiery, A., Richard, Y., Prave, M., 1993. Detection of bovine paratuberculosis by culture of pooled feces. *Rev. Med. Vet. (Toulouse)*. 144, 527-533.
- Vogel, O., 1977. Paratuberculosis in a dog. *Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr.* 90, 419-421.
- Waters, W., Miller, J., Palmer, M., Stabel, J., Jones, D., Koistinen, K., Steadham, E., Hamilton, M., Davis, W., Bannantine, J., 2003. Early induction of humoral and cellular immune responses during experimental *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection of calves. *Infect. Immunity* 71, 5130-5138.
- Watson, E., 1935. Tuberculin, johnin and mallein derived from non-protein media. *Can. Public Heal. J.* 26, 268-275.
- Wayne, L., Good, R., Böttger, E., Butler, R., Dorsch, M., Ezaki, T., Gross, W., Jonas, V., Kilburn, J., Kirschner, P., Krichevsky, M., Ridell, M., Shinnick, T., Springer, B., Stackebrandt, E., Tarnok, I., Tarnok, Z., Tasaka, H., Vincent, V., Warren, N., Knott, C., Johnson, R., 1996. Semantide- and chemotaxonomy-based analyses of some problematic phenotypic clusters of slowly growing mycobacteria, a cooperative study of the International Working Group on Mycobacterial Taxonomy. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46, 280-297.
- Wayne, L., Kubica, G., 1986. Mycobacteria. Family *Mycobacteriaceae*, en: Sneath, P.H.A., Mair, N.S., Sharpe, M.E., Holt, J.G. (Eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Williams & Wilkins. Baltimore, MD, USA, Chester, pp. 1436-57.
- Weber, A., Gürke, R., Bauer, K., Schreyer, K., 1992. Bacterial studies on the occurrence of *Mycobacterium paratuberculosis* in fecal samples of zoo ruminants. *Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr.* 105, 161-164.
- Weber, M., 2006. Risk management of paratuberculosis in dairy herds. *Ir. Vet. J.* 59, 555-561.
- Weber, M., Groenendaal, H., van Roermund, H., Nielen, M., 2004. Simulation of alternatives for the Dutch Johne's disease certification-and-monitoring program. *Prev. Vet. Med.* 62, 1-17.
- Weiss, D., Evanson, O., Deng, M., Abrahamsen, M., 2004. Gene expression and antimicrobial activity of bovine macrophages in response to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Vet. Pathol. Online* 41, 326-337.
- Weiss, D., Souza, C., 2008. Review paper: modulation of mononuclear phagocyte function by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Vet. Pathol. Online* 45, 829-841.
- Wells, S., Collins, M., Faaberg, K., Wees, C., Tavornpanich, S., Petrini, K., Collins, J., Cernicchiaro, N., Whitlock, R., 2006. Evaluation of a rapid fecal PCR test for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in dairy cattle. *Clin. Vaccine Immunol.* 13, 1125-30.
- Wells, S., Godden, S., Lindeman, C., Collins, J., 2003. Evaluation of bacteriologic culture of individual and pooled fecal samples for detection of *Mycobacterium paratuberculosis* in dairy cattle herds. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 223, 1022-5.

- Wells, S., Wagner, B., 2000. Herd-level risk factors for infection with *Mycobacterium paratuberculosis* in US dairies and association between familiarity of the herd manager with the disease or prior diagnosis of the disease in that herd and use of preventive measures. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 216, 1450-1457.
- Wells, S., Whitlock, R., Lindeman, C., Fyock, T., 2002a. Evaluation of bacteriologic culture of pooled fecal samples for detection of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Am. J. Vet. Res.* 63, 1207-11.
- Wells, S., Whitlock, R., Wagner, B., Collins, J., Garry, F., Hirst, H., Lawrence, J., Saville, W., Naugle, A., 2002b. Sensitivity of test strategies used in the Voluntary Johne's Disease Herd Status Program for detection of *Mycobacterium paratuberculosis* infection in dairy cattle herds. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 220, 1053-1057.
- Wentink, G., Benedictus, G., Dinkla, E., 1988. Bovine tuberculin reactions after vaccination with an inactivated paratuberculosis vaccin, en: Thorel, M., Merkal, R. (Eds.), *Proceedings of the 2nd International Colloquium on Paratuberculosis*. LCRV, Maisons-Alfort, France, pp. 130-135.
- Wentink, G., Bongers, J., Vos, J., Zeeuwen, A., 1993. Relationship between negative skin test with Johnin after vaccination and post mortem findings. *Vet. Rec.* 132, 38-39.
- Whan, L., Grant, I., Ball, H., Scott, R., Rowe, M., 2001. Bactericidal effect of chlorine on *Mycobacterium paratuberculosis* in drinking water. *Lett. Appl. Microbiol.* 33, 227-231.
- Whipple, D., Callihan, D., Jarnagin, J., 1991. Cultivation of *Mycobacterium paratuberculosis* from bovine fecal specimens and a suggested standardized procedure. *J. Vet. Diagnostic Investig.* 3, 368-373.
- Whipple, D., Merkal, R., 1983. Modifications in the technique for cultivation of *Mycobacterium paratuberculosis*, en: Merkal, R. (Ed.), *Proceedings of the International Colloquium on Research in Paratuberculosis*. International Association for Paratuberculosis, Ames, IA, USA, pp. 82-92.
- Whitlock, R., 2009. Johne's disease, en: Smith, B. (Ed.), *Large Animal Internal Medicine*. Mosby Elsevier, St. Louis, pp. 881-887.
- Whitlock, R., 1998. Johne's disease (Paratuberculosis): diagnostic tests for individual animal and the herd, en: ANEMBE (Ed.), *V Congreso Internacional de Medicina Bovina*. ANEMBE, Sitges, España, pp. 69-72.
- Whitlock, R., 1992. Diarrhea in cattle, en: Anderson, N. (Ed.), *Veterinary Gastroenterology*. Lea & Febiger, Philadelphia, p. 783.
- Whitlock, R., Buergelt, C., 1996. Preclinical and clinical manifestations of paratuberculosis (including pathology). *Vet. Clin. North Am. Anim. Pract.* 12, 345-356.
- Whitlock, R., Rosenberger, A., 1990. Fecal culture protocol for *Mycobacterium paratuberculosis*. A recommended procedure, en: *Proc. Annual Meeting US Animal Health Association*. US Animal Health Association, Richmond, Virginia, USA, pp. 280-285.
- Whitlock, R., Rosenberger, A., Spencer, P., 1989. Laboratory culture techniques for Johne's disease: a critical evaluation of contamination and incubation times, en: *Proc. Annual Meeting US Animal Health Association*. US Animal Health Association, Richmond, Virginia, USA, pp. 382-386.
- Whitlock, R., Sweeney, R., Fyock, T., Smith, J., 2005. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* super-shedders: another factor in the control of Johne's disease, en: Chiodini, R., Hines, M., Collins, M. (Eds.), *Proceedings of the 5th International Colloquium on Paratuberculosis*. International Association for Paratuberculosis, Madison, Wisconsin, USA, p. 164.
- Whitlock, R., Sweeney, R., Hutchinson, L., Van Buskirk, M., 1995. Pennsylvania Johne's disease program (1973 to 1993): a review of the twenty year program, en: Chiodini, R., Collins, M., Bassey, E. (Eds.), *Proceedings of the 4th International Colloquium on Paratuberculosis*. International Association for Paratuberculosis, Cambridge, UK, pp. 102-110.



- Whitlock, R., Wells, S., Sweeney, R., Van Tiem, J., 2000. ELISA and fecal culture for paratuberculosis (Johne's disease): sensitivity and specificity of each method. *Vet. Microbiol.* 77, 387-398.
- Whitlock, R., West, S., Layton, B., Ellingson, J., Stabel, J., Rossiter, C., Buergelt, C., Ginn, P., Pavlik, I., Collins, M., Juste, R., Habecker, P., 1999. Paratuberculosis in bison: a comparison of PCR, culture, serology and histopathology, en: Manning, E., Collins, D. (Eds.), *Proceedings of the 6th International Colloquium on Paratuberculosis*. International Association for Paratuberculosis, Melbourne, Australia, pp. 424-438.
- Whittington, R., 2010. Cultivation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, en: Behr, M., Collins, D. (Eds.), *Paratuberculosis: Organism, Disease, Control*. CAB International, Preston, UK, pp. 244-266.
- Whittington, R., 2009. Factors affecting isolation and identification of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from fecal and tissue samples in a liquid culture system. *J. Clin. Microbiol.* 47, 614-22.
- Whittington, R., Fell, S., Walker, D., McAllister, S., Marsh, I., Sergeant, E., Taragel, C., Marshall, D., Links, I., 2000a. Use of pooled fecal culture for sensitive and economic detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in flocks of sheep. *J. Clin. Microbiol.* 38, 2550-2556.
- Whittington, R., Lloyd, J., Reddacliff, L., 2001. Recovery of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from nematode larvae cultured from the faeces of sheep with Johne's disease. *Vet. Microbiol.* 81, 273-279.
- Whittington, R., Marsh, I., Choy, E., Cousins, D., 1998. Polymorphisms in IS1311, an insertion sequence common to *Mycobacterium avium* and *M. avium* subsp. *paratuberculosis*, can be used to distinguish between and within these species. *Mol. Cell. Probes* 12, 349-358.
- Whittington, R., Marsh, I., McAllister, S., Turner, M., Marshall, D., Fraser, C., 1999. Evaluation of modified BACTEC 12B radiometric medium and solid media for culture of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from sheep. *J. Bacteriol.* 37, 1077-1083.
- Whittington, R., Marsh, I., Reddacliff, L., 2005. Survival of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in dam water and sediment. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 5304-5308.
- Whittington, R., Marshall, D., Nicholls, P., Marsh, I., Reddacliff, L., 2004. Survival and dormancy of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in the environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 2989-3004.
- Whittington, R., Reddacliff, L., Marsh, I., McAllister, S., Saunders, V., 2000b. Temporal patterns and quantification of excretion of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in sheep with Johne's disease. *Aust. Vet. J.* 78, 34-37.
- Whittington, R., Sergeant, E., 2001. Progress towards understanding the spread, detection and control of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in animal populations. *Aust. Vet. J.* 79, 267-278.
- Whittington, R., Windsor, P., 2009. In utero infection of cattle with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: a critical review and meta-analysis. *Vet. J.* 179, 60-69.
- Wilesmith, J., 1982. Johne's disease: a retrospective study of vaccinated herds in Great Britain. *Br. Vet. J.* 138, 321-331.
- Williams, S., Harris, N., Barletta, R., 1999. Development of a firefly luciferase-based assay for determining antimicrobial susceptibility of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.* 37, 304-309.
- Wilson, D., Rossiter, C., Han, H., Sears, P., 1997. Financial effects of *Mycobacterium paratuberculosis* on mastitis, culling and milk production in clinically normal dairy cattle., en: Chiadini, R., Hines, M., Collins, M. (Eds.), *Proceedings of the 5th International Colloquium on Paratuberculosis*. International Association for Paratuberculosis, Madison, Wisconsin, USA, pp. 151-158.
- Windsor, P., Eppeleston, J., Whittington, R., Jones, S., Britton, A., 2002. Efficacy of a killed *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* vaccine for the control of OJD in Australian sheep flocks, en: Juste, R., Geijo, M., Garrido, J. (Eds.),

Proceedings of the 7th International Colloquium on Paratuberculosis. International Association for Paratuberculosis, Bilbao, Spain, pp. 420-423.

Woo, S., Heintz, J., Albrecht, R., Barletta, R., Czuprynski, C., 2007. Life and death in bovine monocytes: the fate of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Microb. Pathog.* 43, 106-113.

Yates, R., Russell, D., 2005. Phagosome maturation proceeds independently of stimulation of toll-like receptors 2 and 4. *Immunity* 23, 409-417.

Yokomizo, Y., Kishima, M., Mori, Y., Nishimori, K., 1991. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay in comparison with complement fixation test for the diagnosis of subclinical paratuberculosis in cattle. *J. Vet. Med. Sci.* 53, 577-584.

Yokomizo, Y., Merkal, R., Lyle, P., 1983. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of bovine immunoglobulin G1 antibody to a protoplasmic antigen of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Am. J. Vet. Res.* 44, 2205-2207.

Yokomizo, Y., Yugi, H., Merkal, R., 1985. A method for avoiding false-positive reactions in an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the diagnosis of bovine paratuberculosis. *Japanese J. Vet. Sci.* 47, 111-119.

Zecconi, A., Mosca, A., Piccinini, R., Robbi, C., 2002. A comparison of seven different protocols to extract *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* DNA from bovine faeces, en: Juste, R., Geijo, M., Garrido, J. (Eds.), Proceedings of the 7th International Colloquium on Paratuberculosis. CAB International, Bilbao, Spain, pp. 270-273.

Zhu, X., Tu, Z., Coussens, P., Kapur, V., Janagama, H., Naser, S., Sreevatsan, S., 2008. Transcriptional analysis of diverse strains *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in primary bovine monocyte derived macrophages. *Microbes Infect.* 10, 1274-1282.

Zimmer, K., Drager, K., Klawonn, K., Hess, R., 1999. Contribution to the diagnosis of Johne's disease in cattle. Comparative studies on the validity of Ziehl-Neelsen staining, faecal culture and a commercially available DNA-Probe® test in detecting *Mycobacterium paratuberculosis* in faeces from cattle. *J. Vet. Med. Ser. B* 46, 137-140.

Zwick, L., Walsh, T., Barbiere, R., Collins, M., Kinsel, M., Murnane, R., 2002. Paratuberculosis in a mandrill (*Papio sphinx*). *J. Vet. Diagnostic Investig.* 14, 326-328.



## VIII. ANEXOS



## **ANEXO 1: MEDIDAS DE MANEJO Y BIOSEGURIDAD**

### **AREA DE PARTOS**

1. OBJETIVO: mantenerla limpia y seca.
2. PROCEDIMIENTO:
  - a) Áreas interiores:
    - Utilizar el área sólo para partos.
    - Utilizar corrales individuales, asegurando un tamaño adecuado del área.
    - Mantener siempre la cama seca.
    - Eliminar heces y cama después de cada parto.
  - b) Áreas exteriores:
    - Usar un área adecuada minimizando la acumulación de barro y heces.
  - c) Para ambas:
    - Limpiar ubres y vientre después de partos asistidos o siempre que sea posible (rebaños de carne).
    - Recoger y limpiar las ubres antes del parto y retirar los becerros inmediatamente (rebaños de leche).

### **TERNEROS LACTANTES**

1. OBJETIVO: evitar el contacto de las novillas con materiales o ambientes contaminados.
2. PROCEDIMIENTO:
  - Usar calostro de vacas negativas o de bajo riesgo para la cría de las novillas.
  - Prevenir la contaminación fecal del agua y el alimento.
  - Alimentar con lactorreemplazante o leche pasteurizada (rebaños de leche).
  - Manejar el pasto para minimizar la exposición de las novillas a forrajes contaminados (rebaños de carne).
  - Mantener a las novillas en zonas o áreas separadas de vacas de mayor edad (rebaños de leche).
  - Minimizar la transferencia de contaminación desde las vacas a las novillas, p. ej. Alimentar primero a las novillas, utilizar utensilios distintos, lavarse las botas, etc. (rebaños de leche).
  - Minimizar la exposición de las novillas a excrementos de vacas sospechosas (rebaños de carne).

### **NOVILLAS DESTETADAS Y MACHOS HASTA UN AÑO**

1. OBJETIVO: prevenir la exposición a animales infectados y a material fecal, y así como la contaminación del alimento y el agua.
2. PROCEDIMIENTO:
  - No juntar ni permitir contacto directo con ganado adulto ni sus excrementos.

- Prevenir drenajes de material fecal desde el ganado adulto hacia las áreas de recría.
- No usar comederos o bebederos comunes para el ganado adulto y la recría.
- Usar utensilios diferentes para el manejo de heces y de alimentos.
- Mantener los alimentos y el agua lejos de posible contaminación por materiales fecales.
- Evitar el tráfico (animales, personas,...) desde las zonas de ganado adulto hacia las de recría.
- No alimentar con los restos de la ración del ganado adulto al grupo de recría.

### **GANADO ADULTO**

1. OBJETIVO: eliminar los animales de alto riesgo; manejar los animales positivos para reducir el riesgo de exposición del ganado más joven y suscepto a la tuberculosis.
2. PROCEDIMIENTO:
  - Separar, analizar y eliminar todos los animales con signos clínicos de Paratuberculosis tan pronto como sea posible.
  - Manejar aparte los animales asintomáticos con resultados positivos para reducir la contaminación.
  - Eliminarlos cuando sea económicamente factible.
  - Considerar eliminar la descendencia del ganado con resultado positivo al cultivo fecal.

### **COMPRA DE ANIMALES**

1. OBJETIVO: no adquirir o traer de regreso animales infectados de paratuberculosis.
2. PROCEDIMIENTO:
  - Conocer la identidad, historial sanitario e higiene del rebaño de origen.
  - Evaluar el riesgo de paratuberculosis en otras especies además del vacuno, tales como cabras y ovejas.
  - Investigar cualquier historial de paratuberculosis, porcentaje de casos/año, o resultados de pruebas de laboratorio en el rebaño de origen.
  - Evitar comprar animales de rebaños con mayor riesgo que el propio rebaño.
  - Analizar los animales adquiridos (pre o postcompra dependiendo de la edad); integrarlos en el plan de manejo del rebaño.
  - Separar y/o prevenir el contacto con ganado de recría hasta que se conozcan los resultados de laboratorio.



