



Universidad de Buenos Aires



Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Veterinarias

*Trabajo de Tesis presentado para optar por el grado de Doctor de la
Universidad de Buenos Aires*

“Paratuberculosis bovina: función de los anticuerpos anti- lipoarabinomano en la infección”



Tesista: **Mg.Vet. Ana Jolly**

Directora: **Dra. Silvia L. Mundo**

Disciplina: Inmunología Veterinaria

Lugar de desarrollo: Cátedra de Inmunología - Facultad de Ciencias Veterinarias - UBA

2010 - 2016

Agradecer es una práctica que invita al ejercicio de mirar el camino recorrido y reconocer el apoyo y sostén de quienes, de uno u otro modo, lo hicieron posible...

A mi directora, Silvia, guía en esta ruta, con ella di mis primeros pasos en este hermoso trabajo. Siempre estuvo cerca, compartiendo abiertamente su experiencia y mostrando sus ganas de verme crecer. A ella, mi más sincero agradecimiento y la expresión de mi deseo de seguir transitando este camino en su equipo.

A Silvia Hajos, por estar presente y permitirme aprender de su experiencia, por abrirme las puertas de su laboratorio y dejarme trabajar con parte de su grupo, codo a codo. A Silvina Lompardía, becaria de Silvia, con la cual compartí largas tardes de ensayos de apoptosis. A Marilina, Daniela, y todos los miembros de su laboratorio, que siempre me recibieron de la mejor manera.

A Eloy Fernández, q.p.d., a quien recuerdo con su entusiasmo siempre vigente, que nos abrió las puertas de su casa y nos permitió trabajar con sus rodeos y aprender de su experiencia a campo.

A todo el equipo que formamos para la realización de los ensayos *in vivo*. A Maren Ebinger, veterinaria a cargo de la guachera origen de los terneros, que confió en nosotros y en que nuestro trabajo podía volver como mejora algún día al campo, y convenció a los dueños del establecimiento para que nos vendieran los animales. A Jorge De la Orden, y a todo el personal de la Administración de Campos de nuestra facultad, que nos asesoraron y ayudaron en el traslado y el manejo de los animales. Al Hospital Escuela de nuestra facultad, y a su directora Adriana Duchene, por la donación de los insumos y drogas empleadas y por facilitarnos el quirófano. A Guadalupe Álvarez, Betiana Gutiérrez, Javier Brynkier y Verónica Aranda, docentes de la cátedra de Clínica Médica y Quirúrgica en Rumiantes y Cerdos, que pusieron su experiencia a nuestro servicio, haciendo posible el manejo anestésico y quirúrgico de los terneros en forma exitosa. A mis compañeras de cátedra y amigas, Ana Stempler, María Laura Fortuny y Giselle Ingratta, sin su colaboración estos ensayos no habría sido posibles. Fue un placer trabajar con todos ellos en esta tarea y sentir que uniendo saberes se puede llegar mucho más lejos.

Al personal de los laboratorios de micobacterias de Neiker-Tecnalia (Bilbao) y de Visavet (Madrid), por recibirme y permitirme intercambiar experiencias, personales y profesionales, con sus investigadores. Y a la Universidad de Buenos, que a través de su Secretaría de Relaciones Internacionales, financió parte del costo de este

proyecto. Conservo los mejores recuerdos de ese viaje a España, que significó un enorme crecimiento para mí.

A Susi, Mary, Vivi, no docentes de la cátedra de Inmunología, por llevar a cabo día a día esa valiosa tarea a veces invisible, pero sin duda fundamental para el éxito de cualquier trabajo que se emprenda en el laboratorio.

A mis compañeros y amigos de trabajo de la cátedra, Silvita, Barbi, Laus, Anita, Gise, Ana, Lucas, Lili, ..., ¡a todos!, quienes hacen que cada día de trabajo tenga su propio color, que me acompañaron y ayudaron en este proceso. Nada hubiera sido igual sin su presencia y sus consejos. ¡¡¡Gracias!!!

A aquellos docentes del colegio secundario que estimularon mi espíritu crítico desde que era chica.

A mi papá y a su “vaca elástica”, que sin saberlo despertaron en mí otra visión de las cosas y las ganas de saber porqué suceden.

A mi familia y a mis amigos, por ser los que me acompañan, me aconsejan, me critican y me quieren.

A mis hijos Mateo y Magalí, simplemente porque sin ellos no sería la persona que soy y porque es a ellos a quienes este proyecto les ha robado horas de juegos con mamá. Al jardín maternal El Hornero, por cuidar de ellos, acompañando y estimulando su crecimiento durante las largas horas de trabajo. Y a su papá, Mariano, mi eterno compañero, por imprimir las mil y una versiones preliminares y las pilas de *papers*. Pero sobre todo, por su comprensión y su paciencia infinita, por acompañarme siempre... hasta leyó esta tesis (¡siendo abogado!) para darme su opinión. Sin él, sin lugar a dudas, todo hubiera sido mucho más difícil.

A la Facultad de Ciencias Veterinarias y a la Universidad de Buenos Aires como institución y a sus docentes, por formarme, ya desde los tiempos de la escuela secundaria, en mi querido Colegio Nacional de Buenos Aires, como veterinaria y luego en mis estudios de posgrado, como magíster, doctora y docente. Pondré todo mi empeño y dedicación para intentar, con el fruto de mi trabajo, devolverle a la sociedad parte de lo que gratuitamente esta institución me ha brindado.

“Declaro que el material incluido en esta tesis es, a mi mejor saber y entender, original producto de mi propio trabajo (salvo en la medida en que se identifique explícitamente las contribuciones de otro) y que no ha sido presentado, en forma total ni parcial, en otra tesis, en ésta u otra institución.”

Ana Jolly

Índice de Figuras y Tablas	I
Abreviaturas	V
Resumen	VIII
En español.....	VIII
En inglés.....	X
1. Introducción	1
1.1. Paratuberculosis: definición e importancia de la enfermedad.....	1
1.2. Transmisión	4
1.3. El agente causal y su composición antigénica.....	7
1.4. Patogenia y respuesta inmune	11
1.5. Diagnóstico.....	19
1. Diagnóstico directo	20
A. Necropsia y diagnóstico histopatológico.....	20
B. Microscopía.....	20
C. Cultivo bacteriológico.....	20
D. Diagnóstico molecular.....	21
2. Diagnóstico indirecto	23
A. Detección de la respuesta inmune celular.....	23
B. Detección de la respuesta inmune humoral.....	24
1.6. Estrategias de control.....	25
2. Hipótesis y Objetivos	28
3. Capítulo 1 – Modelo de infección <i>in vitro</i>	29
I.1. Introducción.....	29
I.2. Materiales y métodos.....	33
1. Obtención de fagocitos empleados para los ensayos de infección con <i>Map</i>	33
A. Cultivos primarios de macrófagos bovinos (MDMB).....	33
B. Células Bomac.....	35
2. Bacterias	35
3. Anticuerpos	36

A. Producción y obtención de los sueros bovinos específicos frente a LAM.....	37
1. Extracción y caracterización de LAM a partir de un cultivo de micobacterias	37
2. Elaboración del inmunógeno, inmunización de bovinos y caracterización de la respuesta inmune humoral inducida	38
B. Preparación de los sueros para los ensayos de infección de macrófagos	40
4. Ensayos de infección de macrófagos con <i>Map</i> y evaluación de apoptosis...	42
A. Tinción con Naranja de Acridina/Bromuro de Etidio y microscopía de fluorescencia.. ..	42
B. Marcación con Anexina V/ 7-Amino-Actinomycina D (7-AAD) y citometría de flujo	44
C. Marcación con Anexina V/ 7-AAD de cultivos infectados con <i>Map</i> marcada previamente con Isotiocianato de fluoresceína (FITC).....	44
5. Ensayos de infección de macrófagos con <i>Map</i> y evaluación de citoquinas en los sobrenadantes de cultivo a través de la técnica de ELISA	45
A. Definición de la metodología a emplear para la técnica de medición de TNF α e IL-10.....	45
B. Definición de las condiciones del ensayo de infección de macrófagos con <i>Map</i> para la evaluación de las citoquinas	47
6. Análisis estadístico	50
I.3. Resultados.....	51
1. Producción y obtención de los sueros bovinos específicos frente a LAM	51
A. Obtención del inmunógeno para la producción de los sueros anti-LAM.....	51
B. Obtención de grandes volúmenes de suero bovino anti-LAM y su caracterización.....	52
2. Evaluación de Apoptosis	54
3. Evaluación de citoquinas en los sobrenadantes de cultivo a través de la técnica de ELISA.....	60
Resumen de los principales hallazgos relacionados con el modelo <i>in vitro</i> de infección por <i>Map</i>	62
4. Capítulo 2 – Modelo de infección <i>in vivo</i>	63

II.1.	Introducción.....	63
II.2.	Materiales y métodos.....	69
1.	Animales.....	69
2.	Obtención del inóculo bacteriano para el desafío	71
3.	Anticuerpos	72
4.	Modelo de infección de segmentos intestinales.....	73
5.	Procesamiento y evaluación de histopatología temprana	78
6.	Obtención de ácidos nucleicos tisulares.....	78
A.	ADN	78
B.	ARN.....	79
7.	Evaluación y cuantificación de <i>Map</i> en tejido.....	81
A.	Por tinción para microorganismos ácido-alcohol resistentes (BAAR) en cortes tisulares	81
B.	Por cultivo microbiológico. Procesamiento y cultivo de muestras tisulares	82
C.	Por PCR en Tiempo Real para detección de IS900.....	83
8.	Evaluación de la producción temprana de citoquinas tisulares	85
9.	Análisis estadístico	87
II.3.	Resultados	88
1.	Análisis histológico de los cortes de segmentos teñidos con Hematoxilina/Eosina.	88
2.	Obtención de ácidos nucleicos tisulares.....	90
A.	ADN	90
B.	ARN.....	91
3.	Identificación de la presencia de <i>Map</i> en los segmentos intestinales	93
A.	Tinción de Fite-Faraco para microorganismos ácido-alcohol resistentes	93
B.	Cultivo microbiológico	95
C.	PCR-IS900 en Tiempo Real.....	96
4.	Evaluación de la producción temprana de citoquinas tisulares	98

Resumen de los principales hallazgos relacionados con el modelo <i>in vivo</i> de infección por <i>Map</i>	99
5. Discusión y conclusiones	100
1. Modulación por anticuerpos sobre los efectos de <i>Map</i> en el modelo <i>in vitro</i> de infección.....	101
2. Modulación por anticuerpos sobre los efectos de <i>Map</i> en el modelo <i>in vivo</i> de infección	107
3. Reflexiones finales	114
4. Proyección	119
6. Referencias bibliográficas	123
7. Anexos	163
Anexos Técnico	164
Financiamiento y producción científica	169

Figuras

1. Introducción	1
Figura 1. Curva teórica global de la presencia histórica de paratuberculosis en el ganado	2
Figura 2. Transmisión de <i>Map</i> : vías y factores que influyen.....	6
Figura 3. Árbol filogenético de las subespecies de <i>Mycobacterium avium</i>	8
Figura 4. Ubicación de LAM en la pared celular de las micobacterias	10
Figura 5. Eventos tempranos en la infección intestinal por <i>Map</i> : interacción bacteria-macrófago <i>in vivo</i>	12
Figura 6. Signos clínicos y lesiones patológicas macroscópicas características de la paratuberculosis	14
Figura 7. Estadios de la infección por <i>Map</i> en bovinos y modelo inmunopatológico de la paratuberculosis.....	15
3. Capítulo 1 – Modelo de infección <i>in vitro</i>	29
I.2. Materiales y métodos.....	33
Figura 8. Modelo de infección <i>in vitro</i> por <i>Map</i>	33
Figura 9. Diferentes pasos para la obtención de cultivos primarios de macrófagos bovinos.....	34
Figura 10. Cultivos primarios de macrófagos bovinos (MDMB).....	35
Figura 11. Imágenes de los bovinos inmunizados con LAM.....	39
Figura 12. Plan de inmunización y muestreos	39
Figura 13. Purificación de los Acs séricos bovinos.....	41
Figura 14. Tinción de Bomac y MDMB con NA/BE.....	43
Figura 15. Interpretación de la citometría de flujo con marcación con Anexina V/ 7-AAD	44
Figura 16. Análisis diferencial de apoptosis en macrófagos infectados <i>vs.</i> no infectados.....	45
Figura 17. Esquemas de los sistemas empleados para la detección por ELISA de las citoquinas bovinas	46
Figura 18. Niveles de TNF α detectados por ELISA en sobrenadantes de células Bomac infectadas con distintas concentraciones de <i>Map</i>	48
Figura 19. Niveles de IL-10 detectados por ELISA en sobrenadantes de células Bomac infectadas con distintas concentraciones de <i>Map</i>	49

I.3. Resultados.....	51
Figura 20. Caracterización del extracto LAM	52
Figura 21. Especificidad de los anticuerpos inducidos por inmunización	53
Figura 22. Evaluación de apoptosis en macrófagos infectados usando la tinción con NA/BE.....	55
Figura 23. Evaluación de apoptosis en macrófagos infectados mediante la marcación con Anexina V y 7-AAD.....	56
Figura 24. Comparación de los niveles de apoptosis encontrados al pretratar <i>Map</i> con suero de los bovinos inmunizados, pre- y post- inmunización con LAM.....	57
Figura 25. Comparación de los niveles de apoptosis encontrados al pretratar <i>Map</i> con sueros o Acs purificados.....	58
Figura 26. Evaluación de apoptosis en macrófagos Bomac por citometría de flujo, empleando <i>Map</i> marcada con FITC	59
Figura 27. Niveles de citoquinas detectados en sobrenadantes de Bomac infectadas con <i>Map</i> preincubada con diferentes sueros.....	60
Figura 28. Niveles de citoquinas detectados en sobrenadantes de Bomac infectadas con <i>Map</i> preincubada con anticuerpos purificados.....	61
4. Capítulo 2 – Modelo de infección <i>in vivo</i>	63
II.2. Materiales y métodos.....	69
Figura 29. Modelo de infección <i>in vivo</i> por <i>Map</i>	69
Figura 30. Terneros empleados en la experiencia <i>in vivo</i> de infección, en su alojamiento y variables iniciales evaluadas	70
Figura 31. Foto ilustrativa de los frascos de cultivo de <i>Map</i> crecidos para obtener las cantidades necesarias de masa bacteriana para la infección	71
Figura 32. Composición de los <i>pooles</i> de sueros y Acs precipitados obtenidos	72
Figura 33. Equipo de trabajo realizando las cirugías en el quirófano de grandes animales del Hospital Escuela de nuestra Facultad	74
Figura 34. Determinación de segmentos intestinales en el íleon.....	75
Figura 35. Inoculación de segmentos intestinales en el íleon.....	76
Figura 36. Toma de muestras luego de las 3,5 hs de infección quirúrgica	77
Figura 37. Método de criohomogeneización para extracción de ARN.....	80

Figura 38. Curva estándar construida con los valores de Ct promedio obtenidos en 3 repeticiones independientes para distintas cantidades de ADN de <i>Map</i> (QADN_ <i>Map</i>).....	85
Figura 39. Eficiencias de amplificación de los 3 genes blanco bajo las condiciones de reacción seleccionadas	86
II.3. Resultados	88
Figura 40. Aspecto microscópico de los cortes histológicos de los segmentos intestinales.	89
Figura 41. Análisis microscópico comparado de cortes histológicos de los segmentos intestinales infectados con <i>Map</i> y PBS	90
Figura 42. Evaluación de la calidad del ARN extraído de las muestras tisulares.....	92
Figura 43. Tinción de Fite-Faraco para microorganismos ácido-alcohol resistentes	94
Figura 44. Tendencia grupal de recuperación bacteriana a partir de cada segmento	95
Figura 45. Foto ilustrativa de las diferencias en UFC recuperadas de los distintos segmentos	96
Figura 46. Expresión relativa de TNF α e IL-10 en los segmentos intestinales infectados de los 3 terneros	98
5. Discusión y conclusiones	100
Figura 47. Captación de <i>Map</i> luego del ingreso vía oral	116
Figura 48. Escenarios hipotéticos en el primer contacto <i>Map</i> -huésped y su impacto sobre la progresión de la infección	118
 Tablas	
1. Introducción	1
Tabla I. Técnicas recomendadas para el diagnóstico de la paratuberculosis según el propósito	19
3. Capítulo 1 – Modelo de infección <i>in vitro</i>	29
I.2. Materiales y métodos	33
Tabla II. Stocks bacterianos producidos	36

Tabla III. Nivel de reactividad frente a TNF α y de IL-10 del medio de cultivo empleado para las células Bomac y los MDMB.....	47
I.2. Resultados.....	51
Tabla IV. Composición del extracto LAM obtenido	51
Tabla V. Niveles de anticuerpos anti-LAM inducidos por inmunización	53
Tabla VI. Nivel de reactividad frente a PPA pre- y pos- inmunizaciones	54
Tabla VII. Relación TNF α /IL-10 encontrada en los sobrenadantes de Bomac infectadas con <i>Map</i> en presencia de Acs puros	61
4. Capítulo 2 – Modelo de infección <i>in vivo</i>.....	63
II.1. Introducción.....	63
Tabla VIII. Modelos <i>in vivo</i> de infección por <i>Map</i> a corto plazo.....	65
II.2. Materiales y métodos.....	69
Tabla IX. Detalle de los inóculos empleados para los distintos segmentos....	76
Tabla X. Resultados comparativos de las 4 combinatorias de condiciones evaluadas para la reacción de PCR en Tiempo Real.....	83
Tabla XI. Resultados comparativos de las 2 combinatorias de condiciones evaluadas adicionalmente para la reacción de PCR en Tiempo Real.....	84
II.2. Resultados.....	88
Tabla XII. Peso húmedo y títulos de <i>Map</i> de los inóculos empleados en cada cirugía	88
Tabla XIII. Evaluación espectrofotométrica de las muestras de ADN obtenidas a partir de los segmentos intestinales	91
Tabla XIV. Evaluación espectrofotométrica de las muestras de ADN $_{copy}$ obtenidas por retrotranscripción.....	92
Tabla XV. Recuento de UFC recuperadas a partir de los segmentos intestinales en cada animal	95
Tabla XVI. Datos y estimaciones realizadas sobre la cantidad de <i>Map</i> en tejido medida por PCR IS900 en Tiempo Real.....	97
Tabla XVII. Tendencia grupal de recuperación de Equivalentes Genómicos de <i>Map</i> a partir de cada segmento.....	97

- **AAR:** ácido-alcohol resistente
- **ACD:** Citrato de sodio 2,2% p/v- Dextrosa anhidra 2,45% p/v- Ácido Cítrico anhidro 0,73% p/v
- **Acs:** anticuerpos
- **ADC:** albúmina-dextrosa-cloruro de sodio, suplemento para los medios de cultivo de *Map.*
- **ADN:** ácido desoxirribonucleico
- **Acs:** anticuerpos
- **AFI:** adyuvante de Freund incompleto
- **Ahp:** alquil hidroperoxidasa reductasa
- **AraLAM:** LAM sin *cap*
- **ARN:** ácido ribonucleico
- **BAAR:** bacilo ácido-alcohol resistente
- **BE:** Bromuro de Etidio
- **Bov.:** bovina
- **Cap.:** caprina
- **CCB:** capa de células blancas sanguíneas
- **CMP:** células mononucleares periféricas
- **Ct:** ciclo de superación del umbral de fluorescencia en PCR a Tiempo Real
- **d.:** días
- **DAB:** diaminobenzidina
- **ΔRn:** rango de fluorescencia en PCR a Tiempo Real
- **DEPC:** dietil pirocarbonato
- **DO:** densidad óptica
- **EC:** enfermedad de Crohn
- **EDTA:** ácido etilendiaminotetraacético
- **FC:** prueba de Fijación del Complemento
- **FGF:** factor de crecimiento de fibroblastos
- **FITC:** isotiocianato de fluoresceína
- **GH:** hormona de crecimiento
- **h.:** horas
- **HA:** ácido hialurónico
- **HE:** tinción de hematoxilina/eosina
- **HP:** histopatología
- **HPC:** cloruro de hexadecilpiridinio

- **HSP:** Heat Shock Protein (o proteína de choque térmico)
- **HYEM:** Medio Herrold con yema de huevo
- **IDGA:** Prueba de Inmunodifusión en Gel de Agar
- **IDR:** intradermorreacción
- **IFN γ :** interferón gamma
- **INRA:** *Institut National de la Recherche Agronomique* (Francia)
- **LAM:** lipoarabinomanano
- **LB:** Linfocitos B
- **LN:** linfonódulo
- **LNIC:** linfonódulo ileocecal
- **LP:** lámina propia
- **LT:** Linfocitos T
- **LTh:** Linfocitos T *helper* o colaboradores
- **m.:** meses
- **Maa:** *Mycobacterium avium* subsp. *avium*
- **MAC:** Complejo *Mycobacterium avium*
- **Mah:** *Mycobacterium avium* subsp. *hominisuis*
- **ManLAM:** LAM con *cap* de manosas
- **Map:** *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*
- **Mas:** *Mycobacterium avium* subsp. *silvaticum*
- **MCP:** *Monocyte Chemoattractant protein* (o Proteína Quemoattractante de Monocitos)
- **MDM:** macrófagos derivados de monocitos sanguíneos
- **MDMB:** macrófagos derivados de monocitos sanguíneos bovinos
- **ME:** microscopía electrónica
- **MF:** materia fecal
- **Min:** minutos
- **MMP:** metaloproteinasas de la matriz extracelular
- **MO:** microscopía óptica
- **NA:** Naranja de Acridina
- **NC:** no corresponde
- **ND:** no determinado
- **Neg.:** negativo
- **NVA:** células no viables apoptóticas
- **NVN:** células no viables necróticas
- **Ov.:** ovina

- **PBS:** buffer fosfato
- **PCR:** Reacción en Cadena de la Polimerasa
- **PDIM:** dimicocerosato de ftiocerol
- **p.i:** post-infección
- **PILAM:** LAM con *cap* de fosfoinositol
- **PP:** placa de Peyer
- **PPA:** Antígeno Protoplasmático de Paratuberculosis
- **PPD:** derivado proteico purificado; de origen aviar (PPDa) o bovino (PPDb)
- **Q_{ADN_{Map}}:** cantidad de ADN de *Map*
- **RANTES:** *Regulated on Activation, Normal T cell Expressed and Secreted* (o CCL5)
- **RCs:** receptores del complemento
- **Ref.:** Referencia
- **RFcs:** receptores de la porción Fc de los anticuerpos
- **RI:** respuesta inmune
- **Rpm:** revoluciones por minuto
- **RQ:** expresión relativa de un gen de interés comparada con la de un gen normalizador en los ensayos de RT-PCR.
- **RT-PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa
- **SDS-PAGE:** electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida
- **Seg.:** segundos
- **sem:** semanas
- **SENASA:** Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria
- **SF:** solución fisiológica estéril
- **SFB:** suero fetal bovino
- **7-AAD:** 7-Aminoactinomicina D
- **T°:** temperatura
- **TGF:** factor de crecimiento tumoral
- **Th:** linfocito T *helper* o auxiliador
- **Treg:** linfocito T regulador
- **UFC:** unidades formadoras de colonias
- **UR:** unidades relativas
- **VA:** células viables apoptóticas
- **VN:** células viables normales
- **VNTR:** *Variable Number Tandem Repeat*
- **ZN:** tinción de Ziehl-Neelsen

La paratuberculosis es una enfermedad granulomatosa, progresiva y crónica de los rumiantes causada por *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (*Map*). Si bien su presentación es endémica a nivel mundial, su prevalencia está subestimada por las limitantes asociadas al diagnóstico. Presenta importancia en Salud Pública y fuerte impacto económico. Esto sumado a la carencia de medidas eficaces para su prevención, hacen de la paratuberculosis una enfermedad con muchos temas vacantes en materia de investigación.

Si bien *Map* es un patógeno intracelular, la presencia de anticuerpos específicos en la luz intestinal al momento de la infección podría modular la respuesta del huésped. El objetivo de esta tesis fue evaluar el efecto de la opsonización de *Map* con anticuerpos anti-lipoaranimanano (LAM, antígeno inmunodominante de superficie de *Map*) sobre la respuesta a la infección de macrófagos bovinos (*in vitro*) y de segmentos intestinales en terneros (*in vivo*). En ambos modelos, se emplearon anticuerpos séricos de bovinos sanos (n=2), con paratuberculosis natural (n=3) o inmunizados con LAM (n=3) para pretratar *Map*.

En los experimentos *in vitro*, las variables estudiadas fueron el nivel de apoptosis y de secreción de TNF α e IL-10. Encontramos que la presencia de anticuerpos específicos incrementó significativamente la apoptosis de los macrófagos infectados. Por ejemplo, obtuvimos valores de $24,2 \pm 2,9$ % y de $22,4 \pm 0,9$ % al preincubar *Map* con anticuerpos de bovinos inmunizados con LAM o infectados, mientras que el porcentaje de apoptosis en presencia de anticuerpos de bovinos sanos fue de $17,2 \pm 2,6$ %. Este efecto estuvo acompañado por un incremento significativo del nivel de secreción de TNF α en ambos casos.

Para el modelo *in vivo*, se realizó la infección quirúrgica de segmentos intestinales de 3 terneros con: *Map* en PBS, o preincubada con anticuerpos. Se evaluó el aspecto microscópico de los cortes tisulares, la presencia bacteriana y los niveles relativos de expresión de TNF α e IL-10, a las 3,5 horas post-infección. Como principal resultado encontramos una diferencia significativa en el nivel de recuperación bacteriana a partir de los segmentos infectados con los diferentes anticuerpos. Cuando la infección se produjo en presencia de anticuerpos específicos hubo una reducción significativa de las Unidades Formadoras de Colonias (UFC) recuperadas, tanto con los obtenidos de bovinos inmunizados con LAM como de infectados ($2,6 \pm 1,3 \times 10^4$ y $0,4 \pm 0,3 \times 10^4$, respectivamente, vs. $5,4 \pm 1,1 \times 10^4$ UFC/g tejido, para los segmentos inoculados en presencia de anticuerpos de bovinos sanos).

En conjunto, los resultados de esta tesis indican que los anticuerpos específicos modulan los efectos de la infección por *Map*, tanto *in vitro* como *in vivo*, en los modelos bovinos estudiados. Asimismo, postulan por primera vez la capacidad de los anticuerpos de modular la apoptosis de macrófagos. A modo de reflexión final, es posible hipotetizar que la presencia local de altos niveles de anticuerpos específicos al momento de la infección natural por *Map* podría afectar la supervivencia bacteriana en el intestino, en parte por su contribución para el desarrollo de un microambiente pro-inflamatorio, con predominio de TNF α y por el incremento de los niveles de apoptosis de los macrófagos infectados. Estos efectos tendrían un impacto positivo sobre la respuesta inmune en desarrollo y sobre el control de la infección. Es necesario continuar nuestras investigaciones a fin de establecer la relevancia de la inmunidad mediada por anticuerpos en la prevención de la paratuberculosis bovina.

Paratuberculosis is a chronic progressive granulomatous disease affecting ruminants, and is caused by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (*Map*). Its worldwide distribution is known, although its prevalence remains underestimated due to the difficulties derived from its diagnostic. It also has economic and public health importance. In addition, the lack of preventive methods hampers its control and determines the existence of vacancies in research topics related with paratuberculosis.

Even when *Map* is an intracellular bacterium, the presence of specific antibodies in the intestinal lumen at the moment of infection could modulate the host response. The aim of this thesis was to assess the effect of anti-lipoarabinomannan antibodies (LAM, main immunodominant exposed antigen on *Map* surface) on the response to infection with opsonized *Map* of bovine macrophages (*in vitro*) and of calf ileal loops (*in vivo*). Antibodies were obtained from sera of healthy (n=2), paratuberculosis naturally infected (n=3) or LAM-immunized (n=3) bovines.

The level of apoptosis and TNF α /IL-10 secretion were measured *in vitro*. We found a significant increase of the apoptosis level in macrophages when the infection took place in the presence of specific antibodies (24.2 ± 2.9 % and 22.4 ± 0.9 % with antibodies from LAM-immunized or paratuberculosis infected bovines, respectively, *vs.* 17.2 ± 2.6 % with antibodies from healthy bovines). This effect was accompanied by an increase in the secretion of TNF α in both cases.

For the *in vivo* model, ileal loops of three calves were inoculated with *Map* in PBS, with or without antibodies. The microscopic aspect of tissue sections, the bacterial presence and the local relative expression of TNF α and IL-10 were evaluated. As the main result, a significant reduction in bacterial counts (CFU, colony forming units) were detected in the presence of specific antibodies ($2.6 \pm 1.3 \times 10^4$ CFU/g and $0.4 \pm 0.3 \times 10^4$ CFU/g for anti-LAM and infected group *vs.* $5.4 \pm 1.1 \times 10^4$ CFU/g for antibodies from healthy bovines).

Overall, these findings show that specific antibodies modulate the effects of *Map* infection *in vitro* as well as *in vivo* in the bovine models studied here. They also demonstrate for the first time that apoptosis of macrophages can be modulated by antibodies. On reflection, it is possible to hypothesize that the presence of specific antibodies at the portal entry dampen *Map* survival after mucosal invasion, at least partially by promoting a pro-inflammatory environment, with TNF α predominance,

and by increasing the apoptosis level of infected macrophages. These effects could positively impact in the mounted immune response and in the control of the infection. Further research is needed in order to establish the relevance of antibody mediated immunity on paratuberculosis prevention in cattle.

1. Introducción

1.1. Paratuberculosis: definición e importancia de la enfermedad.

La paratuberculosis es una enfermedad granulomatosa, progresiva y crónica causada por *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (*Map*), que afecta principalmente a rumiantes y camélidos domésticos (bovinos, ovinos, caprinos, llama y alpaca) y silvestres (ciervo, gamo, alce, muflón, guanaco, vicuña, entre otros). Es endémica en los cinco continentes y genera pérdidas económicas considerables en la producción ganadera y las industrias derivadas (Ott y col., 1999; Lombard y col., 2005; Kudahl y col., 2008; Bhattarai col., 2013; revisado por García y Shallo, 2015). Su diagnóstico y control resultan un desafío, principalmente debido al largo período de incubación, durante el cual los animales infectados son muy difíciles de detectar, y a la gran capacidad que tiene *Map* para sobrevivir en el ambiente.

Según los datos bibliográficos, el primer caso registrado de esta enfermedad dataría de 1826, cuando se describió un cuadro de engrosamiento de la mucosa del intestino delgado en un bovino asociado con diarreas crónicas, que no coincidía con ninguna patología identificada en aquél momento. La primer descripción de la paratuberculosis como entidad fue realizada por Johne y Frothingham, en Alemania, en 1895, como “un caso peculiar de tuberculosis” en un bovino (Johne y Frothingham, 1895). Unos años después, Bang diferenció esta patología de la tuberculosis utilizando por primera vez la intradermorreacción con tuberculinas de distinto origen (Bang, 1906), y la renombró como pseudotuberculosis o enfermedad de Johne, nombre que conserva hasta la actualidad. Como se muestra en la **Figura 1**, desde estas primeras descripciones de la enfermedad en Europa, el agente se propagó a los rodeos de América y los demás continentes, coincidiendo con el proceso de colonización y el desarrollo pecuario. Las estimaciones disponibles indican que más del 50 % de los establecimientos lecheros de Europa y Norteamérica estarían infectados (USDA-APHIS-VS-CEAH, 2008; Nielsen y Toft, 2009). Por otro lado, ningún país ha publicado suficiente información como para declararse libre de *Map* (Nielsen y Toft, 2009). En nuestra región, Fernández-Silva y col. (2014) han publicado una revisión de estudios sobre prevalencia en ocho países de Latinoamérica y Caribe, informando valores promedio de 16,9 % y 75,8 % para bovinos, a nivel individual y de rodeos, respectivamente. La información sobre la paratuberculosis en la Argentina es escasa y parcial; se conocen sólo tres relevamientos que aportan datos de seroprevalencia individual: uno realizado en el suroeste de la provincia de Córdoba, en el que se describe un 5,3 % (Magnano y

col., 2002), otro realizado en rodeos de cría de la Cuenca del Salado, provincia de Buenos Aires, en el que se informa entre un 7,2 % y un 19,6 % (Paolicchi y col., 2004), y el tercero en rodeos lecheros de la provincia de Corrientes, en el que se detectó una seroprevalencia del 7,6% (Martinis Mercado y col., 2014). Se ha postulado que ésta sería una de las enfermedades infecciosas más costosas para la industria láctea en USA, provocando pérdidas anuales estimadas en USD 200-250 millones (Ott y col., 1999). En nuestro país, las pérdidas derivadas de esta enfermedad fueron estimadas en USD 22 millones para la zona de cría de la cuenca del Salado y en USD 6,3 millones para las cuencas lecheras de la provincia de Buenos Aires (Pasucci y col., 2007). No obstante, la carencia de datos epidemiológicos actuales y completos sobre esta enfermedad impide precisar su impacto real en nuestros rodeos.

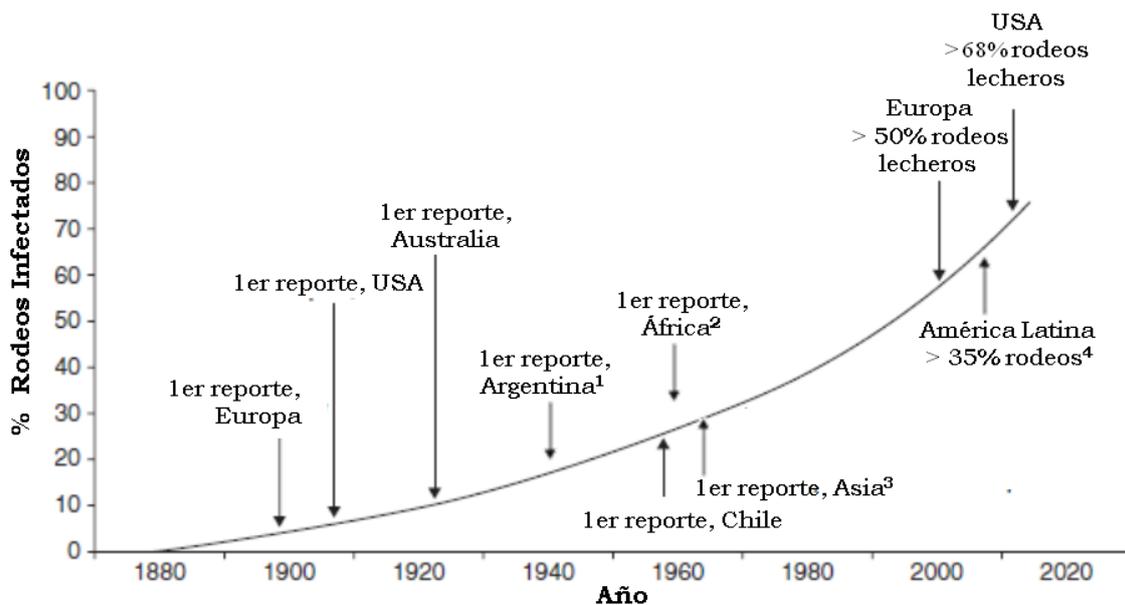


Figura 1. Curva teórica global de la presencia histórica de paratuberculosis en el ganado. Traducida y modificada a partir de la publicada por Manning y Collins (2010). ¹: Ubach (1941); ²: Lobry (1963), revisado por Okuni (2013); ³: Talatchian (1965); ⁴: Fernández-Silva y col., (2014).

Otra enfermedad causada por micobacterias que afecta al ganado es la tuberculosis, la cual tiene una importancia probada en Salud Pública, puesto que hasta un 37,7 % de los casos de tuberculosis humana en distintos países del mundo se debe a una transmisión zoonótica a partir de bovinos infectados (Kantor y col., 2012; Müller y col., 2013). En Argentina, la tasa de decomiso en frigoríficos debida a lesiones tuberculosas disminuyó de 6,7 % a 0,3 %, entre los años 1969 y

2014 (Torres, 2014). No obstante, estudios a campo demuestran la alta presencia de la tuberculosis en nuestros rodeos. En 2011, sobre un total de 1.671 bovinos evaluados en 31 establecimientos de diferentes provincias del centro de nuestro país, se encontró un 29 % de rodeos positivos y un 6,8 % de bovinos reaccionantes al derivado proteico purificado bovino (PPDb) (Magnano y col., 2012). Es importante considerar que el “Plan Nacional de Control y Erradicación de la Tuberculosis Bovina en la República Argentina”, actualizado en el año 2012 por el Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (Res. SENASA N° 128/2012), propone como principal técnica diagnóstica la intradermoreacción simple con el PPDb y la eliminación de los animales positivos. Según diferentes estudios, esta herramienta no permitiría discriminar correctamente entre los animales infectados por *M. bovis* y aquéllos infectados con *Map* (Seva y col., 2014; Garrido y col., 2013). Esto agrega importancia al diagnóstico de la paratuberculosis en los rodeos bovinos de Argentina.

Otra cuestión que hace a la relevancia de esta enfermedad es su semejanza con la enfermedad de Crohn (EC), patología crónica intestinal de los humanos. Puesto que la histopatología y la presentación clínica de ambas entidades poseen remarcables coincidencias, se ha postulado a *Map* como agente involucrado en su patogenia. Se sabe que *Map* puede sobrevivir al proceso de pasteurización de la leche (Chiodini y Hermon-Taylor, 1993) y ha sido encontrada en bajas concentraciones en leche comercial y productos lácteos en distintas partes del mundo (Ikonomopoulos y col., 2005; Clark y col., 2006; Cerf y col., 2007; National Advisory Committee on Microbiological, 2010; Shankar y col., 2010; Paolicchi y col., 2012; Botsaris y col., 2016; Gilardoni y col., 2016). Además, se ha descrito su presencia en el agua corriente (Aboagye y Rowe, 2011) y en aerosoles ambientales y de origen animal (Rhodes y col., 2014). Por lo que si bien el papel de *Map* en la EC aún está en revisión (Atreya y col., 2014; Naser y col., 2014; Waddell y col., 2015; Khan y col., 2016), la exposición humana a este agente es indudable. Diferentes trabajos aportan evidencias que sugieren fuertemente una asociación entre *Map* y esta enfermedad. Por ejemplo, ciertas mutaciones genéticas que se han encontrado asociadas tanto a la EC como a la susceptibilidad a la infección por micobacterias en humanos (Jostins y col., 2012); y la detección molecular de *Map* en el 92 % (Bull y col., 2003) y en el 100 % (Mendoza y col., 2010) de las muestras de pacientes con EC estudiadas. Asimismo, se ha sugerido la presencia de *Map* en las lesiones de EC bajo la morfología de esferoplastos, que son formas bacterianas con una pared

celular deficiente, lo cual generaría dificultades para su identificación por métodos titntoriales y de cultivo (Wall y col., 1993; Hulten y col., 2000; Bull y col., 2003, Mendoza y col., 2010). Esto explicaría la baja cantidad de reportes sobre aislamientos de *Map* a partir de muestras de pacientes con EC. Por último, Bannatine y col. (2014b) han aislado y secuenciado el genoma completo de *Map* a partir de leche de una mujer con esta enfermedad, aportando nuevas evidencias sobre las similitudes de la enfermedad de Crohn en humanos y la paratuberculosis en el ganado. En los últimos años también se ha postulado su participación en otras patologías humanas, como la esclerosis múltiple (Cossu y col., 2013; Mameli y col., 2016), la diabetes mellitus (Rani y col., 2014; Masala y col., 2015), la tiroiditis de Hashimoto (Masala y col., 2014) y la enfermedad de Parkinson (Arru y col., 2016).

Todos estos datos demuestran el alto impacto de la paratuberculosis en nuestra actividad ganadera y el riesgo que implica en la Salud Pública.

1.2. Transmisión.

Una particularidad de la paratuberculosis entre las enfermedades producidas por micobacterias es la susceptibilidad a la infección ligada a la edad. Los terneros menores de seis meses, principalmente los neonatos, son los más susceptibles (Manning y Collins, 2001; Windsor y Whittington, 2010; Espejo y col., 2013; Mortier y col., 2013). Algunos factores que podrían explicar esta asociación entre edad y susceptibilidad a la infección son: I- la presencia de “intestino abierto” (*open gut*) en los neonatos, que facilitaría la invasión tisular (Sweeney, 1996); II- el importante desarrollo en terneros de las placas de Peyer ileales, puerta de entrada de la bacteria (Yasuda y col., 2006; Takanashi y col., 2008); y III – el pasaje directo de *Map* del esófago al abomaso, determinado por el reflejo de gotera esofágica presente en bovinos jóvenes, que evade mecanismos defensivos del tracto alimentario (Clarke, 1997).

La transmisión ocurre principalmente por la vía oral, por contaminación fecal de ubres/pasturas o a través de calostro/leche provenientes de bovinos infectados (Sweeney, 1996; Diéguez y col., 2008; Kudahl y col., 2008; Künzler y col., 2014). Esto implica riesgo de infección aún cuando se apliquen rigurosas prácticas de higiene antes de la recolección del calostro/leche (Slana y col., 2008). La transmisión vertical también es posible (Larsen y Kopecky, 1970; Paolicchi y col.,

2014), si bien el riesgo de infección intrauterina sería limitado (Whittington y Windsor, 2009). La vía venérea podría constituir también una alternativa de infección, ya que se ha informado el aislamiento de *Map* a partir de muestras de semen bovino (Sweeney, 1996; Münster y col., 2013). En la **Figura 2** se esquematizan las vías de transmisión de esta enfermedad y la influencia de algunos de los factores del huésped, de la bacteria y del ambiente. Tradicionalmente se planteaba una asociación fuerte entre el estado de infección de la hembra y el de su cría (Benedictus y col., 2008). Más recientemente se ha reconocido la importancia que también tienen el nivel de prevalencia del rodeo (Nielsen y col., 2016) y las medidas de higiene en las guacheras (Donat y col., 2016) como factores de riesgo. La posibilidad de transmisión por aerosoles (Eisenberg y col., 2011), la descripción de los terneros como eliminadores fecales de *Map*, y la comprobación de transmisión horizontal entre animales de esta categoría etaria (Wolf y col., 2015), obligan a revisar la relevancia de las diferentes vías de transmisión en la epidemiología de la paratuberculosis.

Por otro lado, si bien son las especies domésticas susceptibles las que juegan un papel principal en la transmisión de *Map*, muchos animales silvestres podrían estar involucrados como reservorios ambientales. Esta bacteria ha sido aislada de roedores (Matos y col., 2013), conejos (Beard y col., 2001; Salgado y col., 2011), liebres (Salgado y col., 2014), canguros (Cleland y col., 2010), jabalíes (Kim y col., 2013; Matos y col., 2016), rinocerontes (Bryant y col., 2012), primates (Singh y col., 2011), diversas especies de carnívoros (Matos y col., 2014) y aves (Corn y col., 2005; Gaukler y col., 2009), entre otros animales (revisado por Carta y col., 2013). En muchas de estas especies se ha demostrado la presentación de un cuadro patológico semejante al descrito en rumiantes y el aislamiento de *Map* a partir de materia fecal (MF). Puesto que la transmisión entre especies silvestres y domésticas ha sido comprobada (Stevenson y col., 2009; Fritsch y col., 2012; Shauhnessy y col., 2013), el papel de estos animales en la epidemiología de la paratuberculosis debe ser tenido en cuenta.

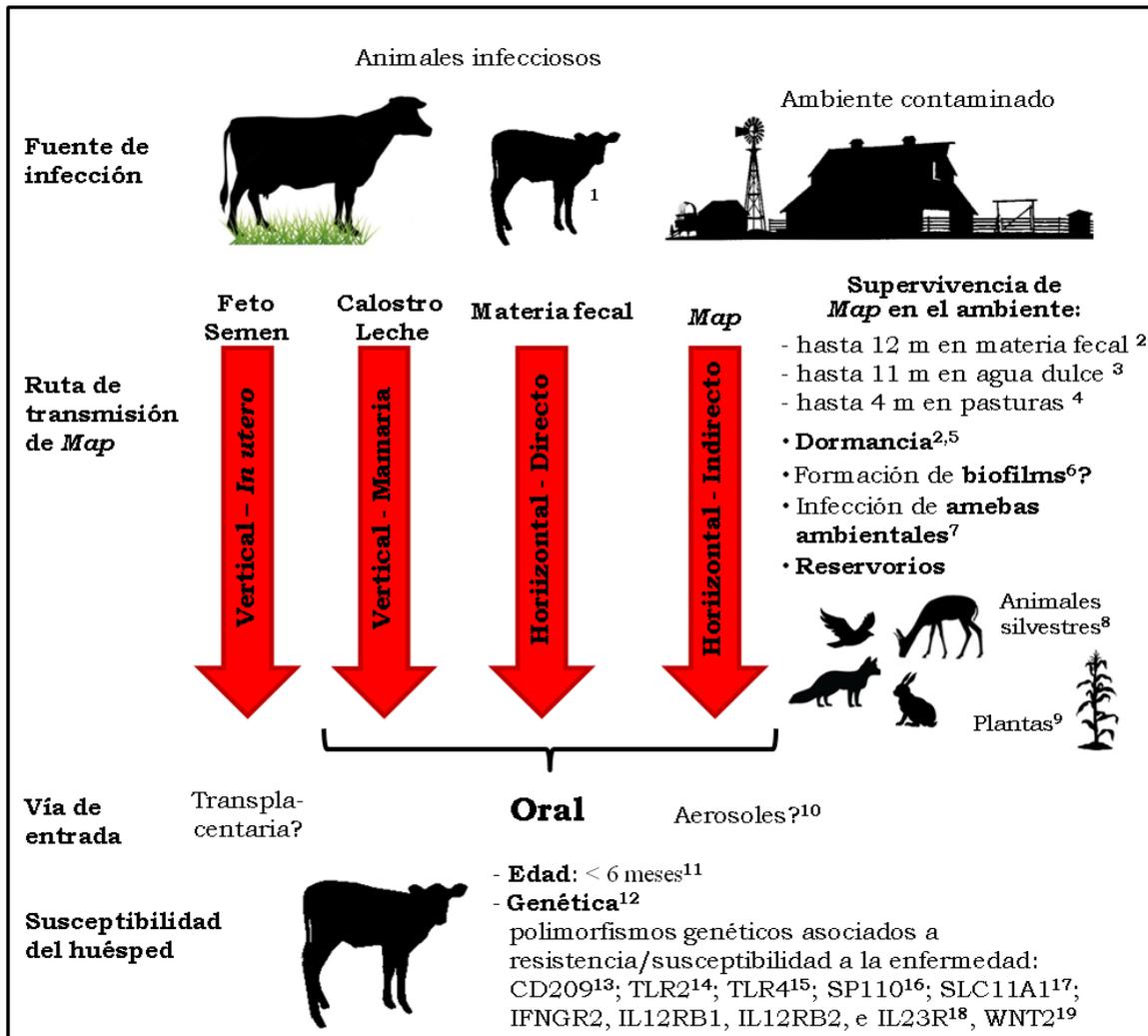


Figura 2. Transmisión de Map: vías y factores que influyen. Modificada a partir de Küpper (2014). m: meses; ¹: Wolf y col. (2015), ²: Whittington y col. (2004), ³: Whittington y col. (2005), ⁴: Eppleston y col. (2014), ⁵: Lamont y col. (2012a), ⁶: Wu y col. (2009), ⁷: Salgado y col. (2015), ⁸: revisión de la paratuberculosis en animales silvestres en Carta y col., (2013), ⁹: Kaevska y col. (2014), ¹⁰: Eisenberg y col. (2011), ¹¹: Windsor y Whittington (2010), ¹²: Alpay y col. (2014), ¹³: Vázquez y col. (2014), ¹⁴: Koets y col. (2010), ¹⁵: Sharma y col., 2015; ¹⁶: Ruiz-Larrañaga y col. (2010); ¹⁷: Pinedo y col. (2009), ¹⁸: Pant y col. (2011), ¹⁹: Pauciullo y col. (2015).

En su conjunto, los datos aportados en los últimos años sobre las posibilidades de transmisión de *Map* y su supervivencia en diferentes sustratos ponen de manifiesto la epidemiología compleja de esta enfermedad.

1.3. El agente causal y su composición antigénica.

Las micobacterias son microorganismos de morfología bacilar, pequeños (0,5-1,5 μm), no esporulados e inmóviles. Tintorialmente, son consideradas Gram positivas, pese a la escasa penetración de colorante por medio de esta técnica, y ácido-alcohol resistentes (AAR), propiedad que se evidencia mediante tinciones como la de Ziehl-Neelsen. *Map* es una **micobacteria cultivable de crecimiento lento** y tiene requerimientos nutricionales complejos (Cocito y col., 1994). Ésta es la única especie del género que requiere para su aislamiento *in vitro* del aporte externo de micobactinas, sideróforos que facilitan el transporte de hierro a través de su pared celular (Merkal y Curran, 1974; Thorel y col., 1990; Wang y col., 2015a). El extenso tiempo generacional de este microorganismo, que puede variar entre 1,3 y 4,4 días, según el inóculo inicial en el medio (Lambrecht y col., 1988; Kim y col., 2002; Elguezábal y col., 2011), determina que el tiempo de incubación de los cultivos sea muy prolongado, de hasta 6 meses (de Juan y col., 2006).

En cuanto a la **clasificación taxonómica**, *Map* está comprendida dentro del Complejo *Mycobacterium avium* (MAC) (Meissner y col., 1974), constituido por especies de crecimiento lento, ya sean de presencia ambiental o bien que afectan a especies animales (patógenas profesionales) o a humanos (patógenas oportunistas). Dentro del complejo MAC, *Map* pertenece a la especie *M. avium*. Turenne y col. (2008) estudiaron la filogenia dentro de esta especie y encontraron que de sus 4 subespecies (*M. avium* subsp. *hominissuis* – *Mah* –, *M. avium* subsp. *avium* – *Maa* –, *M. avium* subsp. *silvaticum* – *Mas* – y *Map*), *Mah* constituye un grupo muy ramificado, del cual han surgido dos clones patogénicos: las subespecies que afectan a las aves (*Maa* y *Mas*) por un lado, y *Map* por el otro. Luego, *Map* ha evolucionado derivando en dos clones genéticamente distinguibles, que engloban cepas ovinas (o “Tipo I”) y cepas bovinas (o “Tipo II”) (Collins y col., 1990; Stevenson y col., 2002) (**Figura 3**). Se ha descrito también un tercer tipo de cepas, denominado “intermedio” (Collins y col., 1990) o “Tipo III” (de Juan y col., 2005). Por sus características moleculares, se considera que éste último está incluido dentro del “Tipo I” (Alexander y col., 2009). Otra variante de *Map* que habría emergido en forma más tardía es el “Tipo Bisón” (Whittington y col., 2001; Sohal y col., 2010).

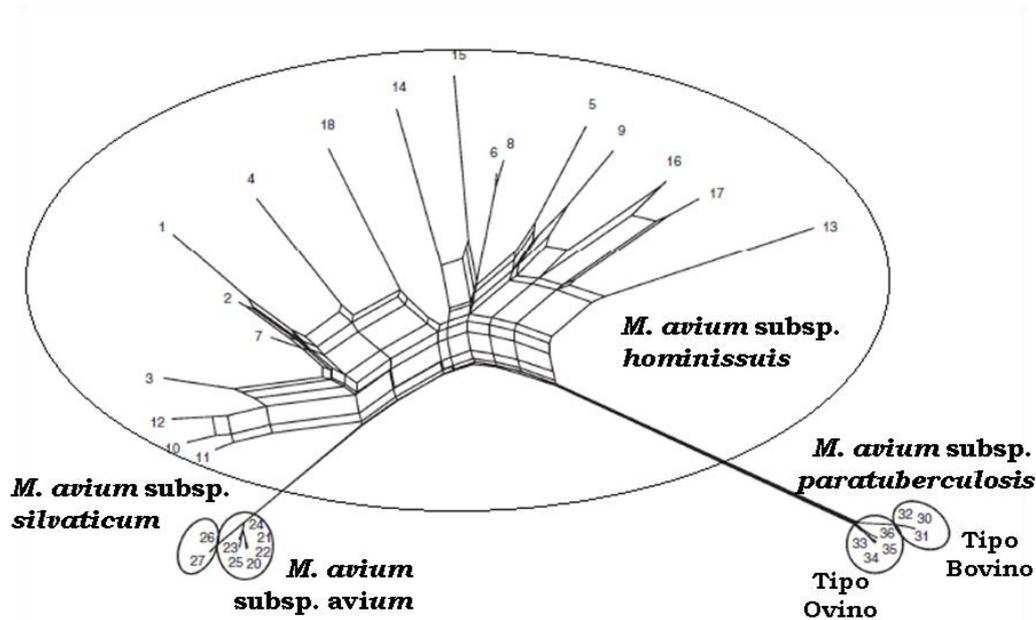


Figura 3. Árbol filogenético de las subespecies de *Mycobacterium avium*. Imagen adaptada de Turenne y col. (2008)

En cuanto a la **composición antigénica** de *Map*, se ha estudiado desde dos grandes perspectivas: en el marco de la búsqueda de antígenos con potencialidad diagnóstica (revisado por Mikkelsen y col., 2011) y en análisis funcionales o de patogenia (revisado por Bannantine y col., 2010), enfoque este último más relevante en el contexto de la temática de esta tesis. Es posible clasificar los antígenos de *Map* en dos grandes grupos según su naturaleza química: proteínas y glicolípidos.

Entre los **antígenos proteicos**, se han estudiado con un enfoque patogénico adhesinas involucradas en la capacidad de invasión tisular de *Map* (Secott y col., 2001; Sechi y col., 2006a; LeFrancois y col., 2013; Viale y col., 2014); proteínas relacionadas con la respuesta al estrés, como las Ahp C y D y la gre A (Olsen y col., 2000; Kawaji y col., 2010; Gurung y col., 2012), las superóxido dismutasas (Liu y col., 2001) y las proteínas de shock térmico (HSP) (Sung y col., 2004; Langelaar y col., 2005a y b; Santema y col., 2011); enzimas involucradas en vías metabólicas bacterianas (Weigoldt y col., 2013) y diversas proteínas recombinantes (Bannantine y col., 2015). Cuando se estudia la inmunogenicidad de los antígenos, una característica de interés es su exposición sobre la superficie bacteriana, ya que ésta determinaría su accesibilidad a los anticuerpos. En este sentido, otra proteína de membrana de *Map* que ha sido estudiada es la p34 (Gilot y col., 1993). Nuestro grupo ha demostrado la presencia de epitopes B en este antígeno (Ostrowski y col., 2003) y la inducción de anticuerpos específicos en bovinos con paratuberculosis,

que podrían tener un efecto beneficioso para el huésped (Mundo y col., 2008; Fernández, 2016).

Por otra parte, los lípidos y glicolípidos representan hasta un 60% del peso seco de la pared celular de las micobacterias (Brennan y Nikaido, 1995; Liu y col., 1999) y en gran medida, las diferencias en patogenicidad entre distintas especies pueden justificarse por la composición diferente de su pared celular (Guenin-Macé y col., 2009; Torrelles y col., 2011). En el caso de *M. tuberculosis*, se han identificado cerca de 250 genes relacionados con el metabolismo de estos compuestos (Cole y col., 1998), lo que sugiere la relevancia de los mismos en la supervivencia micobacteriana dentro del huésped. Dada su liposolubilidad, muchos de estos antígenos pueden ser secretados durante la vida intracelular y alcanzar compartimentos subcelulares diferentes de los que albergan a las bacterias. Así, podrían unirse a moléculas de presentación antigénica no clásicas para ser presentados a las células T y también, ser liberados al medio extracelular donde podrían ejercer efectos sobre diversos componentes de la respuesta inmune (Beatty y col., 2001; Russell y col., 2002). Los **antígenos glicolipídicos** más relevantes de las micobacterias son: el dimicolato de trehalosa, los manósidos de fosfatidilinositol, los lipomananos y los lipoarabinomananos, ya que están estrechamente asociados a la capacidad patogénica (Schwebach y Casadevall, 2001; Nigou y col., 2003; Gilleron y col., 2003; Ainge y col., 2006; Schorey y Sweet, 2008; Robinson y col., 2008; Kan-Sutton y col., 2009; Guenin-Macé y col., 2009; Basler y col., 2010; Torrelles y col., 2011; Thirunavukkarasu y col., 2014). El dimicocerosato de ftiocerol (PDIM, por sus siglas en inglés) es otro reconocido factor de virulencia micobacteriano involucrado en un novedoso mecanismo de evasión inmune a través del cual las micobacterias patógenas inducirían el reclutamiento selectivo de macrófagos permisivos para su replicación, evadiendo la fagocitosis por parte de macrófagos microbicidas (Cambier y col., 2014).

Los **lipoarabinomananos** (LAMs) son considerados el principal antígeno de superficie de las micobacterias, debido a su inmunodominancia y a su abundancia, ya que representan aproximadamente un 2% del peso bacteriano seco (Hunter y col., 1986; Hamasur y col., 1999). Se encuentran asociados a dos estructuras distintas de la pared celular: la capa externa de la bicapa lipídica asimétrica, en la que se intercalan con sus residuos polisacarídicos expuestos en la cápsula, y la membrana plasmática, a la cual están anclados a través de su núcleo lipídico (**Figura 4**).

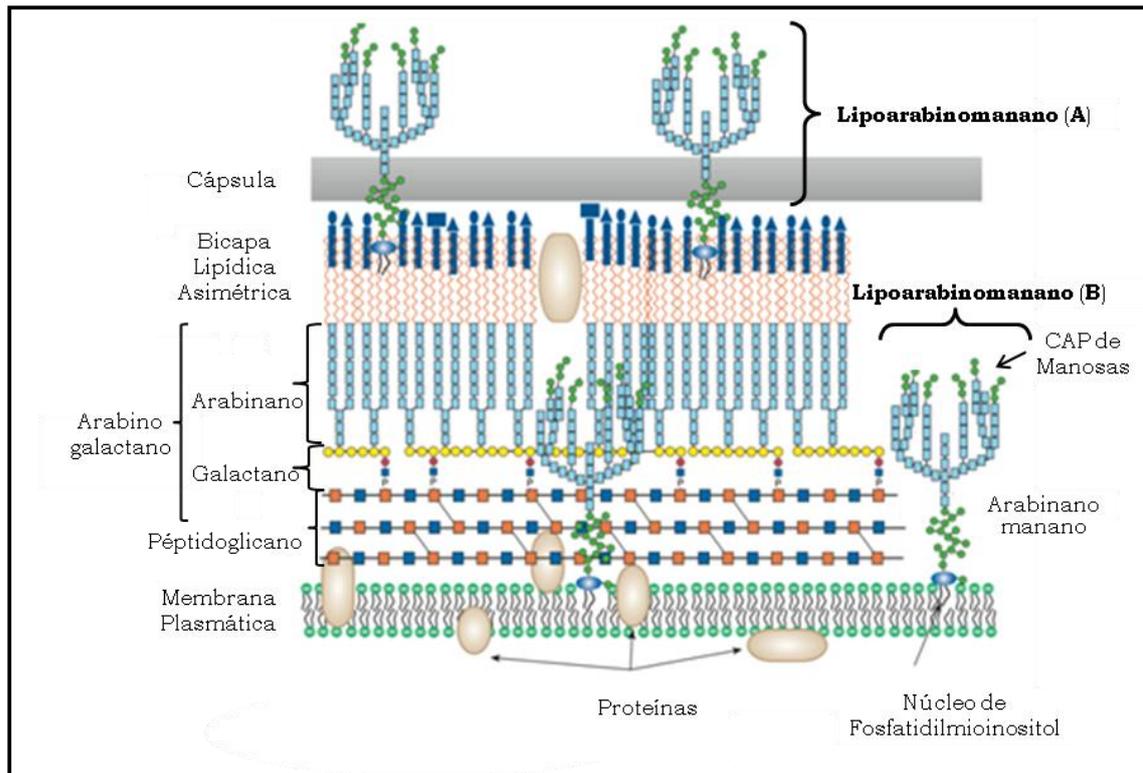


Figura 4. Ubicación de LAM en la pared celular de las micobacterias: A) asociado a la capa externa de la bicapa lipídica y **B)** anclado en la membrana plasmática. Imagen adaptada de Brennan y Crick (2007).

Estructuralmente los LAMs se componen de un núcleo de fosfatidilmiioinositol unido a una cadena polisacáridica, formada por unidades de manosa y arabinosa, que puede estar modificada por un residuo lateral denominado *cap*. Este residuo *cap* varía en las distintas especies del género y determina la clasificación de los LAMs en tres patrones estructurales diferentes: LAMs con un *cap* de fosfoinositol (PILAMs), encontrados en micobacterias de crecimiento rápido; LAMs carentes de *cap* (AraLAMs), hasta el momento sólo descritos en la especie *M. chelonae*; y LAMs con un *cap* de manosas (ManLAMs), presentes en las micobacterias patógenas. Las actividades biológicas de estos compuestos se han estudiado en sistemas *in vitro* (revisado por Nigou y col., 2003; y Briken y col., 2004). Los PILAMs estimulan la activación de macrófagos e inducen la secreción de citoquinas proinflamatorias. En contraste, los ManLAMs presentan una potente actividad antiinflamatoria, al inhibir la activación de macrófagos y la producción de citoquinas como TNF α e IL-12, consideradas de suma importancia en la respuesta celular (Souza y col., 2013). También se demostró su capacidad de inhibir la formación de fagolisosomas *in vitro* (Chua y Deretic, 2004; Rumsey y col., 2006; Welin y col., 2008; Sweet y col., 2010). Todos estos efectos de los ManLAMs serían favorables para la supervivencia

intracelular y, por lo tanto, muchos autores consideran que constituyen un factor clave en la patogenia de las enfermedades causadas por micobacterias (Guenin-Macé y col., 2009; Vergne y col., 2015).

Dada la importante actividad biológica de los componentes glicolipídicos de la pared celular de *Map* y puesto que constituyen estructuras antigénicas reconocidas de forma específica por el sistema inmune, resulta relevante el estudio de la participación de la respuesta inmune frente a estos antígenos en la protección frente a la paratuberculosis.

1.4. Patogenia y respuesta inmune.

Map ingresa por la vía oral y atraviesa la barrera intestinal al ser captada por las células M (Momotani y col., 1988) o por los enterocitos (Sigurdardottir y col., 2005), mayoritariamente en la porción ileal del intestino delgado. Luego, es fagocitada por macrófagos subepiteliales y células dendríticas, dentro de cuyos fagosomas es capaz de sobrevivir y replicar (Bendixen y col., 1981; Momotani y col., 1988; Clarke, 1997). Su persistencia intracelular y la evasión de una respuesta inmune innata apropiada son eventos cruciales para el establecimiento del foco inicial de la inflamación granulomatosa y la progresión de la enfermedad (Klinkenberg y Koets, 2015). De esta manera, el estudio de la **interacción *Map*-macrófago** resulta de particular interés, debido a su relevancia en la inmunopatogenia de la paratuberculosis. La **Figura 5** representa esta interacción *in vivo*, en forma simplificada, y puntualiza los posibles receptores responsables del reconocimiento, que podrían impactar sobre la respuesta del macrófago a la infección, su patrón de expresión de citoquinas, el tráfico intracelular de la bacteria, la maduración de fagosomas, y la actividad microbicida (Souza y col., 2007; Sohal y col., 2008; Woo y Czubinski, 2008; Joller y col., 2010). Por ejemplo, se ha demostrado que la internalización mediada por receptores para el complemento (RCs) es beneficiosa para la supervivencia micobacteriana, ya que disminuye el estallido respiratorio y la secreción de IL-12 por parte del macrófago infectado (Schlesinger, 1998).

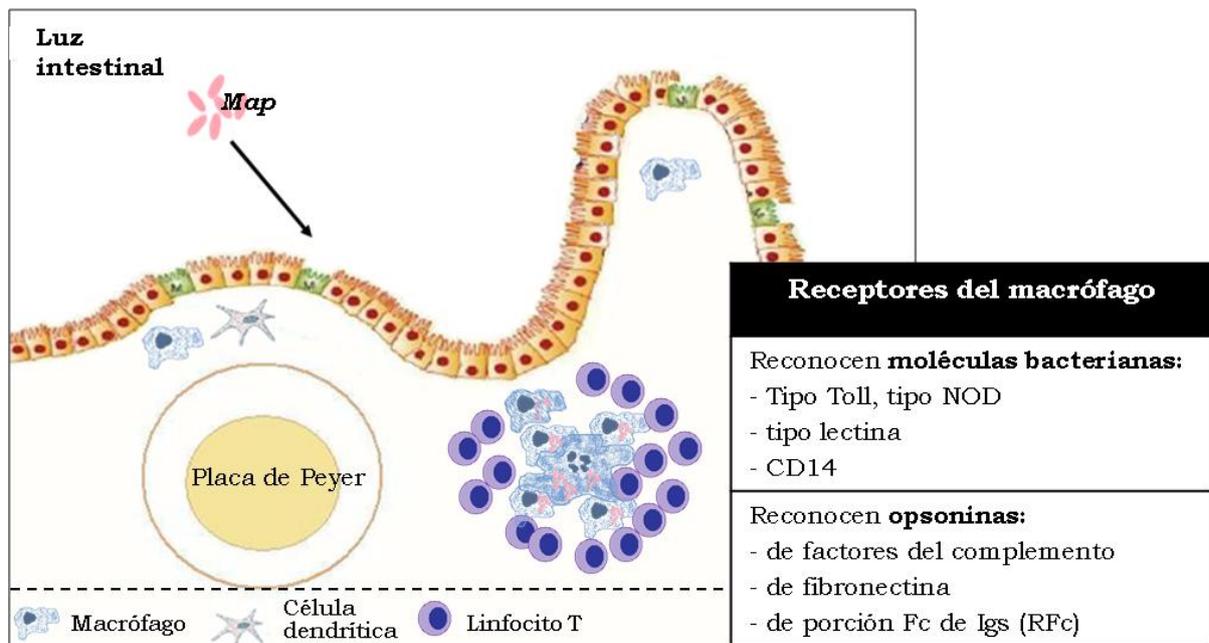


Figura 5. Eventos tempranos en la infección intestinal por *Map*: interacción bacteria-macrófago *in vivo*. *Map* es rápidamente internalizada por macrófagos subepiteliales y células dendríticas. El primer momento de esta interacción es el reconocimiento, en el que intervienen los receptores del macrófago listados en el recuadro.

Los macrófagos permisivos a la infección constituyen el estímulo inicial para la formación de las lesiones granulomatosas y un vehículo para la diseminación de *Map*. En este sentido, Wu y col. (2007a) demostraron que una hora post-infección quirúrgica del intestino, ya era posible detectar macrófagos infectados en los linfonódulos drenantes. Cuando estas células infectadas mueren, el crecimiento exponencial de *Map* dentro del compartimento intracelular se alterna con fases extracelulares, que permiten su interacción con otros componentes del sistema inmune (Tessemá y col., 2001).

Desde la primera descripción de las **formas lesionales** asociadas a la paratuberculosis, que data de 1954 (Stamp y Watt, 1954), numerosos autores han realizado aportes (Buergelt y col., 1978; Clarke y Little, 1996; Pérez y col., 1996; Corpa y col., 2000; González y col., 2005). Para la especie bovina, la clasificación más aceptada en la actualidad es la realizada por González y col. (2005), que describe los siguientes tipos lesionales:

- **Lesiones Focales.** Pequeños granulomas compuestos por 5-30 macrófagos en los espacios interfoliculares de tejido linfoide intestinal y/o de linfonódulos ileales/yeyunales. Escaso número de linfocitos y células gigantes. Ausencia de bacilos AAR (BAAR).

- **Lesiones Multifocales.** Pequeños granulomas compuestos por 15-40 macrófagos y células gigantes, rodeados por un ligero infiltrado de linfocitos y células plasmáticas, localizados en las vellosidades intestinales y en los espacios interfoliculares de tejido linfoide intestinal y/o de linfonódulos ileales/yeyunales. Presencia de un n° moderado de BAAR.

- **Lesiones Difusas.** Afección de grandes tramos del intestino y a veces también de los linfonódulos regionales. El infiltrado celular difuso afecta la lámina propia y también zonas interfoliculares de la submucosa, la muscular y la serosa intestinales. Según el tipo celular predominante en el infiltrado, se subdividen en:

- **Lesiones Difusas Linfocíticas (paucibacilares).** Predominio de linfocitos, células plasmáticas y algunas células gigantes. Escasos o nulos BAAR.
- **Lesiones Difusas Histiocíticas (multibacilares).** Predominio de macrófagos cargados con BAAR y células epitelioides. N° variable de linfocitos y células gigantes.
- **Lesiones Difusas Intermedias.** Infiltración de linfocitos, cél. plasmáticas, células gigantes y macrófagos. N° variable de BAAR, en general, menor que en lesiones multibacilares.

De manera independiente al tipo de lesión desarrollado, el período de incubación de esta enfermedad es muy largo y la expresión clínica sólo se presenta en un pequeño porcentaje de los animales infectados, con mayor frecuencia entre los 2 y 5 años de edad (Whitlock y Buergelt, 1996). Los animales subclínicamente infectados suelen presentar una disminución de su nivel de producción (Smith y col., 2016; revisado por McAloon y col., 2016) y/o problemas reproductivos (Whitlock y Buergelt, 1996; Tiwari y col., 2007; Vanleeuwen y col., 2010; García-Isperto y col., 2016). De hecho, Nielsen y col. (2009) han demostrado que las vacas infectadas pueden registrar disminución en su nivel de producción láctea hasta 300 días antes de la detección de anticuerpos específicos en suero. Es de destacar que estas alteraciones subclínicas son las que generan las principales pérdidas económicas asociadas a la paratuberculosis (Tiwari y col., 2008).

La **manifestación clínica** que aparece como una constante en todas las especies animales es el adelgazamiento progresivo. En los bovinos, además, son comunes otros signos derivados de la malabsorción intestinal tales como diarreas, edemas y muerte (**Figura 6**). También, aunque poco frecuentes, pueden existir presentaciones extradigestivas de la enfermedad, asociadas a la posibilidad de aislamiento de *Map*

a partir de sangre, hígado, músculo esquelético, linfonódulos retrofaríngeos y mandibulares, bazo, pulmones, riñones, glándulas mamarias, útero, testículos, epidídimos, y semen (Whitlock y Buergelt, 1996; Pavlik y col., 2000; Eppleston y Whittington, 2001; Ayele y col., 2004; Brady y col., 2008; Redacliff y col., 2010). La manifestación clínica no guarda una clara relación con la gravedad de las lesiones. Si bien las lesiones difusas multibacilares son representativas de los estadios más severos de la enfermedad y siempre se asocian con cuadros clínicos y altos niveles de excreción fecal permanente de *Map* (Clarke y Little, 1996; Kurade y col., 2004; Reddacliff y col., 2006; Dennis y col., 2011; Kawaji y col., 2011), pueden verse casos clínicos que responden a otras variantes de formas difusas o incluso a formas delimitadas (Clarke y Little, 1996; Dennis y col., 2011).



Figura 6. Signos clínicos y lesiones patológicas macroscópicas características de la paratuberculosis. A¹: Diarrea, B²: Edema submandibular, C³: Emaciación, D⁴: “pliegues cerebroides” en la mucosa intestinal. Fuentes de las imágenes: ¹: <http://www.nadis.org.uk/>; ²: Blowey y Weaver (1997); ³: Mundo (2005); ⁴: <http://www.flockandherd.net.au/>.

La **respuesta inmune** del huésped también se ha asociado con el tipo de forma lesional presente. Así, se ha encontrado una respuesta inmune celular predominante en animales con formas delimitadas (focales/multifocales), mientras que las formas diseminadas se han asociado más frecuentemente a respuestas de tipo humoral (Clarke, 1997). En la **Figura 7** se muestra un esquema que relaciona las diferentes formas lesionales de la paratuberculosis con la respuesta inmune predominante del huésped y los niveles de excreción bacteriana a lo largo del tiempo. Luego de la exposición a *Map*, la respuesta inmune innata puede limitar la infección. Se presume que esto es lo que ocurre en aproximadamente la mitad de las infecciones naturales (van Schaik y col., 1996; Pérez y col., 1999; Corpa y col., 2000; Dennis y col., 2011). En los casos restantes, la infección persiste y se monta una respuesta inmune adaptativa al mismo tiempo que las lesiones comienzan a desarrollarse.

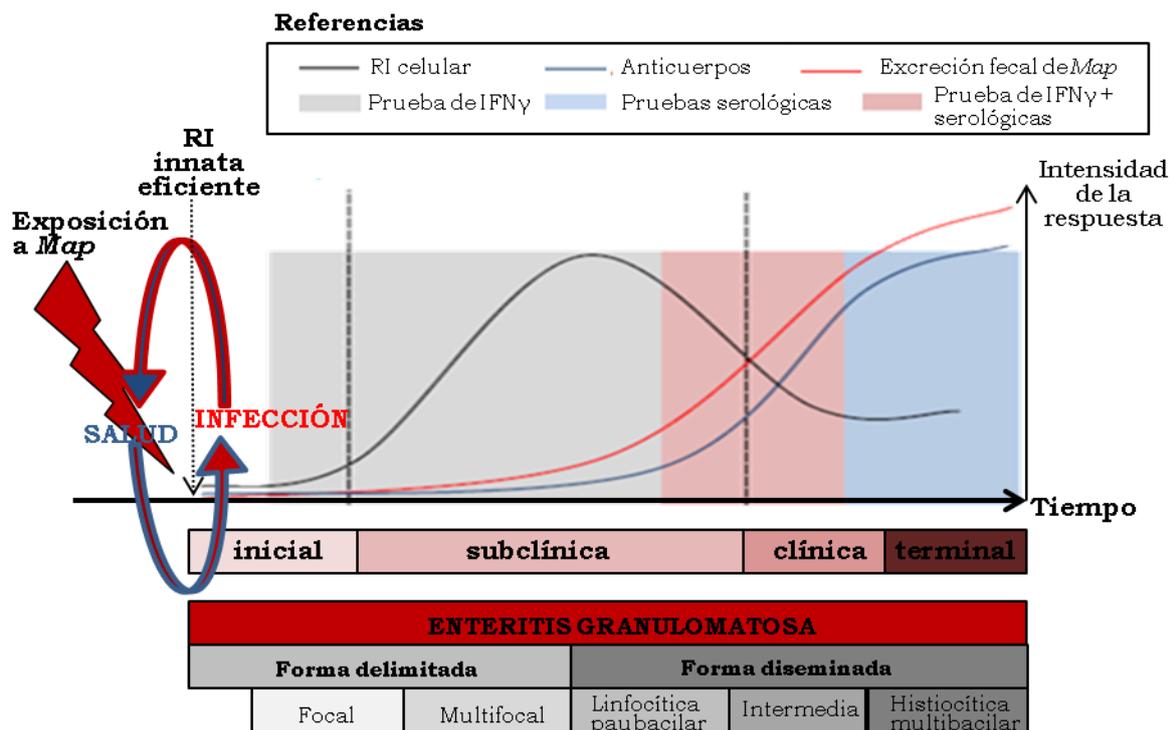


Figura 7. Estadios de la infección por *Map* en bovinos y modelo inmunopatológico de la paratuberculosis. Figura modificada a partir de las publicadas por Bastida y Juste (2011) y Thakur (2012). Las flechas entre el estado de salud y el de infección representan el concepto de que el balance entre *Map* y el huésped determina la contención de la infección en cerca de la mitad de los casos.

Dada la naturaleza intracelular de *Map*, se considera que el perfil celular de la respuesta inmune es el de mayor importancia para la defensa del huésped y que a medida que la infección progresa en algún momento se desencadena un cambio del perfil T helper 1 (Th1) al Th2 que estaría asociado a la aparición de la signología de la enfermedad (Stabel, 2000; Koets y col., 2002). Recientemente se ha visto que la infección subclínica por *Map* cursa con una mayor expresión de la molécula inhibitoria CTLA-4 sobre los linfocitos T CD4+, lo cual podría indicar la inducción de hipofuncionalidad T en etapas tempranas de la enfermedad (Leite y col., 2015).

En líneas generales, el análisis de la respuesta inmune según el **paradigma Th1/Th2** de clasificación de los linfocitos T (LT) CD4+ ha constituido un pilar básico en la disección de la respuesta inmune desde la década de 1980, cuando estos perfiles funcionales fueron descritos por primera vez (Mosmann y col., 1986). Sin embargo, descubrimientos más recientes han demostrado que los LTCD4+ pueden también diferenciarse en diversos fenotipos reguladores, como los Treg naturales y los Treg inducibles, o pro-inflamatorios, como los Th9, Th17 y Th22 (Chen y O'Shea, 2009; revisado por Sun y Zhang, 2014). Estos fenotipos funcionales se han visto involucrados en la progresión de la paratuberculosis en rumiantes (Weiss y col., 2006; Coussens y col., 2012; Nicol y col., 2016; Roussey y col., 2016). Por otra parte, los ensayos de infección experimental de largo plazo con *Map* no han permitido identificar claramente tal cambio de perfil inmunológico de Th1 a Th2 (Waters y col., 2003; Stewart y col., 2007; Begg y col., 2011; Stabel y col., 2011; Stabel y Robbe-Austerman, 2011). Del mismo modo, los altos niveles de secreción específica de IFN γ (perfil Th1) y de anticuerpos (perfil Th2) detectados simultáneamente en bovinos con lesiones severas de paratuberculosis (Vázquez y col., 2013), serían evidencias en contra del paradigma de la polarización Th1/Th2 asociado a la progresión de la paratuberculosis.

Los **LT $\gamma\delta$** también participan en la respuesta inmune de los bovinos frente a las micobacterias (Rhodes y col., 2001; Plattner y col., 2009; Plattner y Hostetter, 2011; Coussens y col., 2012; Baldwin y Telfer, 2015), a través del reconocimiento de antígenos no peptídicos, principalmente presentados en el contexto de moléculas CD1. Estas células se concentran en epitelios y superficies corporales. Además en los rumiantes, a diferencia de lo que ocurre en otras especies, esta subpoblación constituye una fracción considerable del *pool* circulante T, representando un 30-80 % en los recién nacidos y un 5-30 % de los LT circulantes totales en los adultos (Naessens, 1998). En un modelo bovino de infección subcutánea por *Map*, Plattner

y col. (2013) demostraron que los L γ δ migran hacia el sitio de inoculación antes que los LT CD4⁺ y que constituyen una fuente temprana de IFN γ a nivel local. Estos hallazgos, en coincidencia con los de otros estudios, sugieren que la participación de los L γ δ podría ser crítica para la activación de los macrófagos y el control temprano de la infección en bovinos (Badi y col., 2010; de Silva y col., 2015; Baquero y Plattner, 2016). Se estima que en etapas posteriores de la infección, los L γ δ estarían involucrados en la patogénia, al inhibir la activación de los LTC4⁺ y CD8⁺ específicos (Chiodini y Davis, 1992 y 1993; Koets y col., 2002). En efecto, a diferencia de lo que ocurre en humanos y ratones, la supresión funcional de la respuesta inmune en los bovinos parece estar mayoritariamente mediada por macrófagos y algunas subpoblaciones de L γ δ (Hoek y col., 2009; Coussens y col., 2012; Guzman y col., 2014).

El papel **de los linfocitos B (LB) y los anticuerpos** en esta enfermedad ha sido ignorado durante mucho tiempo. Sin embargo, en el caso de la tuberculosis se ha comprobado que la inmunización pasiva con anticuerpos monoclonales (de isotipos A y G) reduce el recuento de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) aisladas a partir de bazo y pulmón en modelos experimentales (Hamasur y col., 2004; Williams y col., 2004; López y col., 2009). Por su parte, Teitelbaum y col. (1998) demostraron que los anticuerpos específicos frente a *M. tuberculosis* no sólo eran capaces de limitar la multiplicación bacteriana dentro del huésped sino que también aumentaban la sobrevivencia de los ratones desafiados. Éstos y otros efectos protectores de anticuerpos dirigidos frente a antígenos proteicos (Williams y col., 2004; Gaikwad y Sinha, 2008) y glicolípidos (Teitelbaum y col., 1998; Hamasur y col., 2004; Kang y col., 2005) de *M. tuberculosis* han sido descritos por distintos grupos. Incluso en la discusión instalada en la comunidad científica sobre estrategias para el diseño racional de nuevas herramientas inmunoproliféricas, se menciona la necesidad de desarrollar vacunas inductoras de una respuesta inmune humoral potente a fin de mejorar la posibilidad de protección frente patógenos intracelulares como las micobacterias (Igietseme y col., 2004; Kauffman, 2007; Kallenius y col., 2008; Bannantine y col., 2014a).

En el campo de la paratuberculosis, Hostetter y col. (2005) probaron que la preincubación de *Map* con suero de complementado de bovinos infectados reducía la supervivencia bacteriana en el compartimento intracelular. Nuestro grupo ha trabajado con Acs provenientes de bovinos infectados, vacunados con una proteína de membrana (p34) y vacunados con LAM, demostrando que la opsonización de

Map con estos Acs induce activación de los macrófagos infectados *in vitro*, aumenta los niveles de ingestión bacteriana y disminuye la viabilidad intracelular (Mundo y col., 2008; Jolly y col., 2011; Fernández y col., 2016). También recientemente Everman y Bermúdez (2015) encontraron que la opsonización con suero de bovinos infectados potenciaba los mecanismos bactericidas del macrófago. Un dato interesante de ese trabajo es que sólo fue detectable este efecto cuando se empleó *Map* preincubada en leche bovina, sustrato natural de la infección, y no en medio de cultivo bacteriano, sugiriendo la existencia de antígenos cuya expresión podría ser inducida sólo en el contexto de la infección. Por otro lado, se ha demostrado que los anticuerpos inducidos por la vacunación experimental con una subunidad proteica de *Map* resultan protectores *in vivo* cuando la vacuna es aplicada tanto en momentos tempranos (Koets y col., 2006) como tardíos (Santema y col., 2013) post-infección. Todos estos hallazgos obligan a la revisión del papel de los anticuerpos en la protección frente a esta enfermedad.

Aún resta dilucidar muchas cuestiones relacionadas con la patogenia de la paratuberculosis. Una herramienta que puede aportar valiosa información es el desarrollo de **modelos matemáticos**, que favorecen la comprensión de la importancia relativa y la interacción entre diferentes variables sobre la progresión de la paratuberculosis. Por ejemplo, se ha podido explicar el cambio de perfil inmunológico durante la infección a través de factores de origen bacteriano (como la dosis infectante y el tiempo de vida media de *Map* en el compartimento extracelular) y del huésped (como la tasa de diferenciación y proliferación local de Th1 *vs.* Th2, y la cinética del agotamiento de los LTh1 debido a la exposición prolongada al antígeno) (Magombedze y col., 2014). También, Klinkenberg y Koets (2015) han identificado dos variables como las principales determinantes de la progresión de la patología: la tasa de reproducción de *Map* y la tasa de reemplazo de macrófagos a nivel local, sugiriendo que la respuesta inmune innata tendría un papel preponderante sobre la respuesta inmune adaptativa en la patogénesis de esta infección. Por su parte, los **modelos de infección experimental**, cada vez más validados, constituyen otra herramienta importante en este sentido. En los últimos años, se han realizado numerosos estudios buscando identificar qué mecanismos de la respuesta inmune pueden resultar protectores y cuáles podrían ser predictivos de la progresión de la enfermedad (de Silva y col., 2010; Stabel y Robbe-Austerman, 2011; Maatanen y col., 2013; Plattner y col., 2014). Es de esperar que estas líneas

de investigación permitan profundizar nuestro entendimiento sobre la inmunopatogenia de la paratuberculosis.

1.5. Diagnóstico.

El diagnóstico de la paratuberculosis constituye un desafío debido a las variaciones en la respuesta inmune y en la excreción bacteriana de los individuos infectados a lo largo del tiempo (Stabel y col., 2014; Laurin y col., 2015) y a la expresión clínica sólo en estadios terminales y en unos pocos animales afectados, como se explica en el apartado anterior. Estas características determinan que no sea posible la utilización de una única técnica diagnóstica en todas las circunstancias. La Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) recomienda el empleo de diferentes técnicas según el propósito subyacente al diagnóstico (**Tabla I**).

Tabla I. Técnicas recomendadas para el diagnóstico de la paratuberculosis según el propósito

Técnica	Propósito					
	Determinar <i>status</i> de rodeo libre	Determinar <i>status</i> de animal libre para movimiento	Plan de control/ erradicación	Diagnóstico de casos clínicos	Vigilancia epidemiológica/ prevalencia	Determinar <i>status</i> inmune de animales/ rodeos post-vacunación
Identificación del Agente						
Histopatología*	+	-	+	+++	-	-
ZN de MF	-	-	-	+	-	-
Cultivo	+++	+++	+	+++	+	-
PCR	+	+	+	++	+	-
Identificación de la Respuesta Inmune						
IDGA**	++	-	+	+	+++	+++
ELISA	++	+	+	+	+++	+++
FC	-	+	+	+	+	+++
Prueba del IFN γ	-	-	+	-	-	+++
IDR	-	-	+	-	-	+++

+++ : técnica más recomendada; ++ : técnica aplicable; + : técnica de aplicación limitada por costo/confiabilidad/tiempo; - : técnica no adecuada para el propósito; * : uso sólo post-mortem; ** : adecuada para aplicar en ovejas y cabras; ZN: Ziehl-Neelsen; MF: Materia Fecal; PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa; IDGA: inmunodifusión en gel de agar; ELISA: ensayo absorbente inmunoenzimático; FC: fijación del complemento; IFN γ : interferón gamma; IDR: intradermorreacción. Tabla traducida a partir de la publicada en el Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres, OIE (2014).

Como se observa en la tabla anterior, las pruebas diagnósticas pueden clasificarse en directas o indirectas, según identifiquen la presencia de *Map* o sus componentes o bien la respuesta inducida en el huésped, evidencia indirecta de la infección.

1.5.1 Diagnóstico directo

A. Necropsia y diagnóstico histopatológico. Se abre el intestino y se inspecciona la mucosa, especialmente la del íleon terminal y la válvula ileocecal, para detectar el plegamiento y el engrosamiento patognomónicos. No siempre existe una relación estrecha entre la gravedad de los síntomas clínicos y la extensión de las lesiones intestinales. Las primeras lesiones se manifiestan como el engrosamiento y el encadenamiento de los vasos linfáticos. Los linfonódulos mesentéricos se encuentran habitualmente prominentes y edematosos. Los frotis de la mucosa afectada y los cortes superficiales de los nódulos linfáticos deben teñirse por el método de Ziehl-Neelsen y examinarse microscópicamente en busca de BAAR con la morfología característica de *Map*. De todas maneras, existen lesiones paucibacilares en las que no pueden identificarse BAAR. La sensibilidad del diagnóstico mejora si se muestrean múltiples regiones del intestino (Sweeney y col., 2006) y los linfonódulos asociados. Al análisis histopatológico microscópico, las lesiones se clasifican según lo descrito en el apartado 1.4.

También, el análisis histopatológico de biopsias hepáticas demostró ser de utilidad en la detección *ante-mortem* de los animales con infectados con signología clínica (Smith y col., 2014).

B. Microscopía. Es un método rápido y de bajo costo que permite la identificación de *Map* basada en su propiedad de AAR. No obstante su baja especificidad, la identificación microscópica de *Map* a partir de materia fecal continúa siendo una herramienta valiosa para una evaluación rápida y diagnóstico sugestivo de paratuberculosis a campo. Además, la aplicación de esta técnica a partir del sedimento obtenido en la preparación de las muestras para cultivo parece ser también de utilidad (Ingratta y col., 2015).

C. Cultivo bacteriológico. El aislamiento de *Map* a partir de muestras del animal sospechoso (materia fecal, leche, tejidos) es la **Prueba de Oro** para la confirmación de la paratuberculosis. Aunque el cultivo es técnicamente difícil, costoso e insume tiempo, es la única prueba que no arroja resultados falsos positivos (100% de especificidad). El cultivo de materia fecal es la mejor prueba

disponible para el diagnóstico de la paratuberculosis en animales vivos. Durante la fase clínica su sensibilidad se aproxima al 100%; sin embargo, sólo detecta un bajo porcentaje de los animales en las fases iniciales de la infección (Whitlock y col., 2000). Además, requiere el uso de agentes decontaminantes para inhibir el crecimiento de otros microorganismos presentes originalmente en las muestras. El uso de estos agentes es en parte responsable por la baja sensibilidad de la técnica (Redacliff y col., 2003).

El **cultivo convencional** de *Map* se puede realizar en diferentes medios sólidos tales como: Löwenstein-Jensen, Herrold con yema de huevo (HEYM) y Middlebrook 7H10. Puesto que se han reportado diferencias en la posibilidad de aislamiento en los distintos medios según las cepas, se recomienda la siembra simultánea de las muestras en al menos 3 medios de cultivo diferentes (Nielsen y col., 2004; de Juan y col., 2006). El cultivo se incuba a 37°C, durante 6 meses para descartar positividad. Luego, todo aislamiento debe ser confirmado ya sea por su dependencia a la micobactina J o por métodos moleculares (Kim y col., 2004; Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres - OIE, 2014).

Por otro lado, existen métodos de **cultivo en medios líquidos** que permiten una identificación precoz del crecimiento bacteriano, basada en tecnologías radiométricas (BACTEC™ 12B o Middlebrook 7H12, BACTEC® system, Becton Dickinson, USA), o fluorométricas (BACTECT MGIT 960 y 9000MB, Becton Dickinson), o bien en la detección de cambios debidos al metabolismo microbiano en la presión de gases, como el CO₂ (ESP® culture system II, TREK diagnostic systems, Cleveland, OH, USA) o en el pH del medio inoculado (MB/BacT, Organon-Technika, Cambridge, UK). Con estos métodos no convencionales se reduce el tiempo necesario para obtener resultados y en algunos casos se logra aumentar la sensibilidad (Eamens y col., 2000; Elguezábal y col., 2011). Sin embargo, suelen requerir la utilización de equipamientos costosos y como los parámetros que evalúan pueden ser modificados por cualquier microorganismo en crecimiento dentro del cultivo, los resultados deben ser siempre confirmados por métodos moleculares.

D. Diagnóstico Molecular. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una herramienta diagnóstica muy valiosa. Se han diseñado *primers* que permiten detectar *Map* en las muestras biológicas/ambientales e identificar rápidamente las bacterias a partir de las colonias aisladas por cultivo. El blanco de detección más ampliamente empleado es el **IS900** (Collins y col., 1989; Green y col., 1989), el cual

es considerado propio de *Map*. La detección de este inserto ha sido propuesta para la identificación de *Map* mediante diferentes pruebas moleculares (revisado por Castellanos y col. 2012). Este blanco presenta la ventaja de estar en copias múltiples en el genoma de *Map*, entre 15-20 copias según la cepa. Si bien se han identificado secuencias similar-IS900 en otras micobacterias (Cousins y col., 1999; Englund y col., 2002; Taddei y col., 2008), se ha demostrado que este inconveniente puede superarse si se tiene en cuenta al diseñar los *primers* específicos (Mundo y col., 2013; Plain y col., 2014).

Otras secuencias propuestas para la identificación molecular de *Map* son: F57 (Poupart y col., 1993; Vasnick y col., 2004); IS1311 (Collins y col., 1997; Whittington y col., 1998); HspX (Ellingson y col., 1998); ISMav2 (Strommenger y col., 2001); ISMpa1 (Olsen y col., 2004); ISMAP02 (Paustian y col., 2004).

Todas estas secuencias han sido inicialmente empleadas en protocolos de PCR en Tiempo Final. Desde hace algunos años se ha comenzado a implementar también la utilización de técnicas de PCR en Tiempo Real en materia fecal a los fines de mejorar los tiempos y la sensibilidad de detección que ofrece el cultivo microbiológico para el diagnóstico de *Map*, encontrando resultados alentadores (Kawaji y col., 2007; Kralik y col., 2011). De hecho, en la actualidad, esta estrategia de diagnóstico ya ha sido incorporada dentro de los planes de control de paratuberculosis de varios países, como Estados Unidos (USDA-APHIS-VS, 2010.), Australia (AHA-AHC, 2011), Inglaterra (CHeCS, 2012), Holanda (Weber y col., 2012) y Nueva Zelanda (Plain y col., 2014). Si bien la materia fecal es la muestra más empleada para el diagnóstico molecular de *Map*, también se utilizan otras como leche, sangre y tejidos. En los últimos años, también la linfa se ha empezado a investigar como muestra potencial para el diagnóstico molecular de paratuberculosis a partir del animal vivo (Khol y col., 2014).

Además de la identificación de *Map* en las muestras, los métodos moleculares pueden ser aplicados para la genotipificación de los aislamientos, constituyendo una herramienta valiosa para la vigilancia epidemiológica de la paratuberculosis (Radomski y col. 2010; Sohal y col. 2014; revisado por Stevenson, 2015). La estrategia de análisis de múltiples *locus* con repeticiones en *tandem* (VNTR) es una de las más empleadas para este patógeno, y de hecho, el *Institut National de la Recherche Agronomique* (INRA) – Francia, ha creado recientemente una base de datos internacional con los perfiles identificados haciendo blanco en 8 secuencias repetitivas del genoma de *Map* (Bryant y col., 2014). En nuestro país, sólo 3

estudios se han publicado que evalúan los genotipos de *Map* circulantes (Romano y col., 2005; Fernández-Silva y col., 2012; Gioffré y col., 2015); de los 2 realizados luego de la estandarización de la metodología de genotipificación, se desprende que el patrón INMV1 es el más frecuente en nuestro medio.

1.5.2. Diagnóstico Indirecto

A. Detección de la respuesta inmune celular. En general, es el primer tipo de respuesta inmune específica montada por el huésped y por lo tanto resulta útil en el diagnóstico de la infección en los estadios subclínicos (Whitlock y col., 2000). La detección de una respuesta sistémica mediada por células suele preceder a la producción de anticuerpos detectables.

La **intradermorreacción** (IDR) se basa en el principio de que los animales pre-expuestos a *Map* desarrollarán una reacción de hipersensibilidad retardada en el sitio de inoculación intradérmica del antígeno que permitirá diferenciarlos de los animales no expuestos. Los antígenos que se emplean son extractos de micobacterias como la PPD_b, la PPD de origen aviar (PPD_a) y la johnina (PPD_j). Esta prueba presenta una baja especificidad derivada del alto nivel de sensibilización hacia el complejo MAC que existe en los rodeos (Inderlied y col., 1993) y no es considerada una buena herramienta para el diagnóstico de la paratuberculosis (Monaghan y col., 1994).

La **prueba del IFN γ** se basa en la detección mediante un ELISA sandwich de los niveles de producción *in vitro* de IFN γ por las células mononucleares de sangre periférica en respuesta a un antígeno micobacteriano (PPD_a y PPD_b), en comparación con los niveles producidos por células sin estimular. Esta prueba fue inicialmente desarrollada para el diagnóstico de la tuberculosis bovina (Rothel y col., 1990) y posteriormente se aplicó al diagnóstico de la paratuberculosis (Billman-Jacobe y col., 1992). Si bien existen kits comerciales para su realización y se la considera una herramienta aplicable para la detección de la enfermedad en animales vivos subclínicamente infectados (Stabel, 1996; Jungersen y col., 2002), no ha sido validada para el diagnóstico de la paratuberculosis. Por esta razón, sus resultados son frecuentemente difíciles de interpretar, por la falta de protocolos estandarizados de estimulación *in vitro* y de criterios definidos de interpretación. Además, su uso presenta limitantes derivadas del requisito de conservación de las células sanguíneas viables, lo que impide la realización de la prueba pasadas las 8 hs de la toma de muestras.

B. Detección de la respuesta inmune humoral. Las pruebas serológicas son las más empleadas para estimar la prevalencia de la enfermedad en rodeos grandes. Antes de la primer fase exponencial de crecimiento de *Map* dentro del huésped, la mayoría de los animales resulta negativo a las pruebas serológicas.

La prueba de **Fijación del Complemento (FC)** ha sido durante muchos años la prueba estándar empleada en los bovinos (Herr y col., 1985). Presenta un buen poder de detección en las etapas de la enfermedad en las que hay altos niveles de Acs circulantes (estadio clínico) (Ridge y col., 1991), pero su sensibilidad es baja en estadios subclínicos. Sin embargo, continúa siendo una prueba requerida para el comercio internacional de ganado en pie. Emplea como antígeno un extracto acuoso delipidado de la cepa *Map* 316F.

La técnica de **Inmunodifusión en Gel de Agar (IDGA)**, al igual que la prueba de FC, es útil para confirmar la enfermedad en los animales clínicamente sospechosos (Shermann y col., 1984). El antígeno empleado es el antígeno protoplasmático de paratuberculosis (PPA). La aparición de una o más líneas de precipitación claramente definidas idénticas a la de un suero positivo control, dentro de las 48 hs de incubación, se considera un resultado positivo.

La técnica **enzimoinmunoensayo (ELISA)** es, hasta el momento, la prueba más sensible y específica para la detección de anticuerpos séricos específicos frente a *Map* y la más difundida, debido a su simplicidad, rapidez, bajo costo relativo y la posibilidad de evaluar simultáneamente múltiples muestras. Su sensibilidad es comparable con la de la prueba de FC en los casos clínicos, pero es mayor que la de ésta en portadores asintomáticos. De todos modos, su sensibilidad en las primeras etapas de la infección es muy pobre, de entre un 7 y un 15% (McKenna y col., 2005; Eda y col., 2006). Su especificidad se ha mejorado notablemente desde la incorporación en el protocolo del paso de pre-absorción de los sueros con *M. phlei*, propuesto por Yokomizo y col. (1983 y 1985) y modificado por Milner y col. (1990). Este procedimiento elimina los anticuerpos que provocan reacciones cruzadas inespecíficas. Los antígenos más empleados en esta prueba son: la PPA, el LAM y *Map* completa. Entre ellos, el más difundido es la PPA, que ofrece la ventaja de estar disponible comercialmente. Además, existen varios kits comerciales de ELISA, la mayoría de ellos emplean el antígeno PPA. Algunos de éstos pueden emplearse también para la detección de anticuerpos en muestras de leche.

A los fines de mejorar la performance de las pruebas serológicas, distintos grupos se han enfocado en la evaluación de nuevos antígenos (Bannantine y col., 2008b;

Gioffré y col., 2009; Gumber y col., 2009; Scott y col., 2010; Casey y col., 2011; Nagata y col., 2013). Nuestro grupo está estudiando la posibilidad de mejorar el diagnóstico serológico al cambiar la estrategia de detección, mediante la identificación selectiva de IgG2 específica (Fernández y col., 2012).

El diagnóstico indirecto de la paratuberculosis, basado en la identificación de la respuesta inmune frente a *Map*, presenta limitantes derivadas tanto de la variabilidad existente entre las respuestas individuales como de la respuesta inmune diferencial en distintas fases de la enfermedad y del estado de anergia clonal que suele caracterizar el estadio terminal. Además, la similitud antigénica existente entre *Map*, las micobacterias causantes de tuberculosis y las micobacterias ambientales, determina que la respuesta inmune del huésped pueda reconocerlas en forma cruzada, lo cual constituye también una limitante (Lilenbaum y col., 2009; Varges y col., 2009; Mon y col., 2012; Kennedy y col., 2014).

Más allá de los métodos descriptos, ya instaurados para el diagnóstico de la paratuberculosis, existen alternativas surgidas de tecnologías emergentes que están en etapas preliminares de evaluación (revisadas por Britton y col., 2015). Por ejemplo, la búsqueda actual de nuevos biomarcadores de infección temprana podría proveer herramientas alternativas que mejoren el diagnóstico de esta infección en un futuro próximo. En este campo, el estudio del microbioma intestinal (Derakhshani y col., 2016), de la expresión de genes marcadores en células circulantes (Park y col., 2016) y de microARNs (Farrell y col., 2015; Shaughnessy y col., 2015) y péptidos micobacterianos (Lamont y col., 2014) en suero, están siendo considerados.

1.6. Estrategias de control.

Existe consenso en cuanto a los criterios mínimos que un plan de control de esta enfermedad debiera incluir, a saber: 1- evaluación diagnóstica de todos los casos de diarrea de rumiantes adultos y descarte de aquéllos con diagnóstico confirmado; 2- implementación de medidas básicas de higiene y manejo, que deberían adaptarse a las características de cada establecimiento particular; 3- examinación periódica y regular del *status* del rodeo con respecto a *Map*, con el foco puesto en la identificación de los animales excretores (Khol y Baumgartner, 2012). En muchos países se implementan **planes de control** que, en la gran

mayoría de los casos son voluntarios y sólo excepcionalmente, como en Suecia, revisten carácter mandatorio (SVA, National Veterinary Institut, 2008). En líneas generales, se basan en la aplicación de cultivo de MF y ELISA, ya sea a partir de muestras de suero o de leche, para la detección de los animales excretores y su eliminación (Whitlock, 2010; revisado por Gheragthy y col., 2014). Además, puesto que el cultivo a partir de muestras ambientales ha demostrado ser una herramienta simple y de bajo costo para la identificación de rodeos infectados (Lavers y col., 2013; Klawonn y col., 2016), la tendencia actual es incorporarla en los planes de control (Eisenberg y col., 2013; Wolf y col., 2014; Donat y col., 2015). De manera infrecuente, se menciona también la aplicación de la prueba de PCR en MF para la detección de *Map*, y la técnica de histopatología y/o cultivo de tejidos para el diagnóstico *post-mortem* de la enfermedad. En Europa, unos pocos países como Noruega, Islandia, Holanda y España, incluyen la vacunación de pequeños rumiantes como medida profiláctica (revisado por Khol y col., 2012). En nuestra región, sólo Chile cuenta con un programa voluntario de certificación oficial de rebaños en paratuberculosis bovina, a partir del año 2014 (SAG-Chile, 2014). En Argentina, el control se realiza solamente por la eliminación del rodeo de los animales clínicamente enfermos. Sin embargo, el Plan Argentina Innovadora 2020 del Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva cita a la paratuberculosis como enfermedad a incluir dentro de los planes de control nacional (Lasta, 2013).

No hay en la actualidad **medidas terapéuticas** aceptadas, si bien algunas alternativas están siendo exploradas (Arsenault y col., 2013; Badiei y col., 2013; Cooney y col., 2014; Li y col., 2016).

En relación a la **inmunoprofilaxis**, sólo se dispone a nivel comercial de vacunas de vieja generación, compuestas mayoritariamente por distintas cepas de *Map* inactivada (revisado por Bastida y Juste, 2011). Estas vacunas reducen la expresión clínica y la excreción fecal de la bacteria, pero no evitan la infección (Körmeny, 1994; van Schaik y col., 1996; Uzonna y col., 2003; Begg y Griffin, 2005; Singh y col., 2007; Juste y col., 2009). Además, su formulación a base del microorganismo completo determina la sensibilización de los LT y la inducción de hipersensibilidad celular frente a PPD_b (Köhler y col., 2001), e interfiere por lo tanto con las pruebas diagnósticas de la tuberculosis y la paratuberculosis a campo.

Los grandes avances de los últimos años en matrices genómicas (*genomic arrays*) (Wu y col., 2007b; Paustian y col., 2008; Castellanos y col., 2009) y proteómicas (*proteomic arrays*) (Leroy y col., 2007; Carlos y col., 2015; Rana y col., 2015) han provisto herramientas para identificar antígenos inmunodominantes de *Map*, blancos potenciales de nuevas estrategias de vacunación. Muchos de éstos están siendo evaluados tanto para el desarrollo de vacunas a vectores vivos recombinantes (Faisal y col., 2013b; Bull y col., 2014; Johnston y col., 2014) como de vacunas a subunidades proteicas (Koets y col., 2006; Kathaperumal y col., 2008; Gurung y col., 2014; Rana y col., 2015; Rana y Akhter, 2016) y a ADN (Sechi y col., 2006b; Roupie y col., 2012). También están siendo consideradas alternativas basadas en la implementación de vacunas vivas atenuadas (Watkins y col., 2010; Park y col., 2011; Faisal y col., 2013a; Bannantine y col., 2008a; Settles y col., 2014; Ghosh y col., 2015), para lo cual la optimización del desarrollo de bancos de mutantes de *Map* generadas por transposición resulta de gran utilidad (Rathnaiah y col., 2014; Rathnaiah y col., 2016). Las vacunas terapéuticas también se han evaluado recientemente con resultados alentadores (Singh y col., 2015). Es de esperar que estas investigaciones puedan brindar en el corto/mediano plazo nuevas herramientas para mejorar el control de la paratuberculosis, evitando los efectos indeseables de las vacunas actuales.

La carencia de medidas inmunoproliféricas aplicables en forma sistemática, sumada a las características ya mencionadas de la enfermedad, tales como su largo período de incubación, la existencia de individuos asintomáticos eliminadores de *Map* y la dificultad para la detección de estos animales subclínicos, hacen de la paratuberculosis una enfermedad de difícil manejo, y plantean la necesidad de ampliar el conocimiento a los fines de mejorar las herramientas para su prevención y control.

2. Hipótesis y Objetivos

Hipótesis

- La infección *in vitro* de macrófagos con *Map* opsonizada con anticuerpos anti-LAM:
 - modifica los niveles de apoptosis inducidos en comparación con los detectados en cultivos infectados con *Map* no opsonizada.
 - induce un patrón de citoquinas diferente al generado en respuesta a la infección por *Map* no opsonizada.
- La administración de anticuerpos específicos frente a LAM limita la infección por *Map*, en un modelo de infección experimental neonatal a corto plazo.

Objetivos

• Generales

- I - Contribuir al conocimiento sobre la respuesta inmune de bovinos frente a *Map* y al control de la paratuberculosis.
- II- Aportar datos que colaboren a ampliar el entendimiento sobre los mecanismos que median efectos intracelulares de los anticuerpos.
- III - Estudiar el impacto de la administración de anticuerpos específicos en la infección de bovinos por *Map*.

• Particulares

- I - Evaluar el efecto de la opsonización de *Map* con anticuerpos anti-LAM sobre:
 - A) el perfil de citoquinas y
 - B) los niveles de apoptosis inducidos en macrófagos infectados *in vitro*.
- II - Identificar el efecto de los anticuerpos anti-LAM en la infección de terneros con *Map*.



BY LIPICARINOMANNAN (LAM) FROM MYCOBACTERIUM
SPP. IN VACCINATED CALVES

Introduction

Materials and methods

Results and discussion

Conclusion

Esta foto es de una de las primeras salidas a campo, en la que se nos quedó el auto al volver. Para mí, simboliza todos los obstáculos que aparecen en este camino de la ciencia y que nosotros, igual, siempre seguimos andandooo!!!

Capítulo 1

Los modelos de infección *in vitro* con *Map* proveen una herramienta para el estudio de la interacción bacteria-huésped a nivel celular. Dada la importancia de los macrófagos subepiteliales intestinales en la patogenia de la paratuberculosis, los modelos más empleados han sido los que se basan en este tipo celular.

Los **cultivos primarios de macrófagos madurados a partir de monocitos sanguíneos** (MDM) de distintas especies animales han sido ampliamente utilizados:

- Bovina (Zurbrick y col., 1987; Weiss y col., 2002 y 2004; Hostetter y col., 2005; Murphy y col., 2006; Janagama y col., 2006; Scandurra y col., 2010; Abendaño y col., 2013b; Souza y col., 2013 y 2014; Bannantine y col., 2015; Souza, 2015; y otros)
- Ovina (Berger y Griffin, 2006; Abendaño y col., 2014)
- Caprina (Taka y col., 2013),
- Ciervo (Dobson y col., 2013; Marfell y col., 2013)
- Humana (Nazareth y col., 2015). En el contexto de estudios relacionados con la enfermedad de Crohn.

También, se han llevado a cabo diversos estudios empleando **macrófagos/monocitos de líneas celulares**, originadas a partir de células de distintas especies animales:

- Bovina. La línea de macrófagos de origen peritoneal, inducida por un virus de simio (sv-40), Bomac, fue establecida por Stabel y Stabel (1995) y empleada en diversos estudios relacionados con la paratuberculosis (Sager y col., 1999; Tooker y col., 2002; Mundo y col., 2008; Stempler y col., 2009; Jolly y col., 2011; Abendaño y col., 2013b).
- Murina. La línea J774.1 fue originalmente establecida a partir de un tumor de tipo sarcoma reticular (Ralph y col., 1975), y la línea RAW264.7, a partir de un tumor inducido por el virus Abelson leucemiantes (Raschke y col., 1978). Estas líneas han sido utilizadas como modelo de paratuberculosis (Hostetter y col., 2003; Zur Lage y col., 2003; Basler y col., 2008; Cha y col., 2013; Thirunavukkarasu y col., 2013; y Ghosh y col., 2014).
- Humano. La línea de macrófagos THP-1, obtenida a partir de una leucemia monocítica aguda (Tsuchiya y col., 1980) ha sido empleada para estudiar la producción de citoquinas en la infección por *Map* (Motiwala y col., 2006; Borrmann y col., 2011; Shin y col., 2015). También, la línea de monocitos

U973, obtenida de un linfoma histiocítico (Ralph y col., 1976) fue empleada recientemente (Wang y col., 2015b).

Tanto los cultivos primarios como las líneas celulares establecidas de macrófagos han servido para dilucidar diversos aspectos relacionados con la patogenia de esta infección poniendo el foco en su principal célula blanco. Asimismo, han permitido estudiar diferencias de patogenicidad entre distintas especies de micobacterias (Weiss y col., 2002 y 2004; Zur Lage y col., 2003; Basler y col., 2008) y entre genotipos de *Map* (Janagama y col., 2006; Gollnick y col., 2007; Borrmann y col., 2011; Abendaño y col., 2013b). La evaluación de la patogenicidad *in vitro* de diferentes cepas mutantes, en modelos de macrófagos, también constituye una herramienta empleada en la investigación de alternativas inmunoproliféricas para la paratuberculosis (Scandurra y col., 2010; Lamont y col., 2014).

En este tipo de modelos, los eventos más estudiados han sido la ingestión de *Map* y su supervivencia en el medio intracelular, la producción de óxido nítrico, la apoptosis, la activación de diversas vías de señalización y la expresión de citoquinas y otras proteínas. Hostetter y col. (2005) emplearon la infección *in vitro* de MDMB para estudiar la influencia de la opsonización (empleando suero competo *vs.* deplegado de bovinos sanos o infectados con paratuberculosis) en los niveles de ingestión y viabilidad intracelular de *Map* y en la co-localización de marcadores de fagosomas y micobacterias, como indicador de presencia bacteriana en fagosomas acidificados. En otros estudios, se ha abordado la evaluación de la posible relación entre ciertos polimorfismos genéticos del huésped y la susceptibilidad a la infección (Taka y col., 2013). También se ha intentado evaluar la respuesta del macrófago a la infección en un microambiente con características más próximas al escenario real en estudios que consideran la influencia de la presencia en el medio de ciertos factores, como hormonas (GH, prolactina, oxitocina, LH prolactina y vitamina D, en Feola y col., 1999), citoquinas (IFN γ , TGF β , IL-10, en Khalifeh y Stabel, 2004; FGF-2 en Wang y col., 2015b) u otras sustancias inmunomoduladoras producidas por las propias micobacterias, como el ManLAM (Souza y col., 2013) y las lipoproteínas (Bannantine y col., 2015).

Otros modelos *in vitro* empleados han sido **cultivos de células epiteliales**, tales como la línea MDBK de epitelio renal bovino (Patel y col., 2006; Alonso-Hearn y col., 2008), la línea MAC-T de epitelio de glándula mamaria bovina (Patel y col., 2006) y el cultivo primario de enterocitos bovinos (Schleig y col., 2005). En estos casos, los

estudios se han centrado en la capacidad de adherencia e invasión de *Map* sobre el epitelio y han permitido interesantes observaciones tales como el hecho de que la pre-incubación de *Map* en leche o la infección previa de células epiteliales potencian su capacidad de invasión celular (Patel y col., 2006).

Finalmente, diversos grupos han intentado desarrollar modelos *in vitro* más complejos, que permitan evaluar la interacción célula-célula ya sea directa o indirecta a través de la secreción de factores solubles como las citoquinas. Así, se han reportado por ejemplo modelos de inducción de **granulomas *in vitro*** en los que, a partir del cultivo y la infección de células mononucleares en presencia de una matriz proteica, es posible evaluar la interacción micobacteria-huésped en estadios tempranos muy difíciles de abordar en estudios *in vivo*. Este modelo ofrece una plataforma con potencialidades para evaluar factores del huésped y de la bacteria involucrados en la formación del granuloma y/o en la inducción del estado de dormancia bacteriana, candidatos vacunales y terapéuticos para control de las micobacteriosis y para la caracterización molecular de la interacción bacteria-macrófago en el marco de esta estructura histológica (Fitzergald y col., 2014). En esta misma línea, otros modelos que se han probado se basan en el co-cultivo de diferentes tipos celulares, tales como:

- El **co-cultivo de macrófagos y LT**, que ha permitido evaluar la capacidad de activación de LT *in vitro* como parte de la respuesta de los macrófagos a la infección por *Map* (Zur Lage y col., 2003).
- El **co-cultivo de macrófagos y células epiteliales**, que ha permitido contrastar la hipótesis de que la interacción inicial de *Map* con la barrera intestinal genera modificaciones fenotípicas en la misma que impactan sobre su interacción posterior con los macrófagos subepiteliales (Lamont y col., 2012b).

Recientemente Everman y col. (2015) han propuesto una estrategia alternativa para evaluar eventos de la infección celular bajo la influencia de los cambios que pudieran ser inducidos en *Map* por la interacción con otros tipos celulares involucrados en la patogenia de la infección. La utilización de un **modelo *in vitro* de pasajes sucesivos por cultivos celulares** permite simular el pasaje de la bacteria desde las células intestinales a los macrófagos subepiteliales y luego la re-infección de la capa epitelial en estadios más avanzados de la infección. En este estudio, a

través del análisis del transcriptoma de *Map* en las distintas etapas de la infección secuencial, detectaron un incremento significativo de la expresión de genes relacionados con la síntesis lipídica y con un fenotipo pro-inflamatorio. Los hallazgos de este modelo fueron consistentes con los obtenidos a partir de muestras intestinales de bovinos naturalmente infectados.

En líneas generales, no obstante las limitantes que supone la utilización de modelos *in vitro* de infección, su aplicación ha permitido realizar importantes aportes en el campo de la paratuberculosis. En varios casos, los investigadores han evaluado la correlación de los resultados *in vitro*, en modelos de MDM (Aho y col., 2003; Chiang y col., 2007) y de pasajes sucesivos por cultivos celulares (Everman y col., 2015), con los eventos detectados *in vivo* en animales infectados. La consistencia entre los mismos soporta la validez de la utilización de estos modelos.

Dados los objetivos planteados en esta tesis, se decidió trabajar con dos modelos de macrófagos: derivados de monocitos bovinos (MDMB) y la línea celular Bomac.

3. Capítulo 1
Materiales y Métodos

Para llevar a cabo el primer objetivo particular y contrastar las hipótesis asociadas, se trabajó con un modelo *in vitro* de infección por *Map*. El diseño experimental seleccionado se esquematiza en la **Figura 8**.

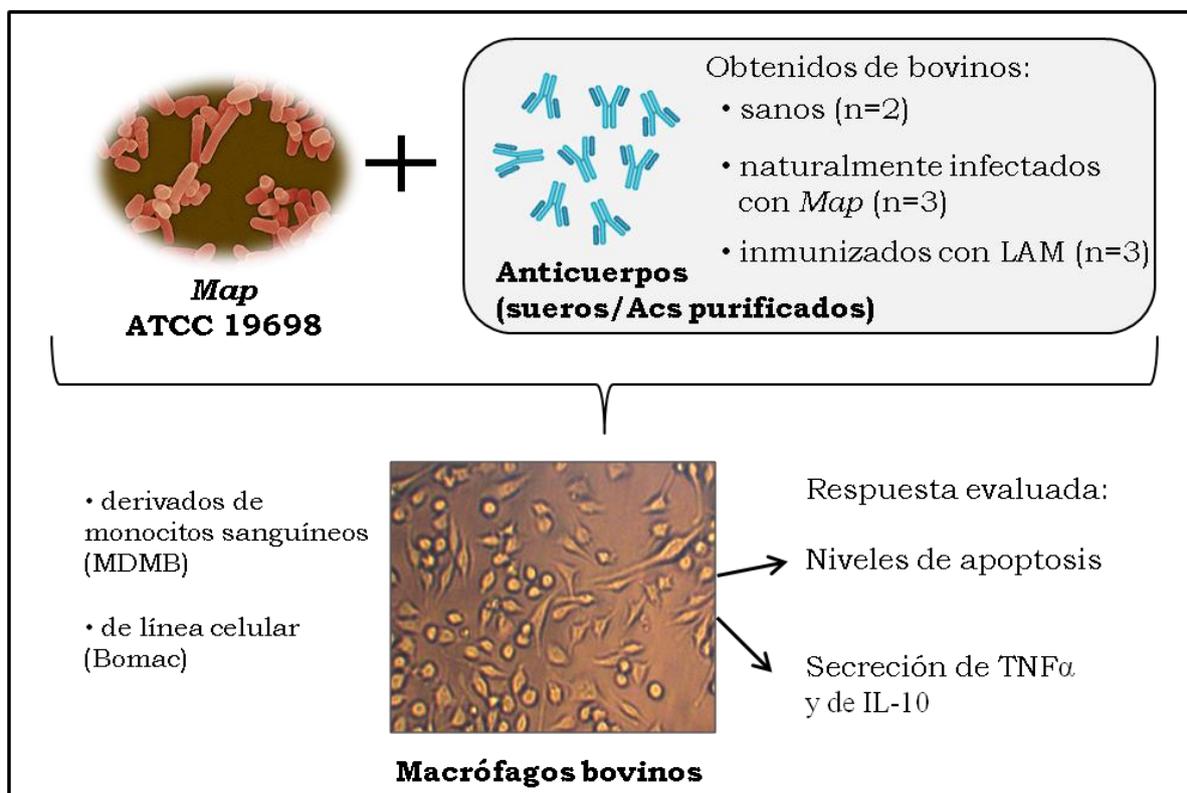


Figura 8. Modelo de infección *in vitro* por *Map*

I.2.1. Obtención de fagocitos empleados para los ensayos de infección con *Map*.

A. Cultivos primarios de macrófagos bovinos (MDMB). Se emplearon 2 bovinos donantes, adultos sanos, pertenecientes al plantel estable de animales de la Facultad de Ciencias Veterinarias (UBA), para la obtención de monocitos sanguíneos. Las extracciones de sangre se realizaron de la vena yugular, en condiciones asépticas, utilizando ACD (Citrato de sodio 2,2 % p/v- Dextrosa anhidra 2,45 % p/v- Ácido Cítrico anhidro 0,73 % p/v) como anticoagulante, a razón de 5 mL c/ 45 mL de sangre. En cada extracción se obtuvo un volumen aproximado de 300 mL totales. Después de centrifugar las muestras, se separó la capa de células blancas (CCB) y fue diluida en solución fisiológica estéril (SF). Se sembró 1 volumen de CCB en SF sobre 1 volumen de Hystopaque® 1077 (Sigma-Aldrich Corp., USA) y se centrifugó a 2.700 rpm, 30 min, a 20°C. Se aspiró el halo de células mononucleares de la interfase y se lavó 2 veces en PBS (NaH₂PO₄ 3 mM; Na₂HPO₄ 7,5

mM; NaCl 145 mM en agua destilada; pH 7,2-7,4) (**Figura 9**).

Las células se resuspendieron en 4 mL de SF y se tomó una alícuota para realizar la tinción vital con azul Tripán al 0,25 % y el recuento celular en cámara de Neubauer. Se trabajó con una concentración final de 1×10^7 células viables/mL, en RPMI 1640 (Gibco™, Invitrogen Corporation, USA) suplementado alternativamente con 20 % de SFB o plasma autólogo, de complementados. Se realizaron pruebas preliminares para establecer la conveniencia de emplear uno u otro suplemento en función de la apariencia morfológica de los cultivos al microscopio óptico. Se sembraron en placas de 24 hoyos (1mL/hoyo), permitiendo la adhesión celular al plástico durante 2,5 hs a 37°C, en estufa con atmósfera enriquecida con 5 % CO₂. Luego, las células no adheridas fueron removidas por lavado con PBS tibio y se incubó la placa durante 3-4 días en estufa de cultivo (37°C, atmósfera humedecida y enriquecida con 5% CO₂) para favorecer la maduración de los monocitos en macrófagos (**Figura 10**). En función de las pruebas preliminares, se decidió emplear como suplemento para el medio de cultivo 20 % de plasma autólogo, ya que parecía mejorar el aspecto microscópico de los cultivos.

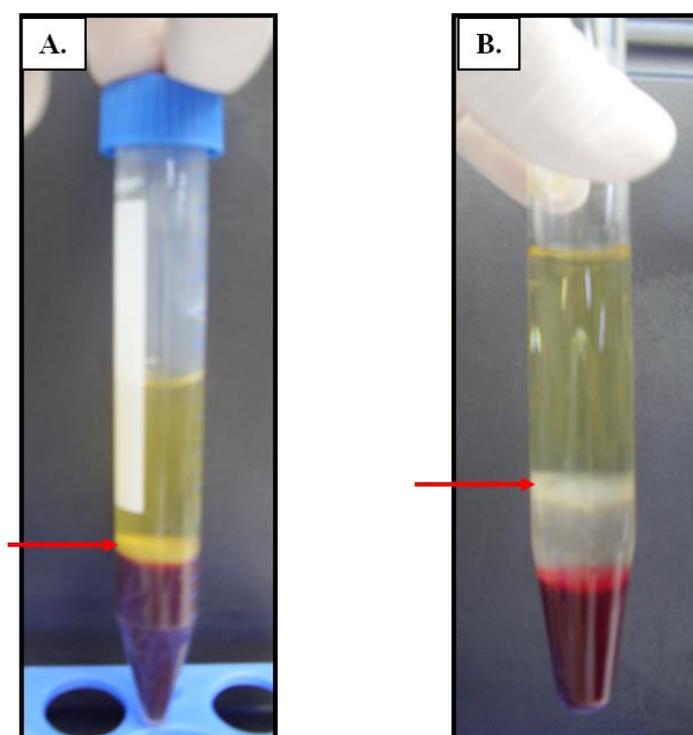


Figura 9. Diferentes pasos para la obtención de cultivos primarios de macrófagos bovinos. A) Separación de la capa de células blancas (CCB) (flecha roja) por centrifugación de sangre anticoagulada. **B)** Obtención del halo de células mononucleares (flecha roja) al centrifugar la CCB obtenida sobre un colchón de Histopaque®.

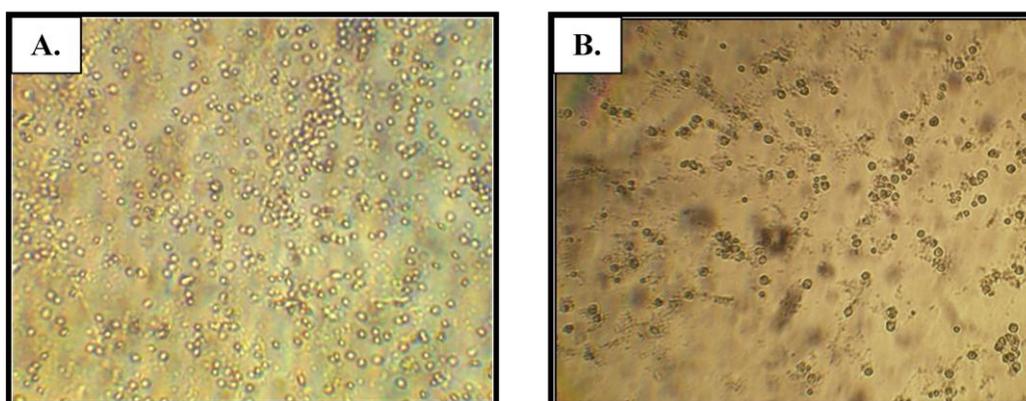


Figura 10. Cultivos primarios de macrófagos bovinos (MDMB). Imágenes microscópicas (100X) al día 0 (**A**) y al día 4 (**B**). Se puede apreciar el cambio de morfología celular predominante de redondeada a con perfiles citoplasmáticos irregulares, compatible con células fagocíticas.

B. Células Bomac. Esta línea celular (Stabel y Stabel, 1995) fue cultivada en frascos de 75 cm² de superficie con medio RPMI 1640 suplementado con 5 % suero fetal bovino (SFB, Internegocios S.A., Argentina) de complementado, e incubada en estufa. Al momento de los ensayos, se despegaron por incubación con ácido etilendiaminotetraacético 5 mM en PBS (PBS-EDTA) en frío durante 5-10 min, se centrifugaron (1.800 rpm, 5 min, 4°C) y se resuspendieron en PBS. Luego, una suspensión celular de concentración 1 x 10⁶ células viables/mL fue sembrada en placas de 24 hoyos, a razón de 200 µL/hoyo. Se agregaron 800 µL de RPMI-SFB/hoyo y se incubó durante 16 hs en estufa de cultivo antes de realizar la infección con micobacterias.

I.2.2. Bacterias.

Se trabajó con la cepa de referencia de *Map* ATCC®19698™. Se cultivó a 37°C en caldo 7H9 (Difco™ Middlebrook 7H9, Becton Dickinson and Co., USA) suplementado con 10 % de Albúmina-Dextrosa-Cloruro de sodio (ADC) y 2 mg/L de Micobactina J (Allied Monitor Inc., USA) (caldo 7H9 suplementado) hasta fase exponencial de crecimiento. Luego, se centrifugó el cultivo, se desagregó por múltiples pasajes por aguja 25G y se resuspendió en medio de congelación (caldo 7H9 10 % ADC y 15 % de glicerol, como criopreservante) hasta obtener una suspensión bacteriana homogénea, que fue fraccionada en viales. Para conocer el título bacteriano del stock, antes de congelarlo a -80°C, se desagregó y se realizó una dilución seriada en base 10. Se sembraron 100 µL de cada dilución en placas de agar 7H9 que se incubaron en

estufa a 37°C. A las 8-12 semanas, se examinaron las placas y se seleccionó la dilución del stock para la cual el número de colonias crecidas oscilaba entre 15 y 100. Con este dato se calculó el título bacteriano como Unidades Formadoras de Colonias (UFC)/mL. Al momento de los ensayos, se descongeló un vial y se incubó durante 16 hs en caldo 7H9 suplementado, en agitación a 37°C. Luego de dos lavados con PBS, se centrifugó (10.000 rpm, 30 min, 4°C), se resuspendió el sedimento bacteriano en RPMI sin suplementos, y se midió la absorbancia a 600 nm llevándolo a la densidad óptica (DO) adecuada según el caso.

Asimismo, se produjeron stocks de otras micobacterias, para las pruebas de diferentes estímulos para la obtención de sobrenadantes de referencia en los ensayos de evaluación de citoquinas. Se cultivó un aislamiento local de *Map*: Malele 35 (obtenido en el Laboratorio de Bacteriología de INTA Balcarce, a partir del cultivo de materia fecal de un bovino de la región pampeana de nuestro país) y una cepa de *M. phlei* ATCC®23042™ (gentilmente cedida por el Laboratorio de Micobacterias del Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA), Martínez). Se obtuvo un stock homogéneo de cada una de las cepas cultivadas. En la **Tabla II** se detallan las características de los stocks producidos.

Tabla II. Stocks bacterianos producidos

Cepa	Título del Stock (UFC/mL)	N° de viales congelados
<i>Map</i> ATCC19698	1×10^{11}	100
<i>Map</i> Malele 35	1×10^{10}	20
<i>M. phlei</i>	$2,5 \times 10^{10}$	68

I.2.3. Anticuerpos.

Se emplearon 3 categorías de sueros bovinos diferentes, con el objetivo de comparar los efectos sobre la respuesta de los macrófagos a la infección por *Map*, al ser pretratada con cada uno de ellos:

- sueros de bovinos sanos (n=2)
- sueros de bovinos con sintomatología clínica compatible con paratuberculosis (diarreas crónicas intermitentes y disminución de peso) (n=3).

Para estas dos categorías se confirmó el diagnóstico mediante el aislamiento de

Map por cultivo y la confirmación de la identidad de las colonias a través de la amplificación del inserto IS900 por PCR.

- sueros de bovinos inmunizados con LAM (n=3), según se detalla en el apartado siguiente (Caravanas N° #3186, #3194 y #3208).

A. Producción y obtención de los sueros bovinos específicos frente a LAM.

A.1 Extracción y caracterización de LAM a partir de un cultivo de micobacterias. Dado el alto grado de homología genómica (Bannantine y col., 2003) y antigénica (Reichel y col., 1999) existente entre *Map* y *Mycobacterium avium* subespecie *avium* (*Maa*) y la mayor velocidad de crecimiento *in vitro* de esta última, se utilizó una cepa de *Maa* (R4) para la extracción de LAM. Esta cepa fue provista, ya inactivada por vapor fluyente, por la Dra. Bernardelli, del laboratorio de Micobacterias de SENASA-Martínez. Se utilizó el protocolo de extracción con solventes descrito por Hamasur y col. (1999) que ya había sido reproducido en nuestro laboratorio (Jolly y col., 2006 y 2011). El extracto obtenido (LAM) se llevó a sequedad por evaporación rotatoria, se resuspendió en PBS y fue evaluado siguiendo la metodología empleada en extracciones anteriores. Para la caracterización, se compararon los resultados obtenidos para este extracto LAM con los de un LAM purificado a partir de *Mycobacterium tuberculosis* (gentilmente cedido por el Dr. Belisle, Universidad de Colorado, Fort Collins, USA), empleado como patrón (LAM patrón).

- **Reacciones colorimétricas.** La concentración de hidratos de carbono y proteínas fue determinada mediante reacciones colorimétricas en el extracto inicial de *Maa* sonicada (*Maas*) y en el extracto LAM. Para la determinación de hidratos de carbono se empleó el protocolo descrito por Masuko y col. (2005), que adapta el método de Fenol-Ácido Sulfúrico (Dubois, 1956) a microplacas (ver Anexo Técnico AT.1.1). Para la evaluación de proteínas se trabajó con el método de Bradford (Bradford, 1976), utilizando el reactivo Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad®, USA) según las instrucciones recomendadas por el fabricante para la determinación en microplacas.

- **Electroforesis desnaturalizante en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE).** Se analizó el patrón electroforético del extracto LAM mediante la técnica de SDS-PAGE. Se utilizó el equipo Mini Protean II (Bio-Rad, USA) y se consideraron las instrucciones del manual *Mini Protean II – Electrophoresis Cell Instruction Manual* para el armado de los geles y buffers y para el procedimiento

general. Se emplearon geles de poliacrilamida al 12 % y al 15 %. Las muestras analizadas fueron: el extracto LAM y una solución de LAM patrón, purificado a partir de *M. tuberculosis*. Se sembraron 10 µg de hidratos de carbono/calle, diluidos en un buffer muestra previamente utilizado por otros autores para la corrida electroforética de hidratos de carbono (sucrosa 10 %, SDS 2 %, azul de bromofenol 0,01 %, en buffer Tris-HCl 50 mM pH 6,8) (Tan y Grewal, 2002). Las corridas se realizaron a 96 mV por aproximadamente 2,5 hs. Para evidenciar la presencia de hidratos de carbono se utilizó la tinción argéntica (Bio-Rad Silver Stain, Bio-Rad, USA) modificada por Fomsgaard y col. (1990). Básicamente, al protocolo recomendado por el fabricante para la tinción de proteínas, se le incorporó un paso inicial de tratamiento oxidativo con ácido periódico a los fines de exponer los grupos carbohidrato y permitir su interacción con el reactivo de plata (ver Anexo Técnico AT.1.2). En paralelo, se prepararon las mismas muestras con el buffer muestra para proteínas especificado en el manual (glicerol 20 %, 2-mercaptoetanol 2 %, SDS 1 %, azul de bromofenol 0,2 %, en buffer Tris-HCl 125 mM pH 6,8) y luego de la corrida, se coloreó este gel con azul de Coomassie para evidenciar proteínas (0,1 % azul de Coomassie R-250 en solución acuosa de metanol 40 % y ác. acético 10 %).

- **Western blot con suero de bovinos infectados.** Se empleó esta metodología con el objetivo de reconfirmar la antigenicidad cruzada entre el LAM de *Maa* obtenido durante la extracción y el LAM de *Map*, frente al cual los bovinos infectados habrían estado expuestos y la conservación de la inmunogenicidad de los componentes presentes en el extracto LAM luego de la extracción. Para ello, se evaluó la reactividad de los 3 sueros de bovinos con paratuberculosis frente al extracto LAM. Los sueros se emplearon a una dilución 1/250. La reacción fue revelada con un anticuerpo anti-IgG bovina (H+L) conjugado con peroxidasa en dilución 1/800 (KPL, Kirkegaard & Perry Laboratories Inc., USA), y el posterior agregado de diaminobenzidina - DAB - (HRP Color Development Reagent 3,3'-diaminobenzidine, Bio-Rad, USA) como sustrato (ver Anexo Técnico AT.1.3).

A.2 Elaboración del inmunógeno, inmunización de bovinos y caracterización de la respuesta inmune humoral inducida. Con el objetivo de obtener anticuerpos bovinos específicos a LAM, se llevó a cabo un plan de inmunización en terneros. Se realizó una emulsión manual de LAM (1 parte) en adyuvante de Freund incompleto (AFI, Sigma-Aldrich Co., USA) (1 parte), empleando jeringas acopladas a una aguja metálica de doble cono. Se distribuyó la emulsión así preparada en jeringas monodosis, conteniendo cada una 2 mg de hidratos de

carbón en un volumen de 2 mL. Se controló su esterilidad, cultivando la emulsión en agar sangre y su estabilidad, evaluando la ausencia de cambios macroscópicos en la misma, luego de conservarla a 4°C durante un lapso mínimo de 5 días.

Se emplearon 3 terneros mestizos hembras (Caravanas N° #3186, #3194 y #3208), de aproximadamente 1 año de edad, pertenecientes a un rodeo de Luján, Pcia. de Buenos Aires, libre de tuberculosis y sin antecedentes de paratuberculosis en los últimos 5 años, que fueron mantenidos a campo natural durante la experiencia (**Figura 11**).



Figura 11. Imágenes de los bovinos inmunizados con LAM

Se aplicó un plan de inmunización de 1 dosis y 3 refuerzos, tal como se muestra en la **Figura 12** sobre una línea cronológica.

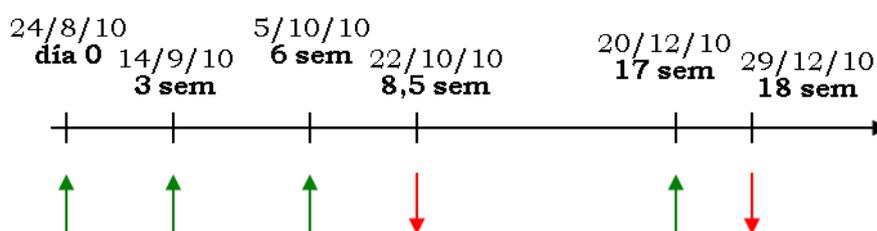


Figura 12. Plan de inmunización y muestreos. Las flechas verdes indican inmunización y las rojas extracción de grandes volúmenes de sangre para obtención de suero.

Se tomaron muestras de sangre yugular antes de cada inmunización y, en las fechas indicadas en la **Figura 12**, se extrajo entre 500 y 600 mL de sangre de cada

animal para recuperación de suero. Se decidió la extracción de estos grandes volúmenes debido a la necesidad de contar con cantidades suficientes de Acs para realizar el pretratamiento de las altas concentraciones de *Map* a emplear en el ensayo *in vivo* planteado en esta tesis.

Se evaluó la respuesta inmune humoral generada a través de diferentes metodologías, estudiando muestras de suero obtenidas pre- y post-inmunización:

- **Western blot frente a LAM y frente a *Map*.** Esta técnica se llevó a cabo según la metodología detallada en el punto I.2.3.A.1.

- **ELISA frente a LAM.** Para la realización de este ELISA, se sensibilizaron placas de 96 hoyos (Greiner Microolon High Binding ELISA microplates, Greiner Bio-One, Alemania) con extracto LAM, a una concentración de hidratos de carbono de 0,5 mg/mL, en buffer PBS pH 7, durante 48 hs a 4°C. Se bloqueó con 100 µL/hoyo de solución bloqueante (PBS-leche descremada al 10 %). Los sueros fueron evaluados a una dilución de 1/100 en solución diluyente (PBS-leche descremada al 10%, 50 µL/hoyo). Se utilizó como Ac secundario anti-IgG bovina (H+L) marcado con peroxidasa (KPL) diluido 1/500 en solución diluyente. La reacción fue revelada mediante la incubación con la solución de sustrato durante 10 min a 24°C. Se empleó una solución de 1 mg/mL de ortofenilendiamina (OPD, Sigma-Aldrich Co., USA) y 1 µL/mL de H₂O₂ 100 volúmenes en buffer citrato-fosfato (Sigma-Aldrich Co., USA) y finalmente, ácido sulfúrico 1M como solución de frenado. La lectura se realizó a 490 nm.

- **ELISA de isotipos frente a *Map*.** Se empleó un ELISA de detección específica de IgG1 e IgG2 para conocer la presencia relativa de estos isotipos en los sueros de los bovinos inmunizados con LAM. La técnica se llevó a cabo según lo detallado previamente (Fernández y col., 2012).

- **ELISA frente al Antígeno Protoplasmático de Paratuberculosis (PPA).** Como parte de la caracterización de la respuesta inmune humoral inducida por la inmunización, se evaluó el nivel de reactividad frente a PPA para cada animal, empleando un protocolo ya descrito (Fernández y col., 2011). Esta prueba es la empleada de rutina en el diagnóstico serológico de la paratuberculosis en bovinos (OIE; Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres, 2014).

B. Preparación de los sueros para los ensayos de infección de macrófagos. Todos los sueros obtenidos fueron deplementados a 56°C

durante 30 min, diluidos en RPMI y esterilizados mediante filtración por membrana de 0,22 μ , antes de ser utilizados en los ensayos de infección de macrófagos. Para confirmar si el efecto detectado se relacionaba con la presencia de anticuerpos específicos en los sueros, se llevaron a cabo algunos ensayos de infección empleando anticuerpos purificados. Los mismos se obtuvieron aplicando un protocolo de purificación por afinidad a proteína G a partir de los sueros, tal como fue descrito antes (Jolly, 2011; ver Anexo Técnico AT.1.4). De los 8 sueros en estudio, se purificaron Acs a partir de 4: 2 de bovinos inmunizados con LAM, 1 de un bovino sano y 1 de un bovino infectado. En la **Figura 13**, se muestra un análisis cualitativo de la composición de las fracciones purificadas, comparada con la del suero entero.

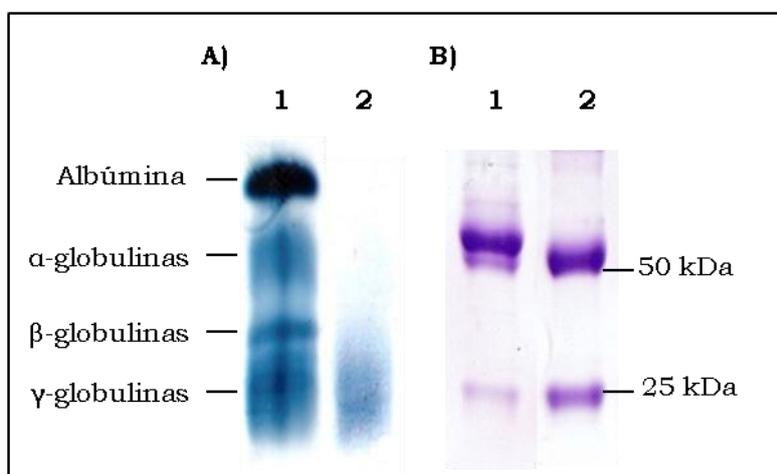


Figura 13. Purificación de los Acs séricos bovinos. **A)** Electroforesis sobre acetato de celulosa teñido con colorante Amido Schwartz. **B)** SDS-PAGE en gel de acrilamida al 15 %, teñido con azul de Coomassie. Las muestras corridas fueron: **1-** suero bovino, **2-** Acs purificados por afinidad a proteína G. Las figuras son representativas de los resultados obtenidos para todos los sueros procesados.

La imagen de la electroforesis sobre acetato de celulosa, muestra la banda única de γ -globulinas que se obtuvo como resultado de la purificación, en comparación con el patrón de bandas múltiples que se observó al correr los sueros completos, de composición heterogénea (**Figura 13.A.**). En el SDS-PAGE puede apreciarse la presencia exclusiva de 2 bandas de peso molecular aproximado 50 y 25 kDa, que corresponderían a la migración de las cadenas pesadas y livianas de las inmunoglobulinas, respectivamente, en las fracciones purificadas (**Figura 13.B.**). En contraposición, en la corrida del suero se observa un patrón complejo de bandas, con el predominio de una banda de mayor peso molecular que la cadena pesada de las inmunoglobulinas. Ésta correspondería a la albúmina, proteína sérica mayoritaria y con un peso molecular aproximado de 65 kDa.

I.2.4. Ensayos de infección de macrófagos con *Map* y evaluación de apoptosis.

Se realizaron ensayos tanto con células Bomac como con MDMB. Las condiciones de infección empleadas fueron: suero de complementado al 10% (como fuente de anticuerpos) y suspensión bacteriana con una DO_{600nm} de 0,15, que correspondería a una cantidad de *Map* de aproximadamente 10^7 UFC/mL (Borrmann y col., 2011). La multiplicidad de infección fue de 10:1 para las células Bomac, de concentración celular conocida por hoyo. Antes de infectar los cultivos, las bacterias fueron incubadas en las distintas soluciones de Acs durante 1 h a 37°C, en agitación. Se permitió luego el contacto micobacteria-macróforo por 2 hs, a 37°C, y se lavó los hoyos con PBS tibio para eliminar las micobacterias no fagocitadas, reemplazándolo por medio de cultivo fresco. Luego de 24 hs de incubación, las placas selladas se transportaron refrigeradas a los laboratorios de IDEHU, donde se realizaron los ensayos de evaluación de apoptosis con la colaboración del equipo de investigación de la Dra. Silvia Hajos (IDEHU, FFyB UBA-CONICET). Se abordaron dos técnicas diferentes: tinción con Naranja de Acridina (NA)/Bromuro de Etidio (BE) y evaluación en microscopio de fluorescencia; y marcación con Anexina V/7-Aminoactinomicina (7-AAD) y evaluación por citometría de flujo.

A. Tinción con Naranja de Acridina/Bromuro de Etidio y microscopía de fluorescencia. Al concluir las 24 hs de infección, las células se despegaron del soporte mediante incubación en baño de hielo con PBS-EDTA 0,02 % p/v durante 15 min y pipeteo suave; se aspiraron y se centrifugaron a 2.500 rpm a 4°C durante 7 min. Los *pellets* celulares se resuspendieron en 25 μ L de PBS. Inmediatamente antes de la observación al microscopio, se agregó 1 μ L de solución de NA (1 mg/mL en PBS, Sigma Aldrich) y 1 μ L de solución de BE (1 mg/mL en PBS, Sigma Aldrich). Las muestras se observaron entre porta y cubre, a 400 aumentos (400X), en microscopio de fluorescencia, utilizando un filtro de amplio rango para FITC. Se registraron fotográficamente varios campos elegidos al azar para el recuento de 100-200 células totales/muestra. Según el patrón de tinción observado y la morfología nuclear, se clasificó las células en cuatro categorías diferentes: Viables/normales (VN), con una estructura nuclear conservada y tinción verde; Viables/apoptóticas (VA), con un puntillado verde brillante en el núcleo, producto de la condensación y/o fragmentación de la cromatina; No viables/necróticas (NVN), con

estructura nuclear conservada y tinción naranja; y No viables/apoptóticas (NVA), con condensación y/o fragmentación de la cromatina y tinción naranja. Se realizaron ensayos de infección de MDMB y Bomac para evaluación de apoptosis. En la **Figura 14** se muestran imágenes representativas de ambos cultivos de macrófagos teñidos con esta técnica.

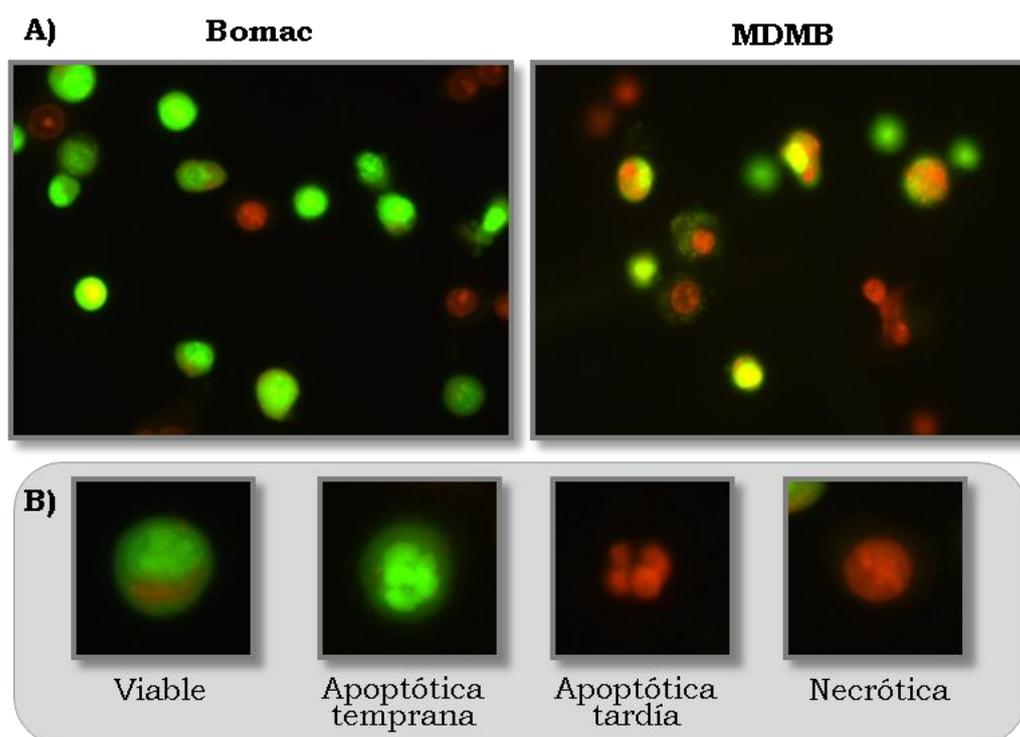


Figura 14. Tinción de Bomac y MDMB con NA/BE. A) Patrón de tinción de ambos tipos de cultivo. **B)** Imágenes representativas de los cuatro tipos celulares identificados. Imágenes a 400X.

Los resultados de esta evaluación se expresaron en porcentajes de apoptosis, calculados con la siguiente fórmula:

$$\text{Porcentaje de Apoptosis} = \frac{VA + NVA}{VA + NVA + VN + NVN} * 100$$

Dónde: VN= Viables/normales; VA= Viables/apoptóticas; NVN= No viables/necróticas; y NVA= No viables/apoptóticas.

B. Marcación con Anexina V/ 7-Amino-Actinomycina D (7-AAD) y citometría de flujo. Se utilizó el kit *PE Annexin V Apoptosis Detection Kit I* (BD Biosciences, USA), según las recomendaciones del fabricante. Se analizaron 20.000 eventos de cada muestra con un citómetro de flujo PAS-III (PARTEC, Münster, Alemania). La Anexina V es una proteína con gran afinidad por la fosfatidilserina, que es translocada de la capa interna a la externa de la membrana plasmática durante los estadios tempranos de la apoptosis. Esto determina que aquellas células que han iniciado el proceso de apoptosis resulten positivas a la marcación con Anexina V acoplada a un fluorocromo, en este caso ficoeritrina. El 7-AAD es un colorante vital, que sólo es captado cuando la membrana celular se encuentra dañada. Así, la marcación simple con Anexina V indica apoptosis temprana; la marcación simple con 7-AAD, muerte celular por necrosis; y la marcación doble indicaría apoptosis tardía; mientras que las células viables serían doble negativas a esta marcación.

Para la interpretación de los resultados, se delimitaron 4 regiones poligonales, teniendo en cuenta las nubes de puntos visualizadas en el *dot plot* de Anexina V *vs.* 7-AAD al evaluar las células de los controles basal y de 100% de muerte celular sugerido por el fabricante. El porcentaje de apoptosis se estimó sumando el porcentaje de eventos con tinción simple positiva para Anexina V (R3) y el de células con tinción doble positiva (R4) (**Figura 15**).

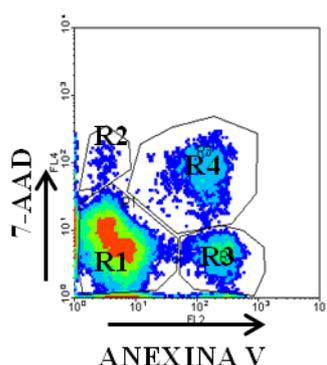


Figura 15. Interpretación de la citometría de flujo con marcación con Anexina V/ 7-AAD. *Density plot* representativo de las regiones poligonales delimitadas para evaluar la apoptosis de los cultivos de macrófagos: células viables (R1), necróticas (R2) y apoptóticas (R3 + R4).

C. Marcación con Anexina V/ 7-AAD de cultivos infectados con *Map* marcada previamente con Isotiocianato de fluoresceína (FITC). Estos ensayos se realizaron a la luz de reportes en los que se encontraron diferentes resultados al evaluar la apoptosis diferenciada de células infectadas y no, en vez de

considerar el cultivo como unidad biológica (Kabara y Coussens, 2012). Para ello, se procedió a la marcación previa de *Map* con FITC, incubando las bacterias en una solución de 0,01‰ FITC en buffer carbonato (200 mM Na₂CO₃/NaHCO₃ y 150 mM NaCl; pH 9,2) durante 30 min. Se realizaron múltiples lavados en PBS y se resuspendieron las bacterias en RPMI, continuando con el protocolo ya descrito. Para el análisis diferencial de los niveles de apoptosis en células infectadas y no de cada cultivo, se analizó primero un histograma de fluorescencia de FITC (FL1) y en función de las curvas detectadas al pasar las muestras control (macrófagos basal e infectados con *Map*-FITC), se definieron dos regiones: R0 y R1 (**Figura 16**). Cada una de estas regiones se definió como un *gate* diferente para visualizar en forma separada los eventos de cada una de ellas en el *dot plot* Anexina V *vs.* 7-AAD.

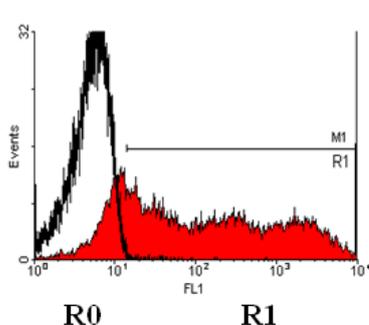


Figura 16. Análisis diferencial de apoptosis en macrófagos infectados *vs.* no infectados. Histograma de fluorescencia en el canal FL1 (FITC) donde se muestra la superposición de la muestra basal (en negro) y de los macrófagos infectados con *Map*-FITC (en rojo). Las R0 y R1 delimitadas en este histograma se emplearon como *gates* para el análisis diferencial de apoptosis en el *dot plot* de Anexina V *vs.* 7-AAD.

I.2.5. Ensayos de infección de macrófagos con *Map* y evaluación de citoquinas en los sobrenadantes de cultivo a través de la técnica de ELISA.

A. Definición de la metodología a emplear para la técnica de medición de TNF α e IL-10. Para el protocolo general de trabajo y la elaboración de los buffers necesarios se siguieron las recomendaciones de Stefura y col. (2008) para la realización de ELISAs ultrasensibles de detección de citoquinas en sobrenadantes de cultivos celulares primarios. Tanto los Ac de captura como los de detección empleados fueron específicos para las citoquinas TNF α e IL-10 de la especie bovina y se adquirieron en AbD Serotec (Oxford, Inglaterra). Brevemente, se sensibilizaron placas de 96 hoyos con 50 μ L/hoyo de una dilución de Ac de captura en buffer bicarbonato 0,05 M pH 9,6 y se incubó durante 16 hs a 4 °C en cámara húmeda. Se lavó tres veces con 100 μ L/hoyo de solución de lavado. Este paso se repitió al finalizar cada incubación. Se bloqueó con sucrosa al 2 % o con BSA 0,2 % en buffer PBS pH 7,4 con Azida sódica 0,02 %, durante 2 hs a 37°C, para el sistema

de TNF α y el de IL-10, respectivamente. Se incubaron luego las muestras de sobrenadantes de cultivo de células, estimuladas y en estado basal (50 μ L/hoyo), durante 16 hs a 4°C. Los Ac de detección y los conjugados se incubaron durante 3 y 1 h a 37°C, respectivamente, utilizando BSA 0,1 %, Tween 20 0,05 % y Azida sódica 0,02 % en PBS pH 7,4 como diluyente. Se agregó luego el sustrato (Bluephos®, KPL) en oscuridad a 24°C. Una vez desarrollado el color (a los 50 y a los 5 min, para TNF α e IL-10, respectivamente), se frenó la reacción con 50 μ L/hoyo de EDTA 0,1 M pH 8 y se procedió a la lectura a 630 nm en en Lector Opsys MR™ (Dynex Technologies, USA). En la **Figura 17** se esquematizan ambos sistemas de detección empleados.

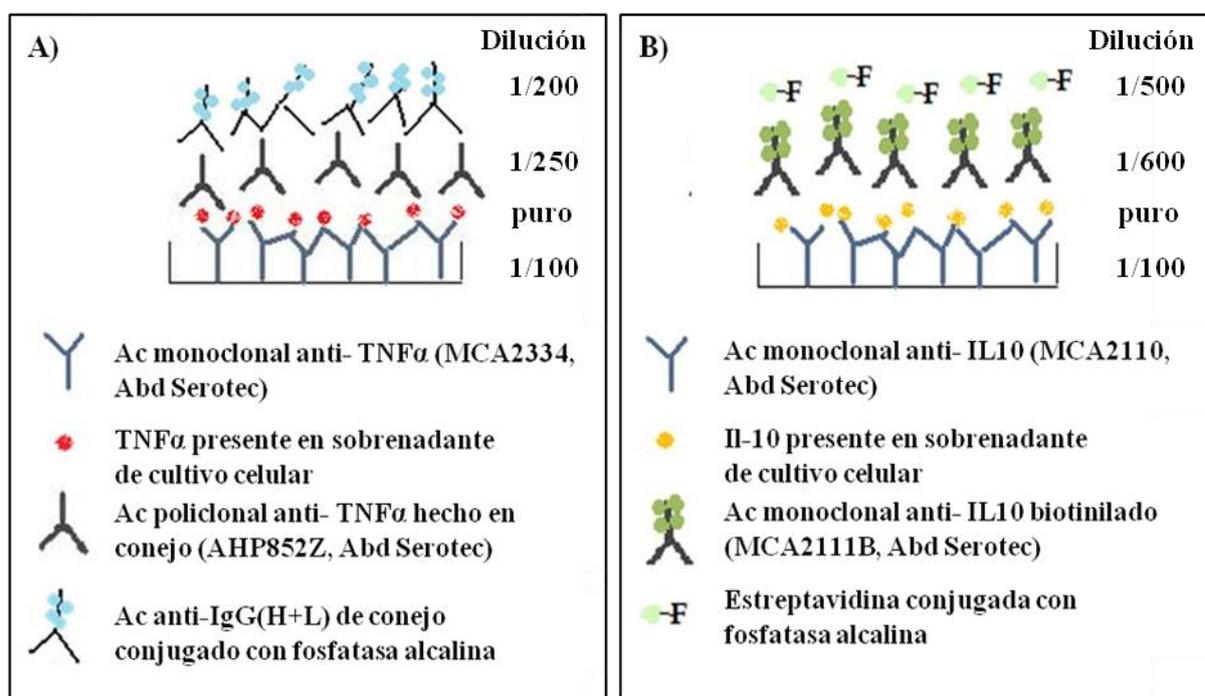


Figura 17. Esquemas de los sistemas empleados para la detección por ELISA de las citoquinas bovinas: **A)** Para TNF α , **B)** Para IL-10.

Dado que no se contaba con patrones positivos, se estimularon diversos tipos celulares (células sanguíneas totales, células mononucleares totales, MDMB y Bomac) para producir sobrenadantes que pudieran emplearse como controles. Se consideraron diferentes protocolos y teniendo en cuenta la cinética diferente de producción de ambas citoquinas, se variaron los tiempos de estimulación y de incubación hasta la recolección. Como resultado de estos ensayos preliminares se decidió utilizar como control el sobrenadante de células periféricas de sangre

anticoagulada, diluida ½ en RPMI e incubada durante 4 días en estufa de cultivo. Para el control de TNFα, se estimularon durante 2 hs con una suspensión de *Map* (DO_{600nm}=0,2) y 10 µg/mL de LPS (Sigma Aldrich, Cat N° L3137). En el caso de IL-10, sólo se empleó la suspensión bacteriana como estímulo durante 2 hs, recolectando el sobrenadante 72 hs después.

B. Definición de las condiciones del ensayo de infección de macrófagos con *Map* para la evaluación de las citoquinas. Se decidió realizar estas evaluaciones sólo sobre cultivos de células Bomac. El empleo de MDMB se descartó debido a complicaciones metodológicas surgidas, como los altos niveles relativos de TNFα y de IL-10 detectados en el medio de cultivo utilizado para este tipo celular (**Tabla III**). Consideramos que la presencia de estos niveles de citoquinas en el medio de cultivo podía interferir con la producción *in situ* de las mismas por parte de los macrófagos, afectando los resultados.

Tabla III Nivel de reactividad frente a TNFα y de IL-10 del medio de cultivo empleado para las células Bomac y los MDMB

Medio de Cultivo	TNFα	IL-10
RPMI + 20% SFB	0,192 ± 0,032	0,397 ± 0,004
RPMI + 20% plasma	0,396 ± 0,037	0,742 ± 0,028

Los resultados se expresan como DO promedio ± DS de dos evaluaciones independientes. El medio suplementado con SFB fue el empleado para las células Bomac y el otro, para las MDMB.

Se evaluaron primero los sobrenadantes recolectados durante los ensayos de apoptosis, sin encontrar niveles detectables de ninguna de las dos citoquinas, razón por la cual se decidió poner a punto las condiciones de infección de Bomac para lograr la producción de dichas citoquinas en niveles detectables y variables en los sobrenadantes de cultivo celular. Para esto, se sembraron placas de 24 hoyos con 0,7 x 10⁶ células Bomac viables/hoyo y se realizó la infección con distintas concentraciones bacterianas de un aislamiento de *Map* (Malele 35). Se utilizaron suspensiones bacterianas de turbidez correspondiente a las siguientes DO a 600 nm: 0,35; 0,75; 1,15; 1,50.

Tal como se muestra en la **Figura 18**, encontramos una tendencia al aumento de

la secreción de TNF α por parte de los macrófagos infectados con *Map* en el tiempo de recolección evaluado, al aumentar la concentración bacteriana. Al emplear la carga bacteriana máxima (DO = 1,50) se llegó casi a cuadruplicar los valores de esta citoquina detectados con respecto a los basales (UR 445 *vs.* 100).

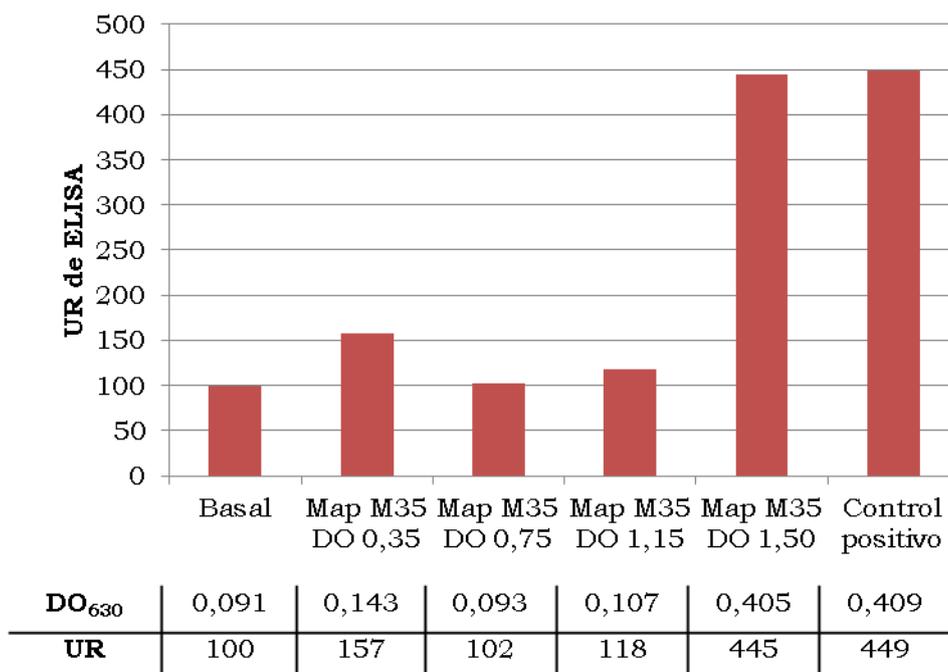


Figura 18. Niveles de TNF α detectados por ELISA en sobrenadantes de células Bomac infectadas con distintas concentraciones de *Map*. Las Unidades Relativas (UR) de TNF α se calcularon como el cociente entre la DO obtenida para cada tratamiento y la DO detectada al analizar el sobrenadante de Bomac sin estimular (DO basal) * 100. Los sobrenadantes se recolectaron a las 2 hs pos-infección. Control positivo: sobrenadante de sangre periférica bovina anticoagulada, diluida 1:2 en RPMI base y cultivada 4 días en estufa, estimulada con *Map* Malele 35 (M35) DO = 0,2 y 10 μ g/mL de LPS durante 2 hs. Se muestran los resultados de un ensayo realizado.

En la **Figura 19** se muestran los resultados obtenidos para IL-10. En este caso observamos que la cepa de *Map* empleada indujo un incremento semejante de la secreción de IL-10 a las 48 hs posinfección a todos las DOs evaluadas. En este caso, el incremento de la carga bacteriana no pareció afectar los niveles de IL-10 secretados.

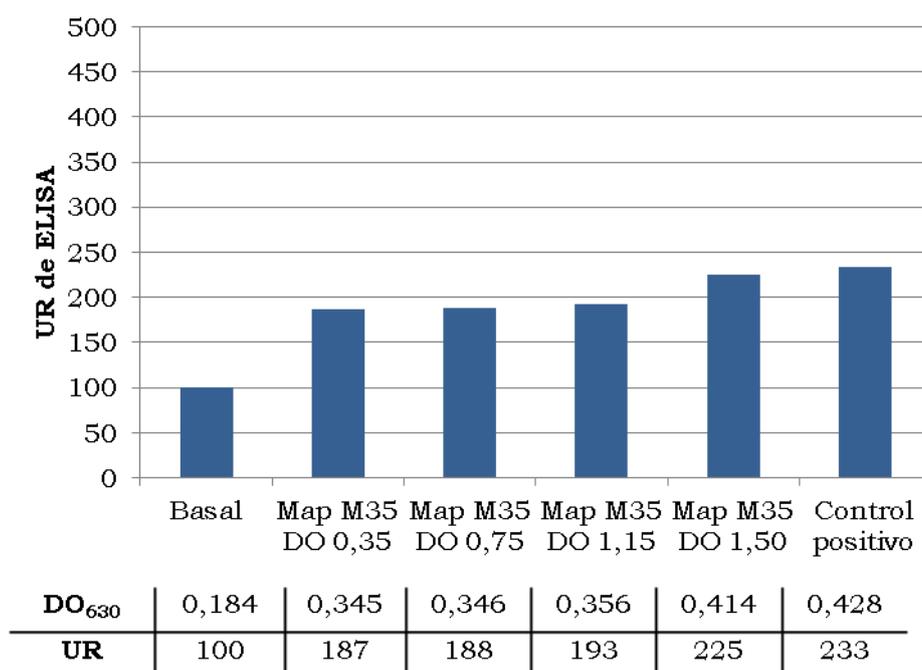


Figura 19. Niveles de IL-10 detectados por ELISA en sobrenadantes de células Bomac infectadas con distintas concentraciones de *Map*. Las Unidades Relativas (UR) de IL-10 se calcularon como el cociente entre la DO obtenida para cada tratamiento y la DO detectada al analizar el sobrenadante Bomac sin estimular (DO basal) * 100. Los sobrenadantes se recolectaron a las 48 hs pos-infección. Control positivo: sobrenadante de sangre periférica bovina anticoagulada, diluida 1:2 en RPMI y cultivada 4 días en estufa, estimulada con *Map* Malele 35 (M35) DO = 0,2 durante 2 hs, recolectado a las 72 hs. Se muestran los resultados de un ensayo realizado.

En función de estos resultados, se seleccionó la turbidez correspondiente a DO = 1,50 para realizar los ensayos de comparación de los niveles de TNFα y de IL-10 producidos por macrófagos infectados con *Map* preincubada con diferentes sueros. Según datos bibliográficos, una DO de 1 correspondería aproximadamente a 10⁸ UFC de *Map*/mL (Borrmann y col., 2011). Esto permite estimar que la multiplicidad de infección de estos ensayos fue mayor a 100:1.

Todos los sobrenadantes obtenidos fueron clarificados por centrifugación, alicuotados en viales de 200 µL y congelados a -80°C hasta su evaluación. También se congelaron sobrenadantes de Bomac sin estimular obtenidos en cada ensayo, como control del nivel de producción basal de las citoquinas a evaluar.

Los resultados se expresaron empleando la siguiente fórmula:

$$\text{Unidades Relativas (UR)} = \frac{\text{DO del SN evaluado}}{\text{DO del SN basal}} \times 100$$

I.2.6. Análisis estadístico.

Se realizaron 2 o 3 repeticiones de cada experimento, según el caso. Se utilizó el software Statistix® 8.0. (Analytical Software, USA) para el análisis estadístico mediante ANOVA de poblaciones múltiples. Se verificó previamente la homogeneidad de varianzas (Test de Bartlett) y la normalidad (Test de Shapiro-Wilk) de cada variable en estudio. Como análisis POSTANOVA, se aplicó el test de Dunnett, considerando la infección con *Map* preincubada con Acs de bovinos sanos como tratamiento control. Para la evaluación comparada del efecto de los sueros de bovinos inmunizados con LAM pre- y post- inmunización y los de los sueros *vs.* Acs purificados, se empleó la prueba T de Student para muestras pareadas. En el experimento de infección con *Map*-FITC, además de la comparación de los resultados para la subpoblación infectada *vs.* la no infectada entre los distintos tratamientos, se utilizó la prueba T de Student para muestras independientes para comparar los niveles de apoptosis obtenidos en estas 2 subpoblaciones de macrófagos al infectar sólo con *Map*. En todos los casos, se consideró un p-valor menor a 0,05 como diferencia estadísticamente significativa.

3. Capítulo 1

Resultados

I.3.1. Producción y obtención de los sueros bovinos específicos frente a LAM

A. Obtención del inmunógeno para la producción de los sueros anti-LAM. Se repitió la metodología empleada en ensayos anteriores para obtener un extracto de LAM. Las fracciones inicial (*Maas*) y final (extracto LAM) fueron analizadas empleando los métodos de Fenol-Ácido Sulfúrico y Bradford, para estimar su concentración de hidratos de carbono y proteínas, respectivamente. Los resultados obtenidos se detallan en la **Tabla IV**.

Tabla IV. Composición del extracto LAM obtenido

Fracción Evaluada	Volumen (mL)	Hidratos de Carbono (mg/mL)	Proteínas (mg/mL)
<i>Maas</i>	76,00	25,60	1,87
Extracto LAM	8,50	15,20	< 0,0625

La concentración de hidratos de carbono fue determinada por el método de Fenol-Ácido Sulfúrico. La concentración proteica, a través del método de Bradford. *Maas*: *Mycobacterium avium* subsp. *avium* sonicada.

A partir de estos resultados, puede analizarse la variación en la relación hidratos de carbono/proteínas como consecuencia del proceso de extracción. Se observa una relación en la fracción inicial equivalente a 13,7 y final a 243,2. Estos valores indican que la metodología empleada permitió incrementar considerablemente la concentración relativa de hidratos de carbono con respecto a la de proteínas.

A través de la técnica de SDS-PAGE y la coloración posterior con tinción argéntica modificada para teñir hidratos de carbono, se analizó el patrón de bandas obtenido para el extracto LAM y el peso molecular aproximado de sus principales componentes. En la **Figura 20.A** se muestra la corrida electroforética del extracto LAM y del LAM de *M. tuberculosis* empleado como patrón.

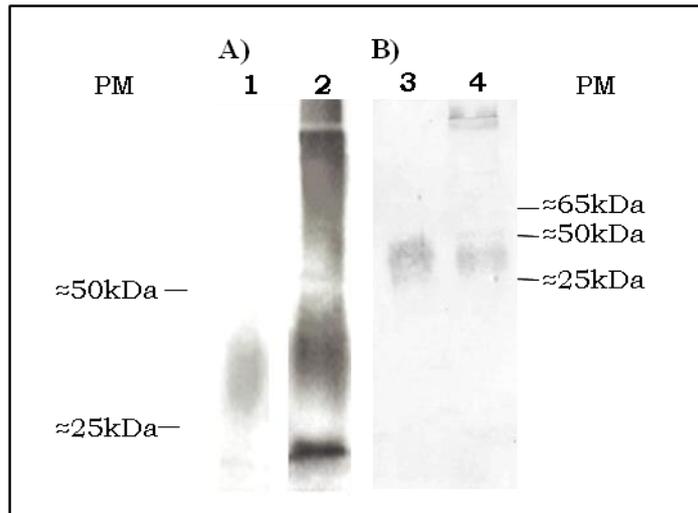


Figura 20. Caracterización del extracto LAM. A) SDS-PAGE al 12 % coloreado con tinción argéntica modificada por Fomsgaard. Se sembraron 10 μ g de hidratos de carbono/calle. **1:** LAM patrón, purificado a partir de *M. tuberculosis*. **2:** extracto LAM de *Maa*. **B)** Western blot a partir de SDS-PAGE al 15 %. **3:** extracto LAM (10 μ g de hidratos de carbono/calle); **4:** *Map* Malele 35, tratada con urea 6M. En ambas calles se evaluó el suero de un bovino infectado en dilución 1/250. **PM:** peso molecular.

La corrida del extracto LAM muestra una composición heterogénea con un patrón de bandas difuso, característico para los hidratos de carbono (Harboe y col., 1998). Un duplicado de este gel fue teñido con azul de Coomasie, sin evidenciar presencia de bandas proteicas en el extracto LAM (resultado no mostrado). Puesto que la tinción de Coomasie puede detectar la presencia de proteínas en el orden de los μ g y, considerando un volumen de siembra por calle de 20 μ L, la ausencia de bandas indicaría una concentración proteica en el extracto LAM inferior a 0,05 mg/mL, en coincidencia con los resultados de las reacciones colorimétricas.

Los sueros de los 3 bovinos infectados evaluados reaccionaron con el extracto LAM en el Western blot. El patrón de reconocimiento observado fue similar para los distintos animales. A modo de ejemplo se muestra el resultado obtenido para uno de los sueros (**Figura 20.B**).

B. Obtención de grandes volúmenes de suero bovino anti-LAM y su caracterización. Luego del plan de inmunización aplicado, se logró obtener un volumen aproximado de 1200 mL de suero totales, entre las 2 sangrías realizadas de los 3 bovinos inmunizados. La respuesta inmune humoral inducida en estos bovinos frente a la inmunización con LAM fue estudiada a través de ensayos de Western blot y de ELISA.

En la **Figura 21** se muestra el patrón de reactividad por Western blot de los 3 sueros frente al extracto LAM y frente a *Map*.

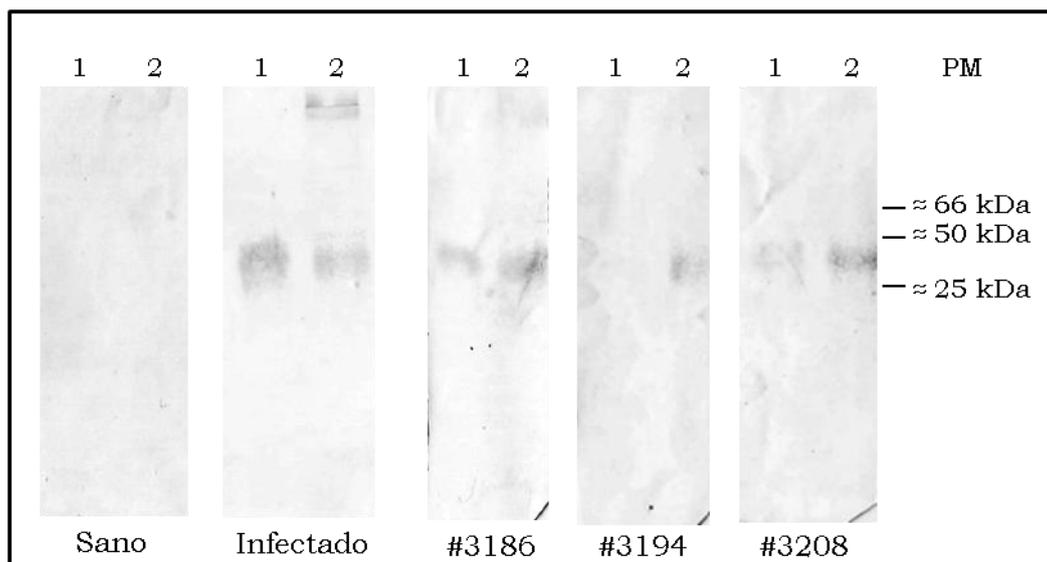


Figura 21. Especificidad de los anticuerpos inducidos por inmunización. Imágenes de un Western blot a partir de un gel de poliacrilamida al 15 %. **1:** extracto LAM (10 µg de hidratos de carbono/calle); **2:** *Map* Malele 35, tratada con urea 6 M. Los rótulos debajo de cada membrana indican los sueros analizados (en dilución 1/250). Los patrones de reactividad mostrados para el suero de bovino sano y de infectado son representativos de los resultados de todos los sueros evaluados en la categoría respectiva. **PM:** peso molecular.

Todos los bovinos inmunizados desarrollaron una respuesta humoral dirigida predominantemente frente a una única banda antigénica del extracto LAM, presente también en la corrida electroforética de *Map* (**Figura 21**, comparación de bandas en la calle 1 y 2 para #3186, #3194 y #3208). El patrón de reconocimiento de *Map* por parte de los sueros de los bovinos infectados fue diferente al de los bovinos inmunizados con LAM, con presencia de múltiples bandas (**Figura 21**, comparación de bandas en la calle 2 para “Infectado” vs. #3186,#3194 y #3208).

Se evaluó también el nivel de anticuerpos específicos producidos a través de la técnica de ELISA. Los resultados encontrados se detallan en la **Tabla V**.

Tabla V. Niveles de anticuerpos anti-LAM inducidos por inmunización

Caravana N°	24/08/10 0 dosis	22/10/10 3 dosis	29/12/10 4 dosis
#3186	0,158 ± 0,001	2,134 ± 0,171	1,702 ± 0,019
#3194	0,140 ± 0,011	1,180 ± 0,001	0,988 ± 0,049
#3208	0,186 ± 0,008	1,988 ± 0,069	2,001 ± 0,043

Los valores de esta tabla representan DO obtenidas al evaluar los sueros en dilución 1/100 en un ELISA anti-LAM ± 1 desvío estándar (DS).

Todos los bovinos inmunizados demostraron altos niveles de reactividad frente a LAM por ELISA, tanto en las muestras de suero tomadas luego de la tercera dosis como en las posteriores a la cuarta. No obstante, la incorporación de la cuarta dosis de inmunización no resultó en un incremento detectable de los niveles de anticuerpos específicos inducidos, con respecto a la tercera. El bovino caravana #3194 fue el que presentó menor nivel de reactividad frente a LAM por ELISA, al evaluar los sueros en dilución 1/100 (**Tabla V**). Este resultado es coincidente con lo observado en el Western blot en donde, de los 3 bovinos, fue éste el que mostró bandas de menor intensidad (**Figura 21**).

Por último, se estudió la respuesta de anticuerpos frente a PPA, comparando los niveles detectados pre- y pos-inmunizaciones (**Tabla VI**).

Tabla VI. Nivel de reactividad frente a PPA pre- y pos- inmunizaciones

Caravana N°	24/08/10 0 dosis	22/10/10 3 dosis	29/12/10 4 dosis
#3186	0,163 ± 0,008	0,145 ± 0,017	0,102 ± 0,001
#3194	0,124 ± 0,016	0,095 ± 0,005	0,083 ± 0,002
#3208	0,118 ± 0,003	0,158 ± 0,005	0,133 ± 0,006

El valor de corte considerado para clasificar al animal como sospechoso fue de 0,202 y como positivo, de 0,303.

Ninguno de los bovinos mostró reactividad frente a PPA, ni al momento de iniciar las inmunizaciones ni luego de concluido el plan. Este hallazgo junto con los bajos niveles de proteínas detectados en el extracto LAM y los resultados del Western blot sugieren que los sueros obtenidos por la inmunización de bovinos reconocen principalmente a LAM como antígeno.

I.3.2. Evaluación de Apoptosis.

Se realizaron ensayos de infección de MDMB y Bomac con *Map*, en presencia o ausencia de Acs específicos, para evaluación de apoptosis. Se empleó primero la tinción con NA/BE. En los dos modelos celulares estudiados se detectó un aumento significativo de los niveles de apoptosis inducidos por *Map* al preincubarla con los sueros inmunes (**Figura 22**). Los resultados obtenidos en ambos casos mostraron

una tendencia semejante; no obstante, los niveles de apoptosis detectados para MDMB resultaron mayores que los de Bomac.

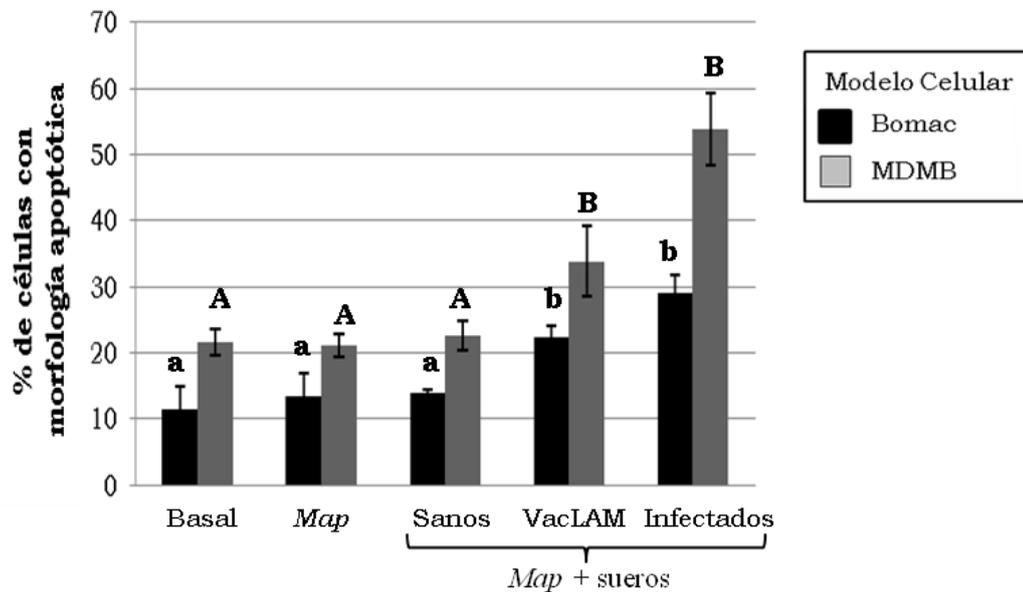


Figura 22. Evaluación de apoptosis en macrófagos infectados usando la tinción con NA/BE. Se muestran los resultados de 3 ensayos independientes para MDMB y 2, para Bomac. Diferentes letras (minúsculas para Bomac y mayúsculas para MDMB) indican diferencias estadísticamente significativas al comparar los distintos tratamientos en un mismo modelo celular (ANOVA y test de Dunnett, $p < 0,05$).

A través del análisis por citometría de flujo se confirmaron los resultados obtenidos mediante la técnica de tinción fluorescente y evaluación microscópica, tanto para el modelo Bomac como para el de MDMB (**Figura 23**).

En relación al efecto de *Map* sobre el nivel basal de apoptosis de los cultivos de macrófagos, estos resultados no fueron concluyentes. En el caso del modelo Bomac, las dos metodologías empleadas detectaron niveles comparables de apoptosis en los hoyos basales y los infectados por *Map* (**Figura 22 y 23**, comparación de “Basal” *vs.* “*Map*” para las barras negras). Al estudiar los cultivos primarios (MDMB), sólo la técnica de citometría de flujo permitió detectar un incremento significativo en la apoptosis de las células infectadas con *Map* con respecto a los hoyos basales (**Figura 22 y 23**, comparación de “Basal” *vs.* “*Map*” para las barras grises).

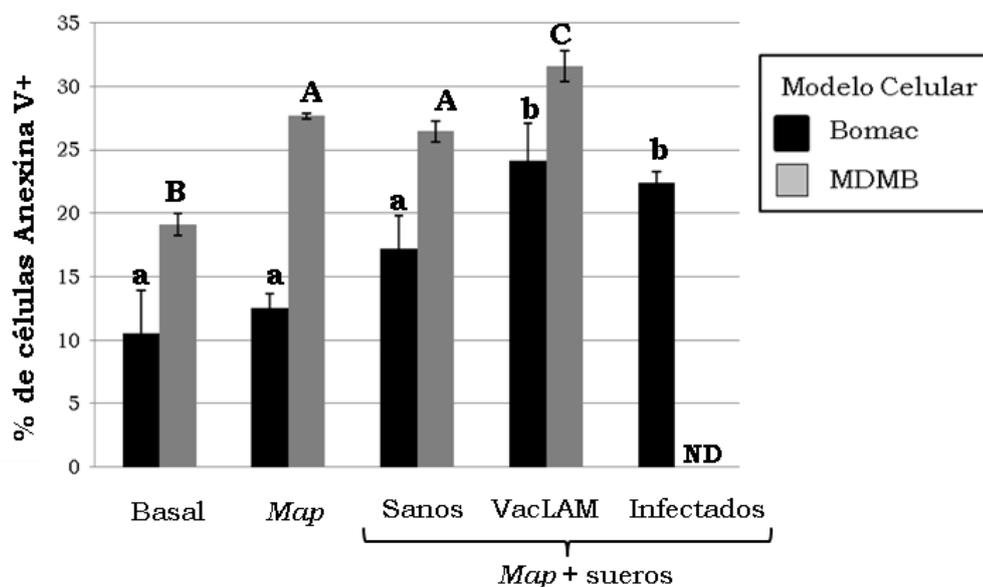


Figura 23. Evaluación de apoptosis en macrófagos infectados mediante la marcación con Anexina V y 7-AAD. Porcentajes de células Anexina V + encontrados en Bomac/MDMB en estado basal y al ser infectados con *Map*, en presencia o ausencia de sueros. Se muestran los resultados de 2 ensayos independientes. Diferentes letras (minúsculas para Bomac y mayúsculas para MDMB) indican diferencias estadísticamente significativas al comparar los distintos tratamientos en un mismo modelo celular (ANOVA y test de Dunnett, $p < 0,05$). ND indica “No Determinado”.

Teniendo en cuenta que en ambos modelos se evidenció una modulación semejante de la apoptosis inducida por *Map* al ser preincubada con sueros inmunes, y dadas las ventajas técnicas del trabajo con la línea celular, decidimos continuar nuestros estudios sólo con las células Bomac como modelo de macrófago bovino.

Luego, quisimos investigar si el efecto observado al preincubar *Map* con los sueros inmunes se debía a la presencia de Acs específicos en ellos. Para esto, repetimos los ensayos de infección comparando el efecto de muestras pareadas de sueros de bovinos vacunados con LAM, tomadas pre- y post- inmunización. El efecto de aumento de apoptosis al preincubar *Map* con los sueros de los bovinos inmunizados, sólo se observó con las muestras de suero tomadas post-inmunización. Mientras que los niveles de apoptosis encontrados con las muestras pre-inmunización resultaron semejantes al basal (**Figura 24**). Estos resultados sugieren que este efecto se debe a la presencia de Acs específicos en los sueros.

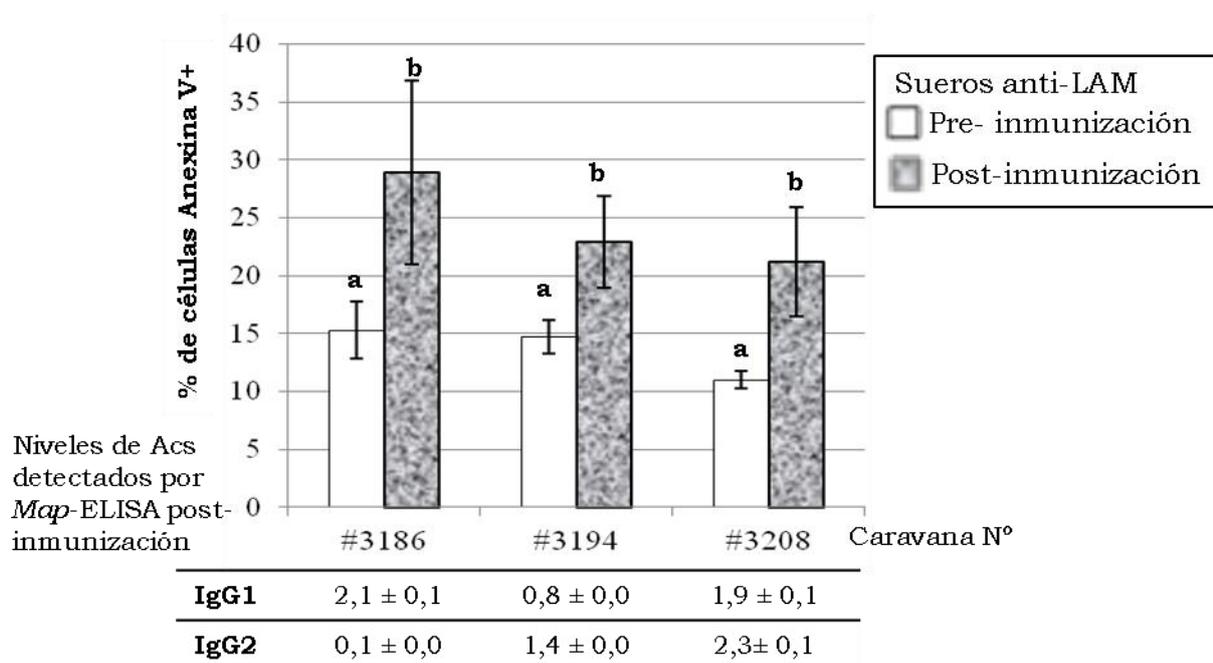


Figura 24. Comparación de los niveles de apoptosis encontrados al pretratar *Map* con suero de los bovinos inmunizados, pre- y post- inmunización con LAM. Se muestran los porcentajes de células Anexina V + obtenidos en 2 ensayos independientes de marcación con Anexina V/7-AAD de células Bomac. Diferentes letras sobre las barras indican diferencias estadísticamente significativas al comparar los sueros pre- y post- inmunización (prueba T de Student para muestras pareadas, $p < 0,05$). La tabla inferior muestra los niveles relativos de IgG1 e IgG2 específicas frente a *Map* encontrados por ELISA y expresados en valores de DO promedio \pm desvío estándar para los sueros post- inmunización. Las muestras pre- inmunización mostraron reactividades inferiores al valor de corte en todos los casos.

Al evaluar la presencia de isotipos IgG1 e IgG2 específicos frente a *Map* en las muestras de los 3 bovinos tomadas post- inmunización, encontramos resultados variables: dos animales produjeron cantidades considerables de ambos isotipos estudiados (caravanas #3194 y #3208), mientras que el tercero mostró un predominio casi total de IgG1 (caravana #3186) en su respuesta a la inmunización (**Figura 24**, tabla).

También, comparamos el efecto de la preincubación de *Map* con sueros *vs.* Acs séricos purificados sobre los niveles de apoptosis inducidos. Para este ensayo consideramos 2 animales de cada categoría en estudio (**Figura 25**).

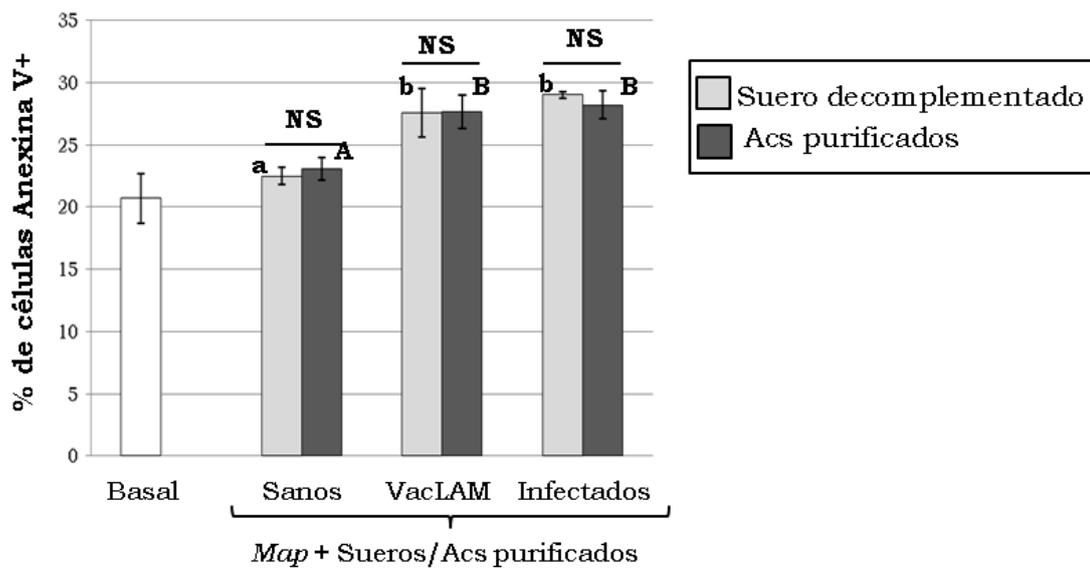


Figura 25. Comparación de los niveles de apoptosis encontrados al pretratar *Map* con sueros o Acs purificados. Se muestran los resultados de 2 ensayos independientes de marcación con Anexina V/7-AAD con células Bomac. Diferentes letras sobre las barras (minúsculas para suero de complementado y mayúsculas para Acs purificados) indican diferencias estadísticamente significativas al comparar los distintos tratamientos (ANOVA y test de Dunnett, $p < 0,05$). “NS” sobre las barras indica que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas al comparar los niveles de apoptosis obtenidos con el suero y con los Acs purificados en cada caso (prueba T de Student para muestras pareadas, $p < 0,05$).

En forma consistente con los resultados mostrados en la **Figura 24**, no encontramos diferencias significativas al comparar el efecto de la preincubación con los sueros *vs.* con los Acs purificados para ninguna de las 3 categorías de bovinos. Este resultado indicaría que los anticuerpos son los principales componentes activos del suero en relación a la capacidad de modular la apoptosis inducida en macrófagos por *Map*.

Por último, a los fines de poder evaluar en forma diferencial el efecto de la infección sobre la apoptosis de las células infectadas y testigos en el mismo cultivo, incorporamos un ensayo empleando *Map* marcada con FITC. Los resultados obtenidos con esta metodología se muestran en la **Figura 26**.

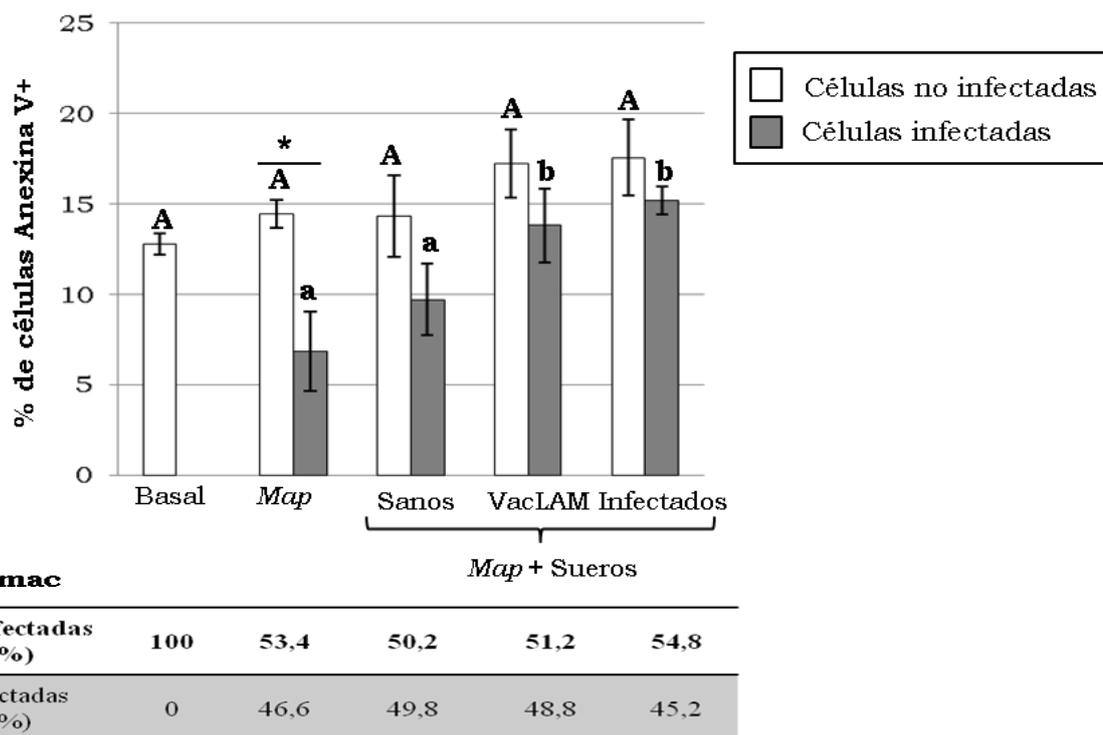


Figura 26. Evaluación de apoptosis en macrófagos Bomac por citometría de flujo, empleando *Map* marcada con FITC. Porcentajes de células Annexina V + para subpoblación testigo e infectada en cada tratamiento. Se realizaron 2 ensayos independientes, evaluando cada vez 2 sueros de cada categoría (Sanos, VacLAM e Infectados). Diferentes letras (mayúsculas para células no infectadas y minúsculas para células infectadas) indican diferencias estadísticamente significativas al comparar los tratamientos (ANOVA y test de Dunnett, $p < 0,05$).*: $p < 0,05$ entre las 2 barras indicadas (prueba T de Student para muestras independientes). La tabla inferior muestra los porcentajes de células infectadas y no en cada cultivo, obtenidos según lo explicado en la Figura 16. Los resultados mostrados son ilustrativos de los 2 ensayos realizados.

Al poder evaluar en forma diferencial las células infectadas *vs.* no infectadas, se encontró una inhibición relativa de la apoptosis en las células infectadas con respecto a las testigos en los cultivos inoculados con *Map* ($p < 0,05$; prueba T de Student para muestras independientes). Además, al pretratar *Map* con los sueros inmunes, la apoptosis de las células infectadas fue significativamente mayor que en el caso de los sueros no inmunes. Estos resultados sugieren que los Acs específicos afectan el efecto de inhibición de apoptosis observado en las células infectadas por *Map*.

Finalmente, analizamos el porcentaje de células infectadas por *Map* resultante en cada tratamiento (**Figura 26**, tabla). En todos los casos encontramos un nivel de infección semejante, de aproximadamente un 50%. Esta observación indicaría que el incremento de apoptosis detectado al pretratar *Map* con los sueros inmunes no estaría relacionado con un aumento de la cantidad de células que han fagocitado.

I.3.3. Evaluación de citoquinas en los sobrenadantes de cultivo a través de la técnica de ELISA.

Se midieron citoquinas en los sobrenadantes de cultivo de células Bomac, en los ensayos de infección con *Map* descritos en la metodología. No pudimos detectar diferencias significativas entre los niveles de citoquinas inducidos por *Map* incubada con los distintos pretratamientos, y la variación encontrada al evaluar distintos sueros pertenecientes a una misma categoría (sanos, inmunizados con LAM o infectados) fue importante, tal como lo demuestran las barras de desvío graficadas (**Figura 27**).

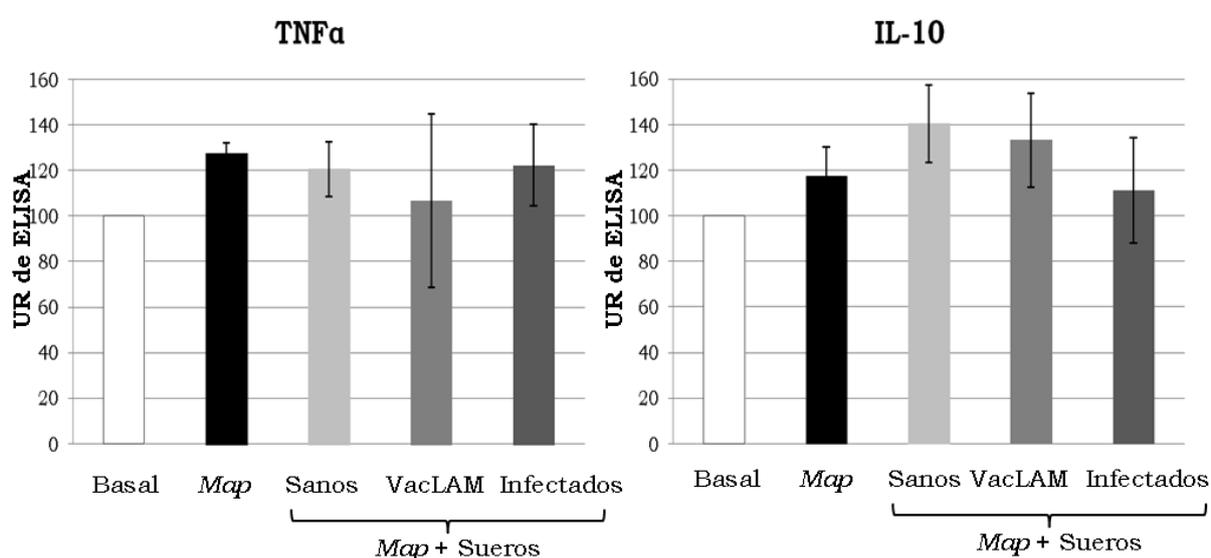


Figura 27. Niveles de citoquinas detectados en sobrenadantes de Bomac infectadas con *Map* preincubada con diferentes sueros. Se muestran los resultados de dos ensayos independientes. Las barras de “*Map* + sueros” grafican el valor promedio obtenido para los sueros del grupo (2 de cada categoría) y el desvío estándar respectivo. Las Unidades Relativas (UR) de ELISA para cada citoquina se calcularon como el cociente entre la DO obtenida para cada muestra y la DO basal * 100.

Con el objetivo de reducir esta variación entre repeticiones biológicas, se analizó los niveles de estas citoquinas en sobrenadantes obtenidos al infectar Bomac con *Map* pretratada con Acs séricos purificados. En este caso, se pudo detectar una diferencia estadísticamente significativa en el aumento de la secreción de TNFα con los Acs provenientes de sueros inmunes, con respecto a los provenientes de sueros control (**Figura 28**). Además, en esta figura se observa que el empleo de Acs purificados permitió disminuir en forma considerable la variación entre repeticiones biológicas, en el caso de los Acs del grupo inmunizado con LAM, del que pudieron evaluarse dos bovinos diferentes.

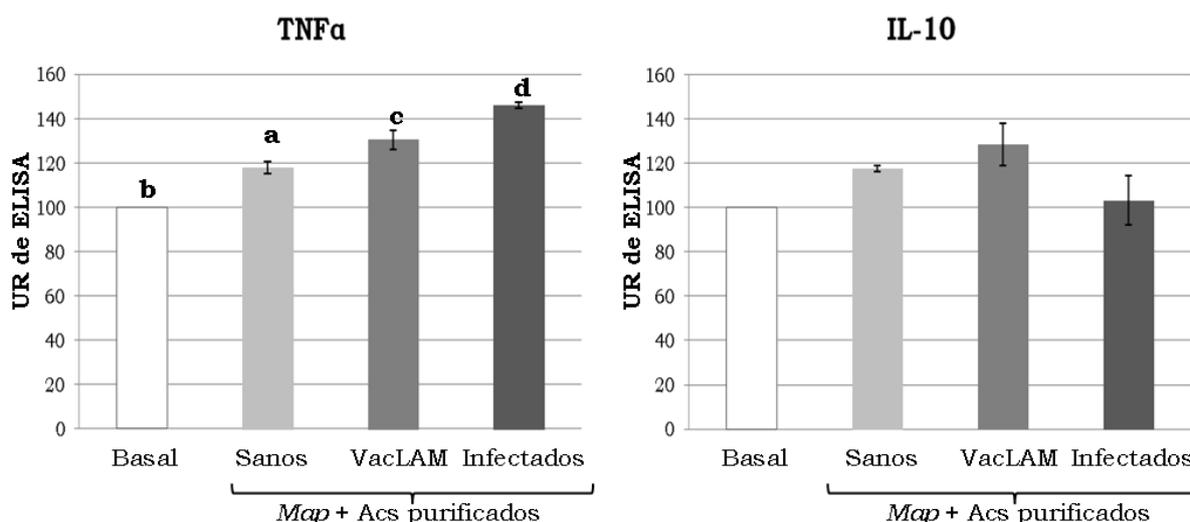


Figura 28. Niveles de citoquinas detectados en sobrenadantes de Bomac infectadas con *Map* preincubada con anticuerpos purificados. Se muestran los resultados de dos ensayos independientes. Las barras de “*Map* + Acs purificados” grafican el valor promedio obtenido para las soluciones de Acs de cada grupo (1 de bovino sano, 2 de inmunizados con LAM y 1 de infectado) y el desvío estándar de 2 ensayos independientes. Las Unidades Relativas (UR) de ELISA para cada citoquina se calcularon como el cociente entre la DO obtenida para cada muestra y la DO basal * 100. Diferentes letras sobre las barras indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos (ANOVA y test de Dunnett, $p < 0,05$).

Como análisis adicional, se evaluaron los niveles de ambas citoquinas en forma conjunta mediante la relación TNFα/IL-10 producida en cada caso (**Tabla VII**). Sólo al infectar con *Map* + Acs de bovinos infectados el balance de estas citoquinas resultó significativamente diferente.

Tabla VII. Relación TNFα/IL-10 encontrada en los sobrenadantes de Bomac infectadas con *Map* en presencia de Acs puros

Tratamiento	Relación TNFα/IL-10 (promedio ±DS)
Basal	0,8 ± 0,1 A
<i>Map</i>	1,1 ± 0,2 A
<i>Map</i> + Acs sanos	1,1 ± 0,1 A
<i>Map</i> + Acs VacLAM	1,0 ± 0,1 A
<i>Map</i> + Acs infectados	1,4 ± 0,2 B

Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos (ANOVA y test de Dunnett, $p < 0,05$).

Resumen de los principales hallazgos relacionados con el modelo *in vitro* de infección por *Map*

✓ Los bovinos inmunizados desarrollaron altos niveles de Acs anti-LAM y mostraron reactividad detectable sólo frente a este antígeno de *Map* por Western blot.

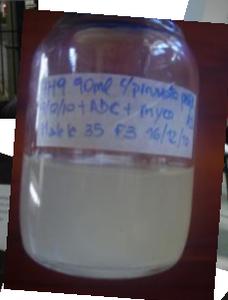
✓ Al evaluar los niveles de apoptosis inducidos por la infección *in vitro* con *Map* preincubada con diferentes sueros/Acs encontramos:

- niveles significativamente mayores de apoptosis al preincubar *Map* con sueros inmunes (de bovinos inmunizados con LAM o infectados con *Map*)
- una capacidad significativamente menor de *Map* de inhibir la apoptosis de los macrófagos infectados cuando ésta ingresaba opsonizada por sueros inmunes.

✓ Al evaluar los niveles de secreción de TNF α e IL-10 inducidos por la infección *in vitro* con *Map* preincubada con diferentes sueros/Acs detectamos:

- una gran variabilidad entre sueros de la misma categoría
- un aumento significativo de la producción de TNF α en presencia de Acs purificados a partir de sueros de bovinos inmunizados o infectados.

✓ La comparación de los resultados encontrados para las muestras pareadas de suero de los bovinos, tomadas pre- y post- inmunización, y para los sueros de complementados *versus* los Acs purificados demuestran que los efectos aquí descritos se relacionan con la presencia de Acs específicos en los sueros.



Capítulo 2

Desde finales de la década de 1980 se han desarrollado distintos modelos de infección experimental *in vivo* para el estudio de la paratuberculosis. Estos modelos constituyen una herramienta muy valiosa para investigar la patogenia de esta enfermedad, los mecanismos asociados a la invasión intestinal de *Map*, los sitios primarios de infección y la respuesta inmune del huésped. Se han descrito variantes en distintas especies animales: bovinos, ovinos, cérvidos, caprinos, conejos y roedores. Para una completa revisión sobre este tema, se pueden leer los trabajos de Hines y col (2007), Begg y Whittington (2008), y Arrazuria y col. (2016). Los modelos se pueden clasificar según sean de corto o largo plazo. La infección experimental convencional, que emplea la vía oral, suele inducir lesiones histopatológicas recién detectables hacia los 6 meses post-infección (Wu y col., 2007a), con manifestaciones clínicas infrecuentes. La necesidad de mantener animales grandes en condiciones de seguridad biológica, por períodos muy prolongados de tiempo (meses/años) limita la utilización de los modelos de largo plazo. En este escenario, el modelo descrito por Plattner y col. (2011) resulta una opción interesante, ya que mediante la inoculación directa en placas de Peyer ileales de la dosis infectante, logran acelerar la patogenia de la enfermedad, pudiendo detectar lesiones histopatológicas características en forma muy temprana. Ya a los 7 días post-infección encuentran agregados multifocales y coalescentes de macrófagos, células epitelioides y células gigantes multinucleadas en la submucosa intestinal, que resultan positivas a la tinción de Ziehl-Neelsen.

En contraparte, los **modelos a corto plazo** proponen, en general, vías y dosis infectantes alternativas para acelerar el curso de la infección. Éstos requieren el uso de animales de muy corta edad (menos de 1 mes) y resultan principalmente útiles para abordar la interacción temprana bacteria-huésped, permitiendo estudiar a través de la evaluación de la respuesta inmune local y regional y, en algunos casos también la sistémica, la inmunopatogenia de esta enfermedad. En la **Tabla VIII** se vuelca la información resumida asociada a estos modelos. Cabe aclarar que excepto los modelos de segmentos intestinales, generados *in vivo* o *ex vivo* (evertidos), los demás mantienen la limitante mencionada para la infección experimental a largo plazo, en cuanto al alojamiento de los animales infectados durante el tiempo que dura el ensayo. El modelo con el que se decidió trabajar en esta tesis es el de segmentos intestinales, que ha permitido aportar nuevos conocimientos, tanto en el campo de la paratuberculosis como en el de la investigación de otros patógenos

intestinales tales como *Clostridium perfringens* (Valgaeren y col., 2013) y *Salmonella* sp. (Coombes y col., 2005).

Tabla VIII. Modelos *in vivo* de infección por *Map* a corto plazo

Modelo	Ref.	Especie	Edad (sem)	Infección Cepa	Dosis total (UFC)	Duración del estudio	Principales Hallazgos
Infección oral	1	Bov.	3	<i>Map</i> ATCC	10^6 10^9 ó 10^{10}	42-45 d	La dosis más baja produjo infección detectable 3 sem p.i , mediante cultivos múltiples de muestras intestinales. En la HP, sólo se detectó una infiltración principalmente de eosinófilos.
Infección quirúrgica intestinal	2	Bov.	2-3	<i>Map</i> K10	10^8 - 10^9	4d-9 meses	<i>Map</i> atraviesa barrera mucosa y 1 h.p.i. puede aislarse de órganos distantes como el hígado y ln. Tendencia al predominio de citoquinas Th1 sobre Th2 a nivel intestinal. Este modelo permitió diferenciar el comportamiento de 2 biotipos distintos de <i>Map</i> : cepa mutante con invasividad reducida y una salvaje.
Infección quirúrgica en Placa de Peyer	3	Bov.	5	<i>Map</i> K10	10^3 y 10^5 (bajas, B)- 10^7 y 10^9 (altas, A)	90 días	<i>Map</i> coloniza ln. ileocecal a todas las dosis infectantes. La válvula ileocecal, sólo a dosis altas. Las lesiones fueron diferentes en B (hiperplasia linfocelular moderada de PP y abscesos en criptas. ZN: neg.) que en A (Granulomas. ZN: pos.). La RI en B fue menor a nivel sistémico (CMP) que a nivel local (LNIC). En A, se detectó RI local y sistémica a niveles comparables.
Canulación Ileal	4	Bov.	8-9	<i>Map</i> K10	10^8	10 meses	1 d.p.i se detectaron macrófagos en la mucosa ileal con <i>Map</i> en su interior, en tiempos posteriores, no. El ADN de <i>Map</i> es detectable en biopsias de íleon hasta 4 m.p.i. y en múltiples tejidos al momento de necropsia (8 m.p.i.). No se detectaron lesiones inflamatorias intestinales mediante examinación endoscópica. No se detectaron diferencias en las subpoblaciones de leucocitos aisladas de terneros infectados vs control. A los 3 m.p.i. se encontró una respuesta linfoproliferativa específica a CD4+
Segmentos intestinales permanentes	5	Bov.	2	<i>Map</i> K10	10^8	9 -11 meses	Mayor presencia de LT CD8+, LT $\gamma\delta$ +, macrófagos y células dendríticas e infiltración de eosinófilos en

Segmentos intestinales permanentes							segmentos infectados. También mayor producción específica de TNF α e IFN γ .
	6	Bov.	2	Map K10	10 ⁸	4 sem	Emplean la tecnología de <i>array</i> de péptidos para estudiar el “kinoma” (porción del genoma que codifica para proteínquinas). Encuentran una correlación entre el tipo de respuesta inmune predominante en el animal y el resultado del análisis kinómico.
	7	Bov.	0 (neonatos)	Map ATCC 19698	10 ⁹	20 hs	5 h.p.i. detectan BAAR en macrófagos subepiteliales. Si la infección se realiza en presencia de suero de bovino infectado, tiende a incrementar el ingreso de <i>Map</i> (mayor % de domos infectados y, sobretodo una tendencia al aumento del n° de BAAR recontados/sección). Los resultados encontrados sugieren que <i>Map</i> atraviesa la barrera intestinal en los domos, principalmente a través de cél. M y es rápidamente captada por macrófagos sub e intraepiteliales.
							1.h.p.i las bacterias se encuentran principalmente asociadas a cél. M y a los leucocitos alojados en el bolsillo de su cara basal.
8	Cap.	3	Map aislamiento caprino	2,365 mg seco	30 min y 1h	Hay invasión bacteriana y cambios en HP (migración de cél. mononucleares a la luz intestinal) ya a las 0,5hs. Describieron 3 fases diferentes en la respuesta tisular a la infección, al estudiar los ARN mensajeros expresados en intestino por <i>microarrays</i> : temprana (0,5 -1 h.p.i.) en la que se activan vías de endocitosis mediada por receptores y se producen cambios en la permeabilidad intestinal; intermedia (2-8 h.p.i.) en la que <i>Map</i> modula vías involucradas en la respuesta inflamatoria, la interacción citoquinas-receptores y otras vías de comunicación intercelular; y la fase tardía (12 h.p.i.), en la que se observa el inicio de una respuesta de inmunotolerancia a nivel de la expresión génica en los linfocitos T.	
9,10	Bov.	3-4	Map ATCC 19698	10 ⁹	0,5-12 hs		

<p>Segmentos intestinales evertidos (<i>ex vivo</i>)</p> <p>Infección subcutánea</p> <p>Infección quirúrgica en Placa de Peyer + subcutánea</p>	11	Ov.	6-8	<i>Map</i> aislamientos bov. y cap.+ cepa vacunal 316F	10 ⁹	1-24 hs	La invasión intestinal de <i>Map</i> ocurre a través de células M, en forma principal. No obstante, por ME fue posible detectar bacterias intactas dentro de enterocitos y aislar <i>Map</i> a partir de segmentos sin PP, por lo que comprobaron que la invasión ocurre en forma secundaria por esta vía. Las áreas de domos captan más bacterias que las áreas sin domos y la invasión es mayor a nivel del íleon que del yeyuno. Las cepas aisladas de materia fecal evaluadas tuvieron mayor capacidad invasiva que la cepa vacunal. Como cambio en la HP detectaron infiltración celular de mono y polimorfonucleares, en LP y vellosidades.
	12	Cap.	3-5	<i>Map</i> ATCC 19698	10 ⁷	1 h	<i>Map</i> marcada radiactivamente es detectada dentro del epitelio de los segmentos intestinales evertidos, en zonas de jejunio sin PP. Esto sugiere captación a través de enterocitos.
	13	Bov.	5-6	<i>Map</i> K10	10 ⁹	30 d	Los LTγδ parecen ser la primer subpoblación reclutada al sitio de infección.
	14	Bov.	6-7	<i>Map</i> K10	10 ⁷ (PP)+ 10 ⁵ (SC) Ó sólo 10 ⁵ (SC) en terneros vacunados	30 d	La evaluación de subpoblaciones reclutadas en subcutáneo en presencia de <i>Map</i> permitiría diferenciar animales vacunados de infectados. Los LTCD4+ y LTγδ WC1+ son las subpoblaciones reclutadas preferencialmente en la infección subcutánea de los terneros vacunados, mientras que los terneros infectados experimentalmente reclutan principalmente LTγδ WC1+.

Referencias:

1: Sweeney y col. (2006); **2:** Wu y col. (2007); **3:** Plattner y col. (2011); **4:** Allen y col. (2009); **5:** Charavaryamath y col. (2013); **6:** Määttänen y col. (2013); **7:** Momotani y col. (1988); **8:** Sigurdardottir y col. (2001); **9:** Khare y col. (2009); **10:** Khare y col. (2012); **11:** Ponnusamy y col. (2013); **12:** Sigurdardottir y col. (2005); **13:** Plattner y col. (2013); **14:** Plattner y col. (2014).

Abreviaciones empleadas

Bov.: bovina; **Cap.:** caprina; **CMP:** células mononucleares periféricas; **d.:** días; **HE:** tinción de Hematoxilina/Eosina; **h.:** horas; **HP:** histopatología; **m.:** meses; **LN:** linfonódulo; **LNIC:** linfonódulo ileocecal; **LP:** lámina propia; **ME:** microscopía electrónica; **MF:** materia fecal; **MO:** microscopía óptica; **Ov.:** ovina; **p.i:** post-infección; **PP:** placa de Peyer; **RI:** respuesta inmune; **sem:** semanas; **ZN:** tinción de Ziehl-Neelsen;

4. Capítulo 2

Materiales y Métodos

Para definir el diseño del modelo *in vivo* de infección se tuvieron en cuenta los datos de los ensayos de segmentos intestinales realizados para el estudio de la paratuberculosis, referidos en la introducción de este capítulo, y otras experiencias metodológicamente semejantes publicadas en rumiantes (Momotani y col., 1988; Sigurdardottir y col., 2001; Coombes y col., 2005; Khare y col., 2012; Valgaeren y col., 2013; Ponnusamy y col., 2013). Se decidió realizar los segmentos en el íleon, órgano blanco principal de la infección primaria por *Map*. Además, puesto que se ha postulado la infección diferencial en zonas asociadas o no a Placas de Peyer y que se sabe que la distribución de esta placa en terneros se extiende en forma continua en el íleon terminal (Reynolds y Morris, 1983), se delimitaron los segmentos desde la unión ileocecal hacia aboral, dejando el extremo proximal del órgano sin utilizar. El diseño experimental seleccionado se esquematiza en la **Figura 29**.

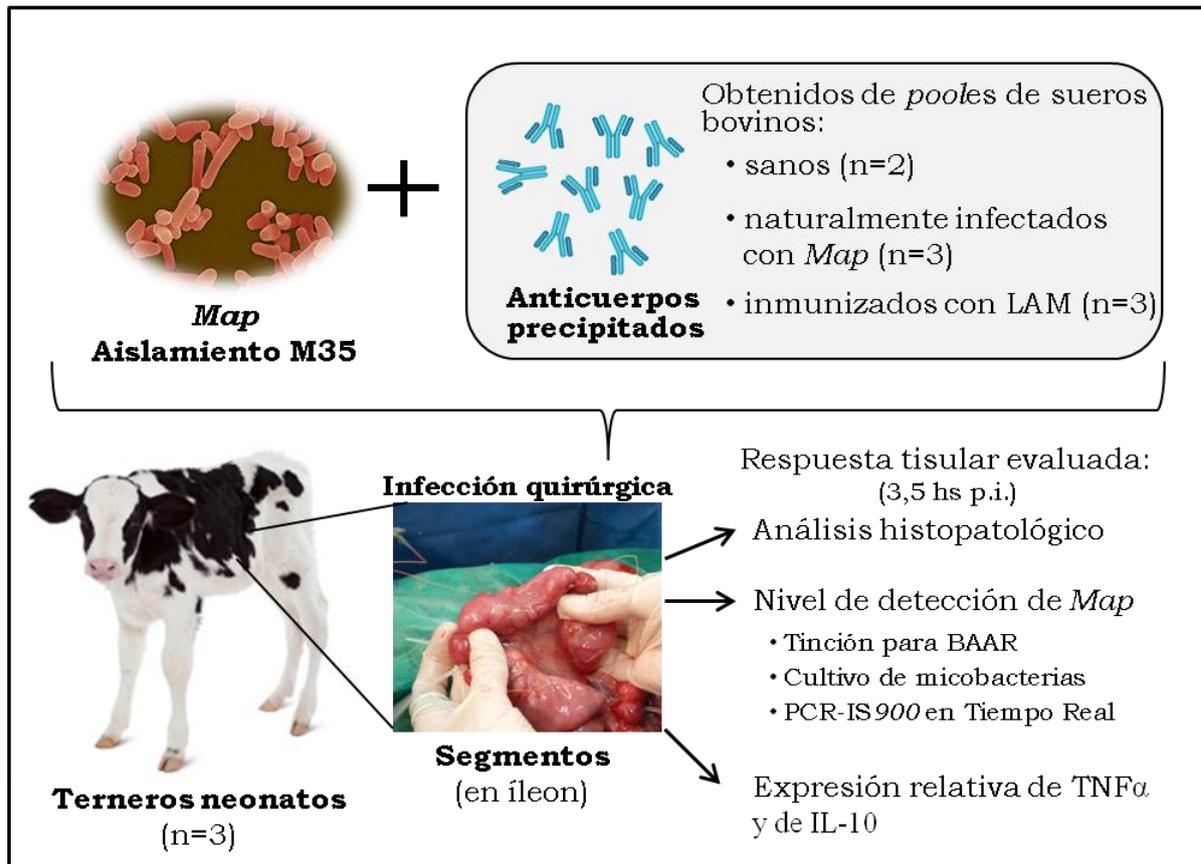


Figura 29. Modelo de infección *in vivo* por *Map*. p.i.: post-infección

II.2.1. Animales.

Se trabajó con 3 terneros neonatos de 3 semanas de edad, machos, mestizos de Holando Argentino, provenientes de un establecimiento libre de tuberculosis y sin

casos de paratuberculosis de Lobos, Pcia. de Bs. As. Los mismos se alojaron en la Facultad de Ciencias Veterinarias, en un box del Pabellón Schang, contiguo a la Cátedra de Inmunología. Allí fueron mantenidos durante una semana para permitir su aclimatación antes de realizar el experimento (**Figura 30.A**). Se alimentaron con 2 tomas de 2 L de sustituto lácteo/ternero/día, 0,5 kg de alimento balanceado iniciador/ternero/día, y agua *ad libitum*. Se tomaron muestras de sangre y de materia fecal para verificar su estado con respecto a la paratuberculosis a través del análisis por ELISA-PPA y cultivo microbiológico, respectivamente. Otra variable que consideramos relevante conocer fue el nivel de calostrado. Para ello, se realizó la prueba de glutaraldehído (Tennant y col., 1979) (Anexo Técnico AT.2.1.), y se estimó así la concentración de gammaglobulinas en el suero de los 3 animales (**Figura 30.B**).



Figura 30. A) Terneros empleados en la experiencia *in vivo* de infección, en su alojamiento dentro de los boxes de la Facultad. **B)** Variables iniciales evaluadas.

B.		Variables generales		Variables específicas		
Caravana N°	Sexo	Perímetro Torácico (cm)	Peso Estimado (Kg)	Nivel de calostrado ¹	ELISA-PPA (DO prom ± DS) ²	Cultivo de MF ³
#070	♂	82	45	Bueno	0,155 ± 0,02	Neg.
#071	♂	86	52	Bueno	0,148 ± 0,04	Neg.
#072	♂	80	42	Bueno	0,159 ± 0,02	Neg.

¹El nivel de calostrado se determinó mediante la prueba de glutaraldehído a partir de suero. Bueno: velocidad de coagulación < 10 min (igual que suero control, de bovino adulto sano). ²ELISA-PPA: El valor de corte considerado para clasificar al animal como sospechoso fue de 0,202 y como positivo, de 0,303. ³Cultivo de MF: se decontaminaron las muestras y se sembraron en medio HYEM según protocolo descripto en el Anexo Técnico (AT.2.2.). Neg.: sin crecimiento microbiano aparente luego de 12 sem a 37°C.

Todos los procedimientos realizados con los animales fueron oportunamente aprobados por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Experimentación (CICUAL) de nuestra Facultad (Protocolo N° 2013/37).

II.2.2. Obtención del inóculo bacteriano para el desafío.

Se eligió el aislamiento local de *Map* Malele 35 utilizado en algunos ensayos de infección *in vitro* en esta tesis, por contar con antecedentes de dos ensayos anteriores de infección experimental realizados por nuestro grupo, en los que demostró capacidad patogénica en bovinos (Jolly y col., 2013; Colavecchia y col., 2016). Además, este aislamiento fue genotipificado en nuestro laboratorio por la técnica de MIRU-VNTR (Thibault y col., 2007) y clasificado como INMV 1 (“*Mac INMV database*”, INRA, Nouzilly, Francia). Este genotipo fue descrito como el predominante en los rodeos argentinos (Gioffré y col., 2015). Se cultivaron grandes volúmenes en caldo 7H9 suplementado según lo detallado previamente (ver sección I.2.2) y adicionado con piruvato de sodio (Sigma Cat N° P2256) a razón de 4,1 g/L, hasta alcanzar la fase exponencial de crecimiento (**Figura 31**).

Teniendo en cuenta antecedentes bibliográficos, se fijó una dosis de 140 mg de *Map* (peso húmedo) como inóculo total por segmento, con un contenido estimado de aproximadamente 1×10^9 UFC de *Map* totales (Hines y col., 2007). Además, los inóculos bacterianos de cada cirugía se titularon en medio de cultivo sólido, a los fines de conocer *a posteriori* la dosis bacteriana real empleada (UFC/segmento).



Figura 31. Foto ilustrativa de los frascos de cultivo de *Map* crecidos para obtener las cantidades necesarias de masa bacteriana para la infección.

II.2.3. Anticuerpos.

Se emplearon las muestras de los sueros bovinos utilizados previamente para los ensayos *in vitro*. Considerando que la presencia de otros componentes biológicamente activos en el suero completo podría generar variaciones entre los tratamientos no explicables por la presencia de Acs, se decidió emplear el método de precipitación salina para concentrar Acs a partir de las muestras de suero. Para esto, se realizó un *pool* de suero de cada categoría: sanos, infectados y inmunizados con LAM, y se procedió a realizar una precipitación salina de los Acs con sulfato de amonio, tal como describimos previamente (Jolly, 2011). Las soluciones de Acs resultantes fueron evaluadas por electroforesis y método colorimétrico de Bradford para la cuantificación proteica, con el fin de estandarizar la cantidad de gammaglobulinas a utilizar (**Figura 32**). Luego, se esterilizaron por filtración y se emplearon a una concentración final de 1 mg/mL de gammaglobulinas en los inóculos. Antes de llevar a cabo la infección quirúrgica, se permitió la interacción de Map con las soluciones de Acs durante 1 h a 37°C, en agitación.

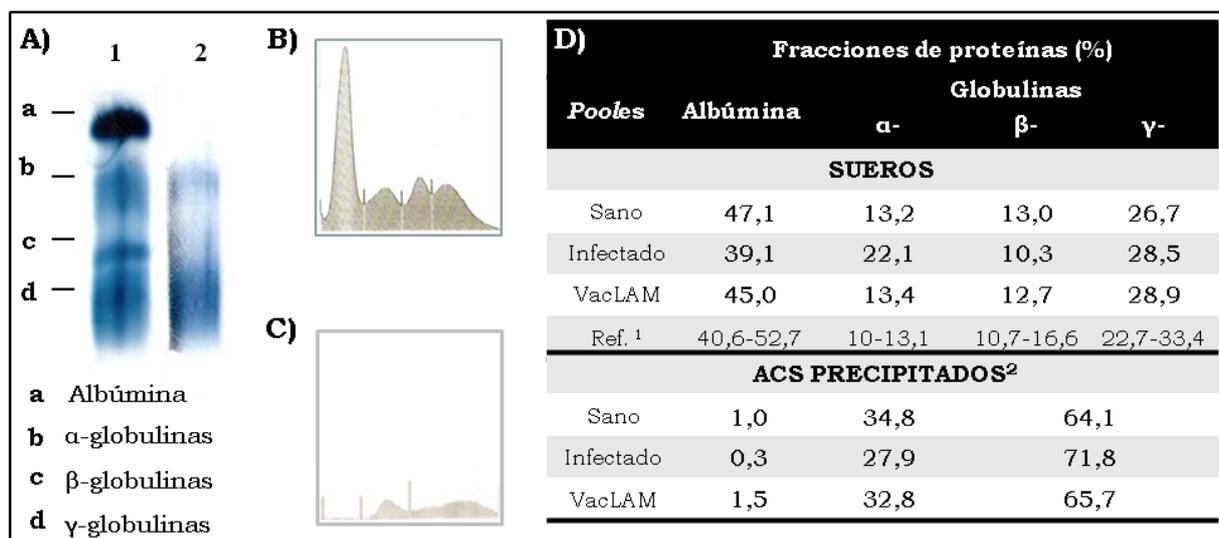


Figura 32. Composición de los *pools* de sueros y Acs precipitados obtenidos. A) Electroforesis sobre acetato de celulosa teñido con colorante Amido Schwartz. Las muestras corridas fueron: **1-** *pool* de sueros bovinos, **2-** Acs precipitados a partir de ese *pool*. **B)** y **C)** Proteinogramas obtenidos a partir de la lectura de la corrida electroforética de *pools* de sueros y fracción obtenida por precipitación salina (concentrado de Acs), respectivamente. Las figuras son representativas de los resultados obtenidos para los 3 *pools* de sueros procesados. **D)** Tabla con los valores relativos de cada fracción proteica (albúmina, α-, β-, γ- globulinas) en los *pools* de sueros y luego de la precipitación de los mismos. ¹Valores relativos de referencia para la especie bovina, según Kaneko (1997); ² Para los *pools* de Acs precipitados se consideraron las fracciones: albúmina, α-, y β+γ-globulinas, debido a los patrones de corrida electroforética obtenidos.

Tal como puede apreciarse en esta figura, mediante la precipitación salina se logró obtener fracciones concentradas en Acs a partir de los *pooles* de sueros, con la presencia de β/γ - globulinas en un rango aproximado de 64 a 72 %.

II.2.4. Modelo de infección de segmentos intestinales.

Para la realización de este experimento se conformó un equipo de trabajo con colegas veterinarios tanto de la cátedra de Inmunología como del área de Clínica Médica y Quirúrgica en Rumiantes y Cerdos de la Facultad. Este equipo estuvo constituido por:

- Vet. Javier Brynkier y Vet. Verónica Aranda, responsables de la anestesia
- Vet. Guadalupe Álvarez, Vet. Betiana Gutiérrez y Alumna María Laura Fortuny, encargadas de la cirugía
- Vet. Ana Jolly, Vet. Giselle Ingratta, Vet. Ana Stempler y alumna Laura Galotta, responsables de la infección y del muestreo.

Se trabajó en el quirófano de grandes animales del Hospital Escuela de nuestra Facultad, realizando una cirugía/día, con el animal en ayuno de 12 hs de sólidos y 6 hs de líquidos (**Figura 33**).

Se administró xylacina (0,1 mg/kg IM) como premedicación; luego se procedió a la inducción con propofol (1 mg/kg EV) y a la intubación. El mantenimiento anestésico se realizó con isofluorano al 2 % (vía inhalatoria) y goteo EV de ketamina (10 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$) y remifentanilo (0,02 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$). Cabe destacar que todas las drogas e insumos empleados en las cirugías fueron donados por el Hospital Escuela de nuestra Facultad.



Figura 33. Equipo de trabajo realizando las cirugías en el quirófano de grandes animales del Hospital Escuela de nuestra Facultad.

Durante toda la intervención se monitorearon los siguientes parámetros: presión arterial, temperatura, saturación de oxígeno, frecuencias respiratoria y cardíaca, coloración y tiempo de llenado capilar de mucosas y reflejos. Se realizó un abordaje lateral derecho del abdomen, se expuso el intestino y se identificaron el ciego, la unión íleocecal y los diferentes patrones de vascularización de íleon y yeyuno, como referencias anatómicas del inicio y finalización del íleon. Se utilizó una cinta métrica estéril para registrar la longitud total del íleon y se generaron segmentos de aproximadamente 8 cm, utilizando ligaduras quirúrgicas, a lo largo de toda su extensión (**Figura 34**). Las longitudes totales aproximadas registradas fueron de 97 cm (#070), 100 cm (#071) y 86 cm (#072).

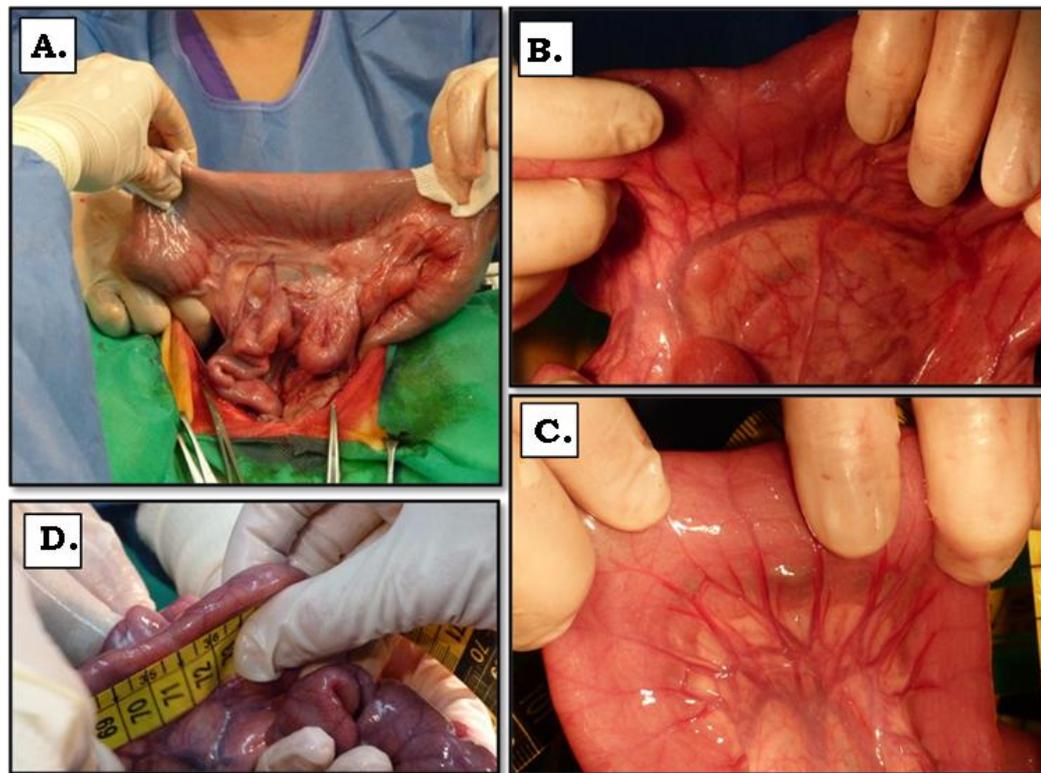


Figura 34. Determinación de segmentos intestinales en el íleon. Identificación de referencias anatómicas: **A)** Ciego e íleon terminal unidos por el pliegue ileocecal; **B)** Íleon, patrón de vascularización paralelo al borde mesentérico; **C)** Yeyuno, patrón de vascularización en arcos; **D)** Medición de longitud total del íleon.

Para la infección se procedió a la inyección con aguja fina (25G) del inóculo bacteriano, en el extremo aboral de cada segmento, por su borde antimesentérico (**Figura 35**). En cada cirugía se delimitó un segmento para cada tratamiento y los tratamientos considerados, que se describen en la **Tabla IX** fueron los mismos para los 3 animales. El orden en el cual se dispusieron los segmentos a lo largo del íleon se seleccionó al azar y fue diferente en cada uno de los 3 terneros.

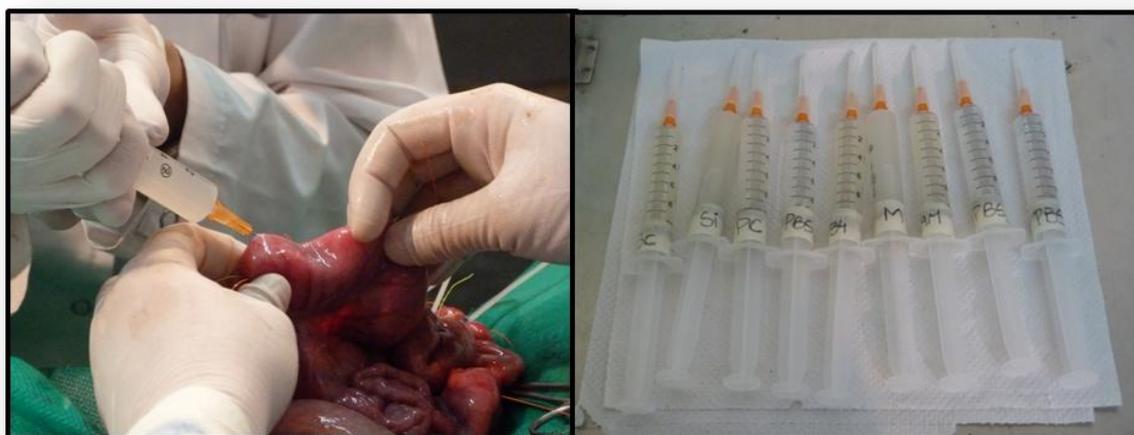


Figura 35. Inoculación de segmentos intestinales en el íleon.

Tabla IX. Detalle de los inóculos empleados para los distintos segmentos.

Tratamiento	Código de segmento	Volumen del Inóculo (mL)	Dosis de <i>Map</i> * (mg)	Concentración de Acs (mg/mL)
Control (PBS)	PBS	8	---	---
<i>Map</i>	M_PBS	8	140	---
<i>Map</i> + Acs pool sano	M_AcS	8	140	1
<i>Map</i> + Acs pool infectado	M_AcI	8	140	1
<i>Map</i> + Acs pool vacLAM	M_AcL	8	140	1

*: peso húmedo

Una vez infectados todos los segmentos, se realizó el cierre provisorio del abdomen. Concluidas las 3,5 hs de infección, se procedió a la eutanasia del animal en plano anestésico con Euthanyle®. Inmediatamente después de verificada la muerte, se realizó la toma de muestras, empleando pinza y bisturí. Cada segmento se procesó con un set de muestreo independiente, a los fines de evitar contaminaciones cruzadas entre muestras. Asimismo, todos los recipientes y materiales necesarios para muestrear se rotularon previamente, con el objetivo de reducir al mínimo los tiempos y lograr una mejor conservación de las muestras. Primero se colocó el segmento sobre una superficie de telgopor, y se realizó una abertura para aspirar su contenido. Luego, se expuso toda la superficie mucosa, fijando el tejido al telgopor

con alfileres y se procedió a su lavado con solución fisiológica estéril antes de tomar las diferentes muestras (**Figura 36**).

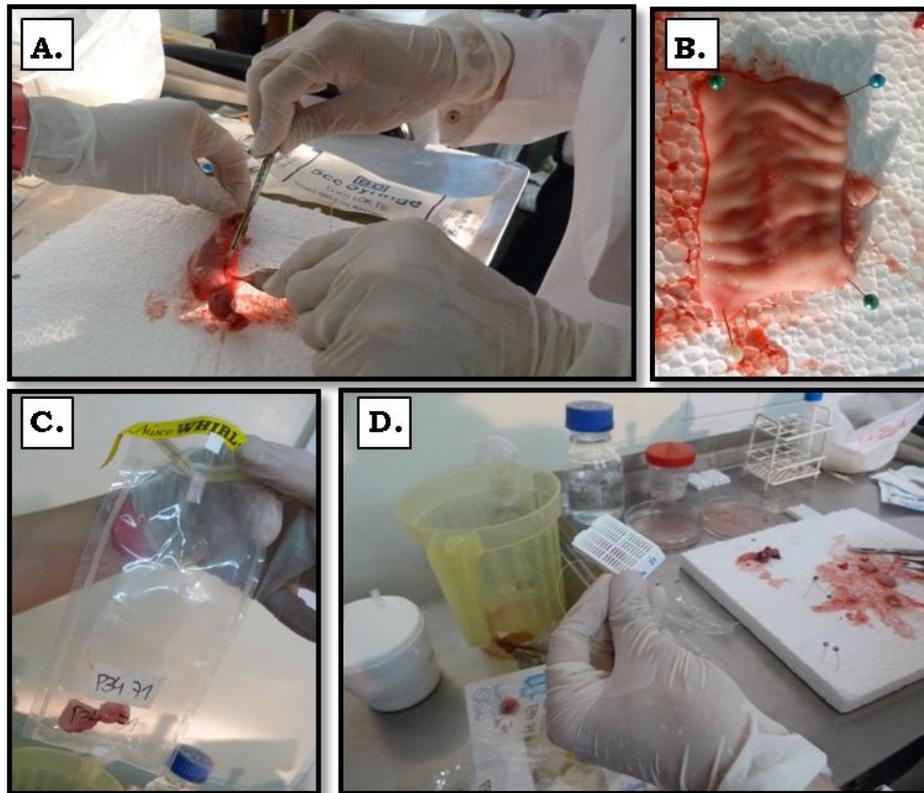


Figura 36. Toma de muestras luego de las 3,5 hs de infección quirúrgica: **A)** Apertura del segmentos por el borde mesentérico; **B)** Exposición de superficie mucosa para su lavado, antes de proceder al muestreo; **C)** Porciones de tejido conservadas para cultivo microbiológico y PCR; **D)** Preparación de muestras para conservar en formol hasta su procesamiento histopatológico.

Se realizaron cortes obteniendo fragmentos de 0,5 x 0,5 cm aproximadamente, que fueron acondicionados según su destino:

- Para **análisis histopatológico**. Se introdujo el trozo de muestra extendido dentro de un cassette, que fue inmediatamente sumergido en formol buffereado (formol al 10 % en PBS).
- Para **análisis de la presencia de *Map*** (cultivo, PCR-IS900 en Tiempo Real). Se conservaron los trozos de tejido en bolsas para muestreo estériles (Microclar, Argentina), que fueron mantenidas en refrigeración hasta concluir el muestreo del día. Luego se conservaron a -20°C hasta su procesamiento.
- Para análisis de **expresión de citoquinas tisulares** (por RT-PCR). Se conservaron 2 trozos de muestra, introduciendo cada uno en un tubo tipo

ependorf libre de ADN/ARNasas y sumergiéndolos inmediatamente en un recipiente de telgopor con nitrógeno líquido. Una vez congelados, se los transfirió a una conservadora con bloques de hielo seco hasta ser trasladados definitivamente al freezer de -80°C . Dada la inestabilidad del ARN, estas muestras fueron las que se tomaron y acondicionaron primero al procesar cada segmento.

Una vez concluida cada cirugía y la toma de muestras, se procedió a la desinfección del quirófano y el instrumental empleado con Despadac® (Laboratorios Calier SA, Barcelona, España), desinfectante tuberculicida recomendado por SENASA (Manual de Procedimientos de desinfección, 2004), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Cabe destacar que con la intención de reducir el uso de animales en investigación, se convocó en cada cirugía a otras cátedras de la Facultad que pudieran tener interés en tomar muestras de los terneros eutanasiados.

II.2.5. Procesamiento y evaluación de histopatología temprana.

Para este punto se trabajó en colaboración con el Dr. Daniel Lombardo y su equipo, miembros de la Cátedra de Histología de esta Facultad. Las muestras tomadas durante el experimento fueron remitidas en formol buffereado a su laboratorio para la inclusión en parafina, corte y montado de los preparados. Se empleó el método de coloración con Hematoxilina/Eosina convencional para la evaluación microscópica y la comparación de los hallazgos en los preparados obtenidos a partir de los diferentes segmentos. Se utilizó un microscopio Leica, modelo DMLS y se capturaron imágenes usando una cámara modelo DC180. Las mismas fueron procesadas con el analizador de imágenes *Leica IM50 software* (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania).

II.2.6. Obtención de ácidos nucleicos tisulares.

Tal como se mencionó en el apartado II.2.4, cabe aclarar que se procesó cada muestra con un *set* de muestreo independiente, a los fines de evitar contaminaciones cruzadas entre ellas. Además, se empleó en todos los casos insumos plásticos libres de ADN/ARNasas.

A. ADN. Los trozos de tejido conservados a -80°C se descongelaron para un procesamiento inicial. Se colocó cada muestra en una placa de Petri, y se procedió al

raspaje de la superficie mucosa previamente lavada, hasta dejar sólo la capa serosa intacta, que fue descartada. El tejido parcialmente procesado se distribuyó de a 100 mg en tubos tipo eppendorf y se congeló a -20°C .

Luego, se realizó la extracción de ADN con TRI Reagent (Sigma Aldrich), siguiendo el protocolo sugerido por el fabricante. Brevemente, cada muestra (100 mg) fue colocada en una bolsita plástica de alto espesor (50 μm , Microclar, Argentina), con 1 mL de Tri Reagent y se procedió a la trituración mecánico-manual, empleando un martillo pequeño y una espátula metálica sobre la bolsa. Se dejó reposar al menos durante 5 min y se agregaron 200 μL de cloroformo por c/mL de Tri Reagent. Se agitó vigorosamente por 15 seg en vórtex y se dejó reposar durante 2-15 min a T° ambiente. Se centrifugó a 12.000 x g (15 min a 4°C) y se aspiró cuidadosamente la interfase blanquecina, colocándola en tubos tipo eppendorf conteniendo 300 μL de etanol 100 %. Se centrifugó a 2.000 x g (5 min a 4°C) y se lavó los *pellets* 2 veces con 1 mL de citrato trisodio 0,1M en etanol 10 %, dejándolos reposar x 30 min, con agitación ocasional. Se resuspendió luego en 1,4 mL de etanol 75 %, se homogeneizó en vórtex y se dejó reposar sobre mesada por 20 min. Se centrifugó a 2.000 x g (5 min a 4°C) y se realizó un segundo lavado con etanol 75 %. Finalmente, se llevó el *pellet* de ADN a sequedad por evaporación y se lo disolvió en NaOH 8 mM en frío, pipeteando suavemente. Se emplearon entre 200 y 1000 μL de solución/muestra, según el tamaño de pellet obtenido. Se centrifugó a 12.000 x g (10 min a 4°C) y se conservó el sobrenadante, al cual se le agregaron 1,5-2 μL de EDTA 196 mM-Cloruro c/100 μL para neutralizar el pH (pH = 7-8). Todas las fracciones de ADN así obtenidas se congelaron a -20°C , conservando una alícuota a 4°C hasta la determinación de la concentración de ADN por espectrofotometría c/luz UV. Para esto se realizaron diluciones de las muestras en Buffer TE 1 X (Tris 1 mM, EDTA 0,1 mM, calidad biotecnológica, pH 7,5-8) y se empleó el equipo Gene Quant Pro (Amersham Biosciences, GE Healthcare Bio-Sciences Corp., NJ, USA) para medir las absorbancias de las muestras a 230, 260 y 280 nm. La concentración de ADN se estimó en todos los casos como $A_{260} \times \text{factor de dilución} \times 50$ (Sambrook y col., 1989).

Durante la extracción de ADN, se procesaron también 2 muestras de íleon provenientes de un ternero sano y de un bovino adulto con paratuberculosis clínica, confirmada por histopatología y cultivo de MF, a modo de controles.

B. ARN. Todas las soluciones empleadas durante la extracción de ARN y obtención del ADN_{copy} se elaboraron con agua destilada tratada con Dietil Pirocarbonato (DEPC, Sigma Aldrich), como inhibidor de nucleasas (100 μL de DEPC

c/100 mL, 12 hs a 37°C y luego autoclavado 15 min a 100°C). Las muestras se traspasaron del freezer de -80°C a un recipiente de telgopor con hielo seco. Dada la inestabilidad propia de esta biomolécula, se trabajó siguiendo la metodología de “criohomogeneización” empleada por von Ziegler y col. (2013) a los fines de reducir al mínimo su desnaturalización durante el proceso de extracción (**Figura 37**).

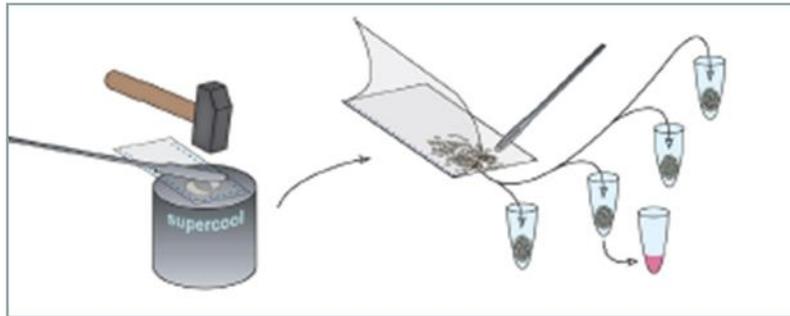


Figura 37. Método de criohomogeneización para extracción de ARN. Se muestran los materiales necesarios para el procedimiento: 1- espátula metálica grande; 2- pilón de hierro macizo; 3- bolsitas de alto espesor; 4- martillo pequeño; 5- tijera; 6- espátula de metal pequeña. Todos estos materiales deben estar previamente congelados a -80°C (Imágenes adaptadas de von Ziegler y col., 2013).

Luego de la trituración con martillo de cada muestra sobre el pilón, se tomó con espátula una escama de tejido disgregado, de una superficie de 0,5 x 0,5 cm (que previamente comprobamos que equivalía aproximadamente a un peso de entre 70 y 100 mg, para este tejido -ileon-), y se llevó a tubo tipo eppendorf con 1 mL del reactivo Tri Reagent. Luego, se siguió el protocolo sugerido por el fabricante. Brevemente, se homogeneizó en vórtex y se terminó de disgregar con jeringa, mediante múltiples pasajes a través de aguja 21G. Se agregaron 200 µL de cloroformo por c/mL de Tri Reagent. Se agitó vigorosamente (en forma manual) durante 15 seg y se dejó reposar sobre mesada durante 2-15 min. Se centrifugó a 12.000 x *g* (15 min a 4°C) y se aspiró cuidadosamente la fase acuosa superior, que contenía el ARN, que se colocó en tubos tipo eppendorf con 500 µL de alcohol isopropílico. Se dejó reposar sobre mesada durante 10-15 min y se centrifugó a

12.000 x *g* (10 min a 4°C). Se descartó el sobrenadante por aspiración con jeringa acoplada a aguja fina y se lavó el *pellet* c/1 mL de 75 % etanol en agua-DEPC, homogeneizando en vórtex. Se centrifugó a 12.000 x *g* (10 min a 4°C) y se llevó el *pellet* a sequedad por evaporación. Luego, se resuspendió en 40 µL de agua ultrapura, libre de ADN/ARNasas (GIBCO, Invitrogen™, ThermoFisher Scientific Inc., MA, USA) pre-atemperada a 55-60°C. Se incubó 10 min en baño maría (55-60°C) para permitir total disolución del *pellet*. Se tomó una alícuota del ARN así extraído para medir concentración por espectrofotometría con luz UV siguiendo la metodología descrita para el ADN en el apartado anterior, pero en este caso, la concentración de ARN se estimó como A_{260} x factor de dilución x 40. (Sambrook y col., 1989); y el resto se sometió a un tratamiento con ADNasa (kit DNAase I Sigma Aldrich, N° Catálogo AMPD1) según las recomendaciones de uso del fabricante, a los fines de eliminar posible contaminación con ADN genómico que pudiera interferir con los resultados de la amplificación posterior de citoquinas. Las muestras de ARN digeridas se conservaron a -80°C. Para la evaluación de la calidad del ARN obtenido, se armaron geles de agarosa al 1,2 % en buffer TAE 1X (Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM) con el agregado de 1,2 µL de Bromuro de etidio c/100 mL de gel. Se sembraron 5-10 µL del ARN tratado con la ADNasa/calle y se corrieron los geles, sumergidos en buffer TAE 1X, a 85 mV durante 1 h. Luego se visualizaron en un transiluminador. Cuando la integridad del ARN se mantiene, en el gel se deberían observar dos banda definidas, correspondientes a las subunidades de ARN ribosomal 18S y 28S, propias de las células eucariotas. Una vez verificada la calidad del ARN, se descongelaron nuevamente las muestras obtenidas y se procedió a realizar la reacción de retrotranscripción usando la enzima Superscript II Reverse Transcriptase (Invitrogen™, ThermoFisher Scientific Inc., MA, USA), siguiendo el protocolo sugerido por el fabricante. Se determinó la concentración de ADN_{copy} resultante para cada muestra, calculada como la A_{260} x factor de dilución x 33 (Sambrook y col., 1989), se diluyeron 1/10 en agua destilada, se dividieron en alícuotas y se congelaron a -20°C hasta su evaluación por PCR en Tiempo Real.

II.2.7. Evaluación y cuantificación de *Map* en tejido.

A. Por tinción para microorganismos ácido-alcohol resistentes (BAAR) en cortes tisulares. Se empleó la técnica de Fite-Faraco para la identificación de BAAR. Esta tinción es semejante a la de Ziehl-Neelsen, pero presenta algunas modificaciones que disminuyen el riesgo de decoloración de las

micobacterias durante el procesamiento y la consecuente reducción de sensibilidad que esto ocasionaría (Marrakchi y col., 2014). Básicamente, se reemplaza el uso de xileno puro por una mezcla de 1 parte de aceite de oliva y 2 partes de xileno, para el desparafinado y el de HCl/alcohol como decolorante por una solución acuosa de H₂SO₄ al 10 % (Faraco, 1938; Fite y col., 1947).

B. Por cultivo microbiológico. Procesamiento y cultivo de muestras tisulares. Dada la alta carga bacteriana empleada para la inoculación de los segmentos, se trabajó primero con una muestra proveniente de uno de los segmentos inoculados sólo con *Map* para establecer si las condiciones del protocolo convencional de cultivo de tejido eran adecuadas para el recuento de colonias en este caso. Se descongeló la muestra y se pesó 1g, que es la cantidad usualmente empleada para el aislamiento primario de *Map* a partir de una muestra diagnóstica de tejido. Se trabajó en esterilidad, con instrumental quirúrgico, troceando la muestra sobre placa de Petri. Luego se la transfirió a una bolsa de plástico de 50 µm de espesor y se agregaron 2 mL de agua destilada estéril, sellándola. Se procedió a la disrupción mecánica manual del tejido, hasta obtener una suspensión turbia. Se agregaron 8 mL más de agua estéril, se traspasó el volumen total de homogenato a un tubo cónico de 50 mL y se agregaron 10 mL de cloruro de hexadecilpiridinio (HPC) al 1,5% (Sigma Aldrich). Se homogenizó por 30 min, en agitador y se decontaminó durante 16 hs a T° ambiente. Luego, se centrifugó a 4.000 rpm (30 min a 10°C), y el sedimento se resuspendió en 500 µL de agua destilada estéril. Se sembraron 4 tubos en pico de flauta de medio HYEM/muestra: 2 sin suplementos, y otros 2 suplementados con antimicrobianos (Ampicilina, Cloranfenicol y Anfotericina B, Anexo Técnico AT.2.2.). Los tubos se incubaron en estufa a 37°C, controlando la aparición de colonias 2 veces/mes durante 2 meses.

Como resultado del cultivo de esta muestra, se obtuvo un número incontable de colonias. Por lo tanto, se decidió adaptar el protocolo convencional para las muestras de este ensayo, partiendo de 100 mg de tejido, por considerar éste como el tamaño mínimo a pesar con precisión. Las proporciones de cantidad de tejido en relación al volumen y % de HPC se mantuvieron tal cual lo empleado en el protocolo original. Sin embargo, para lograr una reducción aún mayor de la cantidad de mg de tejido finalmente inoculados/tubo, se realizó una dilución 1/50 del sedimento obtenido al centrifugar postratamiento con HPC. Se procesaron todas las muestras y se incubaron en estufa, controlando la aparición de colonias 2 veces/mes. A los 2

meses, se procedió a realizar el recuento de colonias y la estimación de UFC/segmento.

C. Por PCR en Tiempo Real para detección de IS900. Se trabajó con el equipo StepOne™ Real Time PCR System (Applied Biosystems, USA), adquirido en consorcio con otras cátedras de nuestra Facultad. Para detectar y cuantificar la presencia del inserto IS900 propio de *Map*, se emplearon los *primers* y la sonda propuestos por Slana y col., (2008) y el Master Mix Taqman® Universal MMix II (Applied Biosystems, ThermoFisher Scientific Inc., MA, USA), fijando las condiciones de termociclado recomendadas por este fabricante: un ciclo de desnaturalización inicial a 95°C por 10 min y luego 40 ciclos de 95°C por 15 seg y 60°C por 1 min. Se empleó una muestra de ADN de concentración conocida, extraída a partir de un cultivo puro de *Map* M35, para la construcción de una curva de concentraciones decrecientes, con el objetivo de definir las concentraciones de sonda y de *primers* más adecuadas para lograr una reacción eficiente (mínimo ciclo de superación del umbral de fluorescencia (Ct) y máximo rango de fluorescencia (ΔRn) para una muestra positiva, manteniendo valores indetectables para una muestra negativa) y el límite de detección de esta técnica bajo nuestras condiciones de trabajo. Se decidió considerar, en un primer momento, las siguientes combinaciones de concentraciones de sonda/*primers*: 50/500, 50/900, 250/500, 250/900, expresadas en nM. Se tuvo en cuenta la pendiente de la curva estándar construida con las concentraciones decrecientes de ADN de *Map*, la eficiencia de cada una de las reacciones y el ΔRn detectado en cada caso para decidir las condiciones óptimas para esta reacción. En la **Tabla X** se resumen los resultados obtenidos al evaluar las diferentes combinatorias de concentraciones de sonda y *primers*.

Tabla X. Resultados comparativos de las 4 combinatorias de condiciones evaluadas para la reacción de PCR en Tiempo Real.

Concentración de sonda/ <i>primers</i> (nM)	Pendiente de la curva estándar	Eficiencia (%)	ΔRn ($\times 10^3$)
50/500	-3,39	98,0	0 – 10
50/900	-3,84	80,6	0 – 10
250/500	-3,94	79,6	0 – 48
250/900	-3,91	80,5	0 – 60

En función de estos resultados, se decidió fijar la concentración de *primers* en 500 nM. Si bien la eficiencia de la reacción fue muy buena al emplear esta concentración de *primers* y 50 nM de sonda, se decidió evaluar otras concentraciones intermedias de sonda (100 y 150 nM), debido a los bajos rangos de fluorescencia (ΔR_n) detectados. Los resultados de esta nueva evaluación se observan en la **Tabla XI**.

Tabla XI. Resultados comparativos de las 2 combinatorias de condiciones evaluadas adicionalmente para la reacción de PCR en Tiempo Real.

Concentración de sonda/ <i>primers</i> (nM)	Pendiente de la curva estándar	Eficiencia (%)	ΔR_n ($\times 10^3$)
100/500	-3,46	94,4	0 – 22
150/500	-3,40	96,9	0 – 30

Puesto que al aumentar la concentración de sonda a 150 nM se mantuvo una elevada eficiencia mejorando los niveles de fluorescencia detectables, se decidió trabajar con esta concentración.

Una vez definidas las condiciones más adecuadas para la realización de la prueba, se estudió el rango dinámico de detección de *Map*, encontrando una relación proporcional inversa entre el valor de Ct y la cantidad de ADN de *Map* (Q_{ADN_Map}) cuando la misma en la muestra oscilaba aproximadamente entre 15 ng y 2 pg (**Figura 38**). El genoma completo de *Map* contiene 4.829.781 pares de bases (Li y col., 2005), lo que equivale aproximadamente a 5 fg, ya que 978 Megabases representan una masa de 1 pg de ADN (Dolezel y col., 2003). Por lo tanto, las cantidades de ADN mencionadas (15 ng y 2 pg) contendrían entre 3.000.000 y 400 equivalentes genómicos de *Map*. No obstante, la capacidad de detección de esta prueba se estableció en el orden de los fg de ADN/reacción, obteniendo valores de Ct promedio de 36 cuando la reacción de amplificación se inició con aproximadamente 7 fg de ADN de *Map*. Esto equivaldría a un límite de detección de 2 genomas de *Map*/reacción.

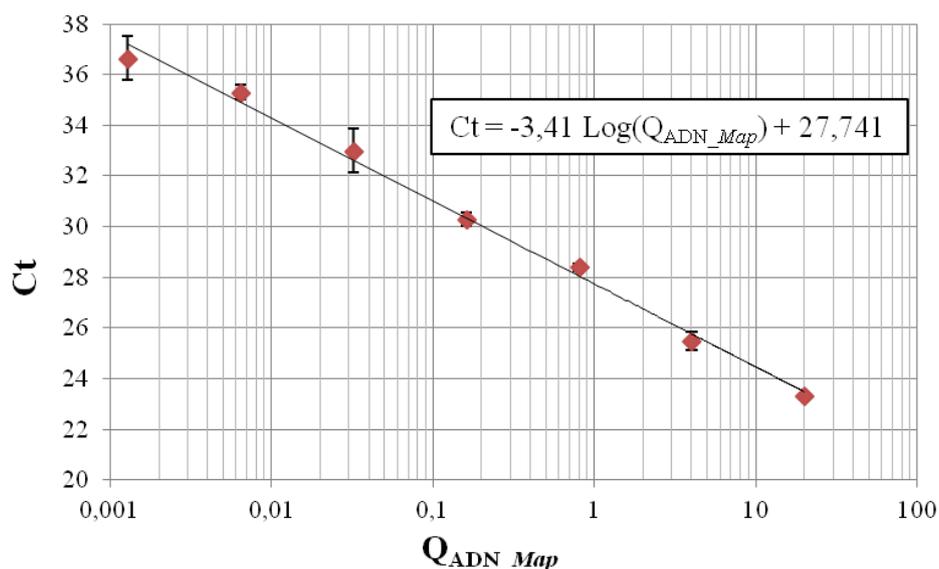


Figura 38. Curva estándar construida con los valores de Ct promedio obtenidos en 3 repeticiones independientes para distintas cantidades de ADN de *Map* (Q_{ADN_Map}). En el recuadro se muestra la ecuación correspondiente.

Por último, se procedió a evaluar las muestras obtenidas en este ensayo. Cada una se analizó por duplicado, en dos experimentos independientes. Teniendo en cuenta los resultados preliminares obtenidos al evaluar distintas cantidades de ADN extraídos de los tejidos control positivo y negativo (ver apartado II.2.6.A), se fijó una cantidad de 20 ng de ADN/reacción, y en función de la concentración de ADN obtenida para cada extracción, se calculó el volumen de muestra a emplear/hoyo. Luego, según el rendimiento de cada extracción (concentración de ADN extraído y volumen total obtenido) se estimó los equivalentes genómicos amplificados por g de tejido en cada caso.

II.2.8. Evaluación de la producción temprana de citoquinas tisulares. Se trabajó con el mix SYBR® Select Master Mix (Life Technologies™, ThermoFisher Scientific Inc., MA, USA) y los *primers* publicados por Abendaño y col. (2013b) para la amplificación de TNF α , IL-10, y β -actina (gen endógeno normalizador). Las condiciones de termociclado fueron: 50°C por 2 min, 95°C por 10 min y luego 40 ciclos de 95°C por 15 seg y 60°C por 1 min. Se evaluaron dos concentraciones de *primers* diferentes (200 y 300 nM) en busca de obtener sistemas de amplificación con eficiencias comparables. Estas concentraciones fueron seleccionadas en función de resultados previos obtenidos en nuestro laboratorio al emplear esta metodología de detección de TNF α , IL-10 y β -actina en macrófagos

bovinos *in vitro*. Se construyeron curvas estándar empleando diluciones seriadas de ADN*copy* en base 5, partiendo de una cantidad de 20 ng de ADN tisular en la primera dilución. Para estas pruebas preliminares, se seleccionó al azar una de las muestras de ADN*copy* obtenida del procesamiento de los segmentos infectados con *Map*. Finalmente, se fijó una concentración de 200 nM de cada primer, para TNF α y β -actina, y de 300 nM de cada *primer* en el caso de IL-10, debido a que las eficiencias de amplificación con estas condiciones resultaron comparables en los 3 casos (Figura 39).

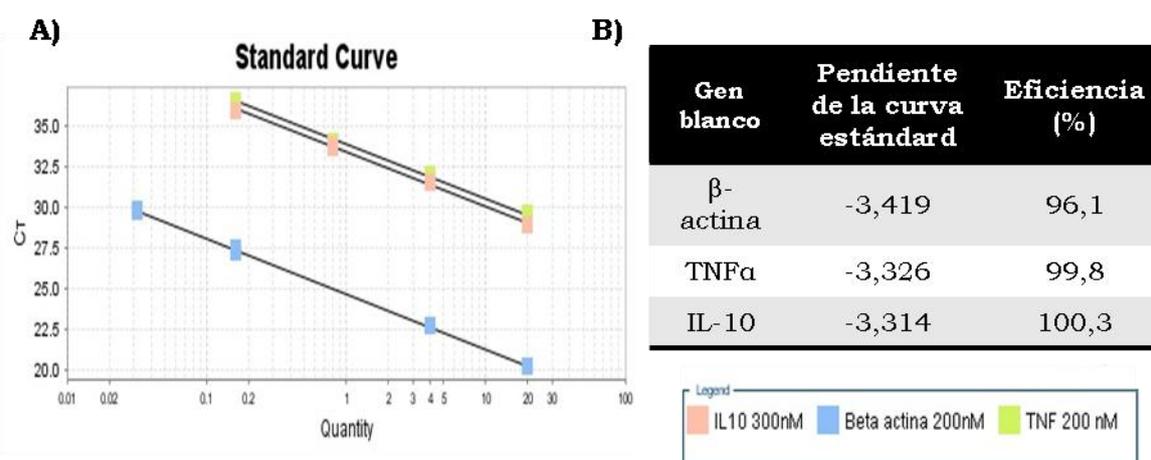


Figura 39. Eficiencias de amplificación de los 3 genes blanco bajo las condiciones de reacción seleccionadas. A) Curvas estándar para β -actina, TNF α e IL-10 obtenidas al partir de cantidades decrecientes de ADN*copy* (entre 20 y 0,032 ng). **B)** Se muestran las características de las 3 curvas de amplificación graficadas.

Seleccionadas las condiciones de amplificación, se evaluaron las muestras de ADN*copy* provenientes de los segmentos intestinales de los 3 animales, empleando 1 ng de ADN/reacción en todos los casos. Estos resultados preliminares nos permitieron realizar la cuantificación relativa (RQ) de la expresión de los 2 genes de interés (TNF α e IL-10) comparándolos con la expresión del gen normalizador, mediante el método $\Delta\Delta Ct$ (Livak y Schmittgen, 2001). A partir de los resultados obtenidos en cada experimento, se calculó el RQ con la siguiente fórmula:

$$RQ = 2^{-\Delta(\Delta Ct)}$$

Dónde: ΔCt representa el Ct (TNF α o IL-10) – Ct (β -actina) y $\Delta(\Delta Ct)$ representa el ΔCt obtenido para cada segmento infectado con *Map* – el ΔCt obtenido para el segmento control (PBS) en el mismo animal.

II.2.9. Análisis estadístico.

El diseño realizado en este modelo *in vivo* se consideró como completamente aleatorizado en bloques. A los fines de reducir el impacto de las variaciones individuales sobre el análisis de la respuesta a la infección, cada ternero se consideró como un bloque. Las determinaciones de las distintas variables a estudiar se realizaron por duplicado, en repeticiones independientes de las diferentes técnicas. Para el análisis de las variables “UFC de *Map/g* de tejido” y “Equivalentes Genómicos de *Map/g* de tejido”, se constató los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas, por lo que se trabajó con la prueba de ANOVA para modelos completamente aleatorizados en bloques (dbca). Como análisis POSTANOVA, se aplicó el test de Dunnett, considerando la infección con *Map* preincubada con Acs de bovinos sanos como tratamiento control. A estos fines se empleó el software Statistix® 8.0. (Analytical Software, USA). Para la evaluación de citoquinas, se empleó el test de Friedman (ANOVA no paramétrico para dbca) ya que no se cumplieron los supuestos de homogeneidad de varianzas ni de normalidad en estas variables estudiadas. En este caso se utilizó el software Infostat®, versión 2014 (Universidad Nacional de Córdoba, Argentina)

4. Capítulo 2
Resultados

Las cirugías se llevaron a cabo en forma exitosa. Se realizó una intervención/día, cumplimentándose el experimento en 1 semana. Luego de 12 semanas de incubación, se pudo determinar las dosis de bacterias viables efectivamente empleadas para cada infección, al recontar las colonias crecidas en los tubos sembrados con diluciones seriadas de los inóculos (**Tabla XII**).

Tabla XII. Peso húmedo y títulos de *Map* de los inóculos empleados en cada cirugía

Características del inóculo	#070	#071	#072
Peso Húmedo (mg/segmento)	140*	140*	140*
Título bacteriano (UFC/segmento)	1,7 x 10 ⁹	1,9 x 10 ⁹	3,9 x 10 ⁹

*según estimaciones referidas en la bibliografía (Hines y col., 2007), correspondería a una cantidad de *Map* aproximada de 1 x 10⁹ UFC/segmento. El peso de cada segmento se estimó en 25 g.

II.3.1. Análisis histológico de los cortes de segmentos teñidos con Hematoxilina/Eosina.

En todos los cortes se pudo observar la integridad del epitelio, lo cual sugiere la conservación de la funcionalidad de la barrera mucosa en los segmentos intestinales generados. De todos modos, se detectaron algunos cambios en la arquitectura tisular subyacente. Por ejemplo, encontramos dilatación de los vasos linfáticos centrales en las vellosidades y de pequeños vasos sanguíneos de la mucosa; y separación de las placas de Peyer del tejido circundante en la submucosa (**Figura 40.A y .B**). Al examinar la capa serosa, encontramos zonas de edema e infiltración inflamatoria, con componentes mono y polimorfonucleares (**Figura 40.C y .D**).

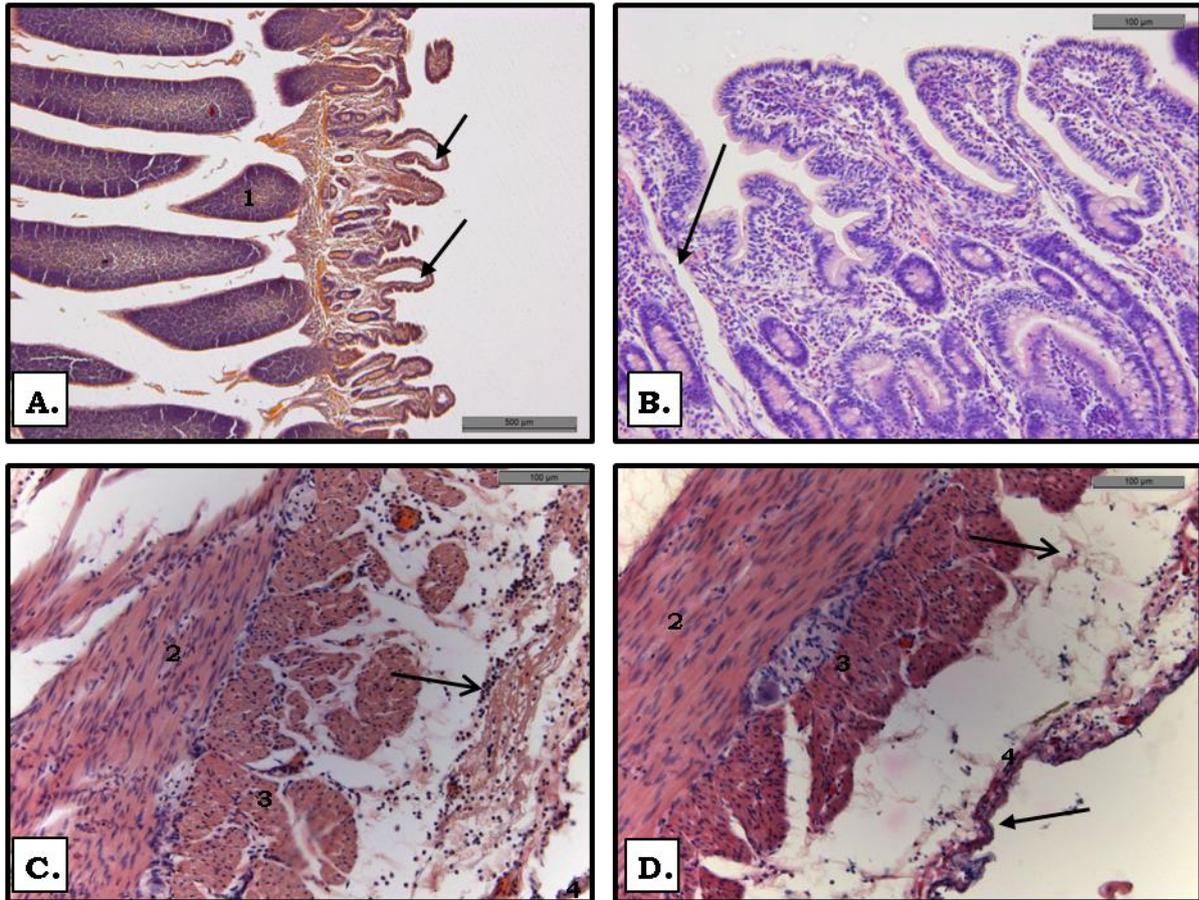


Figura 40. Aspecto microscópico de cortes histológicos de los segmentos intestinales; tinción Hematoxilina/Eosina. **A) y B)** Imágenes representativas del aspecto general de la mucosa y submucosa encontrada, a 50 y 200x respectivamente. Las flechas muestran la dilatación de los linfáticos. **C) y D)** Imágenes representativas del aspecto de la serosa en todos los casos, con engrosamiento (\leftarrow) y presencia de infiltrado inflamatorio y edema (\rightarrow), 200x. **1:** Placa de Peyer, **2:** capa muscular circular interna, **3:** capa muscular longitudinal externa, **4:** serosa.

Por otro lado, se encontraron diferencias al comparar los preparados provenientes de segmentos infectados con *Map* (pretratada o no con los distintos Acs) *versus* los segmentos control. En el primer caso, se observó la presencia de un infiltrado inflamatorio de predominio mononuclear en la lámina propia de la mucosa y en la submucosa, con presencia también de un componente polimorfonuclear (eosinófilos, y secundariamente neutrófilos) (**Figura 41.A y .B**). Estos cambios inflamatorios a nivel de la mucosa y submucosa fueron muy leves o no pudieron detectarse en los cortes de los segmentos inoculados con PBS (**Figura 41.C y .D**).

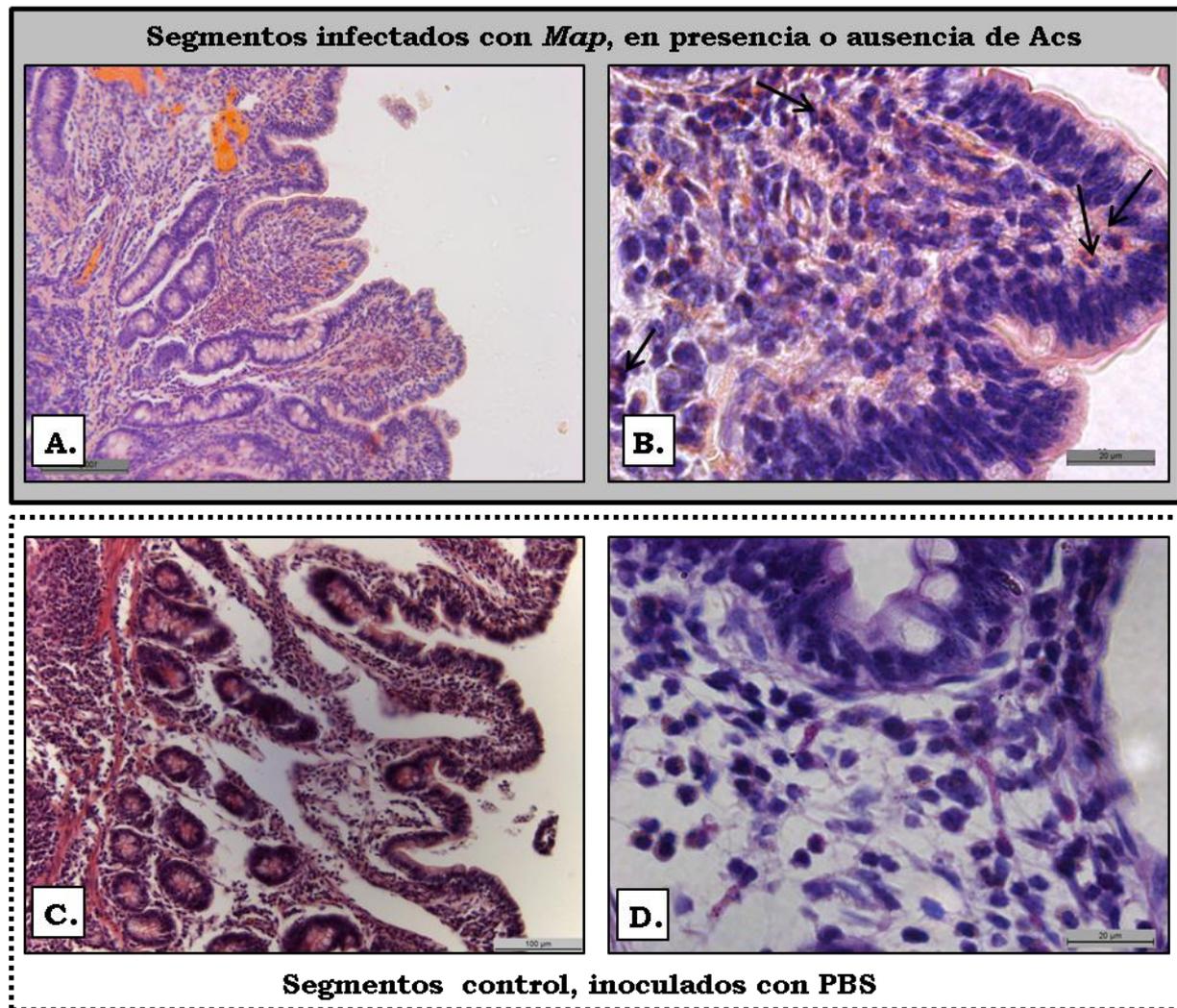


Figura 41. Análisis microscópico comparado de cortes histológicos de los segmentos infectados con *Map* (arriba) y PBS (abajo); tinción Hematoxilina/Eosina. A) y B) Infiltración inflamatoria en lámina propia de la mucosa y submucosa, a 200x y 1000x. Se observan células mononucleares principalmente y algunos eosinófilos (flechas). Estas imágenes son representativas del tipo y grado de alteración encontrado en todos los segmentos infectados con *Map*, independientemente de la presencia o ausencia de Acs. C) y D) Aspecto general de la mucosa ileal en los segmentos inoculados con PBS, a 200x y 1000X.

II.3.2. Obtención de ácidos nucleicos tisulares.

A. ADN. Las características de las muestras de ADN obtenidas luego de la extracción se detallan en la **Tabla XIII**. Se consideró la relación A_{260}/A_{280} como indicador de pureza de las muestras, empleándose solamente aquellas con relaciones iguales o superiores a 1,8.

Tabla XIII. Evaluación espectrofotométrica de las muestras de ADN obtenidas a partir de los segmentos intestinales

Caravana Nº	Segmento	A ₂₆₀	Dilución	[ADN] ng/μL
#070	M_PBS	0,234	1:2	23,4
	M_AcS	0,206	1:2	34,5
	M_AcI	0,131	1:2	32,0
	M_AcL	0,296	1:2	148,0
	PBS	0,114	1:2	57,0
#071	M_PBS	0,902	1:3	135,3
	M_AcS	0,240	1:3	36,0
	M_AcI	0,475	1:3	71,3
	M_AcL	0,621	1:3	93,2
	PBS	0,815	1:3	122,3
#072	M_PBS	0,142	1:2	14,2
	M_AcS	0,108	1:2	10,8
	M_AcI	0,262	1:2	26,2
	M_AcL	0,188	1:2	18,8
	PBS	0,121	1:2	12,1

La concentración de ADN se estimó en todos los casos como $A_{260} \times \text{factor de dilución} \times 50$ (factor de multiplicación para ADN doble cadena). Las alícuotas empleadas para esta determinación se diluyeron en buffer TE 1 X.

Estas muestras fueron conservadas a -20°C hasta su procesamiento para la identificación de *Map* a través del inserto IS900 por PCR en Tiempo Real.

B. ARN. Se logró obtener ARN de buena calidad a partir de todas las muestras procesadas (**Figura 42**). Se realizó la transcripción reversa y se analizó la concentración y calidad de las muestras de ADN_{copy} obtenidas. En la **Tabla XIV** se detallan estos resultados. Se consideró la relación A_{260}/A_{280} como indicador de pureza de las muestras y, al igual que en el caso del ADN, sólo se emplearon aquellas con relaciones iguales o superiores a 1,8. Estas muestras fueron conservadas a -20°C hasta su procesamiento para la evaluación de expresión relativa de citoquinas por PCR en Tiempo Real.

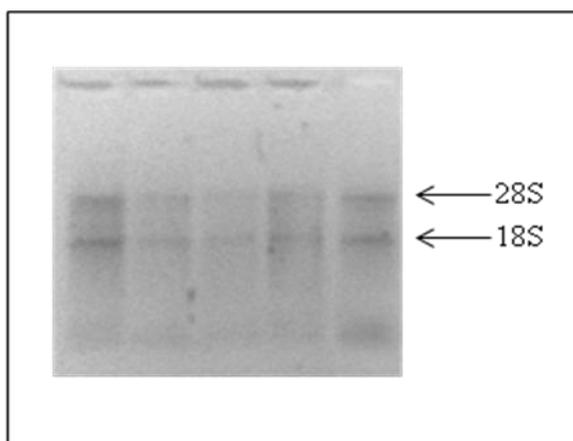


Figura 42. Evaluación de la calidad del ARN extraído de las muestras tisulares, corrida electroforética en gel de agarosa 1,2 %. La imagen es representativa de todas las muestras extraídas. Las flechas indican las bandas correspondientes al ARN ribosomal (subunidades 28 y 18S).

Tabla XIV. Evaluación espectrofotométrica de las muestras de ADN_{copy} obtenidas por retrotranscripción

Caravana N°	Segmento	A ₂₆₀	[ADN] ng/μL
#070	M_PBS	0,214	706,2
	M_AcS	0,176	580,8
	M_AcI	0,206	679,8
	M_AcL	0,184	607,2
	PBS	0,205	676,5
#071	M_PBS	0,237	782,1
	M_AcS	0,225	742,5
	M_AcI	0,247	815,1
	M_AcL	0,243	801,9
	PBS	0,198	653,4
#072	M_PBS	0,178	587,4
	M_AcS	0,206	679,8
	M_AcI	0,211	696,3
	M_AcL	0,212	699,6
	PBS	0,204	673,2

Todas las muestras se evaluaron diluidas 1/100; por lo tanto la concentración de ADN se estimó en todos los casos como A₂₆₀ x 100 x 33 (factor de multiplicación para ADN simple cadena).

III.3.3. Identificación de la presencia de *Map* en los segmentos intestinales

A. Tinción de Fite-Faraco para microorganismos ácido-alcohol resistentes. Se realizó la tinción de Fite-Faraco para la observación de microorganismos ácido-alcohol resistentes en cortes obtenidos a partir de todas las muestras. En los preparados de segmentos infectados con *Map* se evidenció la presencia de BAAR, asociados tanto a las células mononucleares de aspecto fagocítico de la mucosa y submucosa (**Figura 43.A y .B**), como a las células de las Placas de Peyer (**Figura 43.D y .F**). No fue posible detectar bacterias asociadas al epitelio intestinal en ninguno de los casos. No se evidenciaron diferencias considerables en cuanto al número y distribución de bacterias encontradas en los preparados pertenecientes a los diferentes pretratamientos de *Map* en los 3 animales. Todos los preparados obtenidos de los segmentos inoculados con PBS resultaron negativos a esta tinción (**Figura 43.C y .E**), indicando que el cierre de los segmentos fue efectivo, manteniéndose como compartimentos independientes.

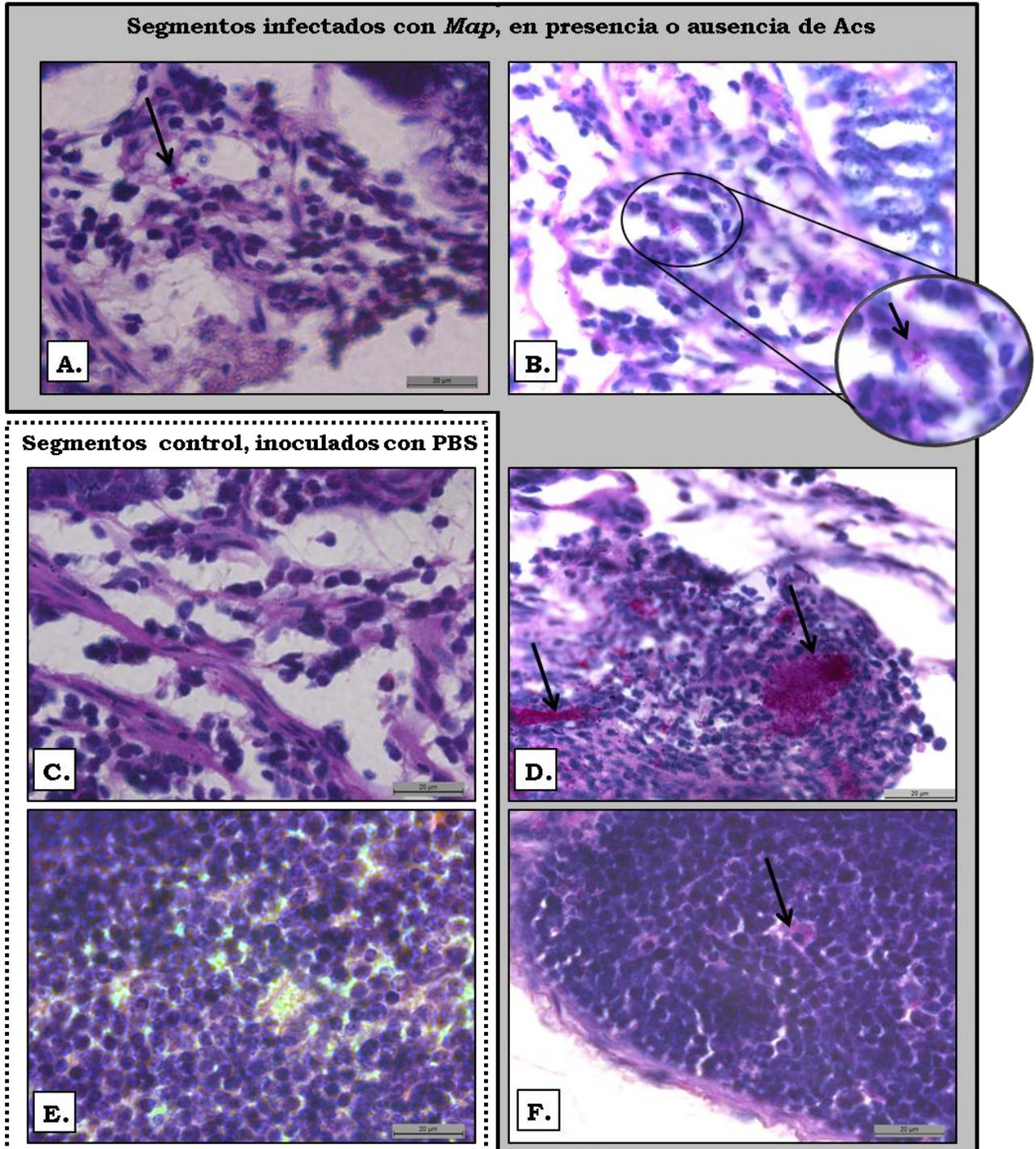


Figura 43. Tinción de Fite-Faraco para microorganismos ácido-alcohol resistentes A) y B) Se muestran imágenes representativas de la lámina propia de la mucosa de segmentos infectados con *Map* en donde se aprecia la presencia de bacterias positivas asociadas a las células del infiltrado inflamatorio. Las flechas señalan acúmulos bacterianos aparentemente ubicados en el compartimento intracelular de fagocitos. **C)** Imagen a igual aumento de la mucosa de un segmento control. **D) y F)** Se observan Placas de Peyer en un corte de un segmento infectado con *Map*. Las flechas señalan algunos de los acúmulos bacterianos identificados (en D) y una célula mononuclear con BAAR en su interior (en F). **E)** Imagen a igual aumento de la misma estructura pero en un segmento control. 1000x.

B. Cultivo microbiológico. A través de esta técnica se estudió la presencia de micobacterias viables en los distintos segmentos. Luego de 2 meses de incubación, se realizó el recuento de colonias de todos los tubos inoculados, con y sin antibióticos. Puesto que no se observaron contaminaciones en ningún caso, se decidió comparar los recuentos obtenidos en los tubos sin antimicrobianos. En la **Tabla XV** se muestran los resultados individuales encontrados para cada segmento infectado; y en la **Figura 44**, se evalúa la tendencia de niveles de recuperación de *Map* al evaluar el mismo segmento en los distintos animales. Los segmentos inoculados con PBS resultaron negativos en todos los casos.

Tabla XV. Recuento de UFC recuperadas a partir de los segmentos intestinales en cada animal

Segmento	#070		#071		#072	
	N°colonias/ tubo	UFC/g x 10 ⁴ *	N°colonias/ tubo	UFC/g x 10 ⁴ *	N°colonias/ tubo	UFC/g x 10 ⁴ *
M_PBS	111,0 ± 8,5	2,2 ± 0,2	239,5 ± 128,0	4,8 ± 2,6	103,5 ± 79,9	2,1 ± 1,6
M_AcS	251,0 ± 93,3	5,0 ± 1,9	235,5 ± 20,5	4,7 ± 0,4	316,0 ± 5,7	6,3 ± 0,1
M_AcI	6,8 ± 3,9	0,14 ± 0,1	36,5 ± 19,1	0,7 ± 0,4	15,0 ± 12,7	0,3 ± 0,2
M_AcL	126,0 ± 17,0	2,5 ± 0,3	190,0 ± 49,5	3,8 ± 1,0	74,0 ± 70,7	1,5 ± 1,4

* Las UFC/g de tejido se estimaron teniendo en cuenta los mg de tejido procesados y el volumen de homogenato inoculado/tubo de cultivo. Los segmentos inoculados con PBS resultaron negativos en todos los casos.

Segmento	UFC/g (prom ± DS) x 10 ⁴
M_PBS	3,0 ± 1,9 B
M_AcS	5,4 ± 1,1 A
M_AcI	0,4 ± 0,3 B
M_AcL	2,6 ± 1,3 B

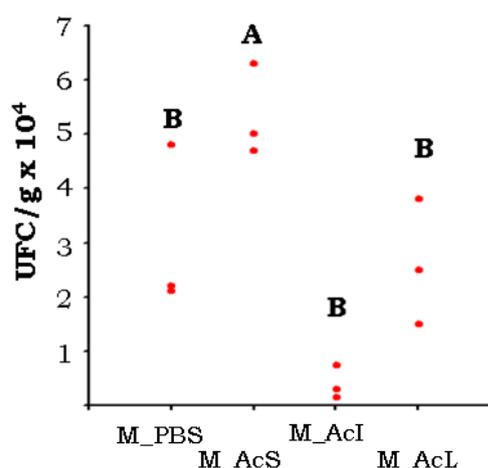


Figura 44. Tendencia grupal de recuperación bacteriana a partir de cada segmento. Se muestran los valores de UFC/g promedio ± DS recuperados para cada tratamiento. En el gráfico, cada punto representa el valor promedio de UFC/g recuperadas para ese segmento por cada animal. Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas entre grupos (ANOVA dbca y test de Dunnett con M_AcS como control, p < 0,05). Los segmentos inoculados con PBS resultaron negativos en todos los casos.

Estos resultados muestran que la infección con *Map* en presencia de Acs específicos (M_AcL y M_AcI) resultó en niveles significativamente menores de recuperación de colonias a partir del tejido que la infección en presencia de Acs irrelevantes (M_AcS). En la **Figura 45** puede verse una fotografía representativa de estos resultados.

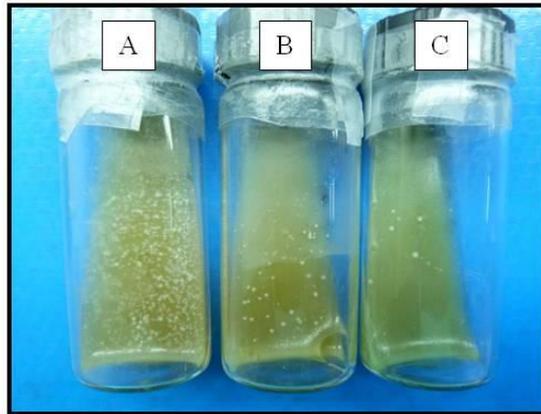


Figura 45. Foto ilustrativa de las diferencias en UFC recuperadas de los distintos segmentos: A- M_AcS; B- M_AcL; C- M_AcI. La imagen es representativa de los resultados obtenidos para los cultivos de los 3 animales.

C. PCR-IS900 en Tiempo Real. A los fines de complementar la información brindada por el cultivo, realizamos el PCR-IS900 en Tiempo Real y comparamos el nivel de presencia de ADN de *Map* detectado en los diferentes segmentos con la recuperación de bacterias viables. Los resultados obtenidos se muestran en la **Tabla XVI** de forma individual y en la **Tabla XVII** se resumen las tendencias grupales.

En el caso del ternero #072, no pudimos lograr amplificación de ADN de *Map* a partir de los segmentos M_AcL y M_AcI, a pesar de haber repetido el proceso de extracción de ADN a partir del tejido. Para todos los restantes segmentos infectados con *Map* (con o sin Acs) el nivel de amplificación de IS900 permitió estimar la presencia de entre 10^8 y 10^9 Equivalentes Genómicos de *Map/g* de tejido, sin encontrar diferencias significativas entre tratamientos. Por el contrario, todos los segmentos inoculados sólo con PBS resultaron negativos a esta prueba.

Tabla XVI. Datos y estimaciones realizadas sobre la cantidad de *Map* en tejido medida por PCR IS900 en Tiempo Real

Caravana N°	Segmento	Ct (prom ± DS)	ngADNMap/g (prom ± DS) x 10 ²	Eq.Gen.Map/g (prom ± DS) x 10 ⁸
#070	M_PBS	32,1 ± 0,0	60,4 ± 0,5	12,1 ± 0,1
	M_AcS	36,2 ± 0,2	14,5 ± 1,2	2,9 ± 0,2
	M_AcI	37,4 ± 0,4	6,3 ± 0,6	1,3 ± 0,1
	M_AcL	35,1 ± 0,1	8,1 ± 0,3	1,6 ± 0,0
	PBS	ND	NC	NC
#071	M_PBS	33,9 ± 0,4	60,4 ± 7,6	12,1 ± 1,5
	M_AcS	32,0 ± 2,7	95,9 ± 68,6	19,2 ± 13,7
	M_AcI	35,4 ± 0,1	54,7 ± 1,1	10,9 ± 0,2
	M_AcL	32,7 ± 0,4	156,0 ± 19,4	31,2 ± 3,9
	PBS	ND	NC	NC
#072	M_PBS	35,9 ± 0,4	9,9 ± 1,2	2,0 ± 0,2
	M_AcS	36,6 ± 0,4	5,7 ± 0,6	1,1 ± 0,1
	M_AcI	ND	NC	NC
	M_AcL	ND	NC	NC
	PBS	ND	NC	NC

ngADNMap/g de segmento: cantidad de ADN de *Map* (en ng) amplificada. Este valor se obtuvo empleando la ecuación de la recta Ct vs cantidad de ADN, corrigiendo el resultado por la cantidad de ADN total extraída en cada caso y multiplicando x 10 (ya que se procesaron 100 mg de tejido). **Eq.Gen. Map/g de segmento:** representa los Equivalentes Genómicos estimados teniendo en cuenta que 1 genoma completo de *Map* equivale a 5 fg de ADN. **ND:** no detectado; **NC:** no corresponde.

Tabla XVII. Tendencia grupal de recuperación de Equivalentes Genómicos de *Map* a partir de cada segmento.

Segmento	Eq. Gen. Map/g (prom ± DS) x 10 ⁸
M_PBS	8,7 ± 5,8 A
M_AcS	7,7 ± 9,9 A
M_AcI	6,1 ± 6,8 A
M_AcL	16,4 ± 20,9 A

Se muestran los valores de Equivalentes Genómicos de *Map/g* promedio ± DS recuperados para cada tratamiento, estimados por PCR IS900 en Tiempo Real. Las letras indican sin diferencias estadísticamente significativas entre grupos (ANOVA dbca, p < 0,05).

II.3.4. Evaluación de la producción temprana de citoquinas tisulares. A modo de aproximación al tipo de respuesta tisular predominante luego de la infección (pro- o anti-inflamatoria), analizamos el nivel de expresión de TNF α e IL-10 en los segmentos intestinales mediante RT-PCR en Tiempo Real. En la **Figura 46** se grafican los resultados obtenidos.

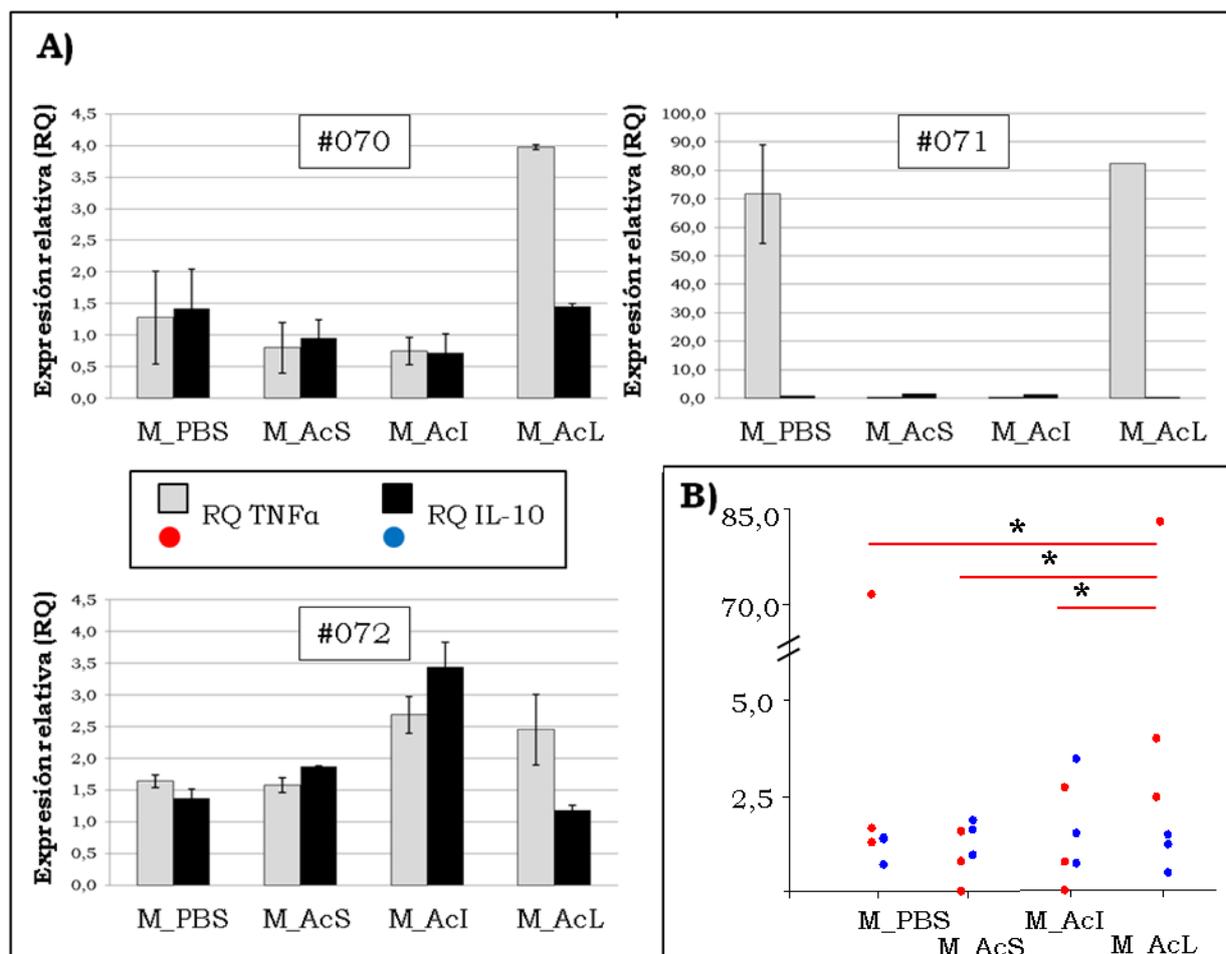


Figura 46. Expresión relativa de TNF α e IL-10 en los segmentos intestinales infectados de los 3 terneros. Los resultados se expresan en RQ, calculadas $2^{-\Delta(\Delta Ct)}$, donde ΔCt representa el Ct (TNF α o IL-10) – Ct (β -actina) y $\Delta(\Delta Ct)$ representa el ΔCt obtenido para cada segmento infectado con *Map* – el ΔCt obtenido para el segmento control (PBS) en el mismo animal. **A)** Se grafican los resultados individuales, de 2 mediciones independientes (RQ promedio \pm desvío estándar). **B)** Tendencia grupal de niveles de expresión relativa de las citoquinas a partir de cada segmento. Los * sobre los puntos indican diferencias estadísticamente significativas entre los segmentos M_AcL y los demás, para TNF α (Test de Friedman, p < 0,05).

Se puede ver que la respuesta fue variable según los animales. En los terneros #070 y #072 se observó una tendencia de respuesta semejante, principalmente en los segmentos M_AcL, mientras que el ternero #071 mostró un patrón diferente de

respuesta. No obstante, en los 3 casos hubo una expresión relativa de TNF α significativamente mayor en los segmentos M_AcL que en los restantes.

Resumen de los principales hallazgos relacionados con el modelo *in vivo* de infección por *Map*

- ✓ La infección intestinal con *Map* (en presencia o ausencia de Acs) indujo una respuesta temprana de inflamación local, a predominio mononuclear, principalmente en mucosa y submucosa.
- ✓ El nivel de presencia de *Map* en los segmentos intestinales infectados con los distintos Acs resultó comparable en todos los casos, tanto a evaluar el nivel de amplificación de IS900 como al analizar los resultados de la tinción para micobacterias en los cortes histológicos.
- ✓ La recuperación de bacterias viables a partir del tejido mostró diferencias significativas según el pretratamiento de *Map*: los segmentos infectados con *Map* + Acs específicos (de bovinos infectados o inmunizados con LAM) resultaron en menores niveles de UFC que los infectados con *Map* + Acs irrelevantes.
- ✓ Se encontró un predominio de TNF α sobre IL-10 en la respuesta tisular temprana de los 3 terneros para los segmentos infectados con *Map* + Acs de bovinos inmunizados con LAM. En cambio, la infección en presencia de Acs irrelevantes resultó en un balance neutral de la expresión de estas citoquinas.

5. Discusión

Para poder evaluar las hipótesis propuestas en esta tesis fue necesario primero inmunizar bovinos con LAM a los fines de contar con sueros con altos niveles de anticuerpos específicos a este antígeno. Las características del extracto LAM aquí obtenido fueron coincidentes con las resultantes de extracciones realizadas previamente en nuestro laboratorio (Jolly y col., 2011). El plan de inmunización aplicado permitió inducir altos niveles de anticuerpos específicos en los bovinos inmunizados. Sin embargo, si se compara la respuesta detectada luego de la 3era y de la 4ta inmunización, podemos concluir que la incorporación de un tercer refuerzo no incrementó el nivel de la respuesta inmune humoral detectada. Cuando se caracterizó esta respuesta por Western blot, encontramos que los 3 bovinos inmunizados generaron anticuerpos contra una única banda antigénica del extracto LAM, coincidente en peso molecular y antigenicidad con el LAM purificado de *M. tuberculosis*. Ninguno de los bovinos mostró reactividad frente a PPA antes de iniciar las inmunizaciones, y éstas no indujeron variaciones en dicha respuesta. Este hallazgo junto con los bajos niveles de proteínas detectados en el extracto antigénico y los resultados del Western blot, también sugieren que la respuesta inmune humoral de los bovinos aquí inmunizados fue principalmente dirigida contra LAM.

Dado el enfoque de este trabajo, puesto en estudiar los efectos de los anticuerpos en modelos experimentales de paratuberculosis, para el análisis de los resultados obtenidos comparamos la infección con *Map* en presencia de anticuerpos irrelevantes (obtenidos a partir de muestras de suero de bovinos sanos) *vs.* en presencia de anticuerpos específicos (obtenidos a partir de muestras de suero de bovinos enfermos de paratuberculosis o inmunizados con LAM). Si bien incluimos en nuestros experimentos el tratamiento con *Map* solamente, consideramos que para estudiar el posible efecto de los anticuerpos, la comparación con el efecto de *Map* pretratada con anticuerpos irrelevantes era un mejor control. Puesto que en la mayoría de los casos no encontramos referencias previas donde se evaluara el efecto de los anticuerpos, el tratamiento con *Map* se incluyó a los fines de poder comparar nuestros resultados con los de otros autores. De esta manera, se contempló la posibilidad de que la preincubación con anticuerpos tuviera un efecto sobre las variables estudiadas, independiente de la especificidad de los mismos. Además, puesto que muchos otros componentes del suero podrían tener efectos biológicos y que en la mayoría de los ensayos no empleamos anticuerpos purificados sino sueros o fracciones precipitadas de los mismos, consideramos que la comparación con sueros de bovinos sanos permitió independizarse en mayor grado del efecto de estos otros componentes

séricos. Algunos estudios de inmunización pasiva en modelos de tuberculosis demostraron que la eficacia de la protección conferida por los anticuerpos depende de su especificidad (revisado por Glatman-Freedman y Casadevall, 1998). Teniendo en cuenta estas observaciones, nos pareció importante considerar el efecto no sólo de anticuerpos provenientes de bovinos infectados, inducidos por el contacto con múltiples estructuras antigénicas de *Map*, sino también evaluar anticuerpos inducidos por inmunización con LAM, con una especificidad más definida. Esta diferencia en especificidad pudo visualizarse en los resultados del Western blot frente a *Map* de los sueros de bovinos infectados *vs.* inmunizados con LAM (ver Figura 21).

5.1. Modulación por anticuerpos sobre los efectos de *Map* en el modelo *in vitro* de infección.

Si bien la modulación de la apoptosis es reconocida como un factor de virulencia de las micobacterias (Whittington y col., 2012; Arsenault y col., 2014), no hay un claro consenso sobre cuál sería su efecto: pro- o anti- apoptótico. Existen evidencias experimentales que sugieren tanto su capacidad de inhibir la apoptosis (Lee y col., 2009; Behar y col., 2011; Kabara y Coussens, 2012; Abendaño y col., 2013a y b) como de estimularla (Aguiló y col., 2013; Periasamy y col., 2013). Algunos estudios han descrito la capacidad apoptogénica de micobacterias en términos relativos, encontrando que las especies patógenas producen menores niveles de apoptosis que las apatógenas (Weiss y col., 2004; Wojtas y col., 2011). En parte, esta controversia puede asociarse con el comportamiento bifásico descrito para las micobacterias dentro del huésped, con capacidad de inhibir la apoptosis de macrófagos en fases tempranas, manteniendo un ambiente adecuado para su replicación; y de inducir muerte celular por necrosis, logrando escapar de ese medio intracelular para su diseminación, en estadios más avanzados de la infección (Porcelli y Jacobs WR Jr, 2008; Behar y col., 2010; Briken, 2013). Por otra parte, se describió que *Map* induce la apoptosis *ex vivo* en MDM de ciervos de razas genéticamente resistentes, pero no de razas susceptibles a la infección (Dobson y col., 2013). Esta observación sugiere una asociación entre la inhibición de la apoptosis de macrófagos por parte de *Map* y el desarrollo de la infección. Kabara y Coussens (2012) han demostrado la importancia de evaluar en forma diferencial macrófagos infectados y testigos dentro de cada cultivo, al encontrar un efecto diferente de la infección por *Map* sobre la

apoptosis de estas subpoblaciones. A la luz de sus resultados, la difusión del empleo de la metodología que proponen podría contribuir a resolver dicha controversia. De hecho, en esta tesis no encontramos un efecto claro de *Map* sobre la apoptosis de macrófagos en los ensayos convencionales. Sin embargo, al emplear la metodología propuesta por estos autores, detectamos un nivel de apoptosis significativamente menor en las células infectadas con respecto a las no infectadas dentro de un mismo cultivo. Estos resultados demuestran la capacidad de *Map* de inhibir la apoptosis en el modelo aquí estudiado.

En cuanto a la modulación por anticuerpos del efecto de *Map* en el modelo *in vitro*, encontramos un aumento de la apoptosis al producirse la infección en presencia de sueros inmunes. Fue posible detectar este efecto en dos modelos celulares distintos (Bomac y MDMB) y mediante dos metodologías diferentes. No obstante, los niveles de apoptosis detectados fueron mayores en el modelo de cultivo primario. Estas observaciones podrían explicarse por una mayor resistencia relativa de las células Bomac a la apoptosis, que podría estar relacionada con la transformación generada al incorporar el ADN del virus sv-40 para lograr la inmortalidad de esta línea celular (Stabel y Stabel, 1995). Otra explicación alternativa para las diferencias encontradas podría vincularse con la menor capacidad de Bomac de ingerir *Map* en comparación con MDMB (Woo y col., 2006). Sin embargo, el trabajo con líneas celulares supone ventajas técnicas sobre el empleo de cultivos primarios, tales como la disponibilidad de células casi sin limitante numérica o el evitar la variabilidad derivada del empleo de diferentes donantes de células y de las condiciones particulares del donante al momento de cada extracción. Por lo tanto, considerando que la línea celular Bomac demostró conservar las principales características de los macrófagos (Stabel y Stabel, 1995; Tooker y col., 2002; Mundo y col., 2008; Jolly y col., 2011; Abendaño y col., 2013b; Oh y col., 2015) y constituir un modelo confiable y reproducible de infección *in vitro* con *Map* (Abendaño y col., 2013b) decidimos continuar nuestros estudios sólo con las células Bomac como modelo de macrófago bovino.

A los fines de evaluar si el efecto encontrado sobre la apoptosis al preincubar *Map* con sueros inmunes podía explicarse por la presencia de anticuerpos específicos, comparamos los niveles de apoptosis inducidos por *Map* luego de ser preincubada con: muestras de suero de los bovinos inmunizados con LAM pre- *vs.* post-inmunización y también suero *vs.* anticuerpos séricos purificados. Así, pudimos comprobar que el efecto pro-apoptótico sólo se detectaba en presencia de las muestras de suero post-inmunización y que era comparable al preincubar *Map* con el

suero completo o con los anticuerpos purificados. Estos resultados sugieren fuertemente que los anticuerpos específicos serían los responsables del efecto detectado al pretratar *Map* con sueros inmunes.

En la actualidad, es poco lo que se sabe sobre la modulación de la apoptosis por anticuerpos dirigidos contra patógenos en el curso de las infecciones. Sólo pudimos encontrar una referencia bibliográfica al respecto, en la que estudiaron un modelo *in vitro* de infección por *Clostridium difficile*, patógeno extracelular y exotoxigénico, y demostraron que un suero anti-toxina A podía prevenir la apoptosis de células colorrectales en cultivo (Kim y col., 2014). Según nuestro conocimiento, no hay reportes bibliográficos sobre este fenómeno en infecciones por bacterias intracelulares. Además, en relación a las características y diversidad funcional de la respuesta inmune humoral de los bovinos, si bien es reconocida la existencia de diferentes subclases de anticuerpos de isotipo IgG, es poco lo que se sabe de las funciones biológicas de los mismos (Estes y Brown, 2002; Corbeil, 2002). En trabajos anteriores, nuestro grupo aportó evidencias sobre la capacidad opsonizante de la IgG1 bovina frente a *Map* y su relevancia en la reducción de la viabilidad intracelular de esta bacteria dentro de macrófagos (Mundo y col., 2008; Jolly y col., 2011). Con la intención de evaluar la participación relativa de IgG1 e IgG2 en el efecto pro-apoptótico aquí encontrado, isotipificamos los sueros de los 3 bovinos inmunizados con LAM obtenidos post-inmunización y analizamos en forma conjunta estos datos con los resultados obtenidos para cada suero en los ensayos de apoptosis. No pudimos detectar una tendencia en cuanto a los niveles relativos de ambos isotipos en los 3 bovinos. Sin embargo, es interesante destacar los resultados encontrados para el bovino #3186: la reactividad de su suero detectable por ELISA frente a *Map* fue casi exclusivamente debida a IgG1 y este suero fue el que indujo mayores niveles de apoptosis al ser empleado para preincubar *Map*. Estos hallazgos nos permiten sugerir la participación de la IgG1 como moduladora de la capacidad apoptogénica de *Map* en el modelo *in vitro* estudiado. Sería importante repetir estos experimentos preincubando *Map* con anticuerpos séricos purificados por isotipo, a los fines de confirmar esta hipótesis.

Por otro lado, en los ensayos en los que se empleó *Map* marcada con FITC, pudimos comprobar que la presencia de los sueros inmunes tuvo un efecto significativo sólo sobre la subpoblación de células infectadas de los cultivos; lo cual sugiere que el efecto sobre las células que han fagocitado no se transfiere a las células no infectadas, ya fuera por factores solubles o a través del contacto célula-

célula. Además, en estos experimentos analizamos el porcentaje de células infectadas por *Map* en cada tratamiento, encontrando en todos los casos aproximadamente un 50 %. Cabe destacar que estos valores son comparables con los publicados por otros autores para ensayos de infección con *Map* semejantes en células MDMB (Bormann y col., 2011; Dobson y col., 2013). Este dato resulta de interés, puesto que constituye un aporte para la validación de la utilización de Bomac como modelo de macrófagos bovinos.

En su conjunto, los resultados encontrados en esta tesis al evaluar la apoptosis corroboran la capacidad de los anticuerpos, de bovinos infectados y de inmunizados con LAM, de interferir con la inhibición de la apoptosis generada por *Map* al infectar macrófagos *in vitro*. Estas evidencias experimentales nos permiten sostener nuestra primera hipótesis de trabajo: **“La infección *in vitro* de macrófagos con *Map* opsonizada con anticuerpos anti-LAM modifica los niveles de apoptosis inducidos en comparación con los detectados en cultivos infectados con *Map* no opsonizada.”**

El grupo de Joller y colaboradores ha hecho importantes aportes sobre las funciones mediadas por anticuerpos en la infección por diferentes bacterias intracelulares (Joller y col., 2007, 2010, 2011; Weber, 2012). Ellos describieron un nuevo mecanismo de acción de los anticuerpos que, a través de la interacción con los FcRs, les permite modular el tráfico intracelular de los patógenos, redireccionándolos hacia el compartimento lisosomal y permitiendo así su degradación. Este redireccionamiento mediado por anticuerpos ya había sido propuesto por Armstrong y Hart en 1975 para *M. tuberculosis* y observado también en otros modelos *in vitro* de infecciones intracelulares como *Encephalitozoon sp.* (Niederkorn y Shadduck, 1980), *Toxoplasma gondii* (Joiner y col., 1990), *Salmonella sp.* (Tobar y col., 2004), *Rickettsia sp.* (Feng y col., 2004). En este marco, es posible postular que la internalización de *Map* a través de la vía de FcRs en los macrófagos infectados en presencia de sueros inmunes podría haber modulado su tráfico hacia los lisosomas, limitando la capacidad de esta bacteria de interferir en las vías apoptóticas.

En esta tesis, también estudiamos en el modelo *in vitro* de infección el efecto de los anticuerpos sobre los niveles de producción relativa de TNF α e IL-10, puesto que el balance entre estas citoquinas se considera un indicador relevante del estado de activación de macrófagos, y está asociado con la patogenia de las enfermedades por micobacterias (Rojas y col., 1999; Weiss y col., 2004; Marino y col., 2010; Magombedze y col., 2015). En primer lugar, se analizaron los sobrenadantes de los

ensayos de infección realizados para evaluar apoptosis, pero no fue posible identificar niveles de ninguna de las dos citoquinas en esas muestras con la metodología empleada. Para lograr niveles detectables de TNF α e IL-10 fue necesario emplear mayores cantidades de células/hoyo y estimularlas con mayores cargas de bacterias. Sager y col. (1999) sugirieron que las células Bomac no eran capaces de producir TNF α al ser estimuladas con LPS o IFN γ . En contraposición, nosotros pudimos detectar esta citoquina cuando las estimulamos con *Map*, demostrando que las células Bomac tienen la capacidad de producirla. Asimismo, si se analizan en conjunto los niveles de TNF α e IL-10, se puede ver que la infección indujo la secreción de IL-10 a todas las concentraciones bacterianas evaluadas (ver Figura 19), mientras que los niveles de TNF α sólo se diferenciaron de los basales a altas concentraciones bacterianas (ver Figura 18). Este predominio de IL-10 observado para la mayoría de las concentraciones de *Map* resulta esperable, si se tiene en cuenta lo enunciado anteriormente sobre el balance entre los niveles de IL-10 y TNF α y la patogenicidad de las micobacterias. A partir de estos resultados, interpretamos que si bien las células Bomac se muestran hiporrespondedoras a estímulos inductores de la secreción de TNF α , al incrementar el nivel de estimulación, infectándolas con dosis elevadas de *Map*, se logra evidenciar su capacidad de secreción de niveles altos de dicha citoquina.

En relación al efecto de los anticuerpos sobre la producción de TNF α e IL-10, los niveles que detectamos resultaron en general bajos (valores de UR de ELISA entre 100 y 150) y mostraron una gran variabilidad entre sueros, principalmente en el grupo inmunizado con LAM. Esto podría deberse a las limitaciones del sistema relacionadas con el modelo empleado (células Bomac, bacterias de cepa de laboratorio *Map* ATCC19698, etc.), con los tiempos de evaluación y/o las condiciones de estimulación empleadas; o bien a una influencia de múltiples componentes del suero de complementado sobre los efectos de *Map* al infectar macrófagos *in vitro*. Sin embargo, cuando infectamos macrófagos en presencia de anticuerpos específicos purificados, encontramos una producción significativamente mayor de TNF α , tanto para los anticuerpos obtenidos a partir de los 2 sueros de bovinos inmunizados con LAM como para los obtenidos a partir de uno de los bovinos infectados que pudo evaluarse. Este resultado pone en evidencia la importancia de la utilización de anticuerpos purificados para evaluar su funcionalidad, ya que el empleo de sueros enteros de complementado puede influenciar los resultados, impidiendo identificar el efecto debido a los anticuerpos presentes en ellos. La necesidad de emplear

fracciones purificadas de anticuerpos en vez de sueros ya había sido destacada en otro trabajo de nuestro grupo, donde evaluamos el efecto de los anticuerpos sobre niveles de fagocitosis y de viabilidad bacteriana (Jolly y col., 2011). En esta tesis, los hallazgos obtenidos nos permiten corroborar nuestra hipótesis **“La infección *in vitro* de macrófagos con *Map* opsonizada con anticuerpos anti-LAM induce un patrón de citoquinas diferente al generado en respuesta a la infección por *Map* no opsonizada.”**.

Al parecer, el mecanismo mediante el cual las micobacterias son capaces de inhibir la apoptosis se relaciona con el balance de citoquinas inducidos por la cepa micobacteriana, ya que se vio que cepas altamente patógenas inducen niveles elevados de IL-10 al infectar macrófagos *in vitro*, a la vez que estimulan la producción de receptores solubles de TNF, con lo cual se reduce la actividad biológica del TNF α , que tendría un efecto pro-apoptótico sobre macrófagos (Balcewicz-Sablinska y col., 1998; Abendaño y col., 2014). También en un ensayo *in vivo* de infección de ratones con *M. bovis* se encontró una correlación entre la inhibición de apoptosis, el aumento de los niveles de IL-10 y la disminución de los niveles de TNF α (Rodrigues y col., 2009). Por lo tanto, el incremento que detectamos de la secreción de TNF α en los cultivos de macrófagos infectados con *Map* en presencia de anticuerpos específicos, en concomitancia con el aumento en los niveles de apoptosis, podría indicar la interferencia de los anticuerpos con las vías que *Map* emplea para modular la producción de citoquinas y la apoptosis dentro del macrófago.

El LAM de las cepas patógenas (Nigou y col., 2003) se ha descrito como un factor de virulencia clave en la modulación de la apoptosis para *M. tuberculosis* (Rojas y col., 1999 y 2000; Krzyzowska y col., 2007 y 2008; Wojtas y col., 2011), y para *Map* (Souza y col., 2013). Por lo tanto, el efecto que detectamos de los anticuerpos específicos podría en parte ser explicado por el bloqueo de la actividad de esta molécula al acomplejarse con los anticuerpos anti-LAM.

Los grandes avances que se han realizado en la última década en materia de tecnologías para estudios genéticos en mamíferos, han provisto metodologías mejoradas (con respecto al ELISA) para evaluar la respuesta de los macrófagos a la infección. Así, nuevas tecnologías de transcriptómica, como el estudio pangenómico en *microarray* (Ekins y Chu, 1999) y el RNA-seq (Wang y col., 2009), han sido aplicadas en el estudio de la interacción *Map*-macrófago (MacHugh y col., 2012; Ruelbretch y col., 2014; Casey y col., 2015) permitiendo una visión más global de la respuesta a la infección y de la modulación de patrones de regulación de la expresión

génica en estas células. Un nivel de abordaje aún más complejo es el que proponen las metodologías basadas en el estudio del “interactoma”, es decir, el análisis simultáneo del transcriptoma de la bacteria y de la célula huésped (revisado por Durmus y col., 2015). Este tipo de estudios se ha comenzado a realizar recientemente en el campo de la paratuberculosis y resultan promisorios para lograr nuevos avances en el conocimiento sobre su patogenia (Lamont y col., 2013; Rienksma y col., 2015). Sería interesante la aplicación de estas nuevas tecnologías en el marco de nuestro modelo experimental *in vitro*, ya que podría permitirnos ampliar el conocimiento sobre el alcance y los mecanismos mediadores de los efectos de los anticuerpos aquí detectados.

5.2. Modulación por anticuerpos sobre los efectos de *Map* en el modelo *in vivo* de infección.

Dada la susceptibilidad temprana a la infección por *Map* en bovinos (Windsor y Whittington, 2010; Marce y col., 2011; Mortier y col., 2013), empleamos terneros de un mes de vida. Para definir la concentración de anticuerpos a utilizar, tuvimos en cuenta los valores fisiológicos en leche bovina descritos por Butler y col. (2005), en el rango de 0,5 a 1 mg/mL de gammaglobulinas, y el experimento publicado por Momotani y col. (1988), donde utilizan sueros bovinos al 5%¹ para preincubar *Map* antes de una infección intestinal, y encuentran una tendencia diferente en los efectos del suero inmune con respecto al control. En relación a la dosis bacteriana empleada para el desafío, los resultados de las titulaciones efectuadas a *posteriori* nos permitieron corroborar que nuestra estimación por peso húmedo del inóculo estuvo dentro de los valores esperados (Hines y col., 2007). Además, las UFC/segmento inoculadas fueron comparables para los 3 terneros y estuvieron dentro del rango empleado por otros autores para experiencias semejantes (Momotani y col., 1988; Khare y col., 2009; Khare y col., 2012; Ponnusamy y col., 2013).

Del análisis microscópico de los cortes tisulares se desprende que la metodología de trabajo empleada en las cirugías permitió mantener la integridad de la barrera mucosa y lograr la compartimentalización efectiva del íleon en segmentos independientes. Esto se confirmó en los 3 terneros mediante el análisis microscópico de los cortes con H/E y mediante los hallazgos en los segmentos inoculados

¹ Este porcentaje de suero representaría una concentración de aproximadamente 1 mg/mL, para una proteinemia de 7 g/dL y un % de gammaglobulinas de 28%, valores promedio para la especie bovina.

solamente con PBS, ya que a pesar de su localización contigua a segmentos infectados con *Map*, en ninguno de ellos se encontró evidencias de infección. En los segmentos infectados, en cambio, fue posible detectar *Map* asociada a células de la mucosa y submucosa intestinal a las 3,5 hs de infección, independientemente de que la infección se hubiera realizado en presencia o ausencia de anticuerpos. Estos hallazgos resultan coincidentes con los de Khare y col. (2009), que demostraron la presencia de *Map* dentro del tejido ya a las 0,5 hs p.i., utilizando también un modelo de segmentos intestinales bovinos. La cinética de la invasión intestinal de *Map*, y su rápida diseminación regional, se ponen también de manifiesto en el reporte de Wu y col. (2007), quienes describen la recuperación de bacterias viables a partir de linfonódulos mesentéricos en tiempos tan tempranos como 1 h luego de la inoculación quirúrgica intestinal de *Map*. El tejido linfoide asociado a mucosas constituye el blanco de la infección por micobacterias (Lugton, 1999). En nuestro experimento fue posible identificar bacterias dentro de las placas de Peyer en el tiempo de infección evaluado (3,5 hs). Sin embargo, en otro estudio en el que se empleó un modelo de infección semejante, se detectaron bacterias asociados a las placas de Peyer a las 20 hs – y no a las 5 hs - post-infección (Momotani y col., 1988). Las cargas bacterianas empleadas para desafiar fueron comparables en ambos casos. Tal vez la utilización de una cepa de menor patogenicidad, como lo es la ATCC19698, en la experiencia de dichos autores haya impactado en la cinética de la invasión intestinal que observaron. Por otro lado, ese reporte es el único antecedente que encontramos de evaluación del efecto de los anticuerpos en modelos de infección *in vivo* a corto plazo con *Map*. Como resultado, describieron una tendencia al incremento de bacterias detectables por microscopía en la submucosa intestinal a las 20 hs p.i. en presencia de suero de un bovino infectado con paratuberculosis, con respecto a suero de un bovino sano (Momotani y col., 1988). En este sentido, sus hallazgos coinciden con los resultados encontrados en nuestro modelo, donde no fue posible detectar diferencias en la evaluación microscópica a las 3,5 hs post-infección de los segmentos con los diferentes anticuerpos.

Los primeros estudios sobre la invasión intestinal de *Map* sugirieron que ocurría a través de las células M (Momotani y col., 1988). Investigaciones posteriores demostraron que la invasión también tenía lugar a través de los enterocitos (Sigurdardorttir y col., 2005; Ponnusamy y col., 2013). Bermúdez y colaboradores (2010) postularon que la utilización de la vía de células M favorecería el reconocimiento de *Map* por parte del sistema inmune y la contención de la infección,

mientras que la entrada por enterocitos representaría la vía patogénica asociada a la diseminación de la infección. En nuestro estudio no encontramos nuevas evidencias en este sentido, ya que no pudimos identificar bacterias asociadas a células del epitelio intestinal (ni M ni enterocitos).

A los fines de medir la presencia bacteriana a nivel tisular, empleamos distintas técnicas, entre ellas el PCR en Tiempo Real para la amplificación del inserto IS900. Para abordar este estudio fue necesario en primer lugar trabajar en la estandarización de la metodología. El sistema de detección de *Map* logrado mostró una sensibilidad del orden de fg de ADN de *Map*/reacción, comparable a la referida internacionalmente para esta técnica (Slana y col., 2008; Logar y col., 2012; Sevilla y col., 2014). Los niveles de amplificación de IS900 detectados a nivel tisular fueron comparables en todos los segmentos infectados, sugiriendo una carga aproximada de entre 10^8 y 10^9 Equivalentes Genómicos de *Map/g* de tejido. Estos valores son coherentes con el título del inóculo empleado (10^9 UFC/segmento), y sugieren que cerca de la totalidad de las bacterias habría atravesado la mucosa intestinal en el tiempo de infección evaluado, independientemente de la presencia o ausencia de anticuerpos. Recientemente Everman y Bermúdez (2015) describieron que la opsonización de *Map* con un *pool* de sueros inmunes incrementaba significativamente el nivel de translocación a través de una monocapa epitelial *in vitro*. Es posible que la carga bacteriana de nuestro inóculo haya saturado la posibilidad de translocación de la barrera intestinal. El empleo de otras cantidades de *Map* en futuros experimentos con este modelo permitiría estudiar si la mayor invasividad en presencia de Acs detectada por dichos autores tiene lugar en la infección del intestino.

Si se analiza el nivel de recuperación de bacterias viables obtenido a partir de los distintos segmentos, éste estuvo en todos los casos en el orden de 10^4 UFC/g de tejido. Como antecedente para contextualizar este análisis, en el experimento de Khare y col. (2009), en el que inocularon segmentos con títulos comparables de *Map* a los aquí usados, y evaluaron el nivel de recuperación bacteriana a distintos tiempos entre 0,5 y 12 h.p.i., recuperaron niveles semejantes de bacterias viables independientemente del tiempo evaluado (aproximadamente 5×10^4 UFC/g de tejido). Estos valores resultan comparables a los aquí informados y sugerirían que más de un 99% de las bacterias invasoras no son viables 3,5 hs p.i. (teniendo en cuenta la diferencia entre las 10^4 UFC/g de tejido recuperados y las $\sim 10^8$ UFC/g de tejido empleadas para el desafío). Sin embargo, es necesario considerar que además

de reflejar los mecanismos bactericidas puesto en marcha en forma temprana, esta diferencia entre bacterias inoculadas y recuperadas del tejido también se ve influenciada por los procedimientos distintos a los que fueron sometidos el inóculo y las muestras tisulares antes de ser sembrados en medios de cultivo: en el primer caso, puesto que se trataba de un cultivo puro de micobacterias, se sembró directamente; mientras que en el segundo caso, las muestras fueron conservadas a -20°C durante 7 meses antes de su procesamiento y fue necesario aplicar un tratamiento con agentes decontaminantes y antimicrobianos, antes del sembrado. El protocolo empleado en este caso podría haber impactado sobre la viabilidad bacteriana, tal como fue previamente descrito por otros autores (Redacliif y col., 2003). Esto indicaría que parte del efecto visualizado de disminución en la cantidad de *Map* recuperadas se debería a un artificio más que a una degradación dada por mecanismos bactericidas tisulares. En este sentido, en un trabajo realizado por Sangari y col. (2001), se analizó la cinética de la invasión bacteriana en el tiempo en un modelo murino de infección por *M. avium* en segmentos intestinales. Ellos encontraron que 1 h p.i. aproximadamente un 7 % del inóculo inicial era recuperable por cultivo desde el tejido mientras que a las 3 hs p.i. alrededor del 50 % del mismo ya se encontraba en la submucosa. Estos resultados contrastarían con los nuestros, sin embargo, en ese caso las muestras tisulares fueron procesadas en fresco y sin la utilización de agentes decontaminantes, lo cual podría explicar los porcentajes de recuperación de micobacterias mucho más altos allí encontrados. Más allá de esta apreciación, que afectaría a todos los segmentos por igual, encontramos diferencias significativas en el nivel de recuperación bacteriana a partir de los segmentos infectados con los diferentes anticuerpos. Cuando la infección se produjo en presencia de anticuerpos específicos, tanto de bovinos inmunizados con LAM como infectados hubo una reducción significativa de UFC recuperadas, siendo todavía más evidente el efecto al emplear los anticuerpos de bovinos infectados. **Estos resultados sugieren que la presencia de anticuerpos específicos no interferiría con la capacidad de *Map* de atravesar la barrera intestinal bajo las condiciones estudiadas, pero sí afectaría su capacidad de sobrevivir dentro del tejido.**

A través de la microscopía y del análisis de la expresión local de citoquinas, quisimos aproximarnos al estudio de la respuesta tisular temprana a esta infección y evaluar si la presencia de anticuerpos específicos podía modularla. En todos los preparados, ya fueran de segmentos infectados o control, detectamos cierto grado de dilatación vascular, y cambios inflamatorios a nivel de la serosa. Estos hallazgos son

coincidentes con lo descrito previamente en un modelo semejante de segmentos intestinales en terneros (Momotani y col., 1988). Dada la presencia de estos hallazgos en todos los cortes, hipotetizamos que estarían asociados a la técnica quirúrgica aplicada para lograr la separación del íleon en compartimentos independientes. Lamentablemente no pudimos analizar en paralelo el aspecto microscópico de una porción de íleon intacta de estos terneros, lo cual nos habría permitido profundizar sobre esta hipótesis. Por otro lado, el escaso desarrollo de las áreas interfoliculares que aquí detectamos en la submucosa también había sido previamente descrito para rumiantes de esta categoría etaria (Po Po y col., 2005; Kapoor y Singh, 2015).

Al analizar los cortes de los segmentos infectados con *Map* encontramos un infiltrado inflamatorio, con componentes mono y polimorfonucleares (principalmente eosinófilos), que apareció en forma constante en la mucosa y submucosa intestinal. Este hallazgo coincide con lo reportado previamente para la infección por *Map* en modelos de segmentos intestinales. Momotani y col. (1988) describieron la presencia de un infiltrado inflamatorio compuesto por linfocitos, macrófagos, neutrófilos y eosinófilos, ya a las 5 hs p.i. De la misma manera, otros autores han descrito el incremento muy temprano de macrófagos en la lámina propia intestinal (0,5 y 1 hs p.i.) y en tiempos posteriores (1-12 hs p.i.) también de neutrófilos (Khare y col. 2009; Ponnusamy y col., 2013). La presencia de eosinófilos ya había sido identificada en otros modelos de paratuberculosis (Mokresh y col., 1989; Clark y col., 2010) y también de tuberculosis (Vijayan y col., 1992; Kirman y col., 2000; Lasco y col., 2004). El papel de las células polimorfonucleares en la patogenia/control de las infecciones por micobacterias no está aún dilucidado (Otsuka y col., 2008; Lowe y col., 2012; Branzk y col., 2014; Dallenga y col., 2015; Welin y col., 2015).

En relación a la expresión de citoquinas tisulares, no pudimos encontrar una tendencia repetible en los segmentos infectados con *Map* (segmentos M_PBS). Para este segmento, en 2 de los 3 terneros evaluados no detectamos cambios significativos en la expresión de TNF α ni de IL-10, con respecto a los segmentos controles (PBS). Solamente en el animal #071 los resultados sugerirían la inducción de un perfil pro-inflamatorio luego de la infección por *Map*. Estos resultados serían coincidentes con los de Khare y col. (2012), quienes evaluaron la expresión de ARN mensajeros con tecnología de *microarrays* luego de la infección con *Map* en un modelo de segmentos intestinales bovinos y no encontraron una expresión significativa de TNF α durante las primeras 12 h.p.i. Por otra parte, en los segmentos inoculados en presencia de anticuerpos anti-LAM (M_AcL) encontramos una expresión predominante de TNF α

sobre IL-10, para los 3 terneros. **Estos resultados sugieren que la modulación de la infección por anticuerpos ocurre también *in vivo* y que los anticuerpos anti-LAM favorecerían el desarrollo de una respuesta pro-inflamatoria frente a la infección por *Map*.** Sin embargo, cuando analizamos la modulación de la expresión de citoquinas por los anticuerpos de bovinos infectados no pudimos encontrar la misma tendencia. En este caso, observamos un nivel de expresión menor de ambas citoquinas, sin predominio claro de la producción de una sobre otra. Se sabe que el LAM es un antígeno con capacidad inmunomoduladora, que puede estimular la producción de IL-10 (Souza y col., 2013) e inhibir la de TNF α *in vitro* (Wojtas y col., 2011); por lo que el efecto detectado en los segmentos M_AcL sobre la producción de estas citoquinas podría deberse al bloqueo directo de los anticuerpos sobre el LAM y su actividad inmunomoduladora. También, se ha descrito que los macrófagos infectados con micobacterias pueden liberar LAM al medio extracelular, por vías exosomales (Beatty y col., 2001). Por lo tanto, los anticuerpos anti-LAM podrían contribuir a la defensa del huésped en la infección, al promover la depuración del LAM secretado, tal como fue observado en un ensayo de inmunización pasiva de ratones (Glatman-Freedman y col., 2000).

En la infección intestinal por *Map* se describieron 3 etapas: temprana (0,5 -1 h.p.i.) en la que se activan vías de endocitosis mediada por receptores y se producen cambios en la permeabilidad intestinal; intermedia (2-8 h.p.i.) en la que *Map* modula vías involucradas en la respuesta inflamatoria, la interacción citoquinas-receptores y otras vías de comunicación intercelular; y la fase tardía (12 h.p.i.), en la que se observa el inicio de una respuesta de inmunotolerancia a nivel de la expresión génica en los linfocitos T (Khare y col., 2012). En la fase intermedia descrita en ese trabajo, que incluiría el tiempo final de evaluación de nuestro experimento, los principales hallazgos bibliográficos descriptos fueron: un incremento significativo de la expresión de TLR4, TLR3 y TLR9, como también de las citoquinas IL-1 β , IL-6 e IL-7 y de los receptores IL-8R e IL-18R. Al mismo tiempo, encontraron una disminución significativa de la expresión de IL-13, IL-15, IL-17 y del receptor IL-4R (Khare y col., 2012). Los resultados publicados por este grupo sugieren que un análisis por tiempos mayores (por ejemplo, 12 hs) permitiría evaluar de forma más profunda el impacto que estos cambios tempranos que detectamos podrían tener sobre el curso de la infección y de la respuesta inmune adaptativa montada. Asimismo, abordar el estudio de otras citoquinas tal vez más involucradas en la patogenia temprana de la paratuberculosis, como la IL-1 α y β , IL-6, IL-17 y la IL-18 (Aho y col., 2003; Tanaka y

col., 2005; Khare y col., 2012), podría permitir una descripción más acabada sobre el alcance del efecto de los anticuerpos en las etapas tempranas de la infección.

Cabe aclarar que para evaluar el posible efecto de los anticuerpos en la respuesta a la infección por *Map* en este modelo *in vivo* decidimos trabajar con *pooles* de fracciones precipitadas de anticuerpos, obtenidas a partir de los sueros de cada categoría. Por un lado, la longitud del íleon de los terneros de esa edad, constituía una limitante anatómica para poder evaluar el efecto de cada fracción de anticuerpos séricos precipitados de forma individual. Además, decidimos trabajar con las fracciones precipitadas para reducir la posibilidad de que los efectos que pudiéramos encontrar estuvieran ligados a la presencia de otros componentes activos en el suero distintos de los anticuerpos. Por ejemplo, está descrito que la unión de *Map* a fibronectina del suero puede facilitar la invasión intestinal (Secott y col., 2001; Schleg y col., 2005; Kuo y col., 2012). Más allá del efecto que la fibronectina podría tener en este modelo de infección artificial en presencia de anticuerpos séricos, también se ha encontrado fibronectina como componente de las secreciones lácteas de bovinos (Sato y Hayashi, 1985). Esto pone de manifiesto la relevancia que podría tener la fibronectina en la infección por *Map* en condiciones naturales. En la actualidad se está estudiando las potenciales actividades biológicas de esta proteína en leche (Orczyk-Pawilowicz y col., 2015).

En forma global, nuestros resultados aportan nuevas evidencias sobre la utilidad del modelo de segmentos intestinales a corto plazo para el estudio de la respuesta temprana a la infección por *Map* en bovinos, mostrando que permite detectar diferencias en situaciones biológicamente distintas como lo son la infección en presencia de anticuerpos con distinta especificidad. En esta tesis encontramos evidencias a favor de nuestra hipótesis **“La administración de anticuerpos específicos frente a LAM limita la infección por *Map*, en un modelo de infección experimental neonatal a corto plazo.”**, de manera principal en lo que se refiere a la reducción de bacterias viables a nivel tisular. Sería interesante profundizar el estudio de la respuesta temprana local en este modelo y lograr definir un perfil de respuesta favorable para limitar la infección. Dado que pudimos identificar numerosas bacterias asociadas a células fagocíticas en la mucosa y submucosa intestinales, una alternativa sería focalizar en el estudio de la interacción micobacteria-macrófago, evaluando la apoptosis *in situ*. El estudio de la expresión de otras citoquinas a nivel tisular, tales como la IL-1 β , la IL-17, el TGF β , como así también de proteínas involucradas en las vías apoptóticas también sería de

relevancia, a la luz de otras investigaciones (Khare y col., 2009; Lee y col., 2009; Zhong y col., 2009; Dudemaine y col., 2014). Por otra parte, se ha sugerido que la infección con micobacterias patógenas promueve la expresión de metaloproteinasas de la matriz extracelular (MMPs) y que la modulación sobre las vías involucradas en la remodelación tisular sería uno de los mecanismos patogénicos de estas bacterias (Coussens y col., 2005; Wang y col., 2011; Roderfeld y col., 2012). El ácido hialurónico (HA) constituye otro componente de la matriz extracelular que se ha estudiado en las lesiones inducidas por micobacterias (Majors y col., 2003; Hirayama y col., 2009; Jolly y col., 2016) y para el cual se ha descrito que tanto *M. tuberculosis* (Aoki y col., 2004) como *Map* (Lefrancois y col., 2013) tienen proteínas con capacidad de unión. El estudio de estos componentes de la matriz extracelular y de las proteínas involucradas en su metabolismo podría permitir nuevos aportes al conocimiento sobre la respuesta temprana local.

5.3. Reflexiones finales. Nuestros resultados sugieren un efecto beneficioso de los anticuerpos dirigidos contra LAM en ambos modelos de paratuberculosis estudiados. Al mismo tiempo, el estudio de los sueros de la categoría “infectados” en esta tesis, permitió corroborar que los efectos potencialmente beneficiosos encontrados al emplear los anticuerpos obtenidos por inmunización con LAM también se producían al emplear los anticuerpos de los bovinos infectados. Incluso, los efectos de estos anticuerpos fueron más pronunciados en la mayoría de los casos que los detectados para los anticuerpos anti-LAM.

En la **Figura 47** se muestra una imagen adaptada de la revisión bibliográfica publicada por Arsenault y col. (2014) sobre la patogenia de la paratuberculosis. En ella se señalan los eventos de la infección natural abarcados por los modelos de infección empleado en esta tesis. En nuestros ensayos *in vitro* trabajamos directamente en la interacción micobacteria-macrófago simplificada a condiciones de laboratorio, y en ella estudiamos el efecto de la presencia de anticuerpos. El modelo *in vivo* considerado, nos permitió aproximarnos un poco más al contexto real en el que la infección tiene lugar. Los resultados que obtuvimos en este caso, estuvieron influenciados por el impacto de la presencia de los anticuerpos en los eventos relacionados con la internalización de *Map* a nivel del epitelio intestinal, su interacción con macrófagos subepiteliales y la formación inicial de lesiones. De todas

formas, puesto que la infección se produjo por inyección directa de las micobacterias en la luz intestinal, el posible efecto de la interacción de *Map* con los componentes lácteos, sustrato natural de la infección, como así también de cambios fenotípicos durante el trayecto por el tubo digestivo no fueron contemplados, constituyendo esto una limitante del modelo empleado. En este sentido, se ha sugerido que las condiciones de pH del abomaso estimularían la activación de algunas proteínas de superficie bacteriana facilitadoras de la invasión tisular (Secott y col., 2001) y que existen adaptaciones metabólicas de *Map* al microambiente intestinal (Weigoldt y col., 2013). También, otros investigadores describieron un incremento en la capacidad de invasión celular y una modificación de los antígenos de superficie cuando *Map* era cultivada en leche cruda de origen bovino, con respecto al cultivo en medios clásicos como el Middlebrook 7H9 (Alonso-Hearn y col., 2010; Everman y Bermúdez, 2015).

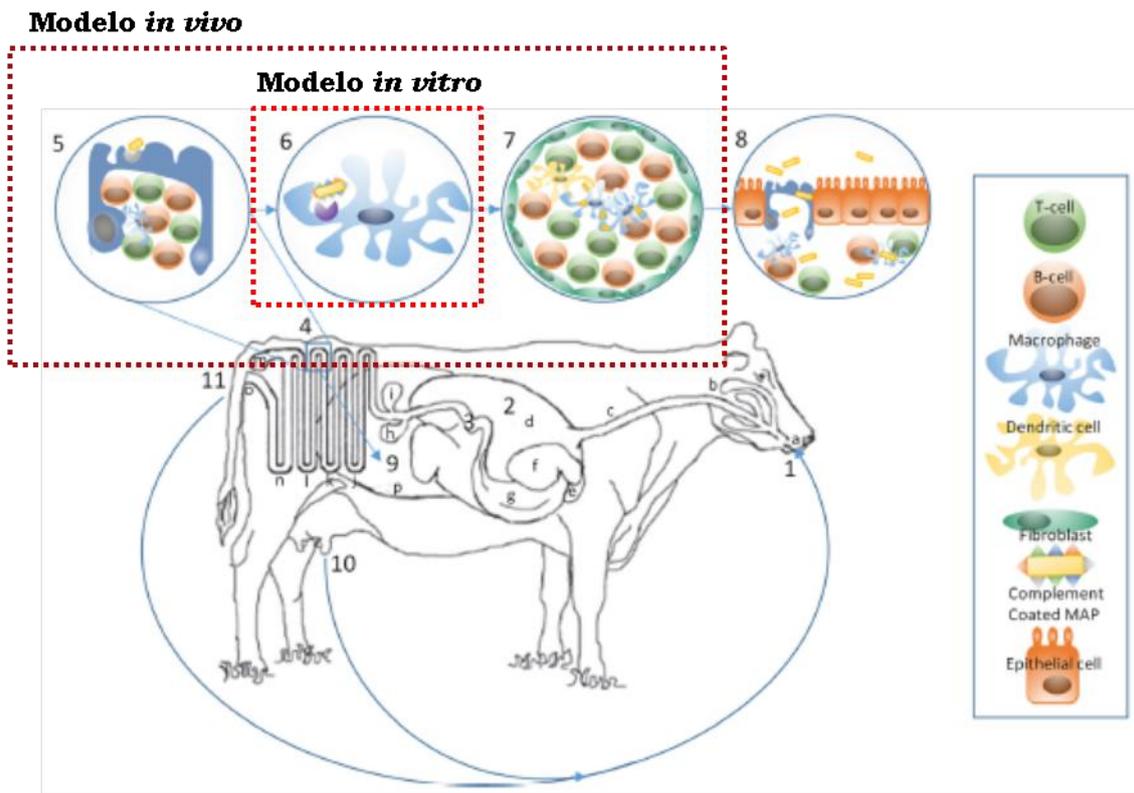


Figura 47. Captación de *Map* luego del ingreso vía oral. *Map* a través el tracto digestivo del bovino y llega al ileon (4), donde es internalizada, principalmente a través de células M. La presencia de algunas proteínas del huésped recubriendo la superficie bacteriana, tales como la fibronectina, podría modular la interacción con el epitelio, aumentando su captación (5). Ya en la lámina propia, *Map* interactúa con los macrófagos residentes y nuevamente aquí la presencia de diferentes opsoninas podría impactar en el resultado de esta interacción (6). Los macrófagos infectados son el principal estímulo para la formación de granulomas (7). Cuando la enfermedad se vuelve activa (8), la transmisión de *Map* podría ocurrir en forma transplacentaria a los fetos (9), y más comúnmente a los recién nacidos a través de la glándula mamaria, ya sea por infección activa de la glándula (10) o por contaminación de sus secreciones con materia fecal presente sobre la ubre (11). Imagen adaptada de Arsenault y col. (2014). Los recuadros en tonos rojos muestran los puntos en la patogenia de esta enfermedad abarcados por los modelos de infección estudiados en esta tesis.

En nuestro estudio, los anticuerpos de bovinos infectados naturalmente con *Map* modularon la respuesta a la infección, con ciertos efectos que consideramos podrían ser beneficiosos para el huésped (aumento de la apoptosis y de la secreción de $TNF\alpha$ por parte de macrófagos *in vitro*, reducción de la recuperación de bacterias viables desde el tejido). Sin embargo, durante el curso de la infección natural, los anticuerpos suelen aparecer en forma tardía, principalmente asociados a un deterioro de la respuesta inmune celular (Stabel, 2000; Koets y col., 2002). No

obstante, la activación precoz de LB ha sido documentada en bovinos experimentalmente infectados con *Map* (Stabel y col., 2011; Fernández y col., 2013).

La teoría tradicional interpretaba a la respuesta inmune humoral como causal del deterioro de la respuesta celular y del inicio de la signología clínica y la excreción fecal de *Map*. Sin embargo, nuevos estudios proponen la inversión de esta relación causal, al sugerir que la respuesta de anticuerpos detectada en fases tardías de la enfermedad sería consecuencia de las altas cargas de bacterias extracelulares presentes en el intestino en estadios avanzados de la patología y el alto nivel de excreción bacteriana resultante (Magombedze y col., 2014; Ganusov y col., 2015). En coincidencia con Koets y col. (2015), consideramos que cabría plantear la pregunta sobre si la falta de respuesta de anticuerpos detectable durante las fases tempranas de la infección se relaciona con un mecanismo activo de evasión de la respuesta inmune por parte de *Map*. De todos modos, es de destacar que la técnica empleada para evaluar los niveles de anticuerpos en la mayoría de los trabajos es el ELISA-PPA, el cual detecta IgG total y de acuerdo a nuestras observaciones previas, tiene una capacidad deficiente para identificar los anticuerpos en etapas tempranas de la infección (Fernández y col., 2012). Un trabajo recientemente publicado en el que se evaluó la respuesta de anticuerpos en mucosa en ovinos experimentalmente infectados con *Map* encontró que los animales que no desarrollaban infección tenían niveles de anticuerpos específicos en materia fecal significativamente mayores que los animales con infección clínica, sugiriendo un papel de la respuesta humoral en la protección frente a la partuberculosis (Begg y col., 2015).

A modo de reflexión final sobre las implicancias biológicas de nuestros hallazgos en su conjunto, es posible hipotetizar que la presencia local de altos niveles de anticuerpos específicos al momento de la infección natural por *Map* podría contribuir a generar un microambiente pro-inflamatorio, con un predominio de TNF α sobre IL-10 y a incrementar los niveles de apoptosis de los macrófagos de la mucosa intestinal. Estos efectos podrían ser beneficiosos para el control de la infección.

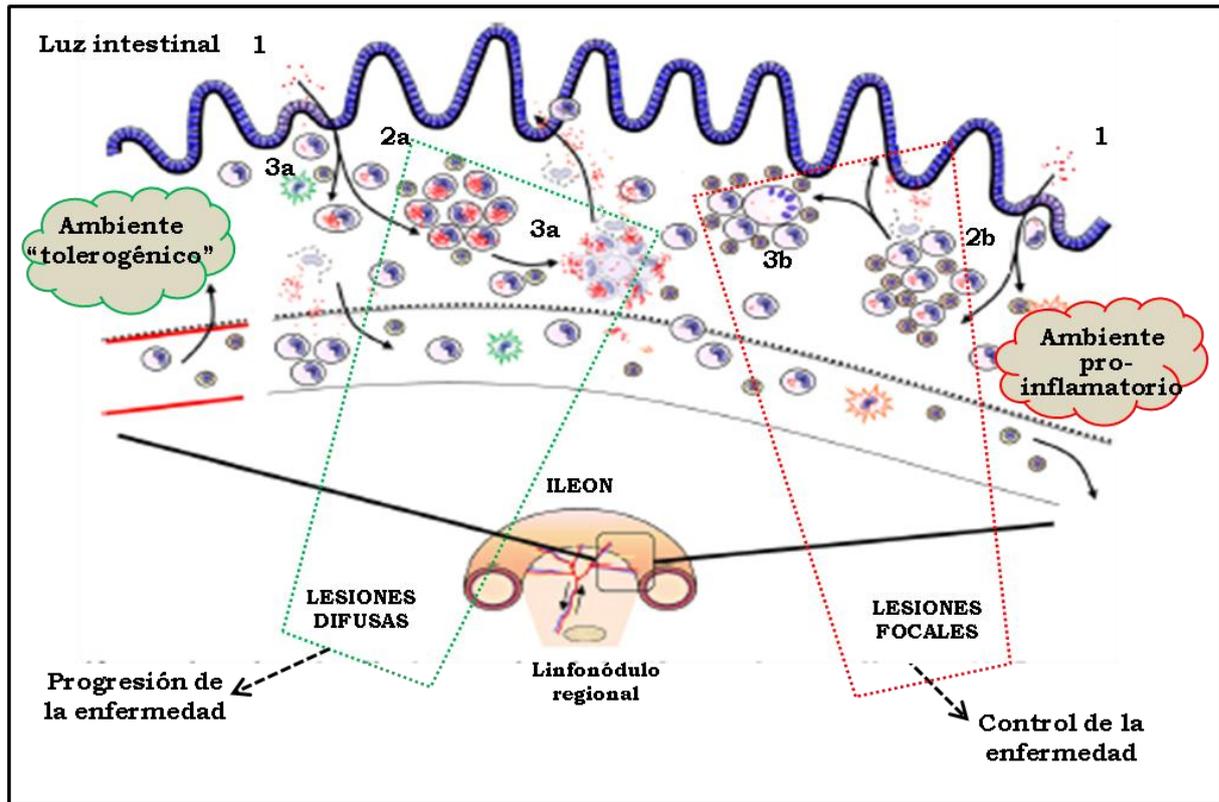


Figura 48. Escenarios hipotéticos en el primer contacto *Map*-huésped y su impacto sobre la progresión de la infección. 1- *Map* atraviesa la barrera intestinal y es rápidamente captada por los macrófagos subepiteliales. El microambiente de la lámina propia predominantemente tolerogénico (2a) o pro-inflamatorio (2b) puede influenciar fuertemente el resultado de esta primera interacción *Map*-macrófago permitiendo la replicación bacteriana intracelular y el desarrollo de lesiones difusas (3a) o bien limitando la replicación y controlando la infección en lesiones focales (3b). Las células fagocíticas que han captado antígeno se dirigen a los linfonódulos regionales donde podrán inducir la activación de linfocitos específicos efectores o reguladores/supresores. El tipo de respuesta inmune adaptativa que predomine, tendrá influencia también en el tipo de lesiones que se desarrollen y el grado de progresión de la enfermedad (González y col., 2005; Vázquez y col., 2013). Esta imagen fue modificada a partir de la publicada por Koets y col. (2015).

Teniendo en cuenta que la viabilidad intracelular de las micobacterias disminuye en células apoptóticas (Fratuzzi y col., 1997; Keane y col., 2000) y que la presentación antigénica y la activación de linfocitos T específicos mejora cuando las células dendríticas fagocitan micobacterias contenidas en cuerpos apoptóticos (Schaible y col., 2003; Winau y col., 2006; Behar y col., 2011), el aumento de la apoptosis detectado *in vitro* en presencia de los anticuerpos específicos podría resultar favorable para el control de la infección *in vivo*. De hecho, en función de las evidencias experimentales encontradas en el caso de la tuberculosis, se ha propuesto la búsqueda de vacunas pro-apotóticas con los fines de mejorar la

protección frente a esa enfermedad (Behar y col., 2011). En la **Figura 48** se esquematiza la patogenia de la paratuberculosis en dos escenarios hipotéticos diferentes, en los que el microambiente (tolerogénico *vs.* pro-inflamatorio) encontrado por *Map* al momento de la infección podría impactar fuertemente sobre el curso posterior de la misma.

Es necesario continuar y ampliar nuestras investigaciones para aproximarnos más a saber si la inmunidad mediada por anticuerpos juega un papel relevante en la prevención o en la progresión de la paratuberculosis en bovinos.

5.4. Proyección.

Se sabe que las secreciones lácteas contienen anticuerpos (Butler et al., 2005) y que su cantidad y especificidad pueden ser modificadas a través de la vacunación, en los bovinos (Thomsen y col., 2012; Tewari y col., 2014; Smith y col., 2015). Por lo tanto, las vacas inmunizadas podrían transferir anticuerpos específicos a sus crías a través de la vía mamaria. Por otro lado, también se ha demostrado que la IgG1 circulante puede ser translocada a la luz intestinal en terneros neonatos (Saif y col., 1983 y 1987; Besser y col., 1988 a y b). En este contexto, el escenario en el cual el primer contacto bacteria-huésped ocurriera con *Map* en forma de inmunocomplejos es probable. Si los anticuerpos colaboraran en la generación de un microambiente hostil para el establecimiento de la infección a nivel local, la inducción de una respuesta inmune humoral potente mediante la vacunación de las hembras podría constituir un objetivo importante para mejorar el control de la paratuberculosis. Con el mismo lineamiento, Kaufmann (2007) ha propuesto, para la prevención de la tuberculosis, el desarrollo de vacunas que induzcan anticuerpos opsonizantes en los alvéolos pulmonares, potencialmente capaces de mediar mecanismos de respuesta claves en el control temprano de la infección.

El desarrollo de una nueva generación de vacunas que permita mejorar el control de la paratuberculosis es uno de las metas actuales (Bull y col., 2014; Bannantine y col., 2014a; Rana y col., 2015) que cobra una dimensión particular en el contexto de nuestro país, en donde la importancia de la tuberculosis bovina y la posible interferencia con su control deben ser tenidas en cuenta. El grupo de Koets y colaboradores ha desarrollado una vacuna experimental a subunidades proteicas recombinantes, que en ensayos preliminares resultó ser una herramienta eficaz en el

control de la infección en bovinos. El estudio de la respuesta inmune desarrollada en los animales vacunados señaló a los anticuerpos como los principales mediadores de los mecanismos de protección luego del desafío (Koets y col., 2006; Santema y col., 2011; Santema y col., 2013).

Por otro lado, se han encontrado evidencias sobre la importancia de la avidéz (Perley y col., 2014) y la especificidad (Bothamley, 2014) de los anticuerpos en sus capacidad protectora, en estudios sobre la tuberculosis. Estas características deberían ser evaluadas en futuros ensayos sobre el papel de la respuesta inmune humoral en la protección frente a la paratuberculosis. Los anticuerpos inducidos a través de estrategias de inmunoprofilaxis podrían actuar como potenciadores de la respuesta inmune celular, en caso de ocurrir un primer contacto bacteria-huésped. Más aún, sería interesante considerar candidatos vacunales que pudieran estimular la producción de IgG1, tanto a nivel sistémico como de secreciones mamarias, isotipo que hemos encontrado asociado a mecanismos protectores tanto en esta tesis como en trabajos anteriores de nuestro grupo (Mundo y col., 2008; Jolly y col., 2011) y que, a diferencia de la IgG2 no suele aparecer en forma temprana en bovinos infectados con paratuberculosis (Koets y col., 2001; Fernández y col., 2012 y 2013). Para lograr este escenario en el que el primer contacto *Map*-huésped tuviera lugar en presencia de altos niveles de anticuerpos específicos, sería posible un plan que considerara la inmunoprofilaxis pasiva como herramienta preventiva, administrando suero hiperinmune a los terneros recién nacidos. Esta estrategia podría ser aplicable en establecimientos con alta presencia de la enfermedad. Otra estrategia potencial podría tener como eje central el diseño de una vacuna que no interfiriera con el diagnóstico de tuberculosis en los rodeos y que indujera altos títulos de anticuerpos específicos protectores en las hembras, a los fines de lograr la transferencia pasiva a las crías durante el calostro y la lactancia.

La consideración de antígenos glicolipídicos para el desarrollo de nuevas vacunas es una tendencia creciente (Nagy y Pál, 2008; Pozsgay, 2008; Astrónomo y Burton, 2010), y ha sido abarcada incluso en el campo de la paratuberculosis (Nguyen y col., 2009). Estos antígenos presentan algunas ventajas: en primer lugar, no están sujetos a mutaciones rápidas como podrían estarlo antígenos proteicos; en segundo lugar, son presentados a las células del sistema inmune a través de la vía de CD1, moléculas que poseen un polimorfismo poblacional limitado (Zwirner y Fainboim, 2005; Van Rhijn y col., 2006). Esto minimizaría las diferencias entre las capacidades individuales de presentación de un antígeno determinado en una población

genéticamente heterogénea. Particularmente, en el contexto de enfermedades micobacterianas en bovinos, la incorporación de antígenos glicolipídicos en las vacunas reduciría la posibilidad de interferencias en el diagnóstico de tuberculosis y paratuberculosis, ya que los antígenos empleados en esas pruebas son básicamente proteicos. La posible interferencia de la inmunización con LAM sobre la prueba de tuberculina fue un aspecto que consideramos en ensayos de inmunización anteriores, y no encontramos reacciones en 8 bovinos estudiados (Jolly y col., 2006; Jolly, 2011). Sin embargo, la naturaleza no proteica de estos antígenos determina que la obtención de los mismos mediante biotecnología recombinante sea dificultosa. Asimismo, la complejidad de sus estructuras impediría su biosíntesis *in vitro*. Una posible alternativa para aprovechar las ventajas de este tipo de antígenos sorteando los inconvenientes asociados a su obtención en grandes cantidades, sería la obtención de mimotopes peptídicos que imitaran la respuesta inmune inducida por los antígenos glicolipídicos. Las vacunas a mimotopes han demostrado inducir altos títulos de anticuerpos opsonizantes frente a antígenos capsulares (Datta y col., 2008), reducir la carga parasitaria en los animales (Costa y col., 2014) y conferir protección frente al desafío (Datta y col., 2008) en modelos murinos de Leishmaniasis y Criptococosis, otras infecciones por patógenos intracelulares. También han aportado resultados promisorios en la lucha contra el cáncer (Buhrman y Slansky, 2013). En lo que se refiere a la investigación de tuberculosis, esta alternativa inmunoprolifáctica ha sido probada en ratones, demostrando la inducción de una respuesta inmune específica (Gevorkian y col., 2005). Sin embargo, su capacidad protectora frente a la infección aun no ha sido evaluada. Como proyección de nuestra investigación, sería interesante considerar el desarrollo de una vacuna a subunidades que conjugara una proteína recombinante de *Map*, con inmunogenicidad probada y presencia de epítomos B y T descriptos, como la p34cx ya desarrollada en nuestro grupo (Ostrowski y col., 2003; Mundo y col., 2008; Fernández, 2016), con mimotopes de LAM.

A modo de reflexión final, este trabajo aporta nuevas evidencias sobre el papel de los anticuerpos en las infecciones por patógenos intracelulares, tanto *in vitro* como *in vivo*, y postula por primera vez la capacidad de los mismos de modular la apoptosis de macrófagos. Si bien la consideración de LAM como antígeno vacunal ha sido planteada en la prevención de la tuberculosis, la evaluación de la potencialidad protectora de los anticuerpos anti-LAM en el campo de la paratuberculosis en rumiantes resulta original. Asimismo, la posibilidad de identificar los antígenos

reconocidos por los anticuerpos de los bovinos infectados, que demostraron aquí tener el mayor efecto limitante de la infección, abriría otra línea de evaluación de candidatos vacunales. Esta investigación podría contribuir al diseño de nuevas vacunas para la prevención de la paratuberculosis bovina en nuestro país.

6. Referencias Bibliográficas

- Abendaño N, Juste RA, Alonso-Hearn M. 2013a. Anti-inflammatory and antiapoptotic responses to infection: a common denominator of human and bovine macrophages infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Biomed Res Int* 2013:908348. doi: 10.1155/2013/908348. Review.
- Abendaño N, Sevilla IA, Prieto JM, Garrido JM, Juste RA, Alonso-Hearn M. 2013b. *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* isolates from sheep and goats show reduced persistence in bovine macrophages than cattle, bison, deer and wild boar strains regardless of genotype. *Vet Microbiol* 163(3-4):325-34. doi: 10.1016/j.vetmic.2012.12.042.
- Abendaño N, Tyukalova L, Barandika JF, Balseiro A, Sevilla IA, Garrido JM, ..., Alonso-Hearn M. 2014. *Mycobacterium Avium* subsp. *paratuberculosis* isolates induce in vitro granuloma formation and show successful survival phenotype, common anti-inflammatory and antiapoptotic responses within ovine macrophages regardless of genotype or host of origin. *PLoS One* 9(8):e104238. doi: 10.1371/journal.pone.0104238.
- Aboagye G, Rowe MT. 2011. Occurrence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in raw water and water treatment operations for the production of potable water. *Water Res* 45(11):3271-8.
- Aguiló N, Marinova D, Martín C, Pardo J. 2013. ESX-1-induced apoptosis during mycobacterial infection: to be or not to be, that is the question. *Front Cell Infect Microbiol* 3:88. doi: 10.3389/fcimb.2013.00088. Review.
- AHA-AHC: Animal Health Australia, Animal Health Committee. 2011. <http://www.animalhealthaustralia.com.au/wp-content/uploads/2011/04/National-Johnes-Disease-Program-Standard-Definitions-and-Rules-for-Cattle.pdf> (acceso: 14/07/2015).
- Aho AD, McNulty AM, Coussens PM. 2003. Enhanced expression of interleukin-1alpha and tumor necrosis factor receptor-associated protein 1 in ileal tissues of cattle infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Infect Immun* 71(11):6479-86.
- Ainge GD, Hudson J, Larsen DS, Painter GF, Singh Gill G, Harper JL. 2006. Phosphatidylinositol mannosides: synthesis and suppression of allergic airway disease. *Bioorg Med Chem* 14(16):5632-42.
- Alexander DC, Turenne CY, Behr MA. 2009. Insertion and deletion events that define the pathogen *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *J Bacteriol* 191(3):1018-25. doi: 10.1128/JB.01340-08.
- Allen AJ, Park KT, Barrington GM, Lahmers KK, Hamilton MJ, Davis WC. 2009. Development of a bovine ileal cannulation model to study the immune response and mechanisms of pathogenesis of paratuberculosis. *Clin Vaccine Immunol* 16(4):453-63.
- Alpay F, Zare Y, Kamalludin MH, Huang X, Shi X, Shook GE, ..., Kirkpatrick BW. 2014. Genome-wide association study of susceptibility to infection by *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in Holstein cattle. *PLoS One* 9(12):e111704. doi: 10.1371/journal.pone.0111704.
- Alonso-Hearn M, Patel D, Danelishvili L, Meunier-Goddik L, Bermudez LE. 2008. The *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* MAP3464 gene encodes an oxidoreductase involved in invasion of bovine epithelial cells through the activation of host cell Cdc42. *Infect Immun* 76(1):170-8.

- Alonso-Hearn M, Eckstein TM, Sommer S, Bermudez LE. 2010. A *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* LuxR regulates cell envelope and virulence. *Innate Immun* 16(4):235-47.
- Aoki K, Matsumoto S, Hirayama Y, Wada T, Ozeki Y, Niki M, ..., Kobayashi K. 2004. Extracellular mycobacterial DNA-binding protein 1 participates in mycobacterium-lung epithelial cell interaction through hyaluronic acid. *J Biol Chem* 279(38):39798-806.
- Armstrong JA, Hart PD. 1975. Phagosome-lysosome interactions in cultured macrophages infected with virulent tubercle bacilli. Reversal of the usual nonfusion pattern and observations on bacterial survival. *J Exp Med* 142(1):1-16.
- Arrazuria R, Juste RA, Elguezabal N. 2016. Mycobacterial Infections in Rabbits: From the Wild to the Laboratory. *Transbound Emerg Dis* doi:10.1111/tbed.12474.
- Arru G, Caggiu E, Paulus K, Sechi GP, Mameli G, Sechi LA. 2016. Is there a role for *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in Parkinson's disease? *J Neuroimmunol* 293:86-90. doi: 10.1016/j.jneuroim.2016.02.016.
- Arsenault RJ, Li Y, Maattanen P, Scruten E, Doig K, Potter A, ..., Napper S. 2013. Altered Toll-like receptor 9 signaling in *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*-infected bovine monocytes reveals potential therapeutic targets. *Infect Immun* 81(1):226-37. doi: 10.1128/IAI.00785-12.
- Arsenault RJ, Maattanen P, Daigle J, Potter A, Griebel P, Napper S. 2014. From mouth to macrophage: mechanisms of innate immune subversion by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Vet Res* 45:54. doi:10.1186/1297-9716-45-54. Review.
- Astronomo RD, Burton DR. 2010. Carbohydrate vaccines: developing sweet solutions to sticky situations? *Nat Rev Drug Discov* 9(4):308-24.
- Atreya R, Bülte M, Gerlach GF, Goethe R, Hornef MW, Köhler H, ..., Weiss S. 2014. ZooMAP Consortium. Facts, myths and hypotheses on the zoonotic nature of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Int J Med Microbiol* 304(7):858-67.
- Ayele WY, Bartos M, Svastova P, Pavlik I. 2004. Distribution of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in organs of naturally infected bull-calves and breeding bulls. *Vet Microbiol* 103(3-4):209-17.
- Badi FA, Haroon AI, Alluwaimi AM. 2010. The gammadelta cells as marker of non-seroconverted cattle naturally infected with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Res Vet Sci* 88(1):72-6.
- Badie A, Moosakhani F, Hamidi A, Sami M. 2013. The effect of Protexin on prevention of ileocecal infection by *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in dairy calves. *J Dairy Sci* 96(10):6535-8. doi: 10.3168/jds.2012-5535.
- Balcewicz-Sablinska MK, Keane J, Kornfeld H, Remold HG. 1998. Pathogenic *Mycobacterium tuberculosis* evades apoptosis of host macrophages by release of TNF-R2, resulting in inactivation of TNF-alpha. *J Immunol* 161(5):2636-41.
- Baldwin CL, Telfer JC. 2015. The bovine model for elucidating the role of $\gamma\delta$ T cells in controlling infectious diseases of importance to cattle and humans. *Mol Immunol* 66(1):35-47.
- Bang, B. 1906. Chronische pseudotuberkulöse Darmentzündung beim Rinde. *Berliner Tierärztliche Wochenschrift* 50: 759-763.

- Bannantine JP, Zhang Q, Li LL, Kapur V. 2003. Genomic homogeneity between *Mycobacterium avium* subsp. *avium* and *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* belies their divergent growth rates. *BMC Microbiology* 3:10.
- Bannantine JP, Everman JL, Rose SJ, Babrak L, Katani R, Barletta RG, ..., Bermudez LE. 2008a. Evaluation of eight live attenuated vaccine candidates for protection against challenge with virulent *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in mice. *Front Cell Infect Microbiol* 4:88.
- Bannantine JP, Waters WR, Stabel JR, Palmer MV, Li L, Kapur V, Paustian ML. 2008b. Development and use of a partial *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* protein array. *Proteomics* 8(3):463-74. doi: 10.1002/pmic.200700644.
- Bannantine JP, Paustian ML, Kapur V, Eda S. 2010. Proteome and Antigens of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. En: Behr MA y Collins DM (eds.), *Paratuberculosis: organism, disease, control*. CABI International, 1er ed., cap. 10, pp. 94-102.
- Bannantine JP, Hines ME 2nd, Bermudez LE, Talaat AM, Sreevatsan S, Stabel JR, ..., Kapur V. 2014a. A rational framework for evaluating the next generation of vaccines against *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Front Cell Infect Microbiol* 4: 126. doi: 10.3389/fcimb.2014.00126.
- Bannantine JP, Li L, Mwangi M, Cote R, Raygoza Garay JA, Kapur V. 2014b. Complete Genome Sequence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, Isolated from Human Breast Milk. *Genome Announc* 2(1), pii: e01252-13. doi: 10.1128/genomeA.01252-13.
- Bannantine JP, Stabel JR, Laws E, D Cardieri MC, Souza CD. 2015. *Mycobacterium avium* Subspecies *paratuberculosis* Recombinant Proteins Modulate Antimycobacterial Functions of Bovine Macrophages. *PLoS One* 10(6):e0128966. doi: 10.1371/journal.pone.0128966.
- Baquero MM, Plattner BL. 2016. Bovine WC1(+) $\gamma\delta$ T lymphocytes modify monocyte-derived macrophage responses during early *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection. *Vet Immunol Immunopathol* 170:65-72. doi: 10.1016/j.vetimm.2015.12.002.
- 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(9-10):879-88.
- Basler T, Holtmann H, Abel J, Eckstein T, Baumer W, Valentin-Weigand P, , Goethe R. 2010. Reduced transcript stabilization restricts TNF-alpha expression in RAW264.7 macrophages infected with pathogenic mycobacteria: evidence for an involvement of lipomannan. *J Leukoc Biol* 87(1):173-83. doi: 10.1189/jlb.0309207.
- Bastida F, Juste RA. 2011. Paratuberculosis control: a review with a focus on vaccination. *J Immune Based Ther Vaccines* 9:8. doi: 10.1186/1476-8518-9-8
- Beard PM, Rhind SM, Buxton D, Daniels MJ, Henderson D, Pirie A, ..., Sharp JM. 2001. Natural paratuberculosis infection in rabbits in Scotland. *J Comp Pathol* 124(4):290-9.
- Beatty WL, Ullrich HJ, Russell DG. 2001. Mycobacterial surface moieties are released from infected macrophages by a constitutive exocytic event. *Eur J Cell Biol* 80(1):31-40.
- Begg DJ, Griffin JF. 2005. Vaccination of sheep against *M. paratuberculosis*: immune parameters and protective efficacy. *Vaccine* 23(42):4999-5008.

- Begg DJ, Whittington RJ. 2008. Experimental animal infection models for Johne's disease, an infectious enteropathy caused by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Vet J* 176(2):129-45.
- Begg DJ, de Silva K, Carter N, Plain KM, Purdie A, Whittington RJ. 2011. Does a Th1 over Th2 dominancy really exist in the early stages of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infections? *Immunobiology* 216(7):840-6. doi: 10.1016/j.imbio.2010.12.004.
- Begg DJ, de Silva K, Plain KM, Purdie AC, Dhand N, Whittington RJ. 2015. Specific faecal antibody responses in sheep infected with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Vet Immunol Immunopathol* 166(3-4):125-31. doi:10.1016/j.vetimm.2015.06.011.
- Behar SM, Divangahi M, Remold HG. 2010. Evasion of innate immunity by *Mycobacterium tuberculosis*: is death an exit strategy? *Nat Rev Microbiol* 8(9):668-74.
- Behar SM, Martin CJ, Nunes-Alves C, Divangahi M, Remold HG. 2011. Lipids, apoptosis, and cross-presentation: links in the chain of host defense against *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbes Infect* 13(8-9):749-56. Review.
- Bendixen PH, Bloch B, Jorgensen JB. 1981. Lack of intracellular degradation of *Mycobacterium paratuberculosis* by bovine macrophages infected *in vitro* and *in vivo*: light microscopic and electron microscopic observations. *Am J Vet Res* 42(1):109-13.
- Benedictus A, Mitchell RM, Linde-Widmann M, Sweeney R, Fyock T, Schukken YH, Whitlock RH. 2008. Transmission parameters of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infections in a dairy herd going through a control program. *Prev Vet Med* 83(3-4):215-27.
- Berger ST, Griffin FT. 2006. A comparison of ovine monocyte-derived macrophage function following infection with *Mycobacterium avium* ssp. *avium* and *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*. *Immunol Cell Biol* 84(4):349-56.
- Bermúdez LE, Petrofsky M, Sommer S, Barletta RG. 2010. Peyer's patch-deficient mice demonstrate that *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* translocates across the mucosal barrier via both M cells and enterocytes but has inefficient dissemination. *Infect Immun* 78(8):3570-7.
- Besser TE, Gay CC, McGuire TC, Evermann JF. 1988a. Passive immunity to bovine rotavirus infection associated with transfer of serum antibody into the intestinal lumen. *J Virol* 62(7): 2238-42.
- Besser TE, McGuire TC, Gay CC, Pritchett LC. 1988b. Transfer of functional immunoglobulin G (IgG) antibody into the gastrointestinal tract accounts for IgG clearance in calves. *J Virol* 62(7):2234-7.
- Bhattarai B, Fosgate GT, Osterstock JB, Fossler CP, Park SC, Roussel AJ. 2013. Comparison of calf weaning weight and associated economic variables between beef cows with and without serum antibodies against or isolation from feces of *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis*. *J Am Vet Med Assoc* 243(11):1609-15. doi: 10.2460/javma.243.11.1609.
- Billman-Jacobe H, Carrigan M, Cockram F, Corner LA, Gill IJ, Hill JF, ..., Wood PR. 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(2):25-8.

- Borrmann E, Möbius P, Diller R, Köhler H. 2011. Divergent cytokine responses of macrophages to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* strains of Types II and III in a standardized *in vitro* model. *Vet Microbiol* 152(1-2):101-11.
- Bothamley GH. 2014. Epitope-specific antibody levels in tuberculosis: biomarkers of protection, disease, and response to treatment. *Front Immunol* 5:243. doi: 10.3389/fimmu.2014.00243. Review.
- Botsaris G, Swift BM, Slana I, Liapi M, Christodoulou M, Hatzitofi M, ..., Rees CE. 2016. Detection of viable *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in powdered infant formula by phage-PCR and confirmed by culture. *Int J Food Microbiol* 216:91-4. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2015.09.011.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-54.
- Brady C, O'Grady D, O'Meara F, Egan J, Bassett H. 2008. Relationships between clinical signs, pathological changes and tissue distribution of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in 21 cows from herds affected by Johne's disease. *Vet Rec* 162(5):147-52.
- Branzk N, Lubojemska A, Hardison SE, Wang Q, Gutierrez MG, Brown GD, Papayannopoulos V. 2014. Neutrophils sense microbe size and selectively release neutrophil extracellular traps in response to large pathogens. *Nat Immunol* 15(11):1017-25.
- Brennan PJ, Nikaido H. 1995. The envelope of Mycobacteria. *Ann Rev Biochem* 64:29-63.
- Brennan PJ, Crick DC. 2007. The cell-wall core of *Mycobacterium tuberculosis* in the context of drug discovery. *Curr Top Med Chem* 7(5):475-88. Review.
- Briken V, Porcelli SA, Besra GS, Kremer L. 2004. Mycobacterial lipoarabinomannan and related lipoglycans: from biogenesis to modulation of the immune response. *Mol Microbiol* 53(2):391-403.
- Briken V. 2013. *Mycobacterium tuberculosis* genes involved in regulation of host cell death. *Adv Exp Med Biol* 783:93-102. doi: 10.1007/978-1-4614-6111-1_5. Review.
- Britton LE, Cassidy JP, O'Donovan J, Gordon SV, Markey B. 2015. Potential application of emerging diagnostic techniques to the diagnosis of bovine Johne's disease (paratuberculosis). *Vet J pii: S1090-0233(15)00442-6*. doi: 10.1016/j.tvjl.2015.10.033.
- Bryant B, Blyde D, Eamens G, Whittington R. 2012. *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* cultured from the feces of a Southern black rhinoceros (*Diceros bicornis minor*) with diarrhea and weight loss. *J Zoo Wildl Med* 43(2):391-3.
- Bryant J, Thibault VA, Sevilla I, Biet F, McLuckie J, Heron I, ..., Stevenson K. 2014. Exploration of phylogenetic relationships between strains of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* using genome sequencing. En: *Proceedings del XII Coloquio Internacional sobre Paratuberculosis (ICP)*, p.225. Parma, Italia.
- Buergelt CD, Hall C, McEntee K, Duncan JR. 1978. Pathological evaluation of paratuberculosis in naturally infected cattle. *Vet Pathol* 15(2):196-207.
- Buhrman JD, Slansky JE. 2013. Improving T cell responses to modified peptides in tumor vaccines. *Immunol Res* 55(1-3):34-47. Review.
- Bull TJ, McMinn EJ, Sidi-Boumedine K, Skull A, Durkin D, Neild P, ..., 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(7):2915-23.
- Bull TJ, Vrettou C, Linedale R, McGuinness C, Strain S, McNair J, ..., Hope JC. 2014. Immunity, safety and protection of an Adenovirus 5 prime—Modified Vaccinia virus Ankara boost subunit vaccine against *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection in calves. *Vet Res* 45: 112.
- Butler JE, Kehrlí ME Jr. 2005. Immunoglobulins and immunocytes in the mammary glands and its secretions. En: Mestecky J, Lamm ME, Strober W, Bienenstock J, McGee JR, Mayer L (eds.), *Mucosal immunology*. Elsevier Academic Press, 3er ed., cap. 103, pp. 1776-84.
- Cambier CJ, Takaki KK, Larson RP, Hernandez RE, Tobin DM, Urdahl KB, ..., Ramakrishnan L. 2014. Mycobacteria manipulate macrophage recruitment through coordinated use of membrane lipids. *Nature* 505(7482):218-22. doi: 10.1038/nature12799.
- Carlos P, Roupie V, Holbert S, Ascencio F, Huygen K, Gomez-Anduro G,..., Angulo C. 2015. In silico epitope analysis of unique and membrane associated proteins from *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* for immunogenicity and vaccine evaluation. *J Theor Biol* 384:1-9. doi: 10.1016/j.jtbi.2015.08.003.
- Carta T, Álvarez J, Pérez de la Lastra JM, Gortázar C. 2013. Wildlife and paratuberculosis: a review. *Res Vet Sci* 94(2):191-7. doi: 10.1016/j.rvsc.2012.11.002. Review.
- Casey JL, Sanalla AM, Tamvakis D, Thalmann C, Carroll EL, Parisi K, ..., Foley M. 2011. Peptides specific for *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection: diagnostic potential. *Protein Eng Des Sel* 24(8):589-96. doi: 10.1093/protein/gzr026.
- Casey ME, Meade KG, Nalpas NC, Taraktoglou M, Browne JA, Killick KE, ..., MacHugh DE. 2015. Analysis of the Bovine Monocyte-Derived Macrophage Response to *Mycobacterium avium* Subspecies *Paratuberculosis* Infection Using RNA-seq. *Front Immunol* 6:23. doi: 10.3389/fimmu.2015.00023.
- Castellanos E, Aranaz A, Gould KA, Linedale R, Stevenson K, Alvarez J, ..., Bull TJ. 2009. Discovery of stable and variable differences in the *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* type I, II, and III genomes by pan-genome microarray analysis. *Appl Environ Microbiol* 75(3):676-86. doi: 10.1128/AEM.01683-08. Erratum in: *Appl Environ Microbiol* 75(8):2603.
- Castellanos E, de Juan L, Domínguez L, Aranaz A. 2012. Progress in molecular typing of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Res Vet Sci* 92(2):169-79. doi: 10.1016/j.rvsc.2011.05.017.
- Cerf O, Griffiths M, Aziza F. 2007. Assessment of the prevalence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in commercially pasteurized milk. *Foodborne Pathog Dis* 4(4):433-47.
- Cha SB, Yoo A, Park HT, Sung KY, Shin MK, Yoo HS. 2013. Analysis of transcriptional profiles to discover biomarker candidates in *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*-infected macrophages, RAW 264.7. *J Microbiol Biotechnol* 23(8):1167-75.
- Charavaryamath C, Gonzalez-Cano P, Fries P, Gomis S, Doig K, Scruten E, ..., Griebel PJ. 2013. Host responses to persistent *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection in surgically isolated bovine ileal segments. *Clin Vaccine Immunol* 20(2):156-65.

- CHeCS: Cattle Health Certification Standards, United Kingdom. 2012. <http://www.checs.co.uk/> (acceso: 14/07/2015).
- Chen Z, O'Shea JJ. 2008. Th17 cells: a new fate for differentiating helper T cells. *Immunol Res* 41(2):87-102. doi: 10.1007/s12026-007-8014-9. Review.
- Chiang SK, Sommer S, Aho AD, Kiupel M, Colvin C, Tooker B, Coussens PM. 2007. Relationship between *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*, IL-1 α , and TRAF1 in primary bovine monocyte-derived macrophages. *Vet Immunol Immunopathol* 116(3-4):131-44.
- Chiodini RJ, Davis WC. 1992. The cellular immunology of bovine paratuberculosis: the predominant response is mediated by cytotoxic gamma/delta T lymphocytes which prevent CD4⁺ activity. *Microb Pathog* 13(6):447-63.
- Chiodini RJ, Davis WC. 1993. The cellular immunology of bovine paratuberculosis: immunity may be regulated by CD4⁺ helper and CD8⁺ immunoregulatory T lymphocytes which down-regulate gamma/delta⁺ T-cell cytotoxicity. *Microb Pathog* 14(5):355-67.
- Chiodini RJ, Hermon-Taylor J. 1993. The thermal resistance of *Mycobacterium paratuberculosis* in raw milk under conditions simulating pasteurization. *J Vet Diagn Invest* 5(4):629-31.
- Chua J, Deretic V. 2004. *Mycobacterium tuberculosis* reprograms waves of phosphatidylinositol 3-phosphate on phagosomal organelles. *J Biol Chem* 279(35):36982-92.
- CJDI: The Canadian Johne's Disease Initiative. 2009. <http://www.animalhealth.ca/Projects/Detail.aspx?id=21> (acceso: 14/07/2015).
- Clark DL Jr, Anderson JL, Koziczkowski JJ, Ellingson JL. 2006. Detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* genetic components in retail cheese curds purchased in Wisconsin and Minnesota by PCR. *Mol Cell Probes* 20(3-4):197-202.
- Clark RG, Griffin JF, Mackintosh CG. 2010. Johne's disease caused by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in red deer (*Cervus elaphus*): an histopathological grading system, and comparison of paucibacillary and multibacillary disease. *N Z Vet J* 58(2):90-7.
- Clarke CJ, Little D. 1996. The pathology of ovine paratuberculosis: gross and histological changes in the intestine and other tissues. *J Comp Pathol* 114(4):419-37.
- Clarke CJ. 1997. The pathology and pathogenesis of paratuberculosis in ruminants and other species. *J Comp Pathol* 116(3):217-61.
- Cleland PC, Lehmann DR, Phillips PH, Cousins DV, Reddacliff LA, Whittington RJ. 2010. A survey to detect the presence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in Kangaroo Island macropods. *Vet Microbiol* 145(3-4):339-46.
- Cocito C, Gilot P, Coene M, de Kesel M, Poupart P, Vannuffel P. 1994. Paratuberculosis. *Clin Microbiol Rev* 7(3):328-45. Review.
- Colavecchia SB, Fernández B, Jolly A, Minatel L, Hajos SE, Paolicchi FA, Mundo SL. 2016. Immunological findings associated with Argentinean strains of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in bovine models. *Vet Immunol Immunopathol* 176:28-33. doi: 10.1016/j.vetimm.2016.04.010.

- Cole ST, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, Harris D, ..., Barrell BG. 1998. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* 393(6685):537-44. Erratum in: *Nature* 396(6707):190.
- Collins DM, Gabric DM, De Lisle GW. 1989. Identification of a repetitive DNA sequence specific to *Mycobacterium paratuberculosis*. *FEMS Microbiol Lett* 51(1):175-8.
- Collins DM, Gabric DM, de Lisle GW. 1990. Identification of two groups of *Mycobacterium paratuberculosis* strains by restriction endonuclease analysis and DNA hybridization. *J Clin Microbiol* 28(7):1591-6.
- Collins DM, Cavaignac S, de Lisle GW. 1997. Use of four DNA insertion sequences to characterize strains of the *Mycobacterium avium* complex isolated from animals. *Mol Cell Probes* 11(5):373-80.
- Coombes BK, Coburn BA, Potter AA, Gomis S, Mirakhur K, Li Y, Finlay BB. 2005. Analysis of the contribution of *Salmonella* pathogenicity islands 1 and 2 to enteric disease progression using a novel bovine ileal loop model and a murine model of infectious enterocolitis. *Infect Immun* 73(11):7161-9.
- Cooney MA, Steele JL, Steinberg H, Talaat AM. 2014. A murine oral model for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection and immunomodulation with *Lactobacillus casei* ATCC 334. *Front Cell Infect Microbiol* 4:11. doi: 10.3389/fcimb.2014.00011.
- Corbeil LB. 2002. Antibodies as effectors. *Vet Immunol Immunopathol* 87(3-4):169-75. Review.
- Corn JL, Manning EJ, Sreevatsan S, Fischer JR. 2005. Isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from free-ranging birds and mammals on livestock premises. *Appl Environ Microbiol* 71(11):6963-7.
- Corpa JM, Pérez V, Sánchez MA, Marín JF. 2000. Control of paratuberculosis (Johne's disease) in goats by vaccination of adult animals. *Vet Rec* 146(7):195-6.
- Cossu D, Masala S, Frau J, Cocco E, Marrosu MG, Sechi LA. 2013. Anti *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* heat shock protein 70 antibodies in the sera of Sardinian patients with multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 335(1-2):131-3.
- Costa LE, Goulart LR, Pereira NC, Lima MI, Duarte MC, Martins VT, ..., Coelho EA. 2014. Mimotope-based vaccines of *Leishmania infantum* antigens and their protective efficacy against visceral leishmaniasis. *PLoS One* 9(10):e110014. doi: 10.1371/journal.pone.0110014.
- Cousins DV, Whittington R, Marsh I, Masters A, Evans RJ, Kluver P. 1999. Mycobacteria distinct from *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolated from the faeces of ruminants possess IS900-like sequences detectable IS900 polymerase chain reaction: implications for diagnosis. *Mol Cell Probes* 13(6):431-42.
- Coussens PM, Pudrith CB, Skovgaard K, Ren X, Suchyta SP, Stabel JR, Heegaard PM. 2005. Johne's disease in cattle is associated with enhanced expression of genes encoding IL-5, GATA-3, tissue inhibitors of matrix metalloproteinases 1 and 2, and factors promoting apoptosis in peripheral blood mononuclear cells. *Vet Immunol Immunopathol* 105(3-4):221-34.
- Coussens PM, Sipkovsky S, Murphy B, Roussey J, Colvin CJ. 2012. Regulatory T cells in cattle and their potential role in bovine paratuberculosis. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 35(3):233-9. doi: 10.1016/j.cimid.2012.01.004. Review.

- Dallenga T, Corleis B, Schaible UE. 2015. Infection of human neutrophils to study virulence properties of *Mycobacterium tuberculosis*. *Methods Mol Biol* 1285:343-55.
- Datta K, Lees A, Pirofski LA. 2008. Therapeutic efficacy of a conjugate vaccine containing a peptide mimotope of cryptococcal capsular polysaccharide glucuronoxylomannan. *Clin Vaccine Immunol* 15(8):1176-87.
- de Juan L, Mateos A, Domínguez L, Sharp JM, Stevenson K. 2005. Genetic diversity of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* isolates from goats detected by pulsed-field gel electrophoresis. *Vet Microbiol* 106(3-4):249-57.
- de Juan L, Alvarez J, Romero B, Bezos J, Castellanos E, Aranaz A, ..., Domínguez L. 2006. Comparison of four different culture media for isolation and growth of type II and type I/III *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* strains isolated from cattle and goats. *Appl Environ Microbiol* 72(9):5927-32.
- Dennis MM, Reddacliff LA, Whittington RJ. 2011. Longitudinal study of clinicopathological features of Johne's disease in sheep naturally exposed to *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Vet Pathol* 48(3):565-75. doi: 10.1177/0300985810375049.
- Derakhshani H, De Buck J, Mortier R, Barkema HW, Krause DO, Khafipour E. 2016. The Features of Fecal and Ileal Mucosa-Associated Microbiota in Dairy Calves during Early Infection with *Mycobacterium avium* Subspecies *paratuberculosis*. *Front Microbiol* 7:426. doi: 10.3389/fmicb.2016.00426.
- de Silva K, Begg D, Carter N, Taylor D, Di Fiore L, Whittington R. 2010. The early lymphocyte proliferation response in sheep exposed to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* compared to infection status. *Immunobiology* 215(1):12-25. doi: 10.1016/j.imbio.2009.01.014.
- de Silva K, M Plain K, J Begg D, C Purdie A, J Whittington R. 2015. CD4⁺ T-cells, $\gamma\delta$ T-cells and B-cells are associated with lack of vaccine protection in *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection. *Vaccine* 33(1):149-55.
- Diéguez FJ, Arnaiz I, Sanjuán ML, Vilar MJ, Yus E. 2008. Management practices associated with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection and the effects of the infection on dairy herds. *Vet Rec* 162(19):614-7.
- Dobson B, Liggett S, O'Brien R, Griffin JF. 2013. Innate immune markers that distinguish red deer (*Cervus elaphus*) selected for resistant or susceptible genotypes for Johne's disease. *Vet Res* 44:5. doi: 10.1186/1297-9716-44-5.
- Dolezel J, Bartos J, Voglmayr H, Greilhuber J. 2003. Nuclear DNA content and genome size of trout and human. *Cytometry A* 51(2):127-8.
- Donat K, Kube J, Dressel J, Einax E, Pfeffer M, Failing K. 2015. 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(5):975-85. doi: 10.1017/S0950268814002465.
- Donat K, Schmidt M, Köhler H, Sauter-Louis C. 2016. Management of the calving pen is a crucial factor for paratuberculosis control in large dairy herds. *J Dairy Sci* 99(5):3744-52. doi: 10.3168/jds.2015-10625.
- Dubois M. 1956. Colorimetric method for the determination of sugars and related substances. *Anal Chem* 28:350.

- Dudemaine PL, Fecteau G, Lessard M, Labrecque O, Roy JP, Bissonnette N. 2014. Increased blood-circulating interferon- γ , interleukin-17, and osteopontin levels in bovine paratuberculosis. *J Dairy Sci* 97(6):3382-93. doi:10.3168/jds.2013-7059.
- Durmuş S, Çakır T, Özgür A, Guthke R. 2015. A review on computational systems biology of pathogen-host interactions. *Front Microbiol* 6:235. doi: 10.3389/fmicb.2015.00235. Review.
- Eamens GJ, Whittington RJ, Marsh IB, Turner MJ, Saunders V, Kemsley PD, Rayward D. 2000. Comparative sensitivity of various faecal culture methods and ELISA in dairy cattle herds with endemic Johne's disease. *Vet Microbiol* 77 (3-4): 357-367.
- Eda S, Bannantine JP, Waters WR, Mori Y, Whitlock RH, Scott MC, Speer CA. 2006. A highly sensitive and subspecies-specific surface antigen enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of Johne's disease. *Clin Vaccine Immunol* 13(8):837-44.
- Eisenberg SW, Koets AP, Nielen M, Heederik D, Mortier R, De Buck J, Orsel K. 2011. Intestinal infection following aerosol challenge of calves with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Vet Res* 42:117. doi: 10.1186/1297-9716-42-117.
- 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(4):485-9. doi: 10.1017/S002202991300040X.
- Ekins R, Chu FW. 1999. Microarrays: their origins and applications. *Trends Biotechnol* 17(6):217-8.
- Elguezábal N, Bastida F, Sevilla IA, González N, Molina E, Garrido JM, Juste RA. 2011. Estimation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* growth parameters: strain characterization and comparison of methods. *Appl Environ Microbiol* 77(24):8615-24. doi: 10.1128/AEM.05818-11.
- Ellingson JL, Bolin CA, Stabel JR. 1998. Identification of a gene unique to *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* and application to diagnosis of paratuberculosis. *Mol Cell Probes* 12(3):133-42.
- Englund S, Bölske G, Johansson KE. 2002. An IS900-like sequence found in a *Mycobacterium* sp. other than *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *FEMS Microbiol Lett* 209(2):267-71.
- Eppleston J, Whittington RJ. 2001. Isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from the semen of rams with clinical Johne's disease. *Aust Vet J* 79(11):776-7.
- Eppleston J, Begg DJ, Dhand NK, Watt B, Whittington RJ. 2014. Environmental survival of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in different climatic zones of eastern Australia. *Appl Environ Microbiol* 80(8):2337-42.
- Espejo LA, Kubat N, Godden SM, Wells SJ. 2013. Effect of delayed exposure of cattle to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* on the development of subclinical and clinical Johne's disease. *Am J Vet Res* 74(10):1304-10. doi:10.2460/ajvr.74.10.1304.
- Estes DM, Brown WC. 2002. Type 1 and type 2 responses in regulation of Ig isotype expression in cattle. *Vet Immunol Immunopathol* 90(1-2):1-10. Review.
- Everman JL, Eckstein TM, Roussey J, Coussens P, Bannantine JP, Bermudez LE. 2015. Characterization of the inflammatory phenotype of *Mycobacterium avium* subspecies

- paratuberculosis* using a novel cell culture passage model. *Microbiology* 161(7):1420-34. doi: 10.1099/mic.0.000106.
- Everman JL, Bermudez LE. 2015. Antibodies against invasive phenotype-specific antigens increase *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* translocation across a polarized epithelial cell model and enhance killing by bovine macrophages. *Front Cell Infect Microbiol* 5:58. doi: 10.3389/fcimb.2015.00058.
- Faisal SM, Chen JW, Yan F, Chen TT, Useh NM, Yan W, ..., Chang YF. 2013a. Evaluation of a *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* leuD mutant as a vaccine candidate against challenge in a caprine model. *Clin Vaccine Immunol* 20(4):572-81.
- Faisal SM, Yan F, Chen TT, Useh NM, Guo S, Yan W, ..., Chang YF. 2013b. Evaluation of a *Salmonella* vectored vaccine expressing *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* antigens against challenge in a goat model. *PLoS One* 8(8):e70171.
- Faraco J. 1938. Bacillos de Hansen e cortes de parafina. 'Methodo complementar para a pesquisa de bacillos de Hansen em cortes de material incluido em parafina. *Rev Brasil Leprol* 6(2): I77-I80.
- Farrell D, Shaughnessy RG, Britton L, MacHugh DE, Markey B, Gordon SV. 2015. The Identification of Circulating miRNA in Bovine Serum and Their Potential as Novel Biomarkers of Early *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* Infection. *PLoS One* 10(7):e0134310. doi: 10.1371/journal.pone.0134310.
- Feng HM, Whitworth T, Popov V, Walker DH. 2004. Effect of antibody on the Rickettsia-host cell interaction. *Infect Immun* 72(6):3524-30.
- Feola RP, Collins MT, Czuprynski CJ. 1999. Hormonal modulation of phagocytosis and intracellular growth of *Mycobacterium avium* ss. *paratuberculosis* In bovine peripheral blood monocytes. *Microb Pathog* 26(1):1-11.
- Fernández B, Jolly A, Colavecchia S, Fernández E, Mundo S. 2011. Efecto de la infección de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* en la producción de anticuerpos bovinos. In *Vet* 13(1): 9-17.
- Fernández B, Gilardoni LR, Jolly A, Colavecchia SB, Paolicchi FA, Mundo SL. 2012. Detection of Bovine IgG Isotypes in a PPA-ELISA for Johne's Disease Diagnosis in Infected Herds. *Vet Med Int* 2012:145318. doi: 10.1155/2012/145318.
- Fernández B, Colavecchia S, Fortuny ML, Stempler A, Jolly A, Gilardoni L, Paolicchi FA, Mundo SL. 2013. "Early humoral immune response in calves experimentally infected with different genotypes of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*". Xth International Veterinary Immunology Symposium (IVIS). Milán, Italia.
- Fernández B. 2016. Respuesta inmune humoral inducida por proteínas de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* en bovinos (Tesis Doctoral). Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires, Argentina.
- Fernández-Silva JA, Abdulmawjood A, Akineden Ö, Bülte M. 2012. Genotypes of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from South American countries determined by two methods based on genomic repetitive sequences. *Trop Anim Health Prod* 44(6):1123-6. doi: 10.1007/s11250-011-0060-6.
- Fernández-Silva JA, Correa-Valencia NM, Ramírez NF. 2014. Systematic review of the prevalence of paratuberculosis in cattle, sheep, and goats in Latin America and the Caribbean. *Trop Anim Health Prod* 46(8):1321-40. doi: 10.1007/s11250-014-0656-8.

- Fite GL, Cambre PJ, Turner MH. 1947. Procedure for demonstrating lepra bacilli in paraffin sections. *Arch Path* 43(6): 624-5.
- Fitzgerald LE, Abendaño N, Juste RA, Alonso-Hearn M. 2014. Three-dimensional *in vitro* models of granuloma to study bacteria-host interactions, drug-susceptibility, and resuscitation of dormant mycobacteria. *Biomed Res Int* 2014:623856. doi: 10.1155/2014/623856.
- Fomsgaard A, Freudenberg MA, Galanos C. 1990. Modification of the silver staining technique to detect lipopolysaccharide in polyacrylamide gels. *J Clin Microbiol* 28(12):2627-31.
- Fratazzi C, Arbeit RD, Carini C, Remold HG. 1997. Programmed cell death of *Mycobacterium avium* serovar 4-infected human macrophages prevents the mycobacteria from spreading and induces mycobacterial growth inhibition by freshly added, uninfected macrophages. *J Immunol* 158(9):4320-7.
- Fritsch I, Luyven G, Köhler H, Lutz W, Möbius P. 2012. Suspicion of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* transmission between cattle and wild-living red deer (*Cervus elaphus*) by multitarget genotyping. *Appl Environ Microbiol* 78(4):1132-9.
- Gaikwad AN, Sinha S. 2008. Determinants of natural immunity against tuberculosis in an endemic setting: factors operating at the level of macrophage-*Mycobacterium tuberculosis* interaction. *Clin Exp Immunol* 151(3):414-22.
- Ganusov VV, Klinkenberg D, Bakker D, Koets AP. 2015. Evaluating contribution of the cellular and humoral immune responses to the control of shedding of *Mycobacterium avium* spp. *paratuberculosis* in cattle. *Vet Res* 46(1):62.
- Garcia AB, Shalloo L. 2015. Invited review: The economic impact and control of paratuberculosis in cattle. *J Dairy Sci* 98(8):5019-39. doi: 10.3168/jds.2014-9241.
- Garcia-Ispuerto I, López-Gatius F. 2016. Early Foetal Loss Correlates Positively with Seroconversion against *Mycobacterium avium paratuberculosis* in High-Producing Dairy Cows. *Reprod Domest Anim* doi:10.1111/rda.12670.
- Garrido JM, Vazquez P, Molina E, Plazaola JM, Sevilla IA, Geijo MV, ..., Juste RA. 2013. Paratuberculosis vaccination causes only limited cross-reactivity in the skin test for diagnosis of bovine tuberculosis. *PLoS One* 8(11):e80985. doi: 10.1371/journal.pone.0080985.
- Gaukler SM, Linz GM, Sherwood JS, Dyer NW, Bleier WJ, Wannemuehler YM, ..., Logue CM. 2009. *Escherichia coli*, *Salmonella*, and *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in wild European starlings at a Kansas cattle feedlot. *Avian Dis* 53(4):544-51.
- Geraghty T, Graham DA, Mullaney P, More SJ. 2014. A review of bovine Johne's disease control activities in 6 endemically infected countries. *Prev Vet Med* 116(1-2):1-11. doi: 10.1016/j.prevetmed.2014.06.003.
- Gevorkian G, Segura E, Acero G, Palma JP, Espitia C, Manoutcharian K, López-Marín LM. 2005. Peptide mimotopes of *Mycobacterium tuberculosis* carbohydrate immunodeterminants. *Biochem J* 387(Pt 2):411-7.
- Ghosh P, Steinberg H, Talaat AM. 2014. Virulence and immunity orchestrated by the global gene regulator sigL in *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Infect Immun* 82(7):3066-75.

- Ghosh P, Shippy DC, Talaat AM. 2015. Superior protection elicited by live-attenuated vaccines in the murine model of paratuberculosis. *Vaccine* 33(51):7262-70. doi: 10.1016/j.vaccine.2015.10.116.
- Gilardoni LR, Fernández B, Morsella C, Mendez L, Jar AM, Paolicchi FA, Mundo SL. 2016. *Mycobacterium paratuberculosis* detection in cow's milk in Argentina by immunomagnetic separation-PCR. *Braz J Microbiol* 47(2):506-12. doi: 10.1016/j.bjm.2016.01.013.
- Gilleron M, Quesniaux VF, Puzo G. 2003. Acylation state of the phosphatidylinositol hexamannosides from *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette Guerin and *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv and its implication in toll-like receptor response. *J Biol Chem* 278(32):29880-9.
- Gilot P, De Kesel M, Machtelinckx L, Coene M, Cocito C. 1993. Isolation and sequencing of the gene coding for an antigenic 34-kilodalton protein of *Mycobacterium paratuberculosis*. *J Bacteriol* 175(15):4930-5.
- Gioffré A, Echeverría-Valencia G, Arese A, Morsella C, Garbaccio S, Delgado F, ..., Romano MI. 2009. Characterization of the Apa antigen from *M. avium* subsp. *paratuberculosis*: a conserved *Mycobacterium* antigen that elicits a strong humoral response in cattle. *Vet Immunol Immunopathol* 132(2-4):199-208. doi: 10.1016/j.vetimm.2009.06.008.
- Gioffré A, Correa Muñoz M, Alvarado Pinedo MF, Vaca R, Morsella C, Fiorentino MA, Romano MI. 2015. Molecular typing of Argentinian *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolates by multiple-locus variable number-tandem repeat analysis. *Braz J Microbiol* 46(2):557-64. doi: 10.1590/S1517-838246220140283.
- Glatman-Freedman A, Casadevall A. 1998. Serum therapy for tuberculosis revisited: reappraisal of the role of antibody-mediated immunity against *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Microbiol Rev* 11(3):514-32. Review.
- Glatman-Freedman A, Mednick AJ, Lendvai N, Casadevall A. 2000. Clearance and organ distribution of *Mycobacterium tuberculosis* lipoarabinomannan (LAM) in the presence and absence of LAM-binding immunoglobulin M. *Infect Immun* 68(1):335-41.
- Gollnick NS, Mitchell RM, Baumgart M, Janagama HK, Sreevatsan S, Schukken YH. 2007. Survival of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in bovine monocyte-derived macrophages is not affected by host infection status but depends on the infecting bacterial genotype. *Vet Immunol Immunopathol* 120(3-4):93-105.
- González J, Geijo MV, García-Pariente C, Verna A, Corpa JM, Reyes LE, ..., Pérez V. 2005. Histopathological classification of lesions associated with natural paratuberculosis infection in cattle. *J Comp Pathol* 133(2-3):184-96.
- Green EP, Tizard ML, Moss MT, Thompson J, Winterbourne DJ, McFadden JJ, 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(22):9063-73.
- Guenin-Macé L, Siméone R, Demangel C. 2009. Lipids of pathogenic Mycobacteria: contributions to virulence and host immune suppression. *Transbound Emerg Dis* 56(6-7):255-68.
- Gumber S, Taylor DL, Whittington RJ. 2009. Evaluation of the immunogenicity of recombinant stress-associated proteins during *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection: Implications for pathogenesis and diagnosis. *Vet Microbiol* 137(3-4):290-6. doi: 10.1016/j.vetmic.2009.01.012.

- Gurung RB, Purdie AC, Begg DJ, Whittington RJ. 2012. In silico screened *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) recombinant proteins upregulated under stress conditions are immunogenic in sheep. *Vet Immunol Immunopathol* 149(3-4):186-96. doi: 10.1016/j.vetimm.2012.06.026.
- Gurung RB, Purdie AC, Whittington RJ, Begg DJ. 2014. Cellular and humoral immune responses in sheep vaccinated with candidate antigens MAP2698c and MAP3567 from *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Front Cell Infect Microbiol* 4:93.
- Guzman E, Hope J, Taylor G, Smith AL, Cubillos-Zapata C, Charleston B. 2014. Bovine $\gamma\delta$ T cells are a major regulatory T cell subset. *J Immunol* 193(1):208-22. doi: 10.4049/jimmunol.1303398.
- Hamasur B, Kallenius G, Svenson SB. 1999. A new rapid and simple method for large-scale purification of mycobacterial lipoarabinomannan. *FEMS Immunol Med Microbiol* 24(1):11-7.
- Hamasur B, Haile M, Pawlowski A, Schroder U, Kallenius G, Svenson SB. 2004. A mycobacterial lipoarabinomannan specific monoclonal antibody and its F(ab') fragment prolong survival of mice infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Exp Immunol* 138(1):30-8.
- Herr S, Huchzermeyer HF, Te Brugge LA, Williamson CC, Roos JA, Schiele GJ. 1985. The use of a single complement fixation test technique in bovine brucellosis, Johne's disease, dourine, equine piroplasmiasis and Q fever serology. *Onderstepoort J Vet Res* 52(4):279-82.
- Hines ME 2nd, Stabel JR, Sweeney RW, Griffin F, Talaat AM, Bakker D, ...,Whitlock RH. 2007. Experimental challenge models for Johne's disease: a review and proposed international guidelines. *Vet Microbiol* 122(3-4):197-222.
- Hirayama Y, Yoshimura M, Ozeki Y, Sugawara I, Udagawa T, Mizuno S, ..., Matsumoto S. 2009. Mycobacteria exploit host hyaluronan for efficient extracellular replication. *PLoS Pathog* 5(10):e1000643. doi: 10.1371/journal.ppat.1000643.
- Hoek A, Rutten VP, Kool J, Arkesteijn GJ, Bouwstra RJ, Van Rhijn I, Koets AP. 2009. Subpopulations of bovine WC1(+) gammadelta T cells rather than CD4(+)CD25(high)Foxp3(+) T cells act as immune regulatory cells *ex vivo*. *Vet Res* 40(1):6. doi: 10.1051/vetres:2008044.
- Hostetter J, Steadham E, Haynes J, Bailey T, Cheville N. 2003. Phagosomal maturation and intracellular survival of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in J774 cells. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 26(4):269-83.
- Hostetter J, Kagan R, Steadham E. 2005. Opsonization effects on *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*-macrophage interactions. *Clin Diagn Lab Immunol* 12(6):793-6.
- Hulten K, Karttunen TJ, El-Zimaity HM, Naser SA, Collins MT, Graham DY, El-Zaatari FA. 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(2):185-95.
- Hunter SW, Gaylord H, Brennan PJ. 1986. Structure and antigenicity of the phosphorylated lipopolysaccharide antigens from leprosy and tubercle bacilli. *Biol Chem* 261(26):12345-51.

- Ikonomopoulos J, Pavlik I, Bartos M, Svastova P, Ayele WY, Roubal P, ..., Gazouli M. 2005. Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in retail cheeses from Greece and the Czech Republic. *Appl Environ Microbiol* 71(12):8934-6.
- Igietseme JU, Eko FO, He Q, Black CM. 2004. Antibody regulation of Tcell immunity: implications for vaccine strategies against intracellular pathogens. *Expert Rev Vaccines* 3(1):23-34.
- Inderlied CB, Kemper CA, Bermudez LE. 1993. The *Mycobacterium avium* complex. *Clin Microbiol Rev* 6(3):266-310. Review.
- Ingratta G, Fernández B, Colavecchia S, Jolly A, Fortuny ML, Minatel L, Mundo SL. 2015. Intradermal reaction, bacterial load and pathological findings in calves experimentally infected calves with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolates from Argentina. XIvo Congreso de la Asociación Latinoamericana de Inmunología (ALAI). Medellín, Colombia.
- Janagama HK, Jeong K, Kapur V, Coussens P, Sreevatsan S. 2006. Cytokine responses of bovine macrophages to diverse clinical *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* strains. *BMC Microbiol* 6:10.
- Johne HA, Frothingham L. 1895. Ein eigenthümlicher Fall von Tuberculose beim Rind [A peculiar case of tuberculosis in a cow]. *Deutsche Zeitschrift für Tiermedizin und vergleichende. Pathologie* 21:438-55.
- Johnston CD, Bannantine JP, Govender R, Endersen L, Pletzer D, Weingart H, ..., Sleator RD. 2014. Enhanced expression of codon optimized *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* antigens in *Lactobacillus salivarius*. *Front Cell Infect Microbiol* 4:120. doi: 10.3389/fcimb.2014.00120.
- Joiner KA, Fuhrman SA, Miettinen HM, Kasper LH, Mellman I. 1990. *Toxoplasma gondii*: fusion competence of parasitophorous vacuoles in Fc receptor-transfected fibroblasts. *Science* 249(4969): 641-6.
- Joller N, Spörri R, Hilbi H, Oxenius A. 2007. Induction and protective role of antibodies in *Legionella pneumophila* infection. *Eur J Immunol* 37(12):3414-23.
- Joller N, Weber SS, Müller AJ, Spörri R, Selchow P, Sander P, ..., Oxenius A. 2010. Antibodies protect against intracellular bacteria by Fc receptor-mediated lysosomal targeting. *Proc Natl Acad Sci USA* 107(47):20441-6.
- Joller N, Weber SS, Oxenius A. 2011. Antibody-Fc receptor interactions in protection against intracellular pathogens. *Eur J Immunol* 41(4):889-97. Review.
- Jolly A, Colavecchia S, Jar A, Fernández E, Mundo S. 2006. Lipoarabinomannano (LAM) de *Mycobacterium sp.*: respuesta inmune inducida en terneros. *In Vet* 8:103-9.
- Jolly A, Colavecchia S, Fernández B, Fernández E, Mundo S. 2011. Antibodies induced by lipoarabinomannan in bovines: characterization and effects on the interaction between *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and macrophages *in vitro*. *Vet Med Int* 2011:258479. doi:10.4061/2011/258479.
- Jolly A. 2011. Anticuerpos bovinos frente a componentes glicolipídicos de *Mycobacterium avium*: su efecto en la interacción micobacteria - macrófago (Tesis de Maestría en Biotecnología). Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Argentina.

- Jolly A, Morsella C, Bass L, Fiorentino MA, Paolicchi FA, Mundo SL. 2013. Bovine Response to Lipoarabinomannan vaccination and challenge with *Mycobacterium paratuberculosis*. *Braz J Microbiol* 44 (2):511-14.
- Jolly A, Ingratta G, Mascaró M, Matias, Hajos S, Mundo S. 2016. Evaluation of hyaluronic acid in cattle: physiological variations related to age, parturition and in clinical cases of paratuberculosis . *J Vet Sci Tech* 7:342. doi:10.4172/2157-7579.1000342.
- Jostins L, Ripke S, Weersma RK, Duerr RH, McGovern DP, Hui KY, ..., Cho JH. 2012. Host-microbe interactions have shaped the genetic architecture of inflammatory bowel disease. *Nature* 491(7422):119-24. doi: 10.1038/nature11582.
- Jungersen G, Huda A, Hansen JJ, Lind P. 2002. Interpretation of the gamma interferon test for diagnosis of subclinical paratuberculosis in cattle. *Clin Diagn Lab Immunol* 9(2):453-60.
- Juste RA, Alonso-Hearn M, Molina E, Geijo M, Vázquez P, Sevilla IA, Garrido JM. 2009. Significant reduction in bacterial shedding and improvement in milk production in dairy farms after the use of a new inactivated paratuberculosis vaccine in a field trial. *BMC Res Notes* 2:233. doi:10.1186/1756-0500-2-233.
- Kabara E, Coussens PM. 2012. Infection of Primary Bovine Macrophages with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* suppresses Host Cell Apoptosis. *Front Microbiol* 3:215. doi: 10.3389/fmicb.2012.00215.
- Kaevska M, Lvoncik S, Slana I, Kulich P, Kralik P. 2014. Microscopy, culture, and quantitative real-time PCR examination confirm internalization of mycobacteria in plants. *Appl Environ Microbiol* 80(13):3888-94.
- Källenius G, Pawlowski A, Hamasur B, Svenson SB. 2008. Mycobacterial glycoconjugates as vaccine candidates against tuberculosis. *Trends Microbiol* 16(10):456-62. doi: 10.1016/j.tim.2008.07.007.
- Kaneko JJ. 1997. Serum proteins and dysproteinemias. En: Kaneko JJ, Harvey JW, Bruss ML (eds.), *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*, Academic Press Inc., 5ta ed., pp. 124-9.
- Kang PB, Azad AK, Torrelles JB, Kaufman TM, Beharka A, Tibesar E, Schlesinger LS. 2005. The human macrophage mannose receptor directs *Mycobacterium tuberculosis* lipoarabinomannan-mediated phagosome biogenesis. *J Exp Med* 202(7):987-99.
- Kan-Sutton C, Jagannath C, Hunter RL Jr. 2009. Trehalose 6,6'-dimycolate on the surface of *Mycobacterium tuberculosis* modulates surface marker expression for antigen presentation and costimulation in murine macrophages. *Microbes Infect* 11(1):40-8.
- Kantor IN, Torres PM, Morcillo N, Imaz MS, Sequeira MD. 2012. La tuberculosis zoonótica en la Argentina. *Medicina (B Aires)* 72(6):514-20. Review.
- Kapoor K, Singh O. 2015. Ileal and jejunal Peyer's patches in buffalo calves: Histomorphological comparison. *Vet World* 8(11):1273-8. doi:10.14202/vetworld.2015.1273-1278.
- Kathaperumal K, Park SU, McDonough S, Stehman S, Akey B, Huntley J, ..., Chang YF. 2008. Vaccination with recombinant *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* proteins induces differential immune responses and protects calves against infection by oral challenge. *Vaccine* 26(13):1652-63. doi: 10.1016/j.vaccine.2008.01.015.

- Kaufmann SHE. 2007. The contribution of immunology to the rational design of novel antibacterial vaccines. *Nat Rev Microbiol* 5(7):491-504.
- Kawaji S, Taylor DL, Mori Y, Whittington RJ. 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(1-2):36-48.
- Kawaji S, Zhong L, Whittington RJ. 2010. Partial proteome of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* under oxidative and nitrosative stress. *Vet Microbiol* 145(3-4):252-64. doi: 10.1016/j.vetmic.2010.03.025.
- Kawaji S, Begg DJ, Plain KM, Whittington RJ. 2011. A longitudinal study to evaluate the diagnostic potential of a direct faecal quantitative PCR test for Johne's disease in sheep. *Vet Microbiol* 148(1):35-44. doi: 10.1016/j.vetmic.2010.07.022.
- Keane J, Remold HG, Kornfeld H. 2000. Virulent *Mycobacterium tuberculosis* strains evade apoptosis of infected alveolar macrophages. *J Immunol* 164(4):2016-20.
- Kennedy AE, Da Silva AT, Byrne N, Govender R, MacSharry J, O'Mahony J, Sayers RG. 2014. The Single Intradermal Cervical Comparative Test Interferes with Johne's Disease ELISA Diagnostics. *Front Immunol* 5:564. doi: 10.3389/fimmu.2014.00564.
- Khalifeh MS, Stabel JR. 2004. Effects of gamma interferon, interleukin-10, and transforming growth factor beta on the survival of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in monocyte-derived macrophages from naturally infected cattle. *Infect Immun* 72(4):1974-82.
- Khan IA, Pilli S, A S, Rampal R, Chauhan SK, Tiwari V, ..., Ahuja V. 2016. Prevalence and Association of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* with Disease Course in Patients with Ulcero-Constrictive Ileocolonic Disease. *PLoS One* 11(3):e0152063. doi: 10.1371/journal.pone.0152063.
- Khare S, Nunes JS, Figueiredo JF, Lawhon SD, Rossetti CA, Gull T, ..., Adams LG. 2009. Early phase morphological lesions and transcriptional responses of bovine ileum infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Vet Pathol* 46(4):717-28.
- Khare S, Lawhon SD, Drake KL, Nunes JE, Figueiredo JF, Rossetti CA, ..., Adams LG. 2012. Systems biology analysis of gene expression during in vivo *Mycobacterium avium paratuberculosis* enteric colonization reveals role for immune tolerance. *PLoS One* 7(8):e42127. doi: 10.1371/journal.pone.0042127.
- Khol JL, Baumgartner W. 2012. Examples and suggestions for the control of paratuberculosis in European cattle. *Jpn J Vet Res* 60 Suppl:S1-7. Review.
- Khol JL, Pinedo PJ, Buergelt CD, Neumann LM, Rae DO. 2014. Lymphatic fluid for the detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in cows by PCR, compared to fecal sampling and detection of antibodies in blood and milk. *Vet Microbiol* 172(1-2):301-8. doi: 10.1016/j.vetmic.2014.05.022.
- Kim SG, Shin SJ, Jacobson RH, Miller LJ, Harpending PR, Stehman SM, ..., Lein DA. 2002. Development and application of quantitative polymerase chain reaction assay based on the ABI 7700 system (TaqMan) for detection and quantification of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *J Vet Diagn Invest* 14(2):126-31.
- Kim SG, Kim EH, Lafferty CJ, Miller LJ, Koo HJ, Stehman SM, Shin SJ. 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 Diagn Invest 16(5):448-53.
- Kim JM, Ku BK, Lee HN, Hwang IY, Jang YB, Kim J, ..., Jung SC. 2013. *Mycobacterium avium paratuberculosis* in wild boars in Korea. J Wildl Dis 49(2):413-7.
- Kim DH, Lee IH, Nam ST, Nam HJ, Kang JK, Seok H, ..., Kim H. 2014. Effect of antisera from *Clostridium difficile*-infected mice on toxin-A-induced colonic epithelial cell death signaling. J Microbiol Biotechnol 24(5): 696-703.
- Kirman J, Zakaria Z, McCoy K, Delahunt B, Le Gros G. 2000. Role of eosinophils in the pathogenesis of *Mycobacterium bovis* BCG infection in gamma interferon receptor-deficient mice. Infect Immun 68(5):2976-8.
- Klawonn W, Einax E, Pützschel R, Schmidt M, Donat K. 2016. Johne's disease: reliability of environmental sampling to characterize *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (MAP) infection in beef cow-calf herds. Epidemiol Infect 20:1-9.
- Klinkenberg D, Koets A. 2015. The long subclinical phase of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* infections explained without adaptive immunity. Vet Res 46:63. doi: 10.1186/s13567-015-0202-3.
- Koets AP, Rutten VP, 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 Immun 69(3):1492-8.
- Koets A, Rutten V, Hoek A, van Mil F, Müller K, Bakker D, ..., van Eden W. 2002. Progressive bovine paratuberculosis is associated with local loss of CD4(+) T cells, increased frequency of gamma delta T cells, and related changes in T-cell function. Infect Immun 70(7):3856-64.
- Koets A, Hoek A, Langelaar M, Overdijk M, Santema W, Franken P, ..., Rutten V. 2006. Mycobacterial 70 kD heat-shock protein is an effective subunit vaccine against bovine paratuberculosis. Vaccine 24(14): 2550-9.
- Koets A, Santema W, Mertens H, Oostenrijk D, Keestra M, Overdijk M, ..., Rutten V. 2010. Susceptibility to paratuberculosis infection in cattle is associated with single nucleotide polymorphisms in Toll-like receptor 2 which modulate immune responses against *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. Prev Vet Med 93(4):305-15.
- Koets AP, Eda S, Sreevatsan S. 2015. The within host dynamics of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* infection in cattle: where time and place matter. Vet Res 46(1):61. doi: 10.1186/s13567-015-0185-0.
- Köhler H, Gyra H, Zimmer K, Dräger KG, Burkert B, Lemser B, ..., Hess RG. 2001. Immune reactions in cattle after immunization with a *Mycobacterium paratuberculosis* vaccine and implications for the diagnosis of *M. paratuberculosis* and *M. bovis* infections. J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health 48(3):185-95.
- Körmendy B. 1994. The effect of vaccination on the prevalence of paratuberculosis in large dairy herds. Vet Microbiol 41(1-2):117-25.
- Kralik P, Slana I, Kralova A, Babak V, Whitlock RH, 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(1-2):133-8. doi: 10.1016/j.vetmic.2010.10.009.

- Krzyzowska M, Schollenberger A, Pawłowski A, Hamasur B, Winnicka A, Augustynowicz-Kopeć E, Niemiałtowski M. 2007. Lipoarabinomannan as a regulator of the monocyte apoptotic response to *Mycobacterium bovis* BCG Danish strain 1331 infection. *Pol J Microbiol* 56(2):89-96.
- Krzyzowska M, Malewski T, Hamasur B, Augustynowicz-Kopeć E, Schollenberger A, Pawłowski A, Niemiałtowski M. 2008. Gene expression profiling of lipoarabinomannan-treated mouse macrophage cultures infected with *Mycobacterium bovis* BCG. *Pol J Microbiol* 57(2):125-33.
- Kudahl AB, Nielsen SS, Østergaard S. 2008. Economy, efficacy, and feasibility of a risk-based control program against paratuberculosis. *J Dairy Sci* 91(12):4599-609. doi: 10.3168/jds.2008-1257.
- Künzler R, Torgerson P, Keller S, Wittenbrink M, Stephan R, Knubben-Schweizer G, ..., Meylan M. 2014. Observed management practices in relation to the risk of infection with paratuberculosis and to the spread of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Swiss dairy and beef herds. *BMC Vet Res* 10:132. doi: 10.1186/1746-6148-10-132.
- Kuo CJ, Bell H, Hsieh CL, Ptak CP, Chang YF. 2012. Novel mycobacteria antigen 85 complex binding motif on fibronectin. *J Biol Chem* 287(3):1892-902. doi: 10.1074/jbc.M111.298687.
- Küpper JD. 2014. Genetic and phenotypic aspects of infection with *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* in German Holstein cows (Tesis Doctoral). Faculty of Agricultural Sciences, Justus Liebig University Giessen, Alemania.
- Kurade NP, Tripathi BN, Rajukumar K, Parihar NS. 2004. Sequential development of histologic lesions and their relationship with bacterial isolation, fecal shedding, and immune responses during progressive stages of experimental infection of lambs with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Vet Pathol* 41(4):378-87.
- Lambrecht, RS, Carriere JF, Collins MT. 1988. A model for analyzing 493 growth kinetics of a slowly growing *Mycobacterium* sp. *Appl Environ Microbiol* 49 54:910-6.
- Lamont EA, Bannantine JP, Armién A, Ariyakumar DS, Sreevatsan S. 2012a. Identification and characterization of a spore-like morphotype in chronically starved *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* cultures. *PLoS One* 7(1):e30648. doi: 10.1371/journal.pone.0030648.
- Lamont EA, O'Grady SM, Davis WC, Eckstein T, Sreevatsan S. 2012b. Infection with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* results in rapid interleukin-1 β release and macrophage transepithelial migration. *Infect Immun* 80(9):3225-35.
- Lamont EA, Xu WW, Sreevatsan S. 2013. Host-*Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* interactome reveals a novel iron assimilation mechanism linked to nitric oxide stress during early infection. *BMC Genomics* 14:694. doi: 10.1186/1471-2164-14-694.
- Lamont EA, Talaat AM, Coussens PM, Bannantine JP, Grohn YT, Katani R, ..., Sreevatsan S. 2014. Screening of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* mutants for attenuation in a bovine monocyte-derived macrophage model. *Front Cell Infect Microbiol* 4:87. doi: 10.3389/fcimb.2014.00087.
- Langelaar MF, Hope JC, Rutten VP, Noordhuizen JP, van Eden W, Koets AP. 2005a. *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* recombinant heat shock protein 70 interaction with different bovine antigen-presenting cells. *Scand J Immunol* 61(3):242-50.

- Langelaar MF, Weber CN, Overdijk MB, Müller KE, Koets AP, Rutten VP. 2005b. Cytokine gene expression profiles of bovine dendritic cells after interaction with *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (*M.a.p.*), *Escherichia coli* (*E. coli*) or recombinant *M.a.p.* heat shock protein 70. *Vet Immunol Immunopathol* 107(1-2):153-61.
- Larsen AB, Kopecky KE. 1970. *Mycobacterium paratuberculosis* in reproductive organs and semen of bulls. *Am J Vet Res* 31(2):255-8.
- Lasco TM, Turner OC, Cassone L, Sugawara I, Yamada H, McMurray DN, Orme IM. 2004. Rapid accumulation of eosinophils in lung lesions in guinea pigs infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 72(2):1147-9.
- Lasta J. 2013. PLAN ARGENTINA INNOVADORA 2020. Producción animal tradicional (producción de carne en bovinos, aves y cerdos). Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación productiva. Argentina
- Laurin EL, Chaffer M, McClure JT, McKenna SL, Keefe GP. 2015. The association of detection method, season, and lactation stage on identification of fecal shedding in *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* infectious dairy cows. *J Dairy Sci* 98(1):211-20. doi: 10.3168/jds.2014-8406.
- Lavers CJ, McKenna SL, Dohoo IR, Barkema HW, Keefe GP. 2013. Evaluation of environmental fecal culture for *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* detection in dairy herds and association with apparent within-herd prevalence. *Can Vet J* 54(11):1053-60.
- Lee J1, Moon C, Kim J, Jung C, Lee KH, Joo HG, ..., Shin T. 2009. Immunohistochemical localization of galectin-3 in the granulomatous lesions of paratuberculosis-infected bovine intestine. *J Vet Sci* 10(3):177-80.
- Lefrancois LH, Bodier CC, Cochard T, Canepa S, Raze D, Lanotte P, ..., Biet F. 2013. Novel feature of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, highlighted by characterization of the heparin-binding hemagglutinin adhesin. *J Bacteriol* 195(21):4844-53. doi: 10.1128/JB.00671-13.
- Leite FL, Eslabão LB, Pesch B, Bannantine JP, Reinhardt TA, Stabel JR. 2015. ZAP-70, CTLA-4 and proximal T cell receptor signaling in cows infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Vet Immunol Immunopathol* 167(1-2):15-21. doi: 10.1016/j.vetimm.2015.06.017.
- Leroy B, Roupie V, Noël-Georis I, Rosseels V, Walravens K, Govaerts M, ..., Wattiez R. 2007. Antigen discovery: a postgenomic approach to paratuberculosis diagnosis. *Proteomics* 7(7):1164-76.
- Li L, Bannantine JP, Zhang Q, Amonsin A, May BJ, Alt D, ..., Kapur V. 2005. The complete genome sequence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 102(35):12344-9.
- Li Z, You Q, Ossa F, Mead P, Quinton M, Karrow NA. 2016. Assessment of yeast *Saccharomyces cerevisiae* component binding to *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* using bovine epithelial cells. *BMC Vet Res* 12:42. doi: 10.1186/s12917-016-0665-0.
- Lilenbaum W, Marassi CD, Vargas R, Medeiros L, Oelemann WM, Fonseca LS. 2009. Occurrence of false-positive results in three paratuberculosis - ELISAs performed in a tuberculous herd. *Vet Res Commun* 33(7):693-9. doi: 10.1007/s11259-009-9218-3.

- Liu J, Barry CE, Nikaido H. 1999. Cell wall: Physical structure and permeability. En: Ratledge C, Dale J (eds.), *Mycobacteria, Molecular Biology and Virulence*, Blackwell Science Ltd., cap. 12, pp. 221-2.
- Liu X, Feng Z, Harris NB, Cirillo JD, Bercovier H, Barletta RG. 2001. Identification of a secreted superoxide dismutase in *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*. *FEMS Microbiol Lett* 202(2):233-8.
- Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25(4):402-8.
- Lobry MA. 1963. Paratuberculosis in Tropical Africa. *Bull Epiz Dis Afr* 11(3):269-81.
- 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. doi: 10.1186/1746-6148-8-49.
- Lombard JE, Garry FB, McCluskey BJ, Wagner BA. 2005. Risk of removal and effects on milk production associated with paratuberculosis status in dairy cows. *J Am Vet Med Assoc* 227(12):1975-81.
- López Y, Yero D, Falero-Diaz G, Olivares N, Sarmiento ME, Sifontes S, ..., Acosta A. 2009. Induction of a protective response with an IgA monoclonal antibody against *Mycobacterium tuberculosis* 16kDa protein in a model of progressive pulmonary infection. *Int J Med Microbiol* 299(6):447-52.
- Lowe DM, Redford PS, Wilkinson RJ, O'Garra A, Martineau AR. 2012. Neutrophils in tuberculosis: friend or foe? *Trends Immunol* 33(1):14-25. Review.
- Lugton I. 1999. Mucosa-associated lymphoid tissues as sites for uptake, carriage and excretion of tubercle bacilli and other pathogenic mycobacteria. *Immunol Cell Biol* 77(4):364-72.
- Määttänen P, Trost B, Scruten E, Potter A, Kusalik A, Griebel P, Napper S. 2013. Divergent immune responses to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection correlate with kinome responses at the site of intestinal infection. *Infect Immun* 81(8):2861-72.
- Machugh DE, Taraktsoglou M, Killick KE, Nalpas NC, Browne JA, DE Park S, ..., Magee DA. 2012. Pan-genomic analysis of bovine monocyte-derived macrophage gene expression in response to in vitro infection with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Vet Res* 43:25. doi:10.1186/1297-9716-43-25.
- Magnano G, Schneider M, Carranza A, Bérnago E, Henriquez MB, Giraudo JA. 2002. Evaluación serológica de paratuberculosis en el sudoeste de la provincia de Córdoba, Argentina. *Vet Arg* 11:741-6.
- Magnano G, Schneider M, Bérnago E, Lovera H, Navarro F, Macías A, Giraudo J. 2012. Evaluación de brucelosis y tuberculosis bovina en establecimientos de cría y tambo de la región centro de Argentina. *Vet Arg* 29(290).
- Magombedze G, Eda S, Ganusov VV. 2014. Competition for antigen between Th1 and Th2 responses determines the timing of the immune response switch during *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection in ruminants. *PLoS Comput Biol* 10(1):e1003414. doi: 10.1371/journal.pcbi.1003414.

- Magombedze G, Eda S, Stabel J. 2015. Predicting the Role of IL-10 in the Regulation of the Adaptive Immune Responses in *Mycobacterium avium* Subsp. *paratuberculosis* Infections Using Mathematical Models. PLoS One 10(11):e0141539. doi: 10.1371/journal.pone.0141539.
- Majors AK, Austin RC, de la Motte CA, Pyeritz RE, Hascall VC, Kessler SP, ..., Strong SA. 2003. Endoplasmic reticulum stress induces hyaluronan deposition and leukocyte adhesion. J Biol Chem 278(47):47223-31.
- Mameli G, Cocco E, Frau J, Marrosu MG, Sechi LA. 2016. Epstein Barr Virus and *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* peptides are recognized in sera and cerebrospinal fluid of MS patients. Sci Rep 6:22401. doi: 10.1038/srep22401.
- Manning EJ, Collins MT. 2001. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: pathogen, pathogenesis and diagnosis. Rev Sci Tech 20(1):133-50.
- Manning EJB, Collins MT. 2010. Epidemiology of Paratuberculosis. En: Behr MA y Collins DM (eds.), Paratuberculosis: organism, disease, control. CABI International, 1er ed., cap. 3, pp. 22-8.
- Marce C, Ezanno P, Seegers H, Pfeiffer DU, Fourichon C. 2011. Withinherd contact structure and transmission of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in a persistently infected dairy cattle herd. Prev Vet Med 100(2):116-25.
- Marfell BJ, O'Brien R, Griffin JF. 2013. Global gene expression profiling of monocyte-derived macrophages from red deer (*Cervus elaphus*) genotypically resistant or susceptible to *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection. Dev Comp Immunol 40(2):210-7.
- Marino S, Myers A, Flynn JL, Kirschner DE. 2010. TNF and IL-10 are major factors in modulation of the phagocytic cell environment in lung and lymph node in tuberculosis: a next-generation two-compartmental model. J Theor Biol 265(4):586-98.
- Marrakchi H, Lan elle MA, Daff  M. 2014. Mycolic acids: structures, biosynthesis, and beyond. Chem Biol 21(1):67-85.
- Martinis Mercado DS, Cicuta ME, Boehringer SI, Morsella C, Paolicchi F. 2014. La Paratuberculosis y los bovinos lecheros de la provincia de Corrientes. <http://www.unne.edu.ar/unnevieja/Web/cyt/cyt/2002/04-Veterinarias/V-059.pdf> (acceso: 8/07/2015).
- Masala S, Cossu D, Palermo M, Sechi LA. 2014. Recognition of zinc transporter 8 and MAP3865c homologous epitopes by Hashimoto's thyroiditis subjects from Sardinia: a common target with type 1 diabetes? PLoS One 9(5):e97621.
- Masala S, Cossu D, Piccinini S, Rapini N, Mameli G, Manca Bitti ML, Sechi LA. 2015. Proinsulin and MAP3865c homologous epitopes are a target of antibody response in new-onset type 1 diabetes children from continental Italy. Pediatr Diabetes 16(3):189-95.
- Masuko T, Minami A, Iwasaki N, Majima T, Nishimura S, Lee YC. 2005. Carbohydrate analysis by a phenol-sulfuric acid method in microplate format. Anal Biochem 339(1):69-72.
- Matos AC, Figueira L, Martins MH, Matos M, Alvares S, Pinto ML, Coelho AC. 2013. Disseminated *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in two wild Eurasian otters (*Lutra lutra* L.) from Portugal. J Zoo Wildl Med 44(1):193-5.

- Matos AC, Figueira L, Martins MH, Loureiro F, Pinto ML, Matos M, Coelho AC. 2014. Survey of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in road-killed wild carnivores in Portugal. *J Zoo Wildl Med* 45(4):775-8.
- Matos AC, Andrade S, Figueira L, Matos M, Pires MA, Coelho AC, Pinto ML. 2016. Mesenteric lymph node granulomatous lesions in naturally infected wild boar (*Sus scrofa*) in Portugal-Histological, immunohistochemical and molecular aspects. *Vet Immunol Immunopathol* 173:21-6. doi: 0.1016/j.vetimm.2016.03.012.
- McAloon CG, Whyte P, More SJ, Green MJ, O'Grady L, Garcia A, Doherty ML. 2016. The effect of paratuberculosis on milk yield-A systematic review and meta-analysis. *J Dairy Sci* 99(2):1449-60. doi: 10.3168/jds.2015-10156.
- McKenna SL, Sockett DC, Keefe GP, McClure J, VanLeeuwen JA, Barkema HW. 2005. Comparison of two enzyme-linked immunosorbent assays for diagnosis of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *J Vet Diagn Invest* 17(5):463-6.
- Meissner G, Schröder KH, Amadio GE, Anz W, Chaparas S, Engel HW, ..., Wolinsky E. 1974. A co-operative numerical analysis of nonscoto- and nonphotochromogenic slowly growing mycobacteria. *J Gen Microbiol* 83(2):207-35.
- Mendoza JL, San-Pedro A, Culebras E, Cies R, Taxonera C, Lana R, ..., Díaz-Rubio M. 2010. High prevalence of viable *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in Crohn's disease. *World J Gastroenterol* 16(36):4558-63.
- Merkal RS, Curran BJ. 1974. Growth and metabolic characteristics of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Appl Microbiol* 28(2): 276-9.
- Mikkelsen H, Aagaard C, Nielsen SS, Jungersen G. 2011. Review of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* antigen candidates with diagnostic potential. *Vet Microbiol* 152(1-2):1-20. doi: 10.1016/j.vetmic.2011.03.006.
- Milner AR, Mack WN, Coates KJ, Hill J, Gill I, Sheldrick P. 1990. The sensitivity and specificity of a modified ELISA for the diagnosis of Johne's disease from a field trial in cattle. *Vet Microbiol* 25(2-3):193-8.
- Mokresh AH, Czuprynski CJ, Butler DG. 1989. A rabbit model for study of *Mycobacterium paratuberculosis* infection. *Infect Immun* 57(12):3798-807.
- Momotani E, Whipple DL, Thiermann AB, Cheville NF. 1988. Role of M cells and macrophages in the entrance of *Mycobacterium paratuberculosis* into domes of ileal Peyer's patches in calves. *Vet Pathol* 25(2):131-7.
- Mon ML, Viale M, Baschetti G, Alvarado Pinedo F, Gioffre A, Travería G, ..., Romano MI. 2012. Search for *Mycobacterium avium* Subspecies *paratuberculosis* Antigens for the Diagnosis of Paratuberculosis. *Vet Med Int* 2012:860362. doi: 10.1155/2012/860362.
- Monaghan ML, Doherty ML, Collins JD, Kazda JF, Quinn PJ. 1994. The tuberculin test. *Vet Microbiol* 40(1-2):111-24. Review.
- Mortier RA, Barkema HW, Bystrom JM, Illanes O, Orsel K, Wolf R, ..., De Buck J. 2013. Evaluation of age-dependent susceptibility in calves infected with two doses of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* using pathology and tissue culture. *Vet Res* 44:94. doi: 10.1186/1297-9716-44-94.

- Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. 1986. Two types of urine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 136(7):2348-57.
- Motiwala AS, Janagama HK, Paustian ML, Zhu X, Bannantine JP, Kapur V, Sreevatsan S. 2006. Comparative transcriptional analysis of human macrophages exposed to animal and human isolates of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* with diverse genotypes. *Infect Immun* 74(11):6046-56.
- Müller B, Dürr S, Alonso S, Hattendorf J, Laisse CJ, Parsons SD, ..., Zinsstag J. 2013. Zoonotic *Mycobacterium bovis*-induced tuberculosis in humans. *Emerg Infect Dis* 19(6):899-908. doi: 10.3201/eid1906.120543. Review.
- Mundo SL. 2005. Respuesta inmune en bovinos frente a *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (Tesis Doctoral). Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Argentina.
- Mundo SL, Fontanals AM, García M, Durrieu M, Alvarez E, Gentilini ER, Hajos SE. 2008. Bovine IgG1 antibodies against *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* protein p34-cx improve association of bacteria and macrophages. *Vet Res* 39(1):6.
- Mundo SL, Gilardoni LR, Hoffman FJ, Lopez OJ. 2013. Rapid and sensitive method to identify *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in cow's milk by DNA methylase genotyping. *Appl Environ Microbiol* 79(5):1612-8. doi: 10.1128/AEM.02719-12.
- Münster P, Völkel I, Wemheuer W, Schwarz D, Döring S, Czerny CP. 2013. A longitudinal study to characterize the distribution patterns of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* in semen, blood and faeces of a naturally infected bull by IS900 semi-nested and quantitative real-time PCR. *Transbound Emerg Dis* 60(2):175-87. doi: 10.1111/j.1865-1682.2012.01336.x.
- Murphy JT, Sommer S, Kabara EA, Verman N, Kuelbs MA, Saama P, ..., Coussens PM. 2006. Gene expression profiling of monocyte-derived macrophages following infection with *Mycobacterium avium* subspecies *avium* and *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Physiol Genomics* 28(1):67-75.
- Naessens J. 1998. Immunology of cattle. Immunoglobulins. En: Pastoret PP, Griebel P, Bazin H, Govaerts A (eds.), *Handbook of vertebrate immunology*, Academic Press, cap. 13.6, pp. 442.
- Nagata R, Kawaji S, Mori Y. 2013. Use of enoyl coenzyme A hydratase of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* for the serological diagnosis of Johne's disease. *Vet Immunol Immunopathol* 155(4):253-8. doi: 10.1016/j.vetimm.2013.06.020.
- Nagy G, Pál T. 2008. Lipopolysaccharide: a tool and target in enterobacterial vaccine development. *Biol Chem* 389(5):513-20.
- Naser SA, Sagrainsingh SR, Naser AS, Thanigachalam S. 2014. *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* causes Crohn's disease in some inflammatory bowel disease patients. *World J Gastroenterol* 20(23):7403-15.
- National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods. 2010. Assessment of food as a source of exposure to *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (MAP). *J Food Prot* 73(7):1357-97.
- Nazareth N, Magro F, Appelberg R, Silva J, Gracio D, Coelho R, ..., Sarmiento A. 2015. Increased viability but decreased culturability of *Mycobacterium avium* subsp.

- paratuberculosis* in macrophages from inflammatory bowel disease patients under Infliximab treatment. *Med Microbiol Immunol* 204(6):647-56. doi: 10.1007/s00430-015-0393-2.
- Nguyen TKA, Koets ADP, Santema WJ, van Eden W, Rutten V, Van Rhijn I. 2009. The mycobacterial glycolipid glucose monomycolate induces a memory T cell response comparable to a model protein antigen and no B cell response upon experimental vaccination of cattle. *Vaccine* 27:4818-25.
- Nicol L, Gossner A, Watkins C, Chianini F, Dalziel R, Hopkins J. 2016. Variations in IL-23 and IL-25 receptor gene structure, sequence and expression associated with the two disease forms of sheep paratuberculosis. *Vet Res* 47(1):27. doi: 10.1186/s13567-016-0314-4.
- Niederhorn JY, Shadduck JA. 1980. Role of antibody and complement in the control of *Encephalitozoon cuniculi* infections by rabbit macrophages. *Infect Immun* 27(3):995-1002.
- Nielsen SS, Kolmos B, Christoffersen AB. 2004. Comparison of contamination and growth of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* on two different media. *J Appl Microbiol* 96(1):149-53.
- Nielsen SS, Krogh MA, Enevoldsen C. 2009. Time to the occurrence of a decline in milk production in cows with various paratuberculosis antibody profiles. *J Dairy Sci* 92:149-55.
- Nielsen SS, Toft N. 2009. A review of prevalences of paratuberculosis in farmed animals in Europe. *Prev Vet Med* 88(1):1-14. doi: 10.1016/j.prevetmed.2008.07.003.
- Nielsen SS, Hansen KF, Kvist L, Kostoulas P. 2016. Dam's infection progress and within-herd prevalence as predictors of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* ELISA response in Danish Holstein cattle. *Prev Vet Med* 125:54-8. doi: 10.1016/j.prevetmed.2016.01.010.
- Nigou J, Gilleron M, Puzo G. 2003. Lipoarabinomannans: from structure to biosynthesis. *Biochimie* 85(1-2):153-66. Review.
- Oh SY, Mead PJ, Sharma BS, Quinton VM, Boermans HJ, Smith TK, ..., Karrow NA. 2015. Effect of *Penicillium* mycotoxins on the cytokine gene expression, reactive oxygen species production, and phagocytosis of bovine macrophage (BoMacs) function. *Toxicol In Vitro* 30(1 Pt B):446-53. doi: 10.1016/j.tiv.2015.09.017.
- OIE. 2014. Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres. Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE), cap. 2.1.11.
- Okuni JB. 2013. Occurrence of Paratuberculosis in African Countries: a Review. *B J Vet Adv* 3(1):1-8.
- Olsen I, Reitan LJ, Holstad G, Wiker HG. 2000. Alkyl hydroperoxide reductases C and D are major antigens constitutively expressed by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Infect Immun* 68(2):801-8.
- Olsen I, Johansen TB, Billman-Jacobe H, Nilsen SF, Djønne B. 2004. A novel IS element, ISMpa1, in *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Vet Microbiol* 98(3-4):297-306.
- Orczyk-Pawłowicz M, Hirnle L, Berghausen-Mazur M, Kałnik-Prastowska I. 2015. Terminal glycotope expression on milk fibronectin differs from plasma fibronectin and changes over lactation. *Clin Biochem* 48(3):167-73.

- Ostrowski M, Mundo SL, Harris NB, Barletta RG, Lopez OJ. 2003. B-cell epitopes in the immunodominant p34 antigen of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* recognized by antibodies from infected cattle. *Scand J Immunol* 58(5):511-21.
- Otsuka A, Matsunaga I, Komori T, Tomita K, Toda Y, Manabe T, ..., Sugita M. 2008. Trehalose dimycolate elicits eosinophilic skin hypersensitivity in mycobacteria-infected guinea pigs. *J Immunol* 181(12):8528-33.
- Ott SL, Wells SJ, Wagner BA. 1999. Herd-level economic losses associated with Johne's disease on US dairy operations. *Prev Vet Med* 40(3-4):179-92.
- Pant SD, Verschoor CP, Skelding AM, Schenkel FS, You Q, Biggar GA, ..., Karrow NA. 2011. Bovine IFNGR2, IL12RB1, IL12RB2, and IL23R polymorphisms and MAP infection status. *Mamm Genome* 22(9-10):583-8.
- Paolicchi F. 2004. Paratuberculosis: aspectos clínico-patológicos y su impacto en la producción (Parte 1). XXXIIvas Jornadas Uruguayas de Buiatría, p. 127. Paysandú, Uruguay.
- Paolicchi F, Cirone K, Morsella C, Gioffré A. 2012. First isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from commercial pasteurized milk in Argentina. *Braz J Microbiol* 43(3):1034-7. doi: 10.1590/S1517-838220120003000028.
- Paolicchi F, Cirone K, Morsella C, Gioffré A. 2014. Aislamiento de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* desde feto bovino: primer reporte en Argentina. XX Reunión Científico Técnica de la AAVLD, Tucumán, Argentina.
- Park KT, Allen AJ, Bannantine JP, Seo KS, Hamilton MJ, Abdellrazeq GS, ..., Davis WC. 2011. Evaluation of two mutants of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* as candidates for a live attenuated vaccine for Johne's disease. *Vaccine* 29(29-30):4709-19.
- Park HE, Shin MK, Park HT, Jung M, Cho YI, Yoo HS. 2016. Gene expression profiles of putative biomarker candidates in *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*-infected cattle. *Pathog Dis* 74(4). doi: 10.1093/femspd/ftw022.
- Passucci JA, Traversa MJ, de Hagen J, Jorge MC, Schettino DM, Sanz HE. 2007. Análisis económico del saneamiento de paratuberculosis en un rodeo de cria bovina. *Rev Arg Prod Anim* 27(supl. 1):337-8.
- Patel D, Danelishvili L, Yamazaki Y, Alonso M, Paustian ML, Bannantine JP, ..., Bermudez LE. 2006. The ability of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* to enter bovine epithelial cells is influenced by preexposure to a hyperosmolar environment and intracellular passage in bovine mammary epithelial cells. *Infect Immun* 74(5):2849-55.
- Pauciullo A, Küpper J, Brandt H, Donat K, Iannuzzi L, Erhardt G. 2015. Wingless-type MMTV integration site family member 2 (WNT2) gene is associated with resistance to MAP in faecal culture and antibody response in Holstein cattle. *Anim Genet* 46(2):122-32. doi: 10.1111/age.12261
- Paustian ML, Amonsin A, Kapur V, Bannantine JP. 2004. Characterization of novel coding sequences specific to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: implications for diagnosis of Johne's Disease. *J Clin Microbiol* 42(6):2675-81.
- Paustian ML, Zhu X, Sreevatsan S, Robbe-Austerman S, Kapur V, Bannantine JP. 2008. Comparative genomic analysis of *Mycobacterium avium* subspecies obtained from multiple host species. *BMC Genomics* 9:135. doi: 10.1186/1471-2164-9-135.

- Pavlik I, Matlova L, Bartl J, Svastova P, Dvorska L, Whitlock R. 2000. Parallel faecal and organ *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* culture of different productivity types of cattle. *Vet Microbiol* 77(3-4):309-24.
- Pérez V, García Marín JF, Badiola JJ. 1996. Description and classification of different types of lesion associated with natural paratuberculosis infection in sheep. *J Comp Pathol* 114(2):107-122.
- Pérez V, Tellechea J, Corpa JM, Gutiérrez M, García Marín JF. 1999. Relation between pathologic findings and cellular immune responses in sheep with naturally acquired paratuberculosis. *Am J Vet Res* 60(1):123-7.
- Periasamy S, Tripathi BN, Singh N. 2013. Mechanisms of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* induced apoptosis and necrosis in bovine macrophages. *Vet Microbiol* 165(3-4):392-401.
- Perley CC, Frahm M, Click EM, Dobos KM, Ferrari G, Stout JE, Frothingham R. 2014. The human antibody response to the surface of *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS One* 9(2):e98938.
- Pinedo PJ, Buergelt CD, Donovan GA, Melendez P, Morel L, Wu R, ..., Rae DO. 2009. Candidate gene polymorphisms (BoIFNG, TLR4, SLC11A1) as risk factors for paratuberculosis infection in cattle. *Prev Vet Med* 91(2-4):189-96.
- Plain KM, Marsh IB, Waldron AM, Galea F, Whittington AM, Saunders VF, ..., Whittington RJ. 2014. High-throughput direct fecal PCR assay for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in sheep and cattle. *J Clin Microbiol* 52(3):745-57. doi: 10.1128/JCM.03233-13.
- Plattner BL, Doyle RT, Hostetter JM. 2009. Gamma-delta T cell subsets are differentially associated with granuloma development and organization in a bovine model of mycobacterial disease. *Int J Exp Pathol* 90(6):587-97.
- Plattner BL, Chiang YW, Roth JA, Platt R, Huffman E, Zylstra J, Hostetter JM. 2011. Direct inoculation of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* into ileocecal Peyer's patches results in colonization of the intestine in a calf model. *Vet Pathol* 48(3):584-92.
- Plattner BL, Hostetter JM. 2011. Comparative gamma delta T cell immunology: a focus on mycobacterial disease in cattle. *Vet Med Int* 2011:214384.
- Plattner BL, Huffman EL, Hostetter JM. 2013. Gamma-delta T-cell responses during subcutaneous *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* challenge in sensitized or naive calves using matrix biopolymers. *Vet Pathol* 50(4):630-7.
- Plattner BL, Huffman E, Jones DE, Hostetter JM. 2014. T lymphocyte responses during early enteric *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection in cattle. *Vet Immunol Immunopathol* 157(1-2):12-9.
- Ponnusamy D, Periasamy S, Tripathi BN, Pal A. 2013. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* invades through M cells and enterocytes across ileal and jejuna mucosa of lambs. *Res Vet Sci* 94(2):306-12.
- Po Po S, Zuki ABZ, Zamri-Saad M, Rahman-Omar A, Effendy AW. 2005. Morphological Study of the Jejunal and Ileal Peyer's Patches of Three-month Old Calves. *J Anim Vet Adv* 4: 579-89.
- Porcelli SA, Jacobs WR Jr. 2008. Tuberculosis: unsealing the apoptotic envelope. *Nat Immunol* 9(10):1101-2. Review.

- Poupart P, Coene M, Van Heuverswyn H, Cocito C. 1993. Preparation of a specific RNA probe for detection of *Mycobacterium paratuberculosis* and diagnosis of Johne's disease. *J Clin Microbiol* 31(6):1601-5.
- Pozsgay V. 2008. Recent developments in synthetic oligosaccharide-based bacterial vaccines. *Curr Top Med Chem* 8(2):126-40.
- Radomski N, Thibault VC, Karoui C, de Cruz K, Cochard T, Gutiérrez C, ..., Boschiroli ML. 2010. Determination of genotypic diversity of *Mycobacterium avium* subspecies from human and animal origins by mycobacterial interspersed repetitive-unit-variable-number tandem-repeat and IS1311 restriction fragment length polymorphism typing methods. *J Clin Microbiol* 48(4):1026-34. doi: 10.1128/JCM.01869-09.
- Ralph P, Moore MA, Nilsson K. 1976 Lysozyme synthesis by established human and murine histiocytic lymphoma cell lines. *J Exp Med* 143(6):1528-33.
- Ralph P, Prichard J, Cohn M. 1975. Reticulum cell sarcoma: an effector cell in antibody-dependent cell-mediated immunity. *J Immunol* 114(2 pt 2):898-905.
- Rana A, Rub A, Akhter Y. 2015. Proteome-wide B and T cell epitope repertoires in outer membrane proteins of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* have vaccine and diagnostic relevance: a holistic approach. *J Mol Recognit* doi: 10.1002/jmr.2458.
- Rana A, Akhter Y. 2016. A multi-subunit based, thermodynamically stable model vaccine using combined immunoinformatics and protein structure based approach. *Immunobiology* 221(4):544-57. doi: 10.1016/j.imbio.2015.12.004.
- Rani PS, Doddam SN, Agrawal S, Hasnain SE, Sechi LA, Kumar A, Ahmed N. 2014. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* is not discerned in diabetes mellitus patients in Hyderabad, India. *Int J Med Microbiol* 304(5-6):620-5.
- Raschke WC, Baird S, Ralph P, Nakoinz I. 1978. Functional macrophage cell lines transformed by Abelson leukemia virus. *Cell* 15(1):261-7.
- Rathnaiah G, Lamont EA, Harris NB, Fenton RJ, Zinniel DK, Liu X, ..., Barletta RG. 2014. Generation and screening of a comprehensive *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* transposon mutant bank. *Front Cell Infect Microbiol* 4:144.
- Rathnaiah G, Bannantine JP, Bayles DO, Zinniel DK, Stabel JR, Gröhn YT, Barletta RG. 2016. Analysis of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* Mutant Libraries Reveals Loci-dependent transposition Biases and Strategies to Novel Mutant Discovery. *Microbiology*. doi: 10.1099/mic.0.000258.
- Reddacliff LA, Vadalía A, Whittington RJ. 2003. The effect of decontamination protocols on the numbers of sheep strain *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolated from tissues and faeces. *Vet Microbiol* 95(4):271-82.
- 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(1-3):77-90.
- Reddacliff LA, Marsh IB, Fell SA, Austin SL, Whittington RJ. 2010. Isolation of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* from muscle and peripheral lymph nodes using acid-pepsin digest prior to BACTEC culture. *Vet Microbiol* 145(1-2):122-8.

- Reichel MP, Kittelberger R, Penrose ME, Meynell RM, Cousins D, Ellis T, ..., de Lisle GW. 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* 66:135-50.
- Reynolds JD, Morris B. 1983. The evolution and involution of Peyer's patches in fetal and postnatal sheep. *Eur J Immunol* 13(8):627-35.
- Rhodes SG, Hewinson RG, Vordermeier HM. 2001. Antigen recognition and immunomodulation by gamma delta T cells in bovine tuberculosis. *J Immunol* 166(9):5604-10.
- Rhodes G, Richardson H, Hermon-Taylor J, Weightman A, Higham A, Pickup R. 2014. *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*: Human Exposure through Environmental and Domestic Aerosols. *Pathogens* 3(3):577-95.
- Ridge SE, Morgan IR, Sockett DC, Collins MT, Condrón RJ, Skilbeck NW, Webber JJ. 1991. Comparison of the Johne's absorbed EIA and the complement-fixation test for the diagnosis of Johne's disease in cattle. *Aust Vet J* 68(8):253-7. Erratum in: *Aust Vet J* 68(12):399.
- Rienksma RA, Suarez-Diez M, Mollenkopf HJ, Dolganov GM, Dorhoi A, Schoolnik GK, ..., Gengenbacher M. 2015. Comprehensive insights into transcriptional adaptation of intracellular mycobacteria by microbe-enriched dual RNA sequencing. *BMC Genomics* 16:34. doi:10.1186/s12864-014-1197-2.
- Robinson N, Kolter T, Wolke M, Rybniker J, Hartmann P, Plum G. 2008. Mycobacterial phenolic glycolipid inhibits phagosome maturation and subverts the pro-inflammatory cytokine response. *Traffic* 9(11):1936-47.
- Roderfeld M, Koc A, Rath T, Blöcher S, Tschuschner A, Akineden Ö, ..., Roeb E. 2012. Induction of matrix metalloproteinases and TLR2 and 6 in murine colon after oral exposure to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Microbes Infect* 14(6):545-53.
- Rodrigues MF, Barsante MM, Alves CC, Souza MA, Ferreira AP, Amarante-Mendes GP, Teixeira HC. 2009. Apoptosis of macrophages during pulmonary *Mycobacterium bovis* infection: correlation with intracellular bacillary load and cytokine levels. *Immunology* 128(1 Suppl):e691-9. doi: 10.1111/j.1365-2567.2009.03062.x.
- Rojas M, Olivier M, Gros P, Barrera LF, García LF. 1999. TNF- α and il-10 modulate the induction of apoptosis by virulent *Mycobacterium tuberculosis* in murine macrophages. *J Immunol* 162(10):6122-31
- Rojas M, García LF, Nigou J, Puzo G, Olivier M. 2000. Mannosylated lipoarabinomannan antagonizes *Mycobacterium tuberculosis*-induced macrophage apoptosis by altering Ca²⁺-dependent cell signaling. *J Infect Dis* 182(1):240-51.
- Romano MI, Amadio A, Bigi F, Klepp L, Etchechoury I, Llana MN, ..., Cataldi A. 2005. Further analysis of VNTR and MIRU in the genome of *Mycobacterium avium* complex, and application to molecular epidemiology of isolates from South America. *Vet Microbiol* 110(3-4):221-37.
- Rothel JS, Jones SL, Corner LA, Cox JC, Wood PR. 1990. A sandwich enzyme immunoassay for bovine interferon-gamma and its use for the detection of tuberculosis in cattle. *Aust Vet J* 67(4):134-7.

- Roupie V, Viart S, Leroy B, Romano M, Trincherio N, Govaerts M, ..., Huygen K. 2012. Immunogenicity of eight *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* specific antigens in DNA vaccinated and *Map* infected mice. *Vet Immunol Immunopathol* 145(1-2):74-85.
- Roussey JA, Oliveira LJ, Langohr IM, Sledge DG, Coussens PM. 2016. Regulatory T cells and immune profiling in johnes disease lesions. *Vet Immunol Immunopathol* pii: S0165-2427(16)30033-2. doi: 10.1016/j.vetimm.2016.03.008.
- Rue-Albrecht K, Magee DA, Killick KE, Nalpas NC, Gordon SV, MacHugh DE. 2014. Comparative functional genomics and the bovine macrophage response to strains of the mycobacterium genus. *Front Immunol* 5:536. doi:10.3389/fimmu.2014.00536. Review.
- Ruiz-Larrañaga O, Garrido JM, Iriondo M, Manzano C, Molina E, Montes I, Vazquez P, ..., Estonba A. 2010. SP110 as a novel susceptibility gene for *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection in cattle. *J Dairy Sci* 93(12):5950-8.
- Rumsey J, Valentine JF, Naser SA. 2006. Inhibition of phagosome maturation and survival of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in polymorphonuclear leukocytes from Crohn's disease patients. *Med Sci Monit* 12(4):BR130-9.
- Russell DG, Mwandumba HC, Rhoades EE. 2002. *Mycobacterium* and the coat of many lipids. *J Cell Biol* 158(3):421-6.
- SAG: Servicio Agrícola y Ganadero, Ministerio de Agricultura, Gobierno de Chile. 2014. Programa de Certificación Oficial de Rebaños en Paratuberculosis Bovina. http://www.sag.cl/sites/default/files/especificaciones_tecnicas_paratuberculosis.pdf (acceso: 21/06/2016).
- Sager H, Davis WC, Jungi TW. 1999. Bovine monocytoïd cells transformed to proliferate cease to exhibit lineage-specific functions. *Vet Immunol Immunopathol* 68(2-4):113-30.
- Saif LJ, Redman DR, Smith KL, Theil KW. 1983. Passive immunity to bovine rotavirus in newborn calves fed colostrums supplements from immunized or nonimmunized cows. *Infect Immun* 41(3):1118-31.
- Saif LJ, Weillnau P, Miller K, Stitzlein L. 1987. Isotypes of intestinal and systemic antibodies in colostrum-fed and colostrum-deprived calves challenged with rotavirus. *Adv Exp Med Biol* 216B, 1815-23.
- Salgado M, Manning EJ, Monti G, Bölske G, Söderlund R, Ruiz M, ..., Kruze J. 2011. European hares in Chile: a different lagomorph reservoir for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*? *J Wildl Dis* 47(3):734-8.
- Salgado M, Monti G, Sevilla I, Manning E. 2014. Association between cattle herd *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) infection and infection of a hare population. *Trop Anim Health Prod* 46(7):1313-6.
- Salgado M, Alfaro M, Salazar F, Badilla X, Troncoso E, Zambrano A, ..., Collins MT. 2015. Application of cattle slurry containing *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) to grassland soil and its effect on the relationship between MAP and free-living amoeba. *Vet Microbiol* 175(1):26-34.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 1989. Commonly uses techniques in molecular cloning, quantitation of DNA and RNA. En: Ford N, Nolan C, Ferguson M (eds.), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2da ed., apéndice E.5.

- Sangari FJ, Goodman J, Petrofsky M, Kolonoski P, Bermudez LE. 2001. *Mycobacterium avium* invades the intestinal mucosa primarily by interacting with enterocytes. *Infect Immun* 69(3):1515-20.
- Santema W, van Kooten P, Hoek A, Leeflang M, Overdijk M, Rutten V, Koets A. 2011. Hsp70 vaccination-induced antibodies recognize B cell epitopes in the cell wall of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Vaccine* 29(7):1364-73.
- Santema W, Rutten V, Segers R, Poot J, Hensen S, Heesterbeek H, Koets A. 2013. Postexposure subunit vaccination against chronic enteric mycobacterial infection in a natural host. *Infect Immun* 81(6):1990-5.
- Sato TN, Hayashi M. 1985. Purification and characterization of bovine milk fibronectin. *J Dairy Res* 52(4):507-11.
- Scandurra GM, de Lisle GW, Cavaignac SM, Young M, Kawakami RP, Collins DM. 2010. Assessment of live candidate vaccines for paratuberculosis in animal models and macrophages. *Infect Immun* 78(3):1383-9.
- Schaible UE, Winau F, Sieling PA, Fischer K, Collins HL, Hagens K, ..., Kaufmann SH. 2003. Apoptosis facilitates antigen presentation to T lymphocytes through MHC-I and CD1 in tuberculosis. *Nat Med* 9(8):1039-46.
- Schleig PM, Buergelt CD, Davis JK, Williams E, Monif GR, Davidson MK. 2005. Attachment of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* to bovine intestinal organ cultures: method development and strain differences. *Vet Microbiol* 108(3-4):271-9.
- Schlesinger LS. 1998. *Mycobacterium tuberculosis* and the complement system. *Trends Microbiol* 6(2):47-50.
- Schorey JS, Sweet L. 2008. The mycobacterial glycopeptidolipids: structure, function, and their role in pathogenesis. *Glycobiology* 18(11):832-41.
- Schwebach JR, Casadevall A. 2001. Expression of *Mycobacterium tuberculosis* arabinomannan antigen *in vitro* and *in vivo*. *Infect Immun* 69(9):5671-8.
- Scott MC, Bannantine JP, Kaneko Y, Branscum AJ, Whitlock RH, Mori Y, ..., Eda S. 2010. Absorbed EVELISA: a diagnostic test with improved specificity for Johne's disease in cattle. *Foodborne Pathog Dis* 7(11):1291-6. doi:10.1089/fpd.2010.0541.
- Sechi LA, Ahmed N, Felis GE, Duprè I, Cannas S, Fadda G, ..., Zanetti S. 2006a. Immunogenicity and cytoadherence of recombinant heparin binding haemagglutinin (HBHA) of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: functional promiscuity or a role in virulence? *Vaccine* 24(3):236-43.
- Sechi LA, Mara L, Cappai P, Frothingam R, Ortu S, Leoni A, ..., Zanetti S. 2006b. 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(3):229-35.
- Secott TE, Lin TL, Wu CC. 2001. Fibronectin attachment protein homologue mediates fibronectin binding by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Infect Immun* 69(4):2075-82.
- SENASA. 2004. Manual de Procedimientos de desinfección. Dr. Marcelo Daniel de la Sota, Dirección de Luchas Sanitarias, Dirección Nacional de Sanidad Animal (SENASA).

- Settles EW, Kink JA, Talaat A. 2014. Attenuated strains of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* as vaccine candidates against Johne's disease. *Vaccine* 32(18):2062-9.
- Seva J, Sanes JM, Ramis G, Mas A, Quereda JJ, Villarreal-Ramos B, ..., Pallares FJ. 2014. Evaluation of the single cervical skin test and interferon gamma responses to detect *Mycobacterium bovis* infected cattle in a herd co-infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Vet Microbiol* 171(1-2):139-46. doi: 10.1016/j.vetmic.2014.03.035.
- Sevilla IA, Garrido JM, Molina E, Geijo MV, Elguezabal N, Vázquez P, Juste RA. 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(12):3757-68.
- Shankar H, Singh SV, Singh PK, Singh AV, Sohal JS, Greenstein RJ. 2010. Presence, characterization, and genotype profiles of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* from unpasteurized individual and pooled milk, commercial pasteurized milk, and milk products in India by culture, PCR, and PCR-REA methods. *Int J Infect Dis* 14(2):e121-6. doi: 10.1016/j.ijid.2009.03.031.
- Sharma BS, Abo-Ismaïl MK, Schenkel FS, You Q, Verschoor CP, Pant SD, Karrow NA. 2015. Association of TLR4 polymorphisms with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection status in Canadian Holsteins. *Anim Genet* 46(5):560-5. doi: 10.1111/age.12333.
- Shaughnessy LJ, Smith LA, Evans J, Anderson D, Caldow G, Marion G, ..., Hutchings MR. 2013. High prevalence of paratuberculosis in rabbits is associated with difficulties in controlling the disease in cattle. *Vet J* 198(1):267-70.
- Shaughnessy RG, Farrell D, Riepema K, Bakker D, Gordon SV. 2015. Analysis of Biobanked Serum from a *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* BovineInfection Model Confirms the Remarkable Stability of Circulating miRNA Profiles and Defines a Bovine Serum miRNA Repertoire. *PLoS One* 10(12):e0145089. doi: 10.1371/journal.pone.0145089. Erratum in: *PLoS One* 11(1):e0147355.
- Sherman DM, Markham RJ, Bates F. 1984. Agar gel immunodiffusion test for diagnosis of clinical paratuberculosis in cattle. *J Am Vet Med Assoc* 185(2):179-82.
- Shin MK, Shin SW, Jung M, Park H, Park HE, Yoo HS. 2015. Host gene expression for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in human THP-1 macrophages. *Pathog Dis* 73(5). doi: 10.1093/femspd/ftv031.
- Sigurdardóttir OG, Press CM, Evensen O. 2001. Uptake of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* through the distal small intestinal mucosa in goats: an ultrastructural study. *Vet Pathol* 38(2):184-9.
- Sigurdardóttir OG, Bakke-McKellep AM, Djønné B, Evensen O. 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(3):223-30.
- Singh SV, Singh PK, Singh AV, Sohal JS, Gupta VK, Vihan VS. 2007. Comparative efficacy of an indigenous 'inactivated vaccine' using highly pathogenic field strain of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* 'Bison type' with a commercial vaccine for the control of Capri-paratuberculosis in India. *Vaccine* 25(41):7102-10.
- Singh SV, Singh AV, Singh PK, Kumar A, Singh B. 2011. Molecular identification and characterization of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in freeliving non-

- human primate (*Rhesus macaques*) from North India. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 34(3):267-71.
- Singh SV, Singh PK, Kumar N, Gupta S, Chaubey KK, Singh B, ..., Dhama K. 2015. Evaluation of goat based 'indigenous vaccine' against bovine Johne's disease in endemically infected native cattle herds. *Indian J Exp Biol* 53(1):16-24. Erratum in: *Indian J Exp Biol* 53(2):124.
- Slana I, Kralik P, Kralova A, Pavlik I. 2008. On-farm spread of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in raw milk studied by IS900 and F57 competitive real time quantitative PCR and culture examination. *Int J Food Microbiol* 128(2):250-7.
- Smith SL, Wilson PR, Collett MG, Heuer C, West DM, Stevenson M, Chambers JP. 2014. Liver biopsy histopathology for diagnosis of Johne's disease in sheep. *Vet Pathol* 51(5):915-8. doi: 10.1177/0300985813516644.
- Smith GW, Smith F, Zuidhof S, Foster DM. 2015. Short communication: Characterization of the serologic response induced by vaccination of late-gestation cows with a Salmonella Dublin vaccine. *J Dairy Sci* 98(4):2529-32.
- Smith RL, Gröhn YT, Pradhan AK, Whitlock RH, Van Kessel JS, Smith JM, ..., Schukken YH. 2016. The effects of progressing and nonprogressing *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* infection on milk production in dairy cows. *J Dairy Sci* 99(2):1383-90. doi: 10.3168/jds.2015-9822.
- Sohal JS, Singh SV, Tyagi P, Subhodh S, Singh PK, Singh AV, Singh Sandhu K. 2008. Immunology of mycobacterial infections: with special reference to *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Immunobiol* 213(7):585-98.
- Sohal JS, Singh SV, Singh PK, Singh AV. 2010. On the evolution of 'Indian Bison type' strains of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Microbiol Res* 165(2):163-71. doi: 10.1016/j.micres.2009.03.007.
- Sohal JS, Arsenault J, Labrecque O, Fairbrother JH, Roy JP, Fecteau G, L'Homme Y. 2014. Genetic structure of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* population in cattle herds in Quebec as revealed by using a combination of multilocus genomic analyses. *J Clin Microbiol* 52(8):2764-75. doi: 10.1128/JCM.00386-14.
- Souza CD, Evanson OA, Sreevatsan S, Weiss DJ. 2007. Cell membrane receptors on bovine mononuclear phagocytes involved in phagocytosis of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Am J Vet Res* 68(9):975-80.
- Souza C, Davis WC, Eckstein TM, Sreevatsan S, Weiss DJ. 2013. Mannosylated lipoarabinomannans from *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* alters the inflammatory response by bovine macrophages and suppresses killing of *Mycobacterium avium* subsp. *avium* organisms. *PLoS One* 8(9):e75924.
- Souza CD. 2015. Blocking the mitogen activated protein kinase-p38 pathway is associated with increase expression of nitric oxide synthase and higher production of nitric oxide by bovine macrophages infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Vet Immunol Immunopathol* 164(1-2):1-9.
- Stabel JR, Stabel TJ. 1995. Immortalization and characterization of bovine peritoneal macrophages transfected with SV40 plasmid DNA. *Vet Immunol Immunopathol* 45(3-4):211-20.

- Stabel JR. 1996. Production of gamma-interferon by peripheral blood mononuclear cells: an important diagnostic tool for detection of subclinical paratuberculosis. *J Vet Diagn Invest* 8(3):345-50.
- Stabel, J. R. 2000. Transitions in immune responses to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Vet. Microbiol* 77(3-4):465-73.
- Stabel JR, Bannantine JP, Eda S, Robbe-Austerman S. 2011. Induction of B cell responses upon experimental infection of neonatal calves with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Clin Vaccine Immunol* 18(7):1139-49.
- Stabel JR, Robbe-Austerman S. 2011. Early immune markers associated with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in a neonatal calf model. *Clin Vaccine Immunol* 18(3):393-405. doi: 10.1128/CVI.00359-10.
- Stabel JR, Bradner L, Robbe-Austerman S, Beitz DC. 2014. Clinical disease and stage of lactation influence shedding of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* into milk and colostrum of naturally infected dairy cows. *J Dairy Sci* 97(10):6296-304. doi: 10.3168/jds.2014-8204.
- Stamp JT, Watt JA. 1954. Johne's disease in sheep. *J Comp Pathol* 64(1):26-40.
- Stefura WP, Campbell D, Douville R, Stinson MJ, Simons E, Becker AB, HayGlass KT. 2008. Ultrasensitive ELISA for measurement of human cytokine response in primary culture. En: Jones MG, Lympany P (eds.), *Methods in Molecular Medicine*. Allergy methods and protocols. Human Press Inc., 1er ed., cap. 10, pp. 107-19.
- Stempler A, Jolly A, Colavecchia SB, Soba M, Fontanals A, Mundo SL. 2009. Development and evaluation of a monoclonal antibody against *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Vet Immunol Immunopathol* 128(1):335-6.
- Stevenson K, Hughes VM, de Juan L, Inglis NF, Wright F, Sharp JM. 2002. Molecular characterization of pigmented and nonpigmented isolates of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *J Clin Microbiol* 40(5):1798-804.
- Stevenson K, Alvarez J, Bakker D, Biet F, de Juan L, Denham S, ..., Greig A. 2009. Occurrence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* across host species and European countries with evidence for transmission between wildlife and domestic ruminants. *BMC Microbiol* 9:212. doi: 10.1186/1471-2180-9-212.
- Stevenson K. 2015. Genetic diversity of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* and the influence of strain type on infection and pathogenesis: a review. *Vet Res* 46:64. doi: 10.1186/s13567-015-0203-2.
- Stewart DJ, Vaughan JA, Stiles PL, Noske PJ, Tizard ML, Prowse SJ, ..., Jones SL. 2007. A long-term bacteriological and immunological study in Holstein-Friesian cattle experimentally infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and necropsy culture results for Holstein-Friesian cattle, Merino sheep and Angora goats. *Vet Microbiol* 122(1-2):83-96.
- Strommenger B, Stevenson K, Gerlach GF. 2001. Isolation and diagnostic potential of ISMav2, a novel insertion sequence-like element from *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *FEMS Microbiol Lett* 196(1):31-7.
- Sun B, Zhang Y. 2014. Overview of orchestration of CD4+ T cell subsets in immune responses. *Adv Exp Med Biol* 841:1-13. doi: 10.1007/978-94-017-9487-9_1.

- Sung N, Takayama K, Collins MT. 2004. Possible association of GroES and antigen 85 proteins with heat resistance of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Appl Environ Microbiol* 70(3):1688-97.
- SVA: National Veterinary Institut. 2008. Surveillance and control programmes. Domestic and wild animals in Sweden. http://www.sva.se/globalassets/redesign2011/pdf/om_sva/publikationer/surveillance-08-web.pdf (acceso: 21/07/2015).
- Sweeney RW. 1996. Transmission of paratuberculosis. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 12(2):305-12.
- Sweeney RW, Uzonna J, Whitlock RH, Habecker PL, Chilton P, Scott P. 2006. Tissue predilection sites and effect of dose on *Mycobacterium avium* subs. *paratuberculosis* organism recovery in a short-term bovine experimental oral infection model. *Res Vet Sci* 80(3):253-9.
- Sweet L, Singh PP, Azad AK, Rajaram MV, Schlesinger LS, Schorey JS. 2010. Mannose receptor-dependent delay in phagosome maturation by *Mycobacterium avium* glycopeptidolipids. *Infect Immun* 78(1):518-26.
- Taddei R, Barbieri I, Pacciarini ML, Fallacara F, Belletti GL, 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(3-4):338-47. doi: 10.1016/j.vetmic.2008.02.007.
- Taka S, Liandris E, Gazouli M, Sotirakoglou K, Theodoropoulos G, Bountouri M, ..., Ikononopoulos J. 2013. *In vitro* expression of the SLC11A1 gene in goat monocyte-derived macrophages challenged with *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis*. *Infect Genet Evol* 17:8-15.
- Takanashi M, Nasu T, Murakami T, Yasuda M. 2008. Secondary lymphoid areas in calf ileal Peyer's patch. *J Vet Med Sci* 70(9):985-8.
- Talatchian M. 1965. First report of Johne's disease in Iran. *Bull Off Int Epizoot* 64:779-82.
- Tan L, Grewal PS. 2002. Comparison of two silver staining techniques for detecting lipopolysaccharides in polyacrylamide gels. *J Clin Microbiol* 40(11):4372-4.
- Tanaka S, Sato M, Onitsuka T, Kamata H, Yokomizo Y. 2005. Inflammatory cytokine gene expression in different types of granulomatous lesions during asymptomatic stages of bovine paratuberculosis. *Vet Pathol* 42(5):579-88.
- Teitelbaum R, Glatman-Freedman A, Chen B, Robbins JB, Unanue E, Casadevall A, Bloom BR. 1998. A mAb recognizing a surface antigen of *Mycobacterium tuberculosis* enhances host survival. *Proc Natl Acad Sci USA* 95(26):15688-93.
- Tennant B, Baldwin BH, Braun RK, Norcross NL, Sandholm M. 1979. Use of the glutaraldehyde coagulation test for detection of hypogammaglobulinemia in neonatal calves. *J Am Vet Med Assoc* 174(8):848-53.
- Tessema MZ, Koets AP, Rutten VP, Gruys E. 2001. How does *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* resist intracellular degradation? *Vet Q* 23(4):153-62. Review.
- Tewari D, Hovingh E, Linscott R, Martel E, Lawrence J, Wolfgang D, Griswold D. 2014. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* antibody response, fecal shedding, and antibody cross-reactivity to *Mycobacterium bovis* in *M. avium* subsp. *paratuberculosis*.

- infected cattle herds vaccinated against Johne's disease. *Clin Vaccine Immunol* 21(5): 698-703.
- Thakur A. 2012. Development of a Multi-Stage Vaccine against Paratuberculosis in Cattle (Tesis Doctoral). National Veterinary Institute, Technical University of Denmark, Copenhagen, Dinamarca.
- Thibault VC, Grayon M, Boschioli ML, Hubbans C, Overduin P, Stevenson K, ..., Biet F. 2007. New variable-number tandem-repeat markers for typing *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and *M. avium* strains: comparison with IS900 and IS1245 restriction fragment length polymorphism typing. *J Clin Microbiol* 45(8):2404-10.
- Thirunavukkarasu S, de Silva K, Whittington RJ, Plain KM. 2013. *In vivo* and *in vitro* expression pattern of Toll-like receptors in *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection. *Vet Immunol Immunopathol* 156(1-2):20-31.
- Thirunavukkarasu S, de Silva K, Plain KM, J Whittington R. 2014. Role of host- and pathogen-associated lipids in directing the immune response in mycobacterial infections, with emphasis on *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Crit Rev Microbiol* 28:1-13.
- Thomsen VT, Nielsen SS, Thakur A, Jungersen G. 2012. Characterization of the long-term immune response to vaccination against *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Danish dairy cows. *Vet Immunol Immunopathol* 145(1-2):316-22.
- Thorel MF, Krichevsky M, Levy-Frebault VV. 1990. Numerical taxonomy of mycobactin-dependent mycobacteria, emended description of *Mycobacterium avium*, and description of *Mycobacterium avium* subsp. *avium* subsp. nov., *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* subsp. nov., and *Mycobacterium avium* subsp. *silvaticum* subsp. nov. *Int J Syst Bacteriol* 40(3):254-60.
- Tiwari A, Vanleeuwen JA, Dohoo IR, Keefe GP, Haddad JP, Tremblay R, ..., Whiting T. 2007. Production effects of pathogens causing bovine leukosis, bovine viral diarrhea, paratuberculosis, and neosporosis. *J Dairy Sci* 90(2):659-69.
- Tiwari A, VanLeeuwen JA, Dohoo IR, Keefe GP, Weersink A. 2008. Estimate of the direct production losses in Canadian dairy herds with *subclinical Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection. *Can Vet J* 49(6):569-76.
- Tobar JA, Gonzalez PA, Kalergis AM. 2004. *Salmonella* escape from antigen presentation can be overcome by targeting bacteria to Fc gamma receptors on dendritic cells. *J Immunol* 173(6): 4058-65.
- Tooker BC, Burton JL, Coussens PM. 2002. Survival tactics of *M. paratuberculosis* in bovine macrophage cells. *Vet Immunol Immunopathol* 87(3-4):429-37.
- Torrelles JB, Sieling PA, Arcos J, Knaup R, Bartling C, Rajaram MV, ..., Schlesinger LS. 2011. Structural differences in lipomannans from pathogenic and nonpathogenic mycobacteria that impact CD1b-restricted T cell responses. *J Biol Chem* 286(41):35438-46.
- Torres PM. 2014. Situación de la tuberculosis bovina en la república argentina. SENASA.
- Tsuchiya S, Yamabe M, Yamaguchi Y, Kobayashi Y, Konno T, Tada K. 1980. Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *Int J Cancer* 26(2):171-6.

- Turenne CY, Collins DM, Alexander DC, Behr MA. 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(7):2479-87. doi: 10.1128/JB.01691-07.
- Ubach FA. 1941. Observaciones sobre la enfermedad de Johne y la enteritis coccidiósica de los bovinos, ovinos y caprinos identificadas en la República de Argentina. *Rev Med B A* 23:3-45.
- USDA-APHIS-VS-CEAH: United States Department of Agriculture, Animal and Plant Health Inspection Service, Veterinary Services and Centers for Epidemiology and Animal Health. 2008. Johne's Disease on U.S. Dairies, 1991–2007. Fort Collins, Colorado, USA. Disponible en: http://www.aphis.usda.gov/animal_health/nahms/dairy/downloads/dairy07/Dairy07_is_Johnes.pdf (acceso: 13/07/2015).
- USDA-APHIS-VS: United States Department of Agriculture, Animal and Plant Health Inspection Service, Veterinary Services. 2010. Uniform Program Standards for the Voluntary Bovine Johne's Disease Control Program. <http://www.johnesdisease.org/Uniform%20Program%20Standards%20for%20the%20Voluntary%20Bovine%20National%20Johne's%20Disease%20Program.pdf> (acceso: 14/07/2015).
- Uzonna JE, Chilton P, Whitlock RH, Habecker PL, Scott P, Sweeney RW. 2003. Efficacy of commercial and field-strain *Mycobacterium paratuberculosis* vaccinations with recombinant IL-12 in a bovine experimental infection model. *Vaccine* 21(23):3101-9.
- Valgaeren B, Pardon B, Goossens E, Verherstraeten S, Schauvliege S, Timbermont L, ..., Van Immerseel F. 2013. Lesion development in a new intestinal loop model indicates the involvement of a shared *Clostridium perfringens* virulence factor in haemorrhagic enteritis in calves. *J Comp Pathol* 149(1):103-12.
- Vanleeuwen JA, Haddad JP, Dohoo IR, Keefe GP, Tiwari A, Tremblay R. 2010. Associations between reproductive performance and seropositivity for bovine leukemia virus, bovine viral diarrhoea virus, *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*, and *Neospora caninum* in Canadian dairy cows. *Prev Vet Med* 94(1-2):54-64. doi: 10.1016/j.prevetmed.2009.11.012.
- Van Rhijn I, Koets AP, Im JS, Piebes D, Reddington F, Besra GS, Rutten VP. 2006. The bovine CD1 family contains group 1 CD1 proteins, but no functional CD1d. *J Immunol* 176(8):4888-93.
- van Schaik G, Kalis CH, Benedictus G, Dijkhuizen AA, Huirne RB. 1996. Cost-benefit analysis of vaccination against paratuberculosis in dairy cattle. *Vet Rec* 139(25):624-7.
- 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 (3–4):197-204.
- Varges R, Marassi CD, Oelemann W, Lilenbaum W. 2009. Interference of intradermal tuberculin tests on the serodiagnosis of paratuberculosis in cattle. *Res Vet Sci* 86(3):371-2. doi: 10.1016/j.rvsc.2008.08.006.
- Vázquez P, Garrido JM, Juste RA. 2013. Specific antibody and interferon-gamma responses associated with immunopathological forms of bovine paratuberculosis in slaughtered Friesian cattle. *PLoS One* 8(5):e64568. doi:10.1371/journal.pone.0064568.

- Vázquez P, Ruiz-Larrañaga O, Garrido JM, Iriondo M, Manzano C, Agirre M, ..., Juste RA. 2014. Genetic association analysis of paratuberculosis forms in holstein-friesian cattle. *Vet Med Int* 2014:321327. doi:10.1155/2014/321327.
- Vergne I, Gilleron M, Nigou J. 2015. Manipulation of the endocytic pathway and phagocyte functions by *Mycobacterium tuberculosis* lipoarabinomannan. *Front Cell Infect Microbiol* 4:187. doi: 10.3389/fcimb.2014.00187.
- Viale MN, Echeverria-Valencia G, Romasanta P, Mon ML, Fernandez M, Malchiodi E, ..., Santangelo Mde L. 2014. Description of a novel adhesin of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Biomed Res Int* 2014:729618. doi: 10.1155/2014/729618.
- Vijayan VK, Reetha AM, Jawahar MS, Sankaran K, Prabhakar R. 1992. Pulmonary eosinophilia in pulmonary tuberculosis. *Chest* 101(6):1708-9.
- von Ziegler LM, Saab BJ, Mansuy IM. 2013. A simple and fast method for tissue cryohomogenization enabling multifarious molecular extraction. *J Neurosci Methods* 216(2):137-41.
- Waddell LA, Rajić A, Stärk KD, McEwen SA. 2015. The zoonotic potential of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*: a systematic review and meta-analyses of the evidence. *Epidemiol Infect* 20:1-23.
- Wall S, Kunze ZM, Saboor S, Soufleri I, Seechurn P, Chiodini R, McFadden JJ. 1993. Identification of spheroplast-like agents isolated from tissues of patients with Crohn's disease and control tissues by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 31(5):1241-5.
- Wang Z, Gerstein M, Snyder M. 2009. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat Rev Genet* 10(1):57-63.
- Wang X, Wang H, Aodon-geril, Shu Y, Momotani Y, Nagata R, Mori Y, Momotani E. 2011. Decreased expression of matrix metalloproteinase-9 and increased expression of tissue inhibitors of matrix metalloproteinase-1 in paratuberculosis-infected cattle in the ELISA-negative subclinical stage. *Anim Biotechnol* 22(1):44-9.
- Wang J, Moolji J, Dufort A, Staffa A, Domenech P, Reed MB, Behr MA. 2015a. Iron Acquisition in *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *J Bacteriol* 198(5):857-66. doi: 10.1128/JB.00922-15.
- Wang J, Wang Z, Yao Y, Wu J, Tang X, Gu T, Li G. 2015b. The fibroblast growth factor-2 arrests *Mycobacterium avium* sp. *paratuberculosis* growth and immunomodulates host response in macrophages. *Tuberculosis (Edinb)* 95(4):505-14.
- Waters WR, Miller JM, Palmer MV, Stabel JR, Jones DE, Koistinen KA, ..., Bannantine JP. 2003. Early induction of humoral and cellular immune responses during experimental *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection of calves. *Infect Immun* 71(9):5130-8.
- Watkins C, Schock A, May L, Denham S, Sales J, Welch L, ..., Stevenson K. 2010. Assessing virulence of vaccine strains of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in a calf model. *Vet Microbiol* 146(1-2):63-9.
- Weber MF. 2012. Five years of milk quality assurance for paratuberculosis in the Netherlands. En: *Proceeding of the XIth International Colloquium on Paratuberculosis*, p. 74.

- Weber SS, Joller N, Küntzel AB, Spörri R, Tchang VS, Scandella E, ..., Oxenius A. 2012. Identification of protective B cell antigens of *Legionella pneumophila*. *J Immunol* 189(2):841-9.
- Weigoldt M, Meens J, Bange FC, Pich A, Gerlach GF, Goethe R. 2013. Metabolic adaptation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* to the gut environment. *Microbiology* 159(Pt 2):380-91.
- Weiss DJ, Evanson OA, Moritz A, Deng MQ, Abrahamsen MS. 2002. Differential responses of bovine macrophages to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and *Mycobacterium avium* subsp. *avium*. *Infect Immun* 70(10):5556-61.
- Weiss DJ, Evanson OA, Deng M, Abrahamsen MS. 2004. Sequential patterns of gene expression by bovine monocyte-derived macrophages associated with ingestion of mycobacterial organisms. *Microb Pathog* 37(4):215-24.
- Weiss DJ, Evanson OA, Souza CD. 2006. Mucosal immune response in cattle with subclinical Johne's disease. *Vet Pathol* 43(2):127-35.
- Welin A, Winberg ME, Abdalla H, Särndahl E, Rasmusson B, Stendahl O, Lerm M. 2008. Incorporation of *Mycobacterium tuberculosis* lipoarabinomannan into macrophage membrane rafts is a prerequisite for the phagosomal maturation block. *Infect Immun* 76(7):2882-7. doi: 10.1128/IAI.01549-07.
- Welin A, Björnsdóttir H, Winther M, Christenson K, Oprea T, Karlsson A, ..., Bylund J. 2015. CFP-10 from *Mycobacterium tuberculosis* selectively activates human neutrophils through a pertussis toxin-sensitive chemotactic receptor. *Infect Immun* 83(1):205-13.
- Whitlock RH, Wells SJ, Sweeney RW, Van Tiem J. 2000. ELISA and fecal culture for paratuberculosis (Johne's disease): sensitivity and specificity of each method. *Vet Microbiol* 77(3-4):387-98.
- Whitlock RH, Buergelt C. 1996. Preclinical and clinical manifestations of paratuberculosis (including pathology). *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 12(2):345-56. Review.
- Whitlock RH. 2010. Paratuberculosis Control Measures in the USA. En: Behr MA y Collins DM (eds.), *Paratuberculosis: organism, disease, control*. CABI International, 1er ed., cap. 27, pp. 319-29.
- 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(6):349-58.
- Whittington RJ, Marsh IB, Whitlock RH. 2001. Typing of IS1311 polymorphisms confirms that bison (*Bison bison*) with paratuberculosis in Montana are infected with a strain of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* distinct from that occurring in cattle and other domesticated livestock. *Mol Cell Probes* 15(3):139-45.
- Whittington RJ, Marshall DJ, Nicholls PJ, Marsh IB, Reddacliff LA. 2004. Survival and dormancy of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in the environment. *Appl Environ Microbiol* 70(5):2989-3004.
- Whittington RJ, Marsh IB, Reddacliff LA. 2005. Survival of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in dam water and sediment. *Appl Environ Microbiol* 71(9):5304-8.
- Whittington RJ, Windsor PA. 2009. *In utero* infection of cattle with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: a critical review and meta-analysis. *Vet J* 179(1):60-9.

- Whittington RJ, Begg DJ, de Silva K, Plain KM, Purdie AC. 2012. Comparative immunological and microbiological aspects of paratuberculosis as a model mycobacterial infection. *Vet Immunol Immunopathol* 148(1-2):29-47. Review.
- Williams A, Reljic R, Naylor I, Clark SO, Falero-Diaz G, Singh M, ..., Ivanyi J. 2004. Passive protection with immunoglobulin A antibodies against tuberculous early infection of the lungs. *Immunology* 111(3):328-33.
- Winau F, Weber S, Sad S, de Diego J, Hoops SL, Breiden B, ..., Schaible UE. 2006. Apoptotic vesicles crossprime CD8 T cells and protect against tuberculosis. *Immunity* 24(1):105-17.
- Windsor PA, Whittington RJ. 2010. Evidence for age susceptibility of cattle to Johne's disease. *Vet J* 184(1):37-44.
- Wojtas B, Fijalkowska B, Wlodarczyk A, Schollenberger A, Niemialtowski M, Hamasur B, ..., Krzyzowska M. 2011. Mannosylated lipoarabinomannan balances apoptosis and inflammatory state in mycobacteria-infected and uninfected bystander macrophages. *Microb Pathog* 51(1-2):9-21.
- Wolf R, Barkema HW, De Buck J, Slomp M, Flaig J, Haupstein D, ..., Orsel K. 2014. High herd-level prevalence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in Western Canadian dairy farms, based on environmental sampling. *J Dairy Sci* 97(10):6250-9. doi: 10.3168/jds.2014-8101.
- Wolf R, Orsel K, De Buck J, Barkema HW. 2015. Calves shedding *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* are common on infected dairy farms. *Vet Res* 46:71. doi: 10.1186/s13567-015-0192-1.
- Woo SR, Sotos J, Hart AP, Barletta RG, Czuprynski CJ. 2006. Bovine monocytes and a macrophage cell line differ in their ability to phagocytose and support the intracellular survival of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Vet Immunol Immunopathol* 110(1-2):109-20.
- Woo SR, Czuprynski CJ. 2008. Tactics of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* for intracellular survival in mononuclear phagocytes. *J Vet Sci* 9(1):1-8.
- Wu CW, Livesey M, Schmoller SK, Manning EJ, Steinberg H, Davis WC, ..., Talaat AM. 2007a. Invasion and persistence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* during early stages of Johne's disease in calves. *Infect Immun* 75(5):2110-9.
- Wu CW, Schmoller SK, Shin SJ, Talaat AM. 2007b. Defining the stressome of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* *in vitro* and in naturally infected cows. *J Bacteriol* 189(21):7877-86.
- Wu CW, Schmoller SK, Bannantine JP, Eckstein TM, Inamine JM, Livesey M, ..., Talaat AM. 2009. A novel cell wall lipopeptide is important for biofilm formation and pathogenicity of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Microb Pathog* 46(4):222-30. doi: 10.1016/j.micpath.2009.01.010.
- Yasuda M, Jenne CN, Kennedy LJ, Reynolds JD. 2006. The sheep and cattle Peyer's patch as a site of B-cell development. *Vet Res* 37(3):401-15.
- Yokomizo Y, Merkal RS, Lyle PA. 1983. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of bovine immunoglobulin G1 antibody to a protoplasmic antigen of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Am J Vet Res* 44(11):2205-7.

- Yokomizo Y, Yugi H, Merkal RS. 1985. A method for avoiding false-positive reactions in an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the diagnosis of bovine paratuberculosis. *Nihon Juigaku Zasshi* 47(1):111-9.
- Zhong L, Di Fiore L, Taylor D, Begg D, de Silva K, Whittington RJ. 2009. Identification of differentially expressed genes in ileum, intestinal lymph node and peripheral blood mononuclear cells of sheep infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* using differential display polymerase chain reaction. *Vet Immunol Immunopathol* 131(3-4): 177-89.
- Zurbrick BG, Czuprynski CJ. 1987. Ingestion and intracellular growth of *Mycobacterium paratuberculosis* within bovine blood monocytes and monocyte-derived macrophages. *Infect Immun* 55(7):1588-93.
- Zur Lage S, Goethe R, Darji A, Valentin-Weigand P, Weiss S. 2003. Activation of macrophages and interference with CD4+ T-cell stimulation by *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* and *Mycobacterium avium* subspecies *avium*. *Immunology* 108(1):62-9.
- Zwirner NW, Fainboim L. 2005. Estructura y función del complejo mayor de histocompatibilidad. En: *Introducción a la inmunología humana*. Fainboim L, Geffner J (eds.), Editorial Panamericana, 5ta ed., cap. 4, pp. 119-20.

7. Anexos

AT.1. Correspondiente a Capítulo 1**➤ AT1.1. MÉTODO DE FENOL SULFURICO EN MICROPLACA**

- 1) Preparación de las diluciones de glucosa para construcción de la curva patrón. La relación entre concentración de glucosa y DO a 490 nm es lineal para concentraciones entre 0,05 y 0,5 mg/mL.
- 2) Agregado de 50 µL de cada dilución de glucosa o de muestra por hoyo.
- 3) Agregado de 30 µL de fenol al 5 % por hoyo. Homogeneización.
- 4) Agregado de 150 µL de ácido sulfúrico por hoyo, empleando una jeringa de tuberculina acoplada a aguja 15/5. Homogeneización.
- 5) Incubación de la placa a temperatura ambiente durante 20 min.
- 6) Lectura a 490 nm en Lector Opsy MR™ (Dynex Technologies, USA).

➤ AT.1.2. MODIFICACIÓN DE FOMSGAARD Y COL. (1990) A LA TINCIÓN ARGÉNTICA

Para la tinción argéntica de proteínas, se empleó el protocolo recomendado por el fabricante del kit Bio-Rad Silver Stain (Cat N° 161-0443/4/5/7, Bio-Rad®, USA). Para la tinción de hidratos de carbono se incorporó la modificación propuesta por Fomsgaard y col. (1990):

- 1) Oxidación con ácido periódico al 0,7 % en solución acuosa de metanol al 40 % y ácido acético al 5 %. Este paso reemplaza al primero del protocolo, que corresponde a la fijación.
- 2) Incubación 20 min a 22°C, en oscuridad.
- 3) En adelante, se mantiene el protocolo original.

➤ AT.1.3. WESTERN BLOT: METODOLOGÍA BÁSICA Y REACTIVOS EMPLEADOSReactivos

- Buffer de transferencia (por litro): Trizma base 2,4 g; Glicina 11,53 g; Metanol 200 mL
- Solución de bloqueo: PBS - leche descremada al 10 %
- Solución de lavado: PBS-leche descremada al 1 % - Tween 20 0,05 %
- Solución diluyente: PBS - leche descremada al 1 %

- Solución de revelado: por mL de buffer TBS, 0,5 mg de DAB y 1 μ L de H₂O₂ 100 volúmenes. Conservar en oscuridad.

Metodología

En primer lugar, se realiza la corrida electroforética de las muestras en gel de poliacrilamida (según lo recomendado en el manual *Mini Protean II – Electrophoresis Cell Instruction Manual*).

- 1) Preparación de la membrana de nitrocelulosa (Trans-blot transfer medium, Bio-Rad, USA) mediante incubación en buffer transferencia durante 30 min.
- 2) Preparación del gel mediante lavados con agua destilada (3 lavados, 10 minutos c/u) y posterior incubación en buffer transferencia durante 5 min.
- 3) Armado del sistema de transferencia (Trans-Blot SD cell, Bio-Rad, USA). Se colocan todos los elementos a emplear en un recipiente con buffer transferencia y se arman los *cassettes*: 1- *cassette* (tapa negra), 2- esponja, 3- papel secante, 4- gel a transferir, 5- membrana de nitrocelulosa, 6- papel secante, 7- esponja, 8- *cassette* (tapa blanca). Evitar la formación de burbujas de aire entre sus componentes.
- 4) Transferencia. 30-40 mV a 4 °C, durante 16 h.
- 5) Incubación de la membrana en solución de bloqueo. 1 h a 37°C en agitación.
- 6) Lavado. Se coloca la membrana en solución de lavado y se incuba en agitación durante 10 min. Repetir 3 veces.
- 7) Incubación de la membrana en solución de anticuerpo primario (suero) diluido 1/250 en buffer diluyente. 1 h a 37°C en agitación.
- 8) Repetición del paso 5.
- 9) Incubación de la membrana en solución de anticuerpo secundario (conjugado anti-IgG bovina (H+L) (KPL, Kirkegaard & Perry Laboratories Inc., USA) diluido 1/800 en solución diluyente. 1 h a 37°C en agitación.
- 10) Repetición del paso 5.
- 11) Incubación de la membrana en solución de revelado hasta la aparición de bandas.
- 12) Frenado de la reacción enzimática por el agregado de agua destilada.

➤ **AT.1.4. PROTOCOLO DE PURIFICACIÓN DE INMUNOGLOBULINAS POR AFINIDAD A PROTEINA G**

Materiales y reactivos

- Proteína G-Agarosa (Exalpa Biologicals Inc, USA, Cat N° X1195)
- Buffer de unión (BU): PBS, pH 7,4
- Buffer de elución (BE): glicina/HCl 100 mM, pH 3,0
- Buffer de neutralización (BN): Tris/HCl 1 M, pH 9,0

Metodología

- 1) Introducción del volumen de Proteína G-Agarosa a emplear dentro de una columna cromatográfica de capacidad adecuada.
- 2) Equilibrado de la columna con BU, hasta lograr un pH 7,4.
- 3) Dilución de la muestra (Acs precipitados) en BU, a concentración proteica 0,5 mg/mL. Llevar a pH 7,4.
- 4) Cargado de la muestra en la columna y retención durante 15 minutos, para permitir interacción de Acs con la matriz.
- 5) Repetición del paso 4.
- 6) Lavado con BU.
- 7) Elución con BE y recolección del eluido en tubos tipo eppendorff conteniendo 10 µL de BN.
- 8) Repetición del paso 2.
- 9) Recuperación de la columna en un tubo tipo eppendorff y centrifugación a velocidad mínima a 4°C.
- 10) Descarte del sobrenadante, resuspensión de la columna en BU- azida sódica al 0,08 %.
- 11) Conservación a 4°C hasta nuevo uso.

AT.2. Correspondiente a Capítulo 2

➤ AT.2.1. Prueba de Grutaraldehído

Reactivos

- solución de glutaraldehído al 10 % (v/v)

Metodología

- 1) Se obtienen los sueros por centrifugación de muestras de sangre sin anticoagulantes.
- 2) Se coloca 1 mL de suero en un tubo y se agrega 100 µL de la solución de glutaraldehído.
- 3) Se homogeniza por agitación suave y se incuba a T° ambiente durante 1 h, evaluando la presencia de gelificación cada 5 min.
- 4) Se registra el tiempo de gelificación de cada muestra, que corresponde a la primera lectura en la que al inclinar el tubo a 45° la muestra de suero permanece inmóvil.

➤ **AT.2.2. Aislamiento de *Map* en cultivos de materia fecal**

Reactivos

- Medio Herrold (por litro): peptona 9 g; NaCl 4,5 g; extracto de carne vacuna 2,7 g; glicerol 27 mL; piruvato de sodio (Sigma Cat N° P2256) 4,1 g; agar bacteriológico 15,3 g; agua destilada 870 mL. Se mezclan todos los componentes (menos el agar). Se ajusta pH a 7,5 con Na(OH) 1N (aproximadamente 1mL). Luego, se agrega el Agar. Se autoclava (25 minutos a 121°C). Se deja entibiar hasta 56°C aproximadamente y se agregan los suplementos.

- Suplementos para el Medio Herrold: Verde de Malaquita oxálica (2%) 5,1 mL; Micobactina J (0.5mg/mL) 4 mL; Ampicilina (60 mg/mL) 1,66 mL; Cloranfenicol (50 mg/mL) 2 mL; Anfotericina B (40 mg/mL) 2,5 mL; 6 yemas de huevo (obtenidas en condiciones asépticas y provenientes de gallinas sin tratamiento antimicrobiano).

Una vez homogeneizado el medio con los suplementos, se vierte en tubos y se lo deja solidificar en inclinación para obtener picos de flauta. Se incuban 48 hs a 37°C para comprobar esterilidad.

Metodología

- Decontaminación y siembra de las materias fecales.

- 1) Se pesan **2 g de materia fecal** con una cucharita descartable y se colocan en un tubo de 50 mL conteniendo **38 mL** de HPC (solución de cloruro de hexadecilpiridinio al 0,9 % estéril, que actúa como decontaminante). Se agita por 30 minutos y se deja a temperatura ambiente por 24 hs.

- 2) Se aspira el **sedimento** con pipeta pasteur estéril y se procede a la siembra.
- 3) Siembra de la materia fecal decontaminada en el medio sólido: Se colocan **4 gotas/ pico de flauta** y se cultiva en medio Herrold con piruvato
- 4) Se incuba en posición horizontal durante una semana a 37°C, con la tapa del frasco medio suelta, para permitir la evaporación de la humedad residual de la superficie del medio. Posteriormente, se cierran las tapas herméticamente y se leen una vez cada 15 días.

Esta tesis se desarrolló en el marco de una beca doctoral otorgada por el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). Los fondos empleados para la realización del trabajo fueron aportados por la Universidad de Buenos Aires, el Ministerio de Ciencia y Tecnología, y la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica, a través de los siguientes subsidios:

- “Respuesta inmune frente a *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* y sus componentes en bovinos.” (UBACYT V023, período 2008-2011). Directora: Silvia L. Mundo.
- “Paratuberculosis bovina: Identificación temprana de animales infectados” (PICT Bicentenario 2010-2672, período 2011-2014) Directora: Silvia L. Mundo.
- “Paratuberculosis en rumiantes: respuesta inmune y diagnóstico” (UBACYT 2011, Cód: 20020100100912, período 2011-2014). Directora: Silvia L. Mundo.
- “Paratuberculosis: evaluación de la respuesta inmune y sus aportes para el diagnóstico de la enfermedad”. (UBACyT N° 20020130100607BA, período 2014-2017). Directora: Silvia L. Mundo.

Parte de los resultados que se describen en este trabajo han sido dados a conocer en las siguientes publicaciones y presentaciones a congresos:

Publicaciones

1. **Jolly A**, Lompardía S, Hajos SE, Mundo SL. 2016. Evidence of a pro-apoptotic effect of specific antibodies in a bovine macrophage model of infection with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Vet Immunol Immunopathol* 169:47-53.
2. **Jolly A**, Morsella C, Bass L, Fiorentino MA, Paolicchi FA, Mundo SL. 2013. Bovine Response to Lipoarabinomannan vaccination and challenge with *Mycobacterium paratuberculosis*. *Braz J Microbiol* 44(2):511-4.
3. **Jolly A**, Colavecchia S, Fernández B, Fernández E, Mundo S. 2011. Antibodies induced by lipoarabinomannan in bovines: characterization and effects on the interaction between *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and macrophages *in vitro*. *Vet Med Int* 2011: 258479.

Presentaciones a congresos internacionales

1. Fernández B, **Jolly A**, Barandiaran S, Mundo S. 2011. “Isotipos de inmunoglobulinas en bovinos infectados con *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*”. XIX Jornadas de Jóvenes Investigadores de la Asociación de Universidades Grupo Montevideo (AUGM). Ciudad del Este, Paraguay.
2. Fernández B, **Jolly A**, Gilardoni L, Goldman L, Colavecchia S, Fernández E, Mundo S. 2010. “Immunoglobulins in sera and feces from Paratuberculosis infected cattle”. 14th International Conference on Production Diseases in Farm Animals. Ghent, Bélgica.

Presentaciones a congresos nacionales

1. **Jolly A**, Stempler A, Fortuny ML, Ingratta G, Lompardía S, Boviez J, Lombardo D, Hajos SE, Mundo SL. 2015. “Paratuberculosis bovina: función de los anticuerpos anti-lipoarabinomano en la infección”. V Jornadas de Jóvenes Investigadores en Ciencias Veterinarias, FVET-UBA. Ciudad de Buenos Aires (Mural).
2. **Jolly A**, Stempler A, Fortuny ML, Ingratta G, Álvarez G, Gutiérrez B, Aranda MV, Brynkier J, Hajos S, Mundo SL. 2014. “La presencia de anticuerpos específicos modula la respuesta temprana a la infección en un modelo bovino intestinal de paratuberculosis”. VII Jornadas y Reunión Anual de la Asociación Argentina de Inmunología Veterinaria. Ciudad de Buenos Aires.
3. **Jolly A**, Stempler A, Fortuny ML, Ingratta G, Galotta L, Álvarez G, Gutiérrez B, Aranda MV, Brynkier J, De la Orden J, Boviez J, Angiono G, Lombardo D, Mundo SL. 2014. “Modelo intestinal de infección por *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* en bovinos. Evaluación del efecto de anticuerpos específicos”. IV Jornadas de Jóvenes Investigadores en Ciencias Veterinarias, FVET-UBA. Ciudad de Buenos Aires.
4. **Jolly A**, Lompardía A, Fernández B, Colavecchia S, Hajos S, Mundo S. 2013. “Modulación por anticuerpos de la respuesta de macrófagos bovinos a la infección in vitro con *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP)”.

III Jornadas de Jóvenes Investigadores en Ciencias Veterinarias, FVET-UBA. Ciudad de Buenos Aires.

5. **Jolly A**, Lompardía A, Fernández B, Colavecchia S, Hajos S, Mundo S. 2012. “La infección in vitro de macrófagos bovinos con *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) induce apoptosis celular que puede ser modulada en presencia de anticuerpos específicos”. II Jornadas de Jóvenes Investigadores en Ciencias Veterinarias, FVET-UBA. Ciudad de Buenos Aires.
6. **Jolly A**, Mundo S. 2011. “La inmunización de terneros con lipoarabinomano (LAM) induce anticuerpos que reducen la supervivencia intracelular de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*”. I Jornadas de Jóvenes Investigadores en Ciencias Veterinarias, FVET-UBA. Ciudad de Buenos Aires.
7. **Jolly A**, Lompardía A, Fernández B, Colavecchia S, Hajos S, Mundo S. 2011. “Modulación por anticuerpos de la apoptosis de macrófagos bovinos infectados con *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (Map) in vitro”. IV Jornadas y Reunión Anual de la Asociación Argentina de Inmunología Veterinaria. Río cuarto, Córdoba.