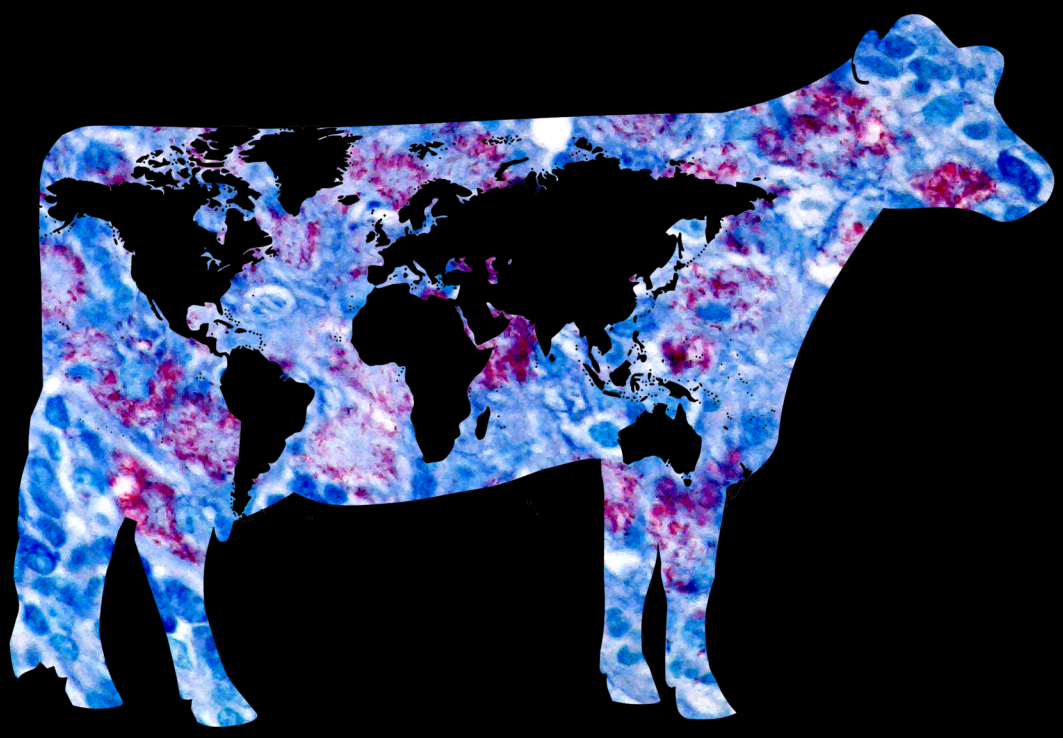
Eficacia de una vacuna inactivada frente a la paratuberculosis bovina en un modelo experimental en terneros y su influencia en la patogenia de la enfermedad



María Muñoz de Frutos

León, 2014

DEPARTAMENTO DE SANIDAD ANIMAL
FACULTAD DE VETERINARIA
UNIVERSIDAD DE LEÓN

EFICACIA DE UNA VACUNA INACTIVADA FRENTE A LA PARATUBERCULOSIS BOVINA EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE TERNEROS Y SU INFLUENCIA EN LA PATOGENIA DE LA ENFERMEDAD

María Muñoz de Frutos

León, 2014

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR EN VETERINARIA POR LA UNIVERSIDAD DE LÉON

La autora de esta tesis doctoral disfrutó de una beca predoctoral FPU (Formación de Profesorado Universitario) del Ministerio de Educación.

La realización de este trabajo ha sido posible gracias al contrato de investigación entre la Universidad de León y CZ Veterinaria titulado “Estudio de la eficacia de la administración de una dosis de vacuna Gudair-vacuno a terneras de reposición”.

Puede ser un héroe tanto el que triunfa como el que sucumbe, pero jamás el que abandona el combate.

- Thomás Carlyle-

A mis padres,

A mi hermano,

A David

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradeceros, no sólo la colaboración directa en este trabajo, sino, el apoyo recibido y todo lo que he podido aprender de vosotros durante este tiempo. Al fin hemos llegado juntos al final de este camino. Dicen que el fin no justifica los medios, pero en este caso vosotros sois esos medios y para mí, mucho más importante que el fin.

En primer lugar, quisiera expresar un agradecimiento especial a los directores de esta tesis. A D. Juan Francisco García Marín, por haberme dado la oportunidad de trabajar en este estudio, y a D. Valentín Pérez Pérez, por dirigir este trabajo sacando tiempo para hacerlo entre sus múltiples ocupaciones y permitir que esto llegara a su fin.

Quisiera agradecer, enormemente, me faltarían palabras para ellos, a los que empezaron este trabajo incluso antes que yo. Al "grupo de la para" de León, especialmente a los que "pringasteis" como nadie en esos primeros momentos, ¡que estos terneros no os dejaron ni vacaciones de Navidad! A Carlos (caaaar), por la selección, vacunación, infección, muestreos, sacrificios, y el trabajo posterior….A Oscar, por lo mismo y por no olvidarte de tu cámara de fotos, ¡sin ti, ni fotos de los terneros tendría!. También a Luís Ernesto por encargarte de los terneros en sus comienzos….¡pobres!… y en aquellos primeros momentos también a Elbio, que nos visitó desde Argentina y colaboró activamente en la infección. A otra argentina, más revolucionaria, que se unió a este grupo poco después, Andrea, ¿qué habría hecho yo sin ti en el trabajo "más fino"?, y de la que he aprendido tanto, en lo científico y en lo que no lo es. Por supuesto a la última incorporación del "grupo", Laetitia a la que tengo que agradecer enormemente toda la ayuda en el laboratorio, redacción de la tesis, y los últimos "empujones" para que esto viera su fin y también, cómo no, todo lo compartido fuera del departamento, ¡de ti también he aprendido muchas cosas!. A Miguel (miiiii) que aunque, por razones del destino, no pertenece al "grupo de la para", para mi es uno más, por todas las veces que me acompañaste a muestrear estos terneros, ese trabajo lo valoro un montón, y también tu ayuda los días de sacrificio, y sobre todo a que finalmente esto pueda ser leído. A Julio, siempre dispuesto a ayudar, incluso mandando trabajos desde el Moredum…todos te agradecemos tu ayuda con la informática, y aunque en este caso, esta sea una mínima parte

de tu contribución a este trabajo, es cierto que sin ti no habría podido conseguirlo. A Marcos, por estar siempre dispuesto a ayudar y sobre todo por el gran trabajo de los últimos días. A Jorge, que aunque cuando “me metí en el mundo de la para”, tu “volaste de él”, después he tenido la suerte de contar contigo para todo lo que he necesitado, la experiencia es un grado. A Maica, por estar siempre dispuesta a ayudar y por llevar a cabo labores que no te pertenecían, siempre sacando tiempo y con la mejor disposición. Por supuesto a Valentín por conseguir la financiación de trabajo, que hoy en día es tan importante, y sin el que esto no podría haberse realizado, además de por los muestreos, sacrificios, correcciones, consejos….y por la paciencia y esfuerzo mostrados en este final

A las técnicos con la que he “convivido” durante estos años en el laboratorio: a Sonia, Gloria y Raquel, por echarme un cable cuando lo he necesitado en la parte que toca a la histología; y en el tema serológico a Bea, junto a Marta y Silvia que además colaboraron en la parte de PCR. Y en la sala de necropsias a Jaime, por su ayuda con las necropsias y “mantener” los botes intactos hasta el día de hoy.

Al Instituto Vasco de Investigación y Desarrollo Agrario (Neiker). Durante estos años sois muchos los que habéis estado ahí, investigadores y técnicos, así que para no olvidarme de nadie os quiero agradecer vuestra colaboración a todos sin excepción, pero en especial me gustaría hacerlo a la gente más “cercana” a este estudio. A Ramón, por “hacerte cargo” de la estadística y tu paciencia al explicármela, pero sobre todo por el entusiasmo mostrado por este trabajo. A Joseba por tu ayuda con los cultivos. A Mariví por “guiarme” cuando os he visitado, por tu grandísima ayuda con los cultivos, por introducirme en ese mundo y por resolver las dudas que me han ido surgiendo este tiempo y a Iker por tu inestimable colaboración en el trabajo “fino”, tu manera de plasmarlo, que ya se que en algunos momentos me he puesto un poco pesada y no has dudado en contestar a cada una de mis preguntas y sobre todo por los ánimos en los momentos de “desesperación”.

A CZ Veterinaria, muy especialmente a Eugenia Puentes, por proporcionarnos las vacunas y PPDs para este trabajo.

Al Instituto de Ganadería de Montaña de CISC-ULE, por permitirnos llevar a cabo allí el estudio y a los operarios por estar pendientes y cuidar de los animales mientras estuvieron en vuestras instalaciones.

En el “terreno informático” quisiera agradecer a Julio, Miguel, Gerardo, Iván, Marcos, Maikel … y en definitiva, a todos los que habéis estado a mi lado en estos años. Ya sabéis que la tecnología “me atropella” y me habéis rescatado en más de una ocasión.

Al resto de los que ahora estáis, habéis formado parte o habéis estado de pasada durante este tiempo por la Unidad de Histología y Anatomía Patológica, profesores, becarios, colaboradores…, por vuestro interés y por haber contribuido a que esto llegue a su fin.

Fuera de lo que a la tesis se refiere, me gustaría agradecer, una vez más, a todos los profesores de la Unidad de Histología y Anatomía Patológica de los que he aprendido mucho, por darme la oportunidad de formarme a vuestro lado en el campo de la Anatomía Patológica, que en definitiva es por lo que yo decidí “meterme en este mundo”. Además me gustaría destacar lo agradecida que les estoy a Maica y Valentín por “apoyarme económicamente” con sus proyectos cuando se me acabó la beca y hasta que la cosa “no dio para más”, así como por guiarme y acompañarme en los congresos…

Por supuesto no podría olvidarme de lo más importante para mí durante todos estos años, como ha sido mi relación con los becarios. De las experimentales que nos hemos “chupao”…con esos corderos y esas ovejitas, tan majos ellos…, ¡a ver si solo los terneros fueron los que dieron guerra! Hemos trabajado mucho, pero también hemos disfrutado mucho con ello, yo al menos. Recuerdo con especial añoranza aquellos primeros años llenos de viajes, semana si, semana también a explotaciones y mataderos (¡si no fuera por esos ratos!), con los que tanto aprendí. Parecía que “los de la para” no hacíamos otra cosa sino viajar, y sí, los viajes fueron divertidos, pero también duros fueron los madrugones, el frío, el calor, las agujetas en el brazo, las “peleas” con el personal pero compensado, por otro lado, con *las* de flores del rastro, y *las* de repuesto…, los baños en el río y *los de Oscar* secándose “al aire”…De ello ha surgido relación con ganaderos de explotaciones y

veterinarios de mataderos, de los que he aprendido mucho y de entre los que querría destacar a Juli de Trabancos, por lo bien que nos ha tratado siempre.

En el terreno mas personal hay muchísima gente a la que tengo que agradecer enormemente lo pendiente (rozando la pesadez en algunos momentos, , aunque después de tanto tiempo, no me extraña) que ha estado del devenir de la tesis…Para no olvidarme de nadie no pongo nombres, pero de todos me llevo un gran recuerdo. Una mención especial a aquellas personas que me apoyaron en los momentos más difíciles, vosotras sabéis quienes sois, solo espero poder corresponderos algún día.

A mi familia, que desde la distancia se preguntaba cuando acabaría esto.¡Pues al fin llegó!. Lástima no haber podido hacerlo antes para que pudieran verlo la tía y el abuelo, pero seguro que dónde estén, están tan orgullosos de su niña. A mis padres, a quienes siempre tengo presentes y los que luchan cada día porque a mi hermano y a mí no nos falte nada (¡a nuestra edad!) y podamos hacer lo que más nos gusta… por apoyarnos siempre. A mi hermanito, por lo mucho que me quiere y me apoya. También especialmente a Silvia, y al tío Enrique, por apoyarme y aconsejarme. Y como no, a David, por quererme tanto, por compartir conmigo tu vida y haberte embarcado junto a mi en el proyecto de lo que a partir de ahora va a ser lo más importante de la nuestra, nuestro hijo.

Espero haber sabido expresar suficientemente mi agradecimiento en estas líneas, si no es así, disculpadme, solo espero haber sabido demostrarlo en cada momento.

Muchas gracias a todos.

ÍNDICE

I.INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS.....1
I.1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS.....3

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....13
II.1. ETIOLOGÍA.....15
II.1.1. Historia, características generales y clasificación taxonómica de *Mycobacteriumavium* subespecies *paratuberculosis (Map)*.....15
II.1.2. Cepas de *Map*y relación con otras micobacterias.....18
II.1.3. Estructura de *Map*.....23
II.1.4. Medios de cultivo.....26
II.1.5. Persistencia en el medio.....29
II.2. EPIDEMIOLOGÍA.....31
II.2.1. Hospedadores susceptibles.....31
II.2.2. Distribución y prevalencia de la paratuberculosis.....32
II.2.2.1. Distribución y prevalencia de la paratuberculosis en ganado bovino.....32
II.2.2.2. Distribución y prevalencia de la paratuberculosis en ganado ovino y caprino.....36
II.2.3. Importancia económica.....39
II.3. PATOGENIA.....42
II.3.1. Contagio.....42
II.3.2. Entrada de *Map* en el organismo y localización inicial.....44
II.3.3. Respuesta inmunitaria del hospedador.....48
II.3.3.1. Respuesta inmunitaria innata.....48
II.3.3.2. Respuesta inmunitaria adaptativa.....54
II.3.3.2.1 Respuesta inmunitaria celular.....56
II.3.3.2.2 Respuesta inmunitaria humoral.....62
II.4. CUADRO CLÍNICO Y LESIONAL.....65
II.4.1. Cuadro clínico.....65
II.4.2. Cuadro lesional.....67
II.4.2.1. Lesiones macroscópicas.....67
II.4.2.2. Lesiones microscópicas.....69
II.4.2.3. Lesiones extraintestinales.....72
II.4.2.4. Clasificaciones lesionales.....73
II.4.2.4.1. Clasificación lesional en la especie bovina.....74
II.4.2.4.2. Clasificación lesional en la especie ovina.....79
II.4.2.4.3. Clasificación lesional en la especie caprina.....86
II.4.2.4.4. Clasificación lesional en animales silvestres.....89
II.4.3. Relación entre formas lesionales y respuesta inmunitaria.....91
II.5. MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO.....96
II.5.1. Diagnóstico clínico y epidemiológico.....96
II.5.2. Diagnóstico anatomopatológico.....97
II.5.3. Diagnóstico bacteriológico.....102
II.5.3.1. Identificación de las micobacterias en frotis.....102
II.5.3.2. Cultivo.....103
II.5.3.3. Técnicas de identificación genética.....109
II.5.4. Diagnóstico inmunológico.....113
II.5.4.1 Técnicas de diagnóstico basadas en la inmunidad celular.....114
II.5.4.1.1. Puebas*in vivo*.....115
II.5.4.1.1.1. Intradermorreacción (IDR).....115

II.5.4.1.2. Pruebas *in vitro* 117
II.5.4.1.2.1. Prueba de liberación de Interferón- γ (IFN- γ) 117
II.5.4.1.2.2. Test de transformación linfocitaria, Detección de la Interleuquina 2 (IL-2) e Inhibición de la migración linfocitaria. 121
II.5.4.2. Técnicas de diagnóstico basadas en la inmunidad humoral 122
II.5.4.2.1. Inmunodifusión en gel de agar (IDGA) 123
II.5.4.2.2. ELISA indirecto 124
II.6.TRATAMIENTO Y CONTROL 128
II.6.1. Tratamiento 128
II.6.2. Control 129
II.6.2.1. Control mediante eliminación de animales infectados 130
II.6.2.2. Control mediante medidas higiénico sanitarias 133
II.6.2.3. Control basado en la vacunación 134
II.6.2.3.1. Tipos de vacunas 138
II.6.2.3.2. Adyuvantes 142
II.6.2.3.3. Pautas vacunales 144
II.6.2.3.4. Efectos adversos 147
II.6.2.3.5. Evaluación de las vacunas 150
II.6.2.3.6. Respuesta inmune asociada a la vacunación 158
II.7. INFECCIONES EXPERIMENTALES 162
II.7.1. Infecciones experimentales en la especie bovina 167
II.7.2. Infecciones experimentales en la especie ovina 180
II.7.3. Infecciones experimentales en la especie caprina 184
II.7.4. Infecciones experimentales en otras especies 187
II.8. RELACIÓN ENTRE LA PARATUBERCULOSIS Y LA TUBERCULOSIS BOVINA 192
II.8.1. Relación lesional 192
II.8.2 Relación entre las pruebas de diagnóstico 194
II.9 RELACIÓN DE *Map* CON PATOLOGÍAS HUMANAS: LA ENFERMEDAD DE CROHN Y OTRAS IMPLICACIONES EN LA SALUD PÚBLICA 201

III.MATERIAL Y MÉTODOS 211
III.1. ANIMALES ESTUDIADOS 213
III.1.1. Selección de animales 213
III.1.2. Grupos y tratamientos 213
III.1.2.1. Vacunación 215
III.1.2.2. Infección experimental 215
III.1.2.2.1. Preparación del inóculo 215
III.1.2.2.2. Caracterización molecular del inóculo 218
III.1.2.2.3. Pauta y dosis de infección 219
III.1.3. Periodo de estudio y toma de muestras “in vivo” 222
III.1.4. Estudios realizados 223
III.1.4.1. Estudios “*in vivo*” 223
III.1.4.1.1. Seguimiento clínico 223
III.1.4.1.2.Valoración del nódulo vacunal 223
III.1.4.1.3. Estudio de la respuesta inmune periférica 224
III.1.4.1.3.1. Respuesta inmune humoral 224
III. 1.4.1.3.1.1. ELISA indirecto 225
III.1.4.1.3.1.1.1. ELISA indirecto frente a paratuberculosis 225

III.1.4.1.3.1.1.2. ELISA indirecto frente a tuberculosis....228
III.1.4.1.3.1.2. IDGA....230
III.1.4.1.3.2.1. Intradermorreacción (IDR) comparada....231
III.1.4.1.3.2.2. Valoración de la producción de IFN-γ....233
III.1.4.1.4. Estudios bacteriológicos en heces....236
III.1.4.1.4.1. Cultivo de heces....236
III.1.4.1.4.2. PCR de heces....241
III.1.4.1.4.2.1. Extracción de las micobacterias....241
III.1.4.1.4.2.2. Lisis y extracción de ADN micobacteriano....241
III.1.4.1.4.2.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)....242
III.1.4.1.4.2.4. Visualización de los resultados....244
III.1.4.1.5. Estudio bacteriológico en suero: PCR de suero....245
III. 1.4.1.5.1. Lisis y extracción de ADN micobacteriano....245
III.1.4.1.5.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)....246
III.1.4.2. Estudios "*post-mortem*"....246
III.1.4.2.1. Estudios anatomopatológicos....246
III.1.4.2.1.1.Necropsia, estudio macroscópico y toma de muestras....246
III.1.4.2.1.2. Procesamiento histológico....247
III.1.4.2.1.3. Clasificación de lesiones....250
III.1.4.2.1.4. Recuento de granulomas y valoración del área lesional....251
III.1.4.2.1.5. Detección inmunohistoquímica de *Map*....253
III.1.4.2.2. Detección de *Map* mediante cultivo de tejidos....256
III.1.4.2.3. Detección de *Map* mediante PCR de tejidos....257
III.1.4.2.3.1. PCR de tejidos frescos....257
III.1.4.2.3.1.1. Extracción de la micobacteria....257
III.1.4.2.3.1.2. Purificación de las micobacterias....258
III.1.4.2.3.1.3. Lisis y extracción del ADN micobacteriano....258
III.1.4.2.3.1.4. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)....258
III.1.4.2.3.2. PCR de tejidos incluidos en parafina....259
III.1.4.2.3.2.1. Lisis y extracción del ADN micobacteriano....259
III.1.4.2.3.2.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)....260
III.1.4.2.4. Valoración de la producción de IFN-γ por linfocitos tisulares....260
III.1.4.2.4.1. Extracción y purificación de linfocitos de los órganos....260
III.1.4.2.4.2. Incubación de linfocitos y órganos....261
III.1.4.2.4.3. Valoración de la producción de IFN-γ....262
III.2. MATERIAL ÓPTICO, FOTOGRÁFICO E INFORMÁTICO....263
III.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO....263

IV.RESULTADOS....267
IV.1. ESTUDIOS "IN VIVO"....269
IV.1.2. Valoración de la temperatura corporal....269
IV.1.3.Valoración del nódulo vacunal....271
IV.1.4. Estudio de la respuesta inmunitaria periférica....276
IV.1.4.1. Respuesta inmunitaria humoral....276
IV.1.4.1.1. ELISA indirecto....276
IV.1.4.1.1.1. ELISA indirecto frente a paratuberculosis....276
IV.1.4.1.1.2. ELISA indirecto frente a tuberculosis....278
IV.1.4.1.2. IDGA....280
IV.1.4.2. Respuesta inmune celular....284

IV.1.4.2.1. Intradermorreacción (IDR) comparada....284
IV.1.4.2.2. Valoración de la producción de IFN-γ....286
IV.2. Estudios *post-mortem*....295
IV.2.1.Estudios anatomopatológicos....295
IV.2.1.1. Lesiones macroscópicas asociadas a paratuberculosis....295
IV.2.1.2. Lesiones microscópicas asociadas a la paratuberculosis....297
IV.2.1.2.1. Estudio y clasificación de las lesiones histológicas.... 298
IV.2.1.2.2. Distribución de los animales según el tipo de lesión....313
IV.2.1.2.3. Recuento del número de granulomas....327
IV.2.1.2.4. Área ocupada por las lesiones granulomatosas en los nódulos linfáticos....345
IV.2.1.3. Lesiones microscópicas no asociadas a paratuberculosis....356
IV2.2. Estudios bacteriológicos....357
IV.2.2.1. Cultivo de material fecal....357
IV.2.2.2. Cultivo de tejidos....357
IV.2.2.3. Reacción en cadena de la polimerasa en muestras fecales....360
IV.2.2.4 Reacción en cadena de la polimerasa en muestras de tejidos....360
IV.2.2.4.1. Tejidos frescos....360
IV.2.2.4.2. Tejidos incluidos en parafina....364
IV.2.2.5. Reacción en cadena de la polimerasa en suero....367
IV.3. RESULTADOS GLOBALES....372
IV.3.1. Relación entre los tipos de lesión y los resultados de las distintas pruebas diagnósticas....372
IV.3.2 Relación entre las diferentes pruebas diagnósticas....380
IV.3.3. Producción *in vitro* local de IFN -γ....383

V.DISCUSIÓN....395
V.1.DISCUSIÓN....397

VI.CONCLUSIONES....441
VI.1. CONCLUSIONES....443

VII.RESUMEN, SUMMARY....445
VII.1.RESUMEN....447
VII.2.SUMMARY....453

VIII. BIBLIOGRAFÍA....459
VII.1.BIBLIOGRAFÍA....461

IX. ANEXOS....533
VII.1.ANEXOS....535

I.INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

I.1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

La paratuberculosis o enfermedad de Johne es una enfermedad infecciosa causada por *Mycobacterium avium* subespecies *paratuberculosis* (*Map*), que afecta a numerosas especies de rumiantes tanto domésticos como silvestres, así como a diferentes especies de monogástricos. Los animales que la padecen presentan una enteritis y linfadenitis granulomatosa de curso crónico que provoca, como signos clínicos más frecuentes, adelgazamiento progresivo, diarrea, y finalmente la muerte de los individuos afectados (Chiodini *et al*., 1984a; Clarke, 1997).

La vía de contagio principal de esta infección es la digestiva, mediante la transmisión fecal-oral, al ingerir los animales bacilos eliminados por individuos que excretan micobacterias en heces (Sweeney, 1996), las cuales pueden contaminar el agua, leche, calostro o cualquier otro alimento (Chiodini *et al*., 1984a; Juste y Aduriz, 1990a; Clarke, 1997). Aunque se ha señalado que los animales adultos pueden infectarse tras la exposición a grandes dosis de la bacteria (Rankin, 1962; Delgado *et al*., 2013), la infección sucede principalmente cuando los animales son jóvenes si bien los signos clínicos no se manifiestan hasta la edad adulta (Julian, 1975; Chiodini *et al*., 1984a; Juste y Aduriz, 1990b; García Marín *et al*., 2000; Brown *et al*., 2007).

La paratuberculosis se encuentra distribuida ampliamente por todo el mundo (Kátic, 1977; Chiodini *et al*., 1984a; Brown *et al*., 2007) y ocasiona cuantiosas pérdidas económicas en los rebaños infectados. En España fue confirmada por primera vez en 1973 en la especie ovina (Aller *et al*., 1973) y desde entonces ha sido diagnosticada en multitud de ocasiones en pequeños rumiantes. En la especie bovina, a pesar de que se sospechaba su existencia desde principios del siglo XX (Roca, 1935), no es hasta 1981 cuando se confirma la presencia de paratuberculosis en esta especie en nuestro país (Juste *et al*., 1983), y desde entonces se ha diagnosticado, cada vez con más frecuencia, en diferentes regiones.

Los estudios de prevalencia de la enfermedad en la especie bovina, tanto en España como en el resto del mundo, han revelado diferentes resultados en función de la técnica empleada, el número de animales estudiados, su edad o aptitud y la región

examinada. En rebaños del País Vasco se ha estimado una prevalencia de entre el 30,4% y el 31,3% en ganado bovino de aptitud lechera al emplear técnicas diagnósticas histopatológicas, bacteriológicas y serológicas (Juste *et al*., 2000b; Garrido, 2001). Los valores descienden, también en la misma zona geográfica, cuando se utiliza una única técnica, al 20% al emplear PCR a tiempo real, 18,7% mediante cultivo de tejidos, 13,6% utilizando técnicas histopatológicas y 8,3% mediante ELISA en muestras sanguíneas (Vázquez *et al*., 2009) o incluso al 0,5% al emplear cultivo de heces (Garrido, 2001). En Asturias las prevalencias estimadas en esta especie han sido del 10% con el empleo de técnicas serológicas y del 44,39% al emplear técnicas histopatológicas (Balseiro, 2004). En Galicia, mediante ELISA en muestras sanguíneas, se observó una prevalencia en granjas entre el 2,78% y el 27,77, en función de la aptitud del rebaño (Diéguez *et al*., 2007). En el conjunto de comunidades autónomas, al emplear PCR en muestras de leche de tanque, se encontró una prevalencia del 10%, pudiendo estar subestimada por la baja sensibilidad de la muestra y el pequeño tamaño muestral (Sevilla *et al*., 2003).

La importancia económica de la paratuberculosis radica en las grandes pérdidas económicas que ocasiona en los rebaños afectados, tanto por la eliminación o muerte de animales (Jhonson-Ifearulundu *et al*., 1999; Ott *et al*., 1999; Lombard *et al*., 2005) como por el descenso en la producción (Merkal *et al*., 1975a; Buergelt y Duncan, 1978; Chiodini *et al*., 1984a; Chiodini y Van Kruiningen, 1986; Benedictus *et al.*, 1987; Juste y Adúriz, 1990a, Spangler *et al*., 1992**;** Wilson *et al*., 1993; Aduriz *et al*., 1994; Van Schaick *et a*l., 1996; Juste, 1997; Stabel, 1998; Ott *et al*., 1999; Aduriz *et al*., 2000; Kennedy y Benedictus, 2001; Bush *et al*., 2006; McKenna *et al*., 2006; Tiwari *et al.*, 2008; Kudahl y Nielsen, 2009; Aly *et al*., 2010). Además, la paratuberculosis es motivo de creciente preocupación por su posible implicación en la salud pública, al sospecharse que *Map* pudiera estar involucrado en la etiología de la enfermedad de Crohn de la especie humana, ya que esta patología presenta similitudes clínicas e histopatológicas con la partuberculosis y *Map* ha sido aislado de sangre, leche y tejidos de pacientes con enfermedad de Crohn (Naser *et al*., 2000b; Schwartz *et al*. 2000, Bull *et al*., 2003; Naser *et al*., 2004; Sechi *et al*., 2005; Juste *et al*., 2009b). Por todas estas razones, se llevan realizando cuantiosos esfuerzos a nivel mundial para el control de la paratuberculosis. El tratamiento farmacológico solo se recomienda en individuos de alto valor genético (St Jean y Jernigan, 1991) ya que no existe un quimioterápico antimicrobiano

totalmente eficaz para tratar esta enfermedad (Juste y Sáez de Ocáriz, 1990; St-Jean y Jeringan, 1991; Aduriz *et al.*, 2000), además de ser un procedimiento inviable económicamente y no conseguir la curación completa (Stabel, 1998).

Las medidas más utilizadas en el control de la paratuberculosis han sido el diagnóstico y eliminación de los animales infectados, medidas higiénico-sanitarias y la vacunación (Nisbet *et al*., 1962; Juste y Casal, 1993; Pérez *et al*., 1995; Bakker *et al*., 2000; Kennedy y Benedictus, 2001; Kalis *et al.*, 2001; Dorshorst *et al*., 2006; Lu *et al.*, 2008). Desde los años 30 del siglo pasado se conoce la eficacia de la vacunación en el control de esta enfermedad (Vallée *et al*, 1934). A partir de entonces, han sido varios los productos vacunales, tanto inactivados (Sigurdsson y Ttyggvadóttir, 1949 y 1950; Sidgurdsson, 1960; Huitema, 1968; Larsen *et al*., 1978; Chiodini *et al*., 1984; Benedictus *et al*., 1988; Leslie *et al*., 1988; Wentink *et al*., 1992; Kalis *et al*., 1992; Aduriz, 1993; Kömerdy, 1994; García-Pariente *et al*., 2002; Reddacliff *et al.*, 2006; Reyes, 2007; Sweeney *et al*., 2009; Eppleston *et al*., 2011; Alonso-Hearn *et al*., 2012; Hüttner *et al*, 2012; Dhand *et al*., 2013; Knust *et al*., 2013; Hines II *et al*., 2014; Tewari *et al*., 2014; Windsor *et al*., 2014) como atenuados (Larsen *et al*., 1964; Crowther *et al* 1976; Saxegaard y Fodstad, 1985; Aduriz, 1993; Gwozdz *et al*., 2000a; Begg y Griffin, 2005), que se han ido desarrollando. En España, la única vacuna que está comercializada (Gudair®, Farco) está compuesta por la cepa 316F de *Map* empleando aceites minerales como adyuvante. Esta vacuna, de eficacia comprobada en varios estudios en pequeños rumiantes (Tellechea *et al*., 1993; García Marín *et al.*, 1995b; 1997;1999b; Corpa *et al*., 2000c; Kennedy y Allworth, 2001; García-Pariente *et al*., 2002, Thompson *et al*., 2002; Windsor *et al*., 2003; Eppleston *et al*., 2004, 2005, 2011; Reddacliff, 2006; Reyes, 2007; Toribio *et a*l., 2007; Singh *et al*., 2007; Griffin *et al.*, 2009; Hüttner *et al*., 2012; Dhand *et al*., 2013; Windsor *et al*., 2014), tiene como uno de sus inconvenientes la formación de nódulos subcutáneos que pueden alcanzar un tamaño considerable e incluso ulcerarse (García Marín *et al*., 1999b; Reddacliff *et al*., 2006; Windsor y Eppleston, 2006; Eppleston y Windsor, 2007; Reyes, 2007) Recientemente se ha diseñado un nuevo producto vacunal frente a paratuberculosis (Silurum®) que emplea como adyuvante el producto Montanide ISA® (Seppic, Francia) que contiene diferentes aceites junto con oleato de manitol. Aunque actualmente en España solo se permite la vacunación en pequeños rumiantes debido a las interferencias

que su administración podría provocar en las pruebas de diagnóstico de la tuberculosis bovina, en otros países como Australia o algunos estados europeos, si se contempla este procedimiento de control, habiéndose autorizado el producto ya mencionado para su uso en ganado bovino (Silirum®, Zoetis).

Así pues, bajo la hipótesis de que la administración de este nuevo producto vacunal tendría efectos en el control de la infección por *Map*, así como en las distintas respuestas que dicha infección provoca en el hospedador, el **objetivo general** de esta Tesis Doctoral sería analizar dichos efectos en un modelo experimental. Por lo tanto, **el primer objetivo** es **valorar la eficacia de una nueva vacuna frente a paratuberculosis en el control de la infección por *Map* en terneros infectados experimentalmente.**

La patogenia es un aspecto de la paratuberculosis del cual se desconocen todavía muchos detalles debido, entre otras causas, a los inconvenientes que plantea el aislamiento laboratorial de *Map*, al amplio periodo de incubación de la propia enfermedad o a la dificultad para reproducir experimentalmente sus características típicas (Coussens, 2004; Stevenson, 2005). Gran parte de los conocimientos que se tienen se han adquirido tras la realización de infecciones experimentales en ovino y caprino, especies más asequibles que el bovino para este tipo de trabajos (Begg *et al*., 2005; Hines II *et al*., 2007b; Begg y Whittington, 2008). En la especie bovina, los trabajos más detallados se llevaron a cabo en los años 60 y 70 del siglo pasado (Payne y Rankin; 1961a; 1961b; Gilmour *et al*., 1965a; Larsen *et al*., 1975a), centrándose sobre todo en la distribución del agente o la aparición de lesiones en los distintos órganos, pero sin caracterizar éstas específicamente. En los últimos años nuestro grupo de investigación ha propuesto un modelo de desarrollo lesional basado en la valoración detallada de la aparición de lesiones granulomatosas en el tejido linfoide intestinal y su progresión hacia distintas zonas del intestino y nódulos linfáticos regionales tanto en estudios experimentales (Delgado *et al*., 2013; Fernández *et al*., 2014) como en casos naturales (Pérez *et al*., 1996; Corpa *et al*., 2000a; González *et al*., 2005). Un **segundo objetivo** de este estudio es **contribuir al conocimiento de la patogenia de la paratuberculosis bovina en un modelo experimental, basado en el desafío por vía oral en terneros de dos meses de edad**, aplicando los criterios anteriormente empleados en pequeños rumiantes.

En estudios experimentales previos llevados a cabo en pequeños rumiantes (Nisbet *et al*., 1962; Juste *et al*., 1994; García Marín *et al*., 1995c; 1997) se ha podido determinar que la vacunación provoca una modificación de la patogenia de la infección por *Map*, causando una disminución en el número de lesiones, su mayor restricción en cuanto a localización al tejido linfoide y modificaciones en la morfología de los granulomas. Sin embargo, no se han llevado a cabo evaluaciones específicas de estos aspectos en la especie bovina. Por ello, un **tercer objetivo** de esta Tesis Doctoral es **estudiar la influencia de la vacunación en la patogenia de la paratuberculosis bovina** en el modelo experimental anteriormente mencionado.

Debido a la gran variabilidad lesional que se puede encontrar en los animales infectados por *Map*, se han realizado varias clasificaciones de las lesiones asociadas a la paratuberculosis en las diferentes especies de rumiantes (Stamp y Watt, 1954; Rajya y Singh, 1961; Buergelt *et al*., 1978; Paliwal y Rajya, 1982; Reddy *et al*., 1984; Carrigan y Seaman, 1990; García Marín *et al*., 1992b; 1992c; 1999a; Menchén, 1995; Pérez *et al*., 1996; Clarke y Litle, 1996; Corpa *et al*., 2000a; Tafti y Rashidi, 2000; Kurade *et al*., 2004; González *et al*., 2005; Kheirandish *et al*., 2008; Balseiro *et al*., 2008;Clark *et al*., 2010), lo que ha permitido conocer su asociación con las diferentes fases de la infección o con la respuesta de los animales infectados a diferentes pruebas de diagnóstico (Pérez *et al*., 1996; 1997; González, 2003; Vázquez *et al*., 2013). En la especie bovina, los estudios histopatológicos llevados a cabo para clasificar las lesiones han sido bastante más escasos que en los pequeños rumiantes domésticos. La primera clasificación la realizan Buergelt *et al.* (1978), reconociendo tres formas según la extensión y gravedad de la lesión granulomatosa. Más recientemente, nuestro grupo de investigación ha publicado una clasificación (González *et al.*, 2005) llevada a cabo en casos naturales de infección por *Map*, en la que se reconocen las denominadas formas focales y multifocales, encontradas en animales subclínicos y que se sugiere que pudieran estar asociadas a las fases iniciales o latentes de la infección, y las lesiones difusas, con varias categorías dentro de ellas, relacionadas con la fase clínica. Esta hipótesis planteada en cuanto a la relación de las lesiones con los diferentes estadios de la infección no ha sido comprobada en estudios experimentales. Así, el **cuarto objetivo concreto** de este estudio es el de **validar, en un modelo experimental, la clasificación de lesiones de la paratuberculosis bovina propuesta en un estudio realizado en casos naturales.**

Una vez que se produce la entrada de *Map* en el organismo, principalmente a través de las células M (Momotami *et al.*, 1988; García Marín *et al.*, 1992a; Sigurdardóttir *et al.*, 2001) que revisten a las placas de Peyer, se produce el contacto entre la bacteria y el sistema inmunitario del hospedador, que es uno de los principales factores que va a determinar la evolución que siga la infección (Sigurdardóttir *et al.*, 2004). La primera línea de defensa con la que se encuentra *Map* es la respuesta inmunitaria innata, la cual es primordial para la puesta en marcha de la respuesta inmunitaria adaptativa, así como para la orientación de la misma (Fearon y Locksley, 1996; Medzhitov y Janeway, Jr., 1997; Vasselon y Detmers, 2002). Consiste en el reconocimiento, sin necesidad de una exposición previa, de moléculas esenciales de los patógenos, de tal forma que las mutaciones que se produzcan en estos organismos no impidan que sean detectados por el hospedador (Fearon y Locksley, 1996; Medzhitov y Janeway, Jr., 1997; Medzhitov y Janeway, Jr., 2000; Vasselom y Detmers; 2002). Recientemente se ha sugerido que un importante mecanismo que participa en la respuesta inmunitaria innata y que podría jugar un papel importante en la patogenia de la paratuberculosis, es la producción basal, no específica, de interferón-gamma (IFN-γ), probablemente por parte de células NK (Olsen *et al.*, 2005; Geijo, 2007).

Tras el establecimiento de la infección en los macrófagos se activa un respuesta inmunitaria de tipo adaptativo mediada por linfocitos T que provoca la secreción de una cascada de citoquinas, de forma que se ha señalado que en las fases iniciales dicha respuesta sería de tipo celular o Th1, que es la que tendría carácter protector y limitante de la multiplicación bacteriana, siendo el IFN-γ la principal citoquina implicada. En la mayor parte de los casos, cuando la infección por *Map* evoluciona hacia formas clínicas con abundante excreción de bacilos hay una transición desde la respuesta Th1 hacia formas Th2, donde predomina la respuesta humoral y son la IL-10 o IL-4 las principales citoquinas involucradas (Stabel, 2000a, 2006; Coussens, 2001; Kidd, 2003). Sin embargo, existen evidencias recientes de que esta secuencia de evolución de la respuesta inmunitaria no tendría por qué producirse siempre en este sentido (Begg *et al.*, 2011; Vázquez *et al.*, 2013). El **quinto** objetivo de este trabajo es **analizar distintos componentes de la respuesta inmunitaria -tanto celular como humoral y a nivel periférico y local- que se desarrolla como consecuencia de la infección experimental por *Map* en terneros.**

La administración de la vacuna frente a paratuberculosis induce en el hospedador una intensa respuesta inmunitaria que es la causa de resultados positivos en las pruebas diagnósticas de valoración de la inmunidad celular y humoral, tanto para paratuberculosis como para tuberculosis (Vallé y Rinjard, 1926; Stuart, 1962; Gilmour y Brotherson, 1966; Larsen *et al*., 1978; Chiodini *et al*., 1984a; Merkal, 1984; Wentink *et al*., 1988; Spangler *et al*., 1991; Aduriz, 1993; Corpa, 1999; Köhler *et al*., 2001; Muskens *et al*., 2002). Además, la potencia inmunizante y protectora de una vacuna se ha asociado precisamente a su capacidad de inducir una respuesta de tipo celular, en la que intervienen fenómenos de hipersensibilidad de tipo retardado, la cual se puede medir poco tiempo después de la vacunación (Gilmour, 1976; Chiodini *et al*., 1984a). El **sexto objetivo** de esta Tesis Doctoral es la **evaluación de las modificaciones inducidas por la vacunación frente a paratuberculosis en la respuesta inmunitaria periférica y local, en terneros vacunados e infectados de forma experimental.** Un objetivo adicional en relación con los dos últimos, es la **valoración del papel que juega la producción no específica de IFN-γ en la infección por *Map* y el efecto que sobre la misma pudiera ejercer la vacunación.**

Uno de los efectos indeseables de la vacunación, que ha motivado la prohibición de su uso en varios países como España, es la aparición de interferencias con las pruebas de diagnóstico inmunológico de la tuberculosis bovina empleada en las campañas de erradicación de esta enfermedad (Stuart, 1962; Khöler *et al*., 2001; Klawoon *et al*., 2002; Bastida y Juste, 2011). Dicha interferencia se debería a la existencia de antígenos comunes en los agentes etiológicos de la tuberculosis y paratuberculosis de forma que, con las pruebas empleadas habitualmente, ocurren reacciones positivas. Como **séptimo** objetivo de este trabajo se encuentra el **analizar las interferencias que induce la vacunación en las pruebas de diagnóstico inmunológico de tuberculosis, tanto en las basadas en la respuesta inmune celular como humoral.**

Además de interferencias en el diagnóstico, se ha señalado que la vacunación provoca otros efectos adversos como la auto-inyección de la persona que realiza la inoculación (Jorgensen, 1983b; Sherman, 1985; Patterson *et al*., 1988; Juste y Sáez de

Ocáriz, 1990), o la producción en el punto de inyección, de un nódulo fibroso con cavidades que contienen material necrótico, que en ocasiones puede salir al exterior por medio de una fístula y que puede alcanzar tamaños importantes en los animales (Stuart, 1962; Benedictus *et al*., 1988) lo que podría dificultar su movilidad así como provocar devaluación en las canales (Eppleston y Windsor, 2007). El **octavo objetivo concreto** de este estudio ha sido **valorar las posibles reacciones adversas en el animal, a nivel local y sistémico, provocadas por la inmunización de terneros con la vacuna Silirum®.**

En la mayoría de estudios en los que se ha valorado la eficacia de la vacunación, ésta se ha determinado mediante el estudio de parámetros productivos, analizando la reducción de los signos clínicos y de la tasa de mortalidad; parámetros epidemiológicos, evaluando las tasas de infección y también valorando la frecuencia de aparición y gravedad de las lesiones. Este último aspecto ha sido empleado en diferentes trabajos de campo en la especie bovina (Kalis *et al*., 1992; Wentink *et al*., 1994; van Schaik *et al*., 1996; García-Pariente *et al*., 2005; Alonso-Hearn *et al*., 2012), aunque en escasos y muy antiguos estudios experimentales (Hagan, 1935; Larsen *et al.*, 1974). Nuestro grupo de trabajo ha desarrollado un modelo histopatológico para evaluar el resultado de infecciones experimentales con *Map* en la especie ovina (Delgado *et al*., 2013, Fernández *et al*., 2014) basado en la valoración de la intensidad de las lesiones, tanto mediante el recuento de granulomas en el intestino y nódulos linfáticos, como analizando la distribución de las lesiones en las diferentes zonas de la mucosa intestinal, de acuerdo con la patogenia de esta infección. El **noveno** objetivo del presente trabajo es la evaluación de la **utilidad del método histopatológico desarrollado en la especie ovina en la valoración de la eficacia vacunal en ganado bovino en un estudio experimental.**

Numerosos estudios, tanto experimentales y especialmente algunos realizados en campo, han puesto de manifiesto que, aunque la vacunación no previene la infección por *Map*, sí que provoca una reducción en su excreción fecal (Larsen *et al*., 1974; Hurley y Ewing, 1983; Jorgensen *et al*., 1983b; Marly *et al*., 1988; Leslie *et al*., 1988; Argenté *et al*., 1992; Kormendy *et al*., 1994; Dimarelli-Malli *et al*., 1997; Mohr, 2000; Kalis *et al*., 2001; Klawonn *et al*., 2002; Eppleston *et al*.,2005; Koets *et al*., 2006;

Patton *et al*., 2006; Reddacliff *et al*., 2006; Singh *et al*., 2007; Toribio *et al*., 2007; Griffin *et al*., 2009; Juste *et al*., 2009a; Alonso-Hearn *et al*., 2012; Knust *et al*., 2013; Tewari *et al*., 2014). En este trabajo, el **décimo** objetivo sería **valorar el efecto de la vacunación sobre la excreción fecal y la colonización de tejidos por *Map*, en terneros vacunados e infectados experimentalmente**.

Como ya se ha señalado, los animales infectados por *Map* muestran una variabilidad de lesiones que se pueden asociar con diferentes respuestas a técnicas de diagnóstico inmunológico (Pérez *et al*., 1996; 1997; González, 2003; Vázquez *et al*., 2013). Además, dichas lesiones muestran también una gran variabilidad en cuanto a la presencia de *Map* en ellas (García Marín *et al*., 1992b; 1992c; Pérez *et al.*, 1996; Corpa *et al*., 2000a; González *et al*., 2005; Verna *et al*., 2007; Geijo, 2007; Delgado *et al*., 2013; Fernández *et al*., 2014), siendo conveniente en muchos casos, realizar un diagnóstico etiológico en el propio tejido lesionado. Así, el **undécimo** objetivo de esta Tesis Doctoral es la **evaluación y comparación de diferentes técnicas de diagnóstico, tanto inmunológico como etiológico, en animales que presentan diferentes tipos lesionales.**

Como **objetivo final**, pero no menos importante, nos planteamos al comenzar esta Tesis Doctoral, fomentar la formación de la estudiante de doctorado en el campo de la Sanidad Animal, y en particular en el ámbito de la investigación científica de la Anatomía Patológica Veterinaria, mediante la estancia en este departamento así como en otros centros de investigación y la asistencia y participación en cursos y congresos de Anatomía Patológica Veterinaria, en general, y de paratuberculosis, en particular.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

II.1. ETIOLOGÍA

II.1.1. Historia, características generales y clasificación taxonómica de *Mycobacterium avium* subespecies *paratuberculosis (Map)*

La paratuberculosis está causada por *Mycobacterium avium* subespecies *paratuberculosis*, un bacilo del género *Mycobacterium* (Lehman y Neuman, 1986) . Se trata del único género de la familia Mycobacteriaceae (Wayne y Kubica, 1986; Shinnick y Good, 1994) que, a su vez, pertenece al suborden Corynebacterinae, orden Actinomycetales, subclase Actinobacteridae, clase Actinobacteria, división Firmacutes y superreino Bacteria (Stackebrandt *et al*., 1997).

Las características mínimas que deben poseer las diferentes especies para ser incluidas dentro del género *Myocbacterium* son (Levy-Febrault y Portaels, 1992; Shinnick y Good, 1994):

- Resistencia a la decoloración con alcohol ácido o ácido-alcohol resistencia.
- Presencia de ácidos micólicos de 60-90 carbonos que por pirolisis se degradan a metil-ésteres de ácidos grasos de 22 a 26 carbonos.
- Contenido de G+C del ADN cromosomal de entre un 61% y un 71%.

Más recientemente se han establecido otras recomendaciones para la descripción de nuevas especies que incluyen como instrumentos más comunes pruebas de cultivo, bioquímicas y genéticas (Tortoli, 2003). Las pruebas de cultivo incluyen temperatura y velocidad de crecimiento así como morfología y pigmentación de las colonias y, para los organismos de crecimiento rápido, tolerancia a NaCl y crecimiento en el medio de MacConkey. Entre las pruebas bioquímicas más utilizadas, destacan la de arilsulfatasa de 3 días, reducción de nitrato, hidrólisis de Tween 80 y urea, catalasa a 68ºC y semicuantitativa. Finalmente como prueba genética, la secuenciación del gen 16 rRNA completo, o de al menos las primeras 500 pbb.

En cuanto a la velocidad de crecimiento, las micobacterias se dividen en dos grupos: las de crecimiento rápido y las de crecimiento lento. Las primeras son aquellas

que forman colonias visibles en menos de siete días, mientras que si este tiempo es superior, debido a su bajo ritmo metabólico que hace que el periodo de generación sea mucho mayor al de la mayoría de bacterias, son clasificadas como micobacterias de crecimiento lento (Shinnick y Good, 1994). Dentro de estas últimas se encuentran las principales especies capaces de producir lesiones, aunque algunas de crecimiento rápido también pueden ser patógenas (Stahl y Urbance, 1990; Shinnick y Good, 1994).

Mycobacterium avium subespecies *paratuberculosis* posee la mayoría de características biológicas del género *Mycobacterium*, aunque presenta peculiaridades que le hacen singular, incluso dentro de su propia especie (Juste *et al*., 2000a).

La paratuberculosis fue diagnosticada por primera vez por Johne y Frotingham en 1895 en una vaca, en lo que en principio estimaron como una forma inusual de tuberculosis intestinal, e identificando una micobacteria que consideraron de tipo aviar (Johne y Frotingham, 1895). Debido a sus diferentes características, más tarde, se propuso como una especie diferente. A lo largo del tiempo ha recibido muchos nombres: inicialmente *Mycobacterium enteritidis chronicae pseudotuberculosae bovis* (Twort e Ingram, 1911a; 1911b), aunque por su complejidad y porque se observó que afectaba a más especies, además de a la bovina, se le dieron otros nombres más sencillos como *Mycobacterium paratuberculosis* (Bergey *et al*., 1923) o *Mycobacterium johnei* (Francis, 1943). El nombre actual de *Mycobacterium avium* subespecies *paratuberculosis*, o de forma abreviada *Map* (Juste, 1997) se debe a una revisión del complejo *Mycobacterium avium-paratuberculosis* realizada por Thorel *et al*. (Thorel *et al.*, 1990), en la que se afianzó *Map* como subespecie, aunque no exento de polémica, ya que se llegó a plantear un debate sobre esta terminología, y hay quienes preferían denominarlo *Mycobacterium paratuberculosis* (Hines, 1997; Juste, 1997; Stevenson y Sharp, 1997), entre otras razones porque en la clasificación de Thorel *et al.* (1990) sólo se considera a *Map* de origen bovino cuyo crecimiento es estimulado por el piruvato en medios clásicos de yema de huevo.

En cuanto a sus propiedades, *Map* es un microorganismo de forma cocobacilar de 1-2 x 0,5 micras de tamaño, que se tiñe débilmente con la tinción de Gram, considerándose como Gram-positivo (Smith, 1969). Tanto esta última característica, como su ácido alcohol-resistencia se deben a la elevada proporción de ácidos micólicos

de la pared, que conceden a ésta un carácter ceroso que dificulta la penetración de colorantes al igual que su eliminación (Wayne y Kubica, 1986; Shimmick y Good, 1994). Esta pared, junto a una capsula más externa y una membrana citoplasmática, más interna, forman la envoltura de *Map* (Rastogi *et al.*, 2001). Así mismo, la propiedad de ácido alcohol-resistencia hace que tintorialmente el método de Zielh-Neelsen sea el más adecuado para este microorganismo. No obstante, se han descrito formas que no son resitentes a la decoloración con un alcohol ácido o que lo son parcialmente (Stavitsky y Beck, 1945). En cuanto a sus necesidades de oxígeno, se trata de un agente aerobio o microaerobio (Chiodini *et al*., 1984a) cuya temperatura óptima de crecimiento oscila entre 30 y 45ºC (Wayne y Kubica, 1986; Levy-Febrault y Portaels, 1992). Además, se sabe que se trata de un microorganismo que presenta tendencia a formar grumos, supuestamente debido a la disposición que adoptan al replicarse dentro de los macrófagos que infectan, y que crece sin formar cordones (Thorel *et al.*, 1990).

Respecto a su velocidad de crecimiento, *Map* está clasificada dentro del grupo de micobacterias de crecimiento lento (Grange, 1990; Grange *et al*., 1990). Esta lenta velocidad de crecimiento, unida a la necesidad de micobactina son características muy útiles para su identificación (Chiodini *et al*., 1984a; Thorel *et al*., 1990).

Del mismo modo que otros géneros y otras especies de micobacterias, *Map* puede sufrir cambios morfológicos y fisiológicos al verse su pared alterada, de modo que esta se pierda total o parcialmente. Así podemos encontrar 4 fases de transición además de la forma habitual del bacilo (McGee *et al*., 1971):

- Fase de protoplasto: En la que la superficie externa se encuentra libre de todos los constituyentes de pared, de morfología esférica, Gram-negativa, osmóticamente frágil y con resistencia a la penicilina (McQuillen *et al*., 1960).
- Fase de esferoplasto: Se diferencia de la fase anterior, por conservar algo de material de la pared celular. Se trata de una fase observada además en pacientes con la enfermedad e Crohn en 1986, por Chiodini *et al*. (Chiodini *et al*., 1986; Wall *et al*., 1993).

Ambas fases pueden revertir a la bacteria original o pasar a fase L, pero no se pueden reproducir como protoplastos o esferoplastos, respectivamente (McQuillen *et al*., 1960).

- Fase transicional: La mayoría de aislados de variantes con pared defectiva se encuentran, probablemente, en esta fase, caracteriza por presentar inestabilidad morfológica, con tendencia a revertir a una fase bacteriana vegetativa (Wittler *et al*., 1960). Al igual que las dos fases anteriores puede convertirse en Fase-L, pero no puede multiplicarse de forma seriada.
- Fase-L: Se trata de variantes de tamaño, forma y cantidad de pared variable y que se pueden replicar seriadamente en medios sólidos produciendo colonias distinguibles con aspecto de "huevo frito" (Klieneberger-Nobel, 1961). Estas formas mantienen su especificidad, ocasionando una respuesta serológica por parte del hospedador (Kovalenko y Dorozhkova, 1986).

El-Zaatari *et al* (2003) han encontrado, mediante hibridación *in situ*, formas defectivas de pared en muestras de intestino, nódulos linfáticos e hígado al estudiar vacas y una oveja con paratuberculosis clínica, como se había hecho anteriormente en casos de enfermedad de Crohn con esta misma técnica (Hulten *et al*., 2000b, 2001; Sechi *et al*., 2001) señalando la importancia de estas formas de pared defectiva en la patogenia de la infección por *Map*, ya que serían capaces de evadir la respuesta del hospedador e instalarse en él sin poder ser detectadas con la tinción de Zielh Neelsen ni mediante cultivo.

II.1.2. Cepas de *Map* y relación con otras micobacterias

Algunas de las bacterias delgénero *Mycobacterium* se han agrupado taxonómicamente en varios complejos entre los que cabe destacar el complejo *Mycobacterium tuberculosis* y el complejo *Mycobacterium avium*, en el que se encuentra *Map*.

El complejo *Mycobacterium avium* incluye especies muy cercanas genéticamente como son *M.avium*, *M. intracelulare* y *M. paratuberculosis* (Collins *et al.*, 1997). Todas ellas presentan en su genoma un grupo de genes llamados ESAT-6, que no han sido mantenidos en otros géneros y que codifican, entre otras, proteínas relacionadas con la inducción de respuesta inmunitaria (Gey Van Pittius *et al*, 2001).

En 1990, Thorel *et al*., 1990 propusieron un cambio de nomenclatura para clasificar a las diferentes especies del complejo *Mycobacterium avium*, basándose en criterios microbiológicos y genéticos y dividiendo al complejo en cuatro grupos:

- Grupo 1, en el que se encuentran las cepas de *Mycobacterium paratuberculosis* y cepas obtenidas de pacientes con enfermedad de Crohn, que pasan a denominarse *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis.* La cepa tipo es la ATCC 19698 o CIP 103963. El distintivo más práctico de *Map* es su dependencia de micobactina para crecer *in vitro* en medios con yema de huevo y su extremadamente baja velocidad de crecimiento. Así mismo, es patógena obligada, afecta principalmente a rumiantes provocando una enteritis crónica (paratuberculosis) y pudiera estar implicada en la enfermedad de Crohn.

- Grupo 2, en el que se encuentran cepas de *Mycobacterium intracellulare* y *Mycobacterium avium* que pasan a denominarse *Mycobacterium avium* subspecies *avium* (*Maa*). La cepa tipo es la ATCC 25291 ó CIP 104244. *Maa* se aísla de muestras ambientales y crece sin necesidad de micobactina. Es el agente de tuberculosis en las aves y provoca infecciones en un amplio rango de animales e incluso en el hombre.

- Grupo 3, en el que se encuentran cepas de micobacterias aisladas de palomas torcaces que pasan a denominarse *Mycobacterium avium* subspecies *silvaticum*, la cual se caracteriza por ser incapaz de crecer en medios con base de huevo y por estar estimulado su crecimiento en medios con pH 5,5.

- Grupo 4, en el que se encuentra la cepa denominada *Mycobacterium paratuberculosis 316F*, aislada en Weybridge en 1940. Se trata de una cepa utilizada para la producción de antígenos y vacunas y que no es dependiente de micobactina en medios a base de huevo como el Herrold.

Las técnicas más ampliamente utilizadas para la diferenciación de las tres principales subespecies del complejo *Mycobacterium avium* son las técnicas de identificación genética como la PCR (Bull *et al.*, 2000; Ellingson *et al*., 2000; Juste *et al*., 2000a; Englund, 2003). En el caso de *Map*, see basan en la detección de secuencias de inserción como la IS*900*, específica esta micobacteria (Green *et al.*, 1989), aunque en ocasiones, puede dar lugar a falsos positivos (Cousins *et al*., 1999b; Englund *et al*., 2002). Otras secuencias de inserción de *Map* son la IS *Mav*2 (Strommenger *et al*., 2001) y la IS*1311* (Whittington *et al*., 2001b), aunque esta última puede aparecer en el genoma de *Maa* (Collins *et al*., 1997) y se considera una secuencia altamente

polimórfica, ya que pueden aparecer nuevos genotipos IS*1311*, como ocurre en bisontes con paratuberculosis (Whittington *et al*., 2001**b**), clasificadas como cepas tipo B ("Bison type" *B*).

A nivel genético, se han encontrado 5 genes que dan lugar a productos con carácter antigénico presentes en *Map* y no en otras especies de micobacterias (Bannantine *et al.*, 2004). Además, *Map* presenta unidades de repetición entremezcladas (MIRU) que no aparecen en otras subespecies del complejo *Mycobacterium avium* (Bull *et al.*, 2003).

La complejidad de *Map* es tal que ya en 1951 Taylor (Taylor, 1951a), al observar diferencias en los requerimientos y características de cultivo, identificó 3 cepas diferentes: una de ellas bovina y las otras dos ovinas. De las ovinas una era pigmentada y más virulenta (Stamp y Watt, 1954) y la otra no pigmentada y aislada de ovejas islandesas, resultando ambas más difíciles de cultivar que la cepa bovina. Esta mayor dificultad de crecimiento, unido a los diferentes requerimientos para el cultivo fueron igualmente observados posteriormente por otros investigadores (Juste *et al*., 1991b; Muskens *et al.*, 2000; Whittington *et al*., 2001b) además de la inhibición de crecimiento de las cepas ovinas en medios con piruvato (Juste *et al.*, 1991b).

Más recientemente, la tipificación de cepas se ha realizado en base a pruebas genéticas como el análisis RFLP (polimorfismos de la longitud de fragmentos de restricción) por medio de sondas específicas frente IS*900*, tras la digestión del ADN cromosómico con diferentes enzimas (IS*900*-RFLP). Se ha demostrado que esta técnica es capaz de diferenciar aislados de *Map* que por otras técnicas parecen ser homogéneos (Whipple *et al*., 1990). En un estudio se analizaron mediante esta técnica 46 aislamientos de vacas, ovejas y cabras de Nueva Zelanda, Australia, Canadá, Islas Feroe y Noruega (Collins *et al.*, 1990**a**). Se obtuvieron 10 patrones de hibridación diferentes clasificados en dos grandes grupos, a uno ello se le denomino *S* ("Sheep type") ya que englobaba cepas aislasdas de ovejas, y al otro grupo *C* ("Cattle type") ya que incluía todas las cepas encontradas en bovino. Sin embargo, no eran estrictamente específicas ya que al grupo *C* se le asignaron varias cepas aisladas en ovejas y cabras y al grupo *S* un aislado de una cabra de Nueva Zelanda.

En este sentido, se ha comprobado que algunas cepas de origen caprino tienen poca patogenicidad para el ganado bovino (Saxegaard, 1990), hay cepas ovinas que infectan al ganado bovino (Whittington *et al*., 2001b) y cepas bovinas que pueden infectar al ganado ovino (Muskens *et al*., 2000; Muskens *et al*., 2001; Verna *et al*., 2007), si bien con evoluciones lesionales y respuestas inmunitarias diferentes (Fernández *et al*., 2014a), y al ganado caprino (Whittington *et al*., 2000b). Estos estudios han sido realizados tanto en condiciones naturales (Muskens *et al*., 2000, 2001; Whittington *et al*., 2000b, 2001b) como a través de infecciones experimentales (Saxegaard, 1990; Verna *et al*., 2007; Fernández *et al*., 2014a).

Se han encontrado similitudes genéticas entre las cepas bovinas, caprinas y humanas aunque no con las ovinas (Pillai *et al*., 2001). No obstante, sí se ha observado una relación genética entre las cepas ovinas y bovinas aisladas de la misma zona geográfica, sugiriendo que estas cepas son compartidas entre las dos especies (Whittington *et al*., 2000b; Motiwala *et al*., 2003). En el estudio de Collins *et al*. (1990a) se comprobó que una oveja procedente de Canadá estaba infectada por un tipo de cepa que pertenecía a un patrón diferente a *C* y al *S*, que designaron de tipo intermedio (*I)*, al igual que cinco aislamientos realizados en ovejas sudafricanas (de Lisle *et al*., 1992). Mediante la técnica de RFLP se comprobó que 16 aislamientos de cabras noruegas, 5 de vacas y 2 de ciervos daneses y una oveja griega eran similares entre sí y se diferenciaban de un aislamiento de una oveja de las Islas Feroe (Thoresen y Olsaker, 1994). Con este mismo análisis se tipificaron aislados procedentes de ovejas, cabras y vacas de granjas con paratuberculosis de Marruecos, Sudáfrica, Estados Unidos y Alemania y se clasificaron además según su crecimiento (Bauerfeind *et al*., 1996). Se identificaron cinco patrones que fueron clasificados en dos grupos, esta vez reiterando la estrecha relación de los mismos con las especies a las que se asocian; los de grupo I (de crecimiento extremadamente lento) en la que estaban clasificados todos los aislamientos ovinos, y los del grupo II (de crecimiento moderadamente lento) que englobaba a todos los aislamientos bovinos y caprinos. Pavlik *et al*. (1995) detectaron 3 grupos de patrones *Pst*IIS900-RFLP a los que denominaron A, B y C, analizando aislados de vacas, ovejas y una cabra principalmente de Eslovaquia y República Checa sin asociar ninguno de los patrones a ninguna especie. Además, años más tarde, este mismo grupo (Pavlik *et al*., 1999a) mediante el método *Pst*I-*Bst*EII-IS900-RFLP analizaron 1008 aislados estableciendo en esta ocasión 28 patrones RFLP que se distribuyeron en los dos grupos principales ya establecidos por Collins *et al*. (1990),

esto es bovino o *C* y ovino o *S*, al que pertenecían 1002 y 4 cepas respectivamente, así como el en intermedio o *I* al que atribuyeron 2 cepas. No obstante Pavlik *et al.* (1999a) señalaron que no existía relación de especificidad o correlación entre cepas, velocidad de crecimiento y hospedadores.

Posteriormente se han clasificado los aislamientos de *Map* de forma diferente. Así, Stevenson *et al* (2002), empleando la técnica de electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE) con los enzimas *Sna*BI Y *Spe*I, los han clasificado en aislamientos de tipo I, en el que engloban a los pigmentados, de crecimiento más lento, todas cepas ovinas y alguna cepa caprina de Noruega y aislamientos de tipo II, que incluyen los no pigmentados, de crecimiento más rápido, pertenecientes a vacas y un amplio rango de hospedadores incluyendo humanos y animales salvajes. Ambos tipos pueden ser diferenciados por endonucleasas de restricción para la IS*1311* (IS*1311* PCR-REA) (Marsh *et al*., 1999) así como por una PCR específica (Collins *et al*., 2002). Así mismo, posteriormente se comprobó que cuatro aislados de tipo I diferían de nueve aislados de tipo II por la presencia de una inserción de 11 pares de bases en una región del ADN genómico de *Map* y que los aislamientos de tipo I contenían tres loci específicos carentes en los de tipo II (Dohmann *et al*., 2003). La idea de clasificarlos por Stevenson *et al*. (2002) en tipo I y tipo II en vez de con el nombre de una especie, era para aclarar el que no existe una correlación entre el nombre del grupo y la especie hospedadora en que se hallaron. A esta clasificación, se le añade un tercer tipo, el tipo III, obtenido al estudiar aislamientos de cabras mediante la misma técnica (PFGE) (de Juan *et al.*, 2005). Este tipo III, parece ser intemedio entre el tipo I y el tipo II, con un muevo perfil (16-11), aunque fenotípicamente de crecimiento lento como los de tipo I, y siendo catalogado con la técnica de RFLP como el intemedio (I) de la clasificación de Collins *et al*. (1990a) y calificado mediante IS*1311*-REA como de tipo ovino.

En un estudio realizado por Sevilla *et al*. (2007) se caracterizaron 520 aislamientos de varias regiones de España de diferentes hospedadores (vaca, oveja, cabra, bisonte, ciervo y jabalí) tipados mediante el análisis por endonucleasas de restricción para la IS*1311*.Con esta técnica (REA-IS1131) se comprobó que todos los aislamientos de vaca eran de tipo bovino, al igual que el 4% y 26% de los de oveja y cabra respectivamente, así como los de ciervo y jabalí. El 96% y 74% de los aislados de ovejas y cabras pertenecían al tipo ovino. Además, en el mismo trabajo sus autores (Sevilla *et al*., 2007) caracterizaron 269 aislados mediante PFGE utilizando las endonucleasas S*na*BI y S*pe*I, con lo que se obtuvieron 37 perfiles diferentes. Los

perfiles 2-1 y 1-1 aparecieron en el 85% de los aislados de vaca, el 43% de cabras estaban infectadas con cepas del perfil 16-11, mientras que en oveja se obtuvieron 10 perfiles diferentes, ninguno con una incidencia mayor del 25%. Por tanto en España se señala la homogeneidad genética de los aislados de vaca y la heterogeneidad de los aislados de oveja y cabra.

II.1.3. Estructura de *Map*

Las principales propiedades estructurales y antigénicas de *Map* se las confiere su pared celular (Merkal *et al*., 1965; Stanford, 1983; Grange *et al*, 1990), al igual que ocurre con el resto de micobacterias. La pared micobacteriana está formada internamente por una capa llamada mureina, compuesta por peptidoglicanos, que es la que le concede rigidez y forma, además del poder adyuvante de la micobacteria. Más externamente se sitúa la capa de arabinogalactano, a la que se unen los ácidos micólicos hacia el exterior, principales responsables de la ácido alcohol resistencia y entre los que existen sulfolípidos y dimicolatos de trealosa ("Cord factors"), no obstante, no se ha demostrado especificidad de especie para el hospedador con respecto a estos ácidos (Chiodini y Van Kruinigen, 1985). Por último, la capa más externa está formada por un complejo grupo de glucolípidos de superficie llamados micósidos, característicos de cada especie, y que confieren a las micobacterias la capacidad de resistir a la acción de las enzimas lisosómicas (Grange, 1990). Hay una molécula de 32-42 Kilodalton (KD) (Reichel *et al*., 1999), llamada lipoarabinomanano (LAM) que aparece anclada en la membrana celular y que llega hasta el exterior de la bacteria. Se trata de un lipopolisacárido que puede excretarse en la fase de replicación y que parece tener bastante importancia en la patogenicidad de las micobacterias (Koets *et al*., 2001). Debido a que la estructura de LAM es diferente para las cepas ovinas y bovinas (Grange, 1990), se viene utilizando en diferentes test diagnósticos (Sugden *et al.*, 1997; Reichel *et al.*, 1999; Valentin-Weigand y Goethe, 1999), aunque no parece haber relación entre la presencia de LAM y el aumento de anticuerpos en la fase clínica de la enfermedad (Koets *et al*., 2001).

Es importante conocer la estructura y composición de *Map* para así poder obtener las sustancias con mayor poder antigénico y utilizarlas para el desarrollo de pruebas diagnósticas o incluso para la elaboración de vacunas frente a este agente. La mayor parte de las proteínas que han sido identificadas de *Map,* están presentes en otras especies del complejo *M. avium* y *M. bovis* (Gilot y Cocito, 1993); así, *Map* presenta una homología mayor del 98% con *Mycobacterium avium* subsp. *avium* (*Maa*) en algunas regiones de su secuencia genética (Bannatine *et al.,* 2002).

Algunos de los muchos antígenos que han sido identificados en *Map* son:

- Johnina (Jhonson y Pratt, 1944). Se trata de un extracto proteico purificado, semejante al obtenido para el diagnóstico de tuberculosis. Ha sido utilizado en pruebas de inmunidad celular (Baisden *et al,* 1950).
- El antígeno protoplasmático crudo (PPA-3). Es un antígeno ampliamente utilizado en técnicas serológicas desde hace años (Merkal *et al.,* 1975; Yokomizo *et al.,* 1983, 1991 Bech-Nielsen *et al*., 1985; Molina *et al*., 1991; Aduriz, 1993; García-Marín *et al*., 1994; Pérez *et al.,* 1997).
- "Heat shock proteins" (hsp) o proteínas de choque térmico. Son proteínas obtenidas tras someter a la micobacteria a un estrés térmico (Young *et al.,* 1990). Estas proteínas se dividen en tres grupos: las Dnak, las GroES y las GroEL (Harboe *et al*., 1998). *Map* y *Maa* presentan las mismas GroES (Cobb y Frothingham, 1999), es por ello que pueden ser utilizadas para la elaboración de vacunas, pero no para el diagnóstico diferencial de la enfermedad. La hsp-65 KD es una proteína de tipo GroEL, que actúa como base de la autoinmunización en enfermedades crónicas inflamatorias (El-Zaatari *et al*., 1995). Esta proteína, al igual que la hsp-70KD, inducen una respuesta celular de más intensidad en animales asintomáticos (Koets *et al*., 1999), la cual es mayor en el caso de la hsp-70 KD.
- Las Alquil hidroperóxido reductasas C y D, específicas de *Map*. Se trata de proteínas que la micobaceria expresa en gran cantidad sin necesidad de someterla a un estrés oxidativo. Inducen la producción de Interferon-γ (IFN-γ), y por tanto, resultan muy útiles para la obtención de vacunas y test diagnósticos (Olsen *et al*., 2000), sin que se produzcan reacciones cruzadas con otras especies de micobacterias (Harris y Barletta, 2001).

- Proteínas del complejo 85 (A, B y C). Este complejo presenta un 99% de homología con el de *Maa* (Dheenadhayalan *et al*., 2002). Al igual que algunas de las anteriores proteínas, la 85B podría ser útil para la realización de futuras vacunas celulares (Mullerad *et al*., 2002a; Kathaperumal *et al*., 2008, 2009) debido a que induce respuesta inmune tanto celular como humoral ya que da lugar a la liberación de IFN-γ, Interleuquina-6 (IL-6), IL-10 y óxido nítrico.
- Proteína de 35 KD, la cual presenta una similitud del 95,67% con la de *Maa* (Banasure *et al*., 2001) y juega un papel muy importante en la invasión de las células epiteliales (Bannantine *et al.*, 2003).
- Proteína de 34 KD. Se trata de una proteína con importancia en la respuesta humoral frente a *Map*, debido a que presenta 2 epítopos específicos para células B (De Kesel *et al*., 1993; Gilot *et al*., 1993; Silbaq *et al.*, 1998; Ostrowski *et al*., 2003).
- Superóxidodismutasa (Sod). Enzima dependiente de manganeso de 23 KD, estudiada por Liu *et al.* (2001) sugiriendo su importancia en la respuesta inmunitaria celular del hospedador frente a *Map*.
- Diversos antígenos útiles para la elaboración de vacunas o test diagnósticos como la proteína de 44,3 KD (Mutharia *et al*., 1997), la de 42 KD (White *et al*., 1994), la de 40KD (Stevenson *et al*., 1992), la de 36 KD (El-Zaatari *et al*., 1999), la de 34,5KD (Mutharia *et al*., 1997), la de 32 KD (El-Zaatari *et al*., 1994), la de 16,7 KD (Mullerad *et al*., 2003) y la proteína de secreción de 14KD producida por las micobacterias de complejo avium (Olsen *et al*., 2001b).
- Grupo de hasta 20 proteínas serológicamente reactivas, obtenidas tras la rotura del microorganismo por sonicación (Bech-Nielsen *et al*., 1985).
- Proteínas Pks7 y Csp1 estudiadas por Bannantine y Stabel (2001), que reaccionan con suero de conejos infectados con cepas de *Map* vivas pero no así cuando están inactivadas. Se trata de proteínas similares a otras presentes en el género *Corynebacterium* o en otras especies de micobacterias.

II.1.4. Medios de cultivo

Map fue estudiada desde el punto de vista bacteriológico por primera vez en 1895 por Johne y Frotingham (Johne y Frothingham, 1895), aunque su crecimiento en medio de cultivo no se consiguió hasta 1910 (Twort *et al*., 1910).

En general las micobacterias no necesitan ningún factor de crecimiento y se comportan como muchas otras bacterias respecto a sus requerimientos en los medios de cultivo. No obstante, existen variedades de algunas especies que muestran exigencia absoluta o relativa de determinados compuestos para su crecimiento en medios artificiales. Es el caso de *Map* que requiere micobactina debido a su incapacidad para sintetizarla (Chiodini *et al*., 1984a; Thorel, 1984; Wayne y Kubica, 1986). La micobactina es un elemento quelante del hierro característico de las micobacterias y descubierto por primera vez en relación con el cultivo de *Map* (Francis *et al*., 1953). No obstante, no es la única micobacteria que no es capaz de sintetizar esa sustancia (Hall y Ratledge, 1984), aunque si la única que es patógena. Sin embargo, se ha comprobado experimentalmente (Morrison, 1965; Merkal y Curran, 1974; Juste *et al*., 1993) que la presencia de micobactina no es imprescindible para el crecimiento de *Map*. Incluso, Aduriz *et al*. (1995) y Motiwala *et al*. (2004) aislaron con mayor eficiencia cepas de campo en cultivo primario sin micobactina pero con otros nutrientes. Por tanto, la falta de micobactina en el medio no parece ser el factor más importante, sino más bien, parece ser un problema de cantidad de hierro en el medio y de presencia de otras sustancias que actúen como quelantes de este oligoelemento (Merkal y Curran, 1974; Juste *et al*., 1993). Por ello, a los medios de cultivo a los que se les añade huevo, que es quelante del hierro e impide la absorción de este por aquellas bacterias que no dispongan de un sistema de captación del hierro más eficiente, se les debe añadir alguna sustancia que facilite su incoporación. Así, se ha comprobado que la adicción al medio de citrato férrico amónico al 1% hace que *Map* crezca sin la necesidad de micobactina, si bien lo hace de manera más lenta (Merkal y Curran, 1974).

El aislamiento de *Map* es complicado, debido a la larga duración y elevada posibilidad de contaminación de los cultivos así como al requerimiento de muchos nutrientes (Merkal y Larsen, 1962). Aunque *Map* es capaz de crecer en la mayoría de

los medios utilizados para el aislamiento de micobacterias, se deben evitar las contaminaciones y aportar a *Map* los nutrientes necesarios durante su largo periodo de incubación. Por tanto, la descontaminación de los tejidos o heces previo al aislamiento es un problema que interfiere con el cultivo de la bacteria (Stabel, 1997). Hay varios métodos que se han utilizado para reducir la contaminación bacteriana y fúngica como son los tratamientos con ácido oxálico, NaOH, hipoclorito sódico, fenol, cloruro de benzalconio y cloruro hexadecil piridinio (HPC), siendo los más utilizados los dos últimos métodos (Merkal *et al*., 1982; Turcotte *et al*., 1986). Más tarde, se ha comprobado que la adición de antibióticos y antifúngicos a la muestra tras la fase de descontaminación y concentración parece disminuir significativamente este problema (Stabel, 1997), así como la utilización de tubos de vidrio herméticos. Igualmente, se ha observado que el tratamiento con enzimas líticas estimula el crecimiento de *Map* (Thornton *et al*., 2002). Sin embargo, Redacliff *et al*. (2003b) apuntan que los protocolos rutinarios de descontaminación pueden disminuir el número de microorganismos aislados a partir de heces y tejido. Además, los medios de cultivo deben contener fuentes de carbono y nitrógeno, macroelementos como el calcio, oligoelementos como el fósforo, azufre y hierro, vitaminas, agentes solidificantes y colorantes (Marco y Aduriz, 1990). Igualmente, la adición de piruvato estimula el crecimiento de las colonias, haciendo que estas aparezcan más rápidamente (Merkal y Curran, 1974); no obstante, parece que este efecto se invierte cuando se trata de cepas ovinas (Juste *et al*., 1991b).

En este sentido, se han encontrado diferencias en las características de cultivo de las cepas causantes de la infección en la especie bovina y ovina (Taylor, 1951a). En el primer caso se aíslan con cierta facilidad, incluso cuando la carga bacteriana no es muy elevada, sin embargo las cepas ovina son difíciles de aislar (Stamp y Watt, 1954). Aunque en medios líquidos el crecimiento puede ser visible en un par de semanas (Collins *et al*., 1990), en medios sólidos se necesitan más de seis semanas hasta observar las primeras colonias (Chiodini *et al*., 1984a), y en el caso de las cepas procedentes de ganado ovino, el tiempo necesario hasta la aparición de las colonias puede llegar a ser mayor de un año (Dunkin *et al*, 1935; Taylor, 1951a; Juste *et al.*, 1991b; Whittington *et al*., 2001a). Asimismo, el creciemiento es más lento cuando se realiza el aislamiento a partir de heces que cuando se hace a partir de tejidos u otro cultivo (Reddacliff *et al*., 2003a). Las colonias son predominantemente pequeñas,

húmedas y convexas, pero pueden aparecer con morfologías diferentes al ser cultivadas en el mismo medio y al compararlas con las de medios distintos (Merkal y Curran, 1974).

Los medios que se utilizan, generalmente, son medios a base de huevo, como el Herrold (Merkal *et al*., 1964; Chiodini y van Kruiningen, 1986; Kim *et al*., 1989) o el Löwestein-Jensen (Jorgensen, 1982; Whiple y Merkal, 1985; Merkal *et al*, 1987; Koh *et al*., 1988; Juste *et al*., 1991b), aunque existe gran variedad como aquellos elaborados a base de suero como el Dubos (Gunnarson y Fodstad, 1979; Saxegaard, 1985) o incluso medios sintéticos como el de Middlebrook y sus variantes (Merkal y Curran, 1974; Damato y Collins, 1990) o el de Watson-Reid (Morrison, 1965). Los medios sintéticos dan lugar a un crecimiento más rápido del microorganismo respecto al Herrold (Damato y Collins, 1990).

Como una variante del cultivo, se han usado los sistemas de cultivo líquido. Se trata de sistemas con un elevado grado de automatización basados en la cuantificación de $^{14}CO_2$ que se libera al metabolizar el ^{14}C de los nutrientes del medio y así detectar el crecimiento bacteriano (Garrido *et al*., 2000b), basados en el medio líquido Middlebrook 7H9, normalmente suplementado con micobactina y enriquecido con albúmina sérica bovina, ácido oleico, dextrosa, catalasa, yema de huevo y antibióticos. Entre ellos se encuentran los radiométricos BACTEC (Damato y Collins, 1990; Collins *et al*., 1990b) y los no radiométricos MGIT (fluorométrico) (Shwartz *et al*., 2000; Bull *et al*., 2003), TREK ESP (barométrico) (Kim *et al*., 1988; Ellingson *et al*., 2004), y MB/BacT (colorimétrico) (Stich *et al*., 2004). La obtención de los resultados con estos métodos es más rápida y sensible y se logra de manera automatizada (Collins *et al*., 1988; Damato y Collins, 1990; Collins *et al*., 1990b; Cousins *et al*., 1995; Whittington *et al*., 1999a; Eamens *et al*., 2001; Grant *et al*., 2003; Gumber y Whittington, 2006). No obstante, presentan inconvenientes como el de contaminaciones más frecuentes (Collins *et al*., 1988; Collins *et al*., 1990b; Whittington *et al*., 1999a; Eamens *et al*., 2000), y por tanto la necesidad de añadir antibióticos que pueden retrasar el crecimiento de las micobacterias (Gumber y Whittington, 2006). El coste es más elevado además de requerir un mayor equipamiento (Whitlock, 1998) así como dificultad de trabajar con material radiactivo en el caso de los cultivos radiométricos (Garrido *et al*., 2000b).

II.1.5. Persistencia en el medio

Las características ya citadas de la baja actividad metabólica unida a la resistencia que le atribuye su compleja pared celular (Minnikin *et al*., 1982) hacen que *Map* sea capaz de vivir fuera del hospedador durante largos periodos de tiempo en condiciones adversas (Ratledge *et al*., 1982). Se ha comprobado que puede permanecer viable durante 163 días en agua de río, 270 días en agua de estanque y 11 meses en heces de vaca y en el suelo (Lovell *et al.*, 1944; Larsen *et al*., 1956; Hole, 1958; Jorgensen, 1977), principalmente en suelos neutros y ácidos (Kopecky, 1977), aunque en orina tan sólo 7 días. Las heces tienen un efecto bacteriostático y la orina bactericida (Larsen *et al*., 1956), lo que sugiere que la mezcla de ambas se transforme en un ambiente más hostil que si se encontrara tan sólo en heces, y hace menos probable que contenga la micobacteria durante largos periodos (Chiodini *et al*., 1984a). Se ha descrito que *Map* puede mantenerse a -14ºC durante al menos un año (Hole, 1958; Richards y Thoen, 1977) e incluso este mismo periodo de tiempo a -20ºC, sin que se detecten problemas posteriormente en su cultivo (Juste *et al.*, 2000a).

Map es muy sensible a la luz solar (Merkal y Whipple, 1982), pero puede permanecer al menos 55 semanas en ambientes secos y sombríos, y 48 semanas en agua de presa no expuesta a la luz solar (Whittington *et al*., 2004, 2005). Además, se trata de un microorganismo sensible a las altas temperaturas, la desecación, el hervido, y la elevada concentración de calcio (Whittington *et al*., 2004, 2005).

De igual forma, entre un 3% y 5% de las micobacterias podrían sobrevivir a la pasteurización (Chiodini y Hermon-Taylor, 1993; Rowan *et al*., 2001; Grant *et al.*, 2002) y a los tratamientos de esterilización aplicados al agua para consumo humano (Whan *et al*., 2001). Sin embargo, la combinación de temperatura y aplicación de campos eléctricos pulsátiles es capaz de acabar con la micobacteria (Rowan *et al*., 2001).

Map es resistente a muchos desinfectantes; sin embargo, hay otros que son efectivos en acabar con el microorganismo en 10 minutos tras la exposición: formalina al 5%, cresoles y fenoles a una dilución 1:32 y 1:40, bicloruro de mercurio a una

dilución 1:1000 e hipoclorito cálcico a una dilución 1:50 (Vardaman, 1954; Hole, 1958), así como el amonio al 3% (Katayama *et al*, 2002). No obstante, la presencia de material fecal disminuye notablemente la eficacia de muchos desinfectantes (Chiodini *et al*., 1984a) e incluso algunos son incapaces de actuar sobre heces secas (Merkal y Whipple., 1982). En sentido contrario, la actividad de los desinfectantes puede incrementarse sI se combinan con detergentes (Merkal y Whipple., 1982).

II.2. EPIDEMIOLOGÍA

II.2.1. Hospedadores susceptibles

La paratuberculosis ha sido descrita principalmente en rumiantes domésticos, pero también en silvestres como el ciervo (Temple *et al*., 1979; Chiodini y Van Kruiningen, 1983; Pavlik *et al.*, 2000; Mackintosh *et al*., 2002), gamo (Temple *et al.*, 1979; Pavlik *et al.*, 2000: Balseiro *et al*., 2008), corzo (Pavlik *et al.*, 2000), antílope (Dukes *et al.*, 1992), muflón (Weber *et al.*, 1992; Pavlik *et al*., 2000), llama (Blood y Radostits, 1989; Miller *et al*., 2000), alpaca (Hope *et al*., 1995; Miller *et al*., 2000), bisonte (Buergelt *et al*., 2000), búfalo (Sivakumar *et al*., 2005) o camello (Paling *et al*., 1988; Kramasky *et al*., 2000). Además, se ha identificado la enfermedad y *Map* en casos naturales, en animales monogástricos como el cerdo (Thoen *et al.*, 1975), jabalí (Machackova *et al*., 2003; Álvarez *et al.*, 2005), caballo (Larsen *et al*., 1972), conejo (Fuentes y Cebrian, 1988; Fernández de Luco *et al*., 1995; Pérez *et al*., 1995; Greig *et al*., 1997; Beard *et al.*, 2001b; Judge *et al.*, 2006), liebre (Beard *et al*., 2001a), gato (Palmer *et al*., 2005), lobo y zorro (Beard *et al.*, 2001a), comadreja (Beard *et al*., 2001b), tejón (Beard *et al*., 2001a), macaco (McClure *et al*., 1987), mandril (Zwick *et al*., 2002), oso pardo (Kopecna *et al*., 2006) e incluso aves (Beard *et al*., 2001a) o animales de laboratorio (Hamilton *et al*., 1991). De estas especies, el conejo parece alcanzar una mayor importancia epidemiológica ya que se ha descrito que la micobacteria aislada en los conejos es capaz de reproducir experimentalmente la enfermedad en bovinos (Beard *et al.*, 2001c). Por tanto, la prevalencia de la paratuberculosis aumentaría en las regiones en las que existiera contacto entre las heces de estos conejos y bovinos en el pasto (Daniels *et al*., 2001). Sin embargo, en el caso de rumiantes salvajes como los bisontes aún no se ha comprobado si la infección entre ambas especies es posible, lo que si se conoce es que las cepas de *Map* que infectan a una y otra especie son diferentes (Whittington *et al*., 2001b). En ciervos, sin embargo, mediante estudios experimentales, se ha observado una elevada susceptibilidad de estos a la infección por la cepa bovina de *Map* (O'Brien *et al*., 2006). Así mismo, se ha descrito el riesgo de transmisión que existe entre las especies ovina y bovina, que sufren esta enfermedad con más frecuencia. En este sentido, en un estudio realizado por

Moloney y Whittington (2008), se observó que la paratuberculosis ovina se transmite de forma esporádica a los bovinos.

II.2.2. Distribución y prevalencia de la paratuberculosis

La paratuberculosis es una enfermedad que se encuentra distribuida ampliamente por todo el mundo (Kátic, 1977; Chiodini *et al*., 1984a; Blood *et al*., 1989). La prevalencia depende de varios factores como la edad, el tamaño y la aptitud del rebaño así como el tipo de suelo, el manejo y profilaxis frente a esta enfermedad.

Para estimar la prevalencia de la paratuberculosis se han llevado a cabo distintos tipos de estudios, con lo cual la comparación entre unas regiones y otras es difícil y debería tomarse con cautela debido a la diferente sensibilidad de las técnicas diagnósticas (Bakker *et al*., 2000).

II.2.2.1. Distribución y prevalencia de la paratuberculosis en ganado bovino

En España, la posible presencia de paratuberculosis bovina se sospechó por primera vez en 1915 por Farreras (Farreras, 1915) y posteriormente, en 1935 por Roca (Roca, 1935), pero no es hasta 1983 cuando esta enfermedad es completamente documentada en esta especie, en un rebaño de raza Charolais en el País Vasco (Juste *et al.*, 1983). Posteriormente se han publicado datos de prevalencia en diferentes Comunidades Autónomas y provincias españolas. Así, en un estudio llevado a cabo en mataderos del País Vasco, con muestras de 201 animales, sobre las que se empleó el uso combinado de las técnicas diagnósticas histopatológicas, bacteriológicas y serológicas, reveló una prevalencia del 30,4% en esta Comunidad Autónoma (Juste *et al*., 2000b). En esta misma Comunidad, se observó una prevalencia del 0,5% mediante cultivo de muestras de matadero, mientras que al combinar técnicas serológicas, bacteriológicas e histopatología la prevalencia ascendía al 31,3% (Garrido, 2001). Años más tarde, este mismo grupo de investigación, y tras año y medio de recogida de muestras en matadero, estudiaron la prevalencia de la paratuberculosis en vacas del País Vasco mediante la combinación de ELISA, cultivo, PCR a tiempo real e histopatología (Vázquez *et al*., 2009). La positividad al test ELISA fue del 8,3%, la de la histopatología del 13,6%,

mientras que la prevalencia encontrada con cultivo y PCR se cifró, respectivamente, en el 18,7 y el 20%, encontrando además el pico de edad para el diagnóstico de la enfermedad entre los 3 y los 5 años (Vázquez *et al*., 2009). En el Principado de Asturias (Balseiro *et al.*, 2003), en un estudio realizado con muestras tomadas en matadero de 134 animales sobre las que se aplicaban estudios histopatológicos, se estimó una prevalencia del 28,35%. Sin embargo, estos mismos autores encontraron en Asturias una prevalencia media del 1,23% mediante estudios serológicos llevados a cabo entre los años 1995 y 2001 en 16 rebaños de producción lechera, muy inferior a la calculada por histopatología (44,39%) (Balseiro, 2004), indicando que estas diferencias pudieran deberse a que la mayoría de animales presentaban lesiones de tipo focal, las cuales no son detectadas por la técnica serológica empleada (ELISA). En Galicia, mediante el empleo de ELISA en muestras sanguíneas, se observó una prevalencia individual de 4,03%, 2,07% y 3,84% en granjas de producción lechera, cárnica y mixta, respectivamente, así como una prevalencia de granjas de 27,77/18,79%, 2,78/2,40% y 5,70/12,24% según se tomara al menos uno o dos animales positivos para granjas de aptitud láctea, cárnica o mixta, respectivamente (Diéguez *et al*., 2007). En muestras de leche de diferentes Comunidades Autónomas, se detecto la presencia de ADN de *Map* mediante PCR en un 18% del colectivo de animales estudiados (Sevilla *et al.*, 2003).

En estudios intrarebaño, la prevalencia en explotaciones de Castilla y León, varía entre un 12% y un 27%, al utilizar el test serológico ELISA y PPA-3 como antígeno (González, 2003), sin embargo esta prevalencia en animales desechados, valorada mediante estudios histopatológicos, fue del 67,7% (González., 2003). En Asturias, la seroprevalencia intrarebaño varía entre el 0 y el 22% al medirla mediante test ELISA-PPA-3, mientas que con el test Pourquier, la positividad intrarebaño en suero, oscila entre un 0% y un 18,18% (Balseiro, 2004).

En cuanto a lo que sucede en otros países, los métodos más empleados para medir la prevalencia han sido bacteriológicos y serológicos. Así, en Dinamarca, aplicando la técnica del cultivo sobre nódulos linfáticos mesentéricos en bovino, se obtuvo una prevalencia del 9,8% (Jorgensen, 1972), mientras que con el empleo de la técnica ELISA en muestras de tanque de leche en este país, esta ascenció al 47% (Nielsen *et al*., 2000**b**corrigendun). La prevalencia en Gran Bretaña, valorada mediante el cultivo de nódulos linfáticos mesentéricos obtenidos en matadero fue del 2,6%

(Cetinkaya *et al*., 1996) y al emplear la técnica de PCR, en el mismo estudio, se observó un aumento en la tasa de infección de hasta el 3,5% (Cetinkaya *et al*., 1996). Con la utilización del cultivo fecal, en Suiza, se obtuvo una prevalencia del 7,7% en vacuno lechero (Glanemann *et al*., 2002). La técnica de la PCR se ha utilizado para medir la tasa de infección de leche en tanque, en este país, con una prevalecia media de 19,7% pero que varía entre el 1,7% y el 49,2%, (Corti y Stephan, 2002), y entre el 7,5% y 36,7% (Stephan *et al*., 2002) en función del estudio y la región muestreada. En cuanto a la seroprevalencia, en Francia se ha estimado en un 5,99% (Meylan *et al*., 1995), en Bélgica en 1,16% en rebaños de leche, 0,86% en rebaños mixtos y 0,52% en rebaños de carne (Boelaert *et al*., 2000), en Italia (Lillini *et al*., 2005) en un 2%, en Holanda entre el 2,7 y el 6,9% (Muskens *et al*., 2000), en Austria oscilando entre el 3,3% y el 7,1% en el 2000 (Gasteiner *et al*., 2000) y aumentando hasta el 19% en el 2006 (Dreier *et al*., 2006) y finalmente, en Eslovenia en un 11,59% (Ocepek *et al*., 2002).

En EE.UU., el cultivo de nódulos linfáticos ileocecales de bovinos sacrificados en matadero arrojó una tasa de infección del 1,6% (Merkal *et al*., 1987). En Nueva Inglaterra, esta tasa fue analizada un año antes mediante el cultivo de estos mismos nódulos linfáticos y de válvula ileocecal, obteniendo un 18% de animales positivos (Chiodini y Van Kruiningen, 1986). En el Estado de Maine y la zona oriental del país, al valorar mediante esta técnica muestras de íleon y nódulos linfáticos mesentéricos, se obtuvo una prevalencia del 16,1% (McKenna *et al*., 2004). En el Estado de Nueva York, mediante el empleo de cultivo de muestras de heces, fue de un 5,2% (Obasanjo *et al*., 1997). Además, en este país se han llevado a cabo diferentes estudios de seroprevalencia tanto conjuntos en diferentes estados, arrojando valores del 0,4% (Dargatz *et al*., 2001b) como individualmente por estados, con una seroprevalencia en Florida que oscilaba entre el 8,6% y el 17,1% (Braun *et al*., 1990), en Lousiana del 4,4% (Turnquist *et al*., 1991), en Wisconsin del 4,79% (Collins *et al*., 1994), en Missouri entre el 5% y el 8% (Thorne y Hardin, 1997), en Michigan de 6,9% (Jhonson-Ifearulundu y Kaneene, 1999), en Georgia oscilaba entre 3,95% y 9,58% (Pence *et al*., 2003), en Alabama de aproximadamente el 8% (Hill *et al*., 2003) y en California con un 9,4% (Adaska y Anderson, 2003). En Canadá, la tasa de infección fue valorada mediante el cultivo de muestras de íleon distal y nódulo linfático ileocecal obteniendo un 5,5% (McNab *et al*., 1988) de prevalencia en la zona de Ontario, mientras que la seroprevalencia individual en esta región ascendía al 6,1% (McNab et al., 1988) y hasta un 2,5% en Saskatchewan (Waldner *et al*., 2002). En la región de Alberta, la

prevalencia fue medida mediante el cultivo de heces, obteniéndose una positividad individual del 3,4% y mediante ELISA en suerouna seroprevalencia del 7%, de las muestras analizadas (Sorensen *et al*., 2003). Otros estudios de seroprevalencia en este país han revelado seropositividades del 2,7% (VanLeeuwen *et al*., 2005) sin distinción entre aptitudes así como del 4,5% en el caso de animales de producción lechera y del 1,7% en producción cárnica (VanLeeuen *et al*., 2006). En Asia, en un estudio realizado en Corea, la seroprevalencia individual se cifró entre el 6,7 y 7,1% de los animales examinados (Pak *et al*., 2003). Prevalencias más bajas, del 0,43%, se obtuvieron en Australia empleando el cultivo de tejidos (Vandergraff *et al*., 1995) y seroprevalencias del 1,6% (Jubb y Galvin, 2000) en algunas áreas del país, mientras que el oeste parece estar libre de enfermedad (Ellis *et al*., 1998).

También hay estudios de prevalencia a nivel de rebaño, llevados a cabo por diferentes métodos y que, al comparar unos rebaños con otros, señalan una mayor prevalencia en vacuno de leche que en vacuno de carne (Merkal *et al*., 1987; Braun *et al*., 1990; Gasteneir *et al.*, 1999), atribuyéndolo a problemas de manejo y confinamiento de animales, mas que a predisposición de razas (Merkal *et al*., 1987; Scoot-Orr *et al*., 1988; Braun *et al*., 1990). Aunque este hecho no ocurre siempre, ya que algunos autores han comprobado la existencia de una mayor prevalencia en rebaños mixtos o de carne que en rebaños de producción lechera (Boelaert *et al*., 2000). En este sentido, en un estudio reciente realizado en la vacas de raza Frisona en Estados Unidos (US Holstein), se ha comprobado la existencia de regiones cromosómicas que determinan la presencia de *Map* en tejidos y heces en esta raza al comparar animales infectados y animales control (Settles *et al*., 2009). Además se ha comprobado que la prevalencia de *Map* en el rebaño es mayor cuanto mayor sea este (Braun *et al.*, 1990).

En cuanto a las prevalencias obtenidas intrarebaño, en Europa y concretamente en Dinamarca, mediante el test ELISA en muestras de tanque de leche, se han encontrado prevalencias entre el 3 y el 60% según la región danesa examinada (Nielsen *et al*., 2000b). Con este mismo test, pero aplicado a muestras de suero se han obtenido resultados de seroprevalencia de entre el 6,6% y el 8,7% en rebaños de leche y entre el 8,7% y el 9,9% en rebaños de carne (VanLeeuwen *et al*., 2006). En Bélgica, la seroprevalencia en rebaños de leche se cifra en un 3,3%, un 2,9% en rebaños mixtos y en los de carne un 4,2% (Boelaert *et al*., 2000). En Estados Unidos, el estudio de

prevalencias intrarebaño se ha llevado a cabo principalmente mediante tests ELISA. En Missouri, en un estudio sobre vacas de 45 rebaños de aptitud lechera se obtuvieron porcentajes del 1,7% al 42,1%, sobre muestras de suero, y del 4,9% al 62,8%, sobre muestras de leche (Hardin y Thorne, 1996)-En Wisconsin, de 54 granjas que resultaron positivas al test ELISA, el 20,3% de los animales fueron diagnosticados como positivos mediante esta técnica (Collins *et al*., 1994). En Alabama, con el estudio de 79 rebaños de carne se encontró una seroprevalencia dentro de los positivos del 3,3% (Hill *et al.*, 2003). En Canadá, en New Brunswick, Nova Scotia y Prince Edwards Island, se ha hallado un 8,5% de seropositivad intrarebaño mediante el test ELISA (Vanleeuwen *et al*., 2001) y en Asia, entre el 8,6 y 23% de muestras de leche positivas, como prevalencia intrarebaño en Irán (Haghkhah *et al.*, 2008). En Nueva Zelanda, en un estudio publicado el 1989, entre un 2% y un 16% de los animales de los rebaños afectados se consideraban excretores, mediante cultivo de heces (De Lisle y Milestone, 1989), mientras que 10 años después, y mediante la misma técnica diagnóstica esta cifra aumentó hasta el 20,6-26,3% de animales que excretaban micobacterias (Reichel *et al.*, 1999).

II.2.2.2. Distribución y prevalencia de la paratuberculosis en ganado ovino y caprino

En España, la primera descripción de paratuberculosis ovina se produjo en León, en 1973 (Aller *et al.*, 1973). Tras este hallazgo, se ha descrito y estudiado la prevalencia de esta enfermedad en diferentes regiones españolas. En Aragón, donde la enfermedad fue descrita por primera vez por Badiola *et al*., (1979), se ha estimado una prevalencia del 46,7% de los rebaños estudiados utilizando métodos anatomopatológicos, cultivo de tejidos y de heces e IDGA (Juste *et al*., 1991a). Otro estudio realizado en Zaragoza, esta vez en ovinos y caprinos remitidos al Servicio de Diagnóstico Anatomopatológico de la Universidad de Zaragoza en el periodo 1981-1993, mediante estudios anatomopatológicos, de IDGA y cultivo, reveló una tasa de infección individual del 10,8% en ovino, y 22,5% en caprino así como una prevalencia intrarebaño de entre 4 y 6% en ovino y del 10% en caprino (García Marín *et al.*, 1994). Respecto a la prevalencia intrarrebaño, García Marín *et al*., (1992c) estudiaron dos granjas ovinas con paratuberculosis, obteniendo una seroprevalencia del 3% medida mediante el test

IDGA. Igualmente, estos autores valoraron este dato en animales desechados, ascendiendo al 18%, mientras que cuando se utilizaron métodos histopatológicos, se logró un 59% de prevalencia (García Marín *et al*., 1992c). Resultados similares se obtuvieron (49,4%) tras realizar estudios histopatológicos en cuatro rebaños de esta región (Pérez *et al*., 1996). En caprino, también en Aragón, en un total de 42 animales de dos granjas, se han calculado prevalencias de 69% mediante histología, 42,85% positivas al test IDGA, 50% al ELISA y este mismo porcentaje al cultivo de tejidos (García Marín *et al*., 1992b). En el País Vasco, en ganado ovino, se llevaron a cabo estudios serológicos mediante ELISA e IDGA obteniéndose una seroprevalencia individual entre el 2 y el 5,8%, una prevalencia en rebaños entre el 23,5 y el 31,4% y tras el estudio de 6 rebaños, una prevalencia intrarebaño entre el 0 y el 4,8% (Juste *et al*., 1992a; Aduriz *et al*., 1994). En Madrid, mediante IDGA, se obtuvo una seroprevalencia individual en caprino del 44% (Mainar-Jaime y Vázquez-Boland, 1998). En la Comunidad Autónoma de Castilla y León, tanto en Ávila como en Salamanca, se realizaron estudios serológicos para comprobar el número de rebaños seroprevalentes: en Ávila, mediante IDGA, se estimó que el 29% de rebaños ovinos, y el 52% de caprinos, eran positivos (Reviriego *et al*., 2000) y en Salamanca, mediante ELISA, se alcanzó una prevalencia individual del 44,12% y del 86,6% de los rebaños (Fernández Benito *et al*., 2001). En León se han realizado estudios histopatológicos para estimar la prevalencia, tanto en ganado ovino, que se cifró entre un 35% y un 71%, según se tomaran las muestras de un matadero u otro en los que se llevó a cabo el estudio (González, 1998) y en caprino dónde el estudio de dos rebaños reveló una prevalencia intrarebaño del 35% (Corpa, 1999). En el sur de España y en las islas Canarias estos estudios han sido llevados a cabo en cabras mediante el test serológico ELISA, de forma que en las Islas Canarias la seroprevalencia se valora en un 0,5%, en Huelva en 6 rebaños es del 41%, en Córdoba del 13% (Molina *et al*., 1991). En esta última provincia años más tarde se hicieron estudios de ELISA indirecto obteniéndose una prevalencia mayor, en rebaños del 97% e individual del 49,7% (Rodríguez, 2000), señalándose que este incremento podría deberse a la existencia de animales vacunados frente a paratuberculosis en los rebaños.

En cuanto a lo que ocurre en otros países, en Europa y más concretamente en el Reino Unido, en un estudio a partir de extensiones de mucosa intestinal de 240 ovinos, se observaron bacilos ácido-alcohol resistentes (BAAR) en el 21% de ellos (Heath,

1955). En los años 70, en Alemania, se estimó que la prevalencia en rebaños era de un 10%, con un 10% de animales afectados en cada explotación (Behrens, 1979). En Islandia, desde la importación de ovejas procedentes de Alemania en 1933, se produce una extensión de la enfermedad (Sidgurdson y Gunnarsson, 1983; Fridriksdottir *et al*., 2000) con una mortalidad anual del 8-9%, que causó la baja de 100.000 animales (Palsson, 1962). En Suiza, en un estudio realizado en la especie caprina en 1995 se apuntó que este país se encontraba libre de infección (Giacometti *et al*., 1995); sin embargo años más tarde la prevalencia, tanto en la especie ovina como en la caprina, fue determinada mediante la técnica de la PCR en leche de tanque, en un 23,8% y 23 % respectivamente (Muehlherr *et al*., 2003). En Grecia, mediante PCR en sangre se obtuvieron unas prevalencias del 5,15% en ovino y del 6,8% en caprino, así como del 5,5% y 10,2% respectivamente, utilizando la técnica de fijación del complemento (Ikonomopoulus *et al*., 2007). En Portugal, mediante ELISA en sangre, se obtuvieron unos porcentajes de animales infectados del 3,7% en los animales y del 46,7% en rebaños, y considerando la especificidad y sensibilidad de la técnica, los porcentajes reales de infección podrían ascender al 6,4 y 93%, respectivamente (Coelho *et al*., 2007). En ganado caprino, en Noruega se estimó una prevalencia del 9% de los animales, realizándose el diagnóstico mediante cultivo fecal, frotis o histopatología durante cinco años (Gunnarson, 1979). En Australia, en un estudio realizado en ovinos sacrificados en matadero, se obtuvo una prevalencia de la enfermedad entre el 2,4 y 4,4% (Sergeant y Baldock, 2002); sin embargo en ganado caprino se ha señalado que este país se encuentra libre de la infección (Ellis *et al*., 1998). En Canadá, concretamente en un estudio realizado en Québec en la especie ovina mediante histopatología, se obtuvo una prevalencia indvidual del 3%, estableciéndose que ésta era directamente proporcional a la edad de los animales (Arsenault *et al*., 2003). En Sudáfrica, en el estudio de un rebaño de una estación agrícola experimental, mediante histopatología se obtuvo una prevalencia del 41,5% (Huchezmeyer y Bastianello, 1992) mientras que con el empleo de la técnica serológica de la IDGA, se obtuvo una prevalencia individual del 1,38% y en rebaños del 0,74% (Michel y Bastianello, 2000). En la India, también la técnica histopatológica, en musestras de tejido intestinal fue la empleada para obtener la prevalencia de un rebaño de ganado ovino, siendo esta del 15% (Reddy *et al.*, 1984). En Marruecos, la prevalencia intrarebaño se midió en 3 rebaños, mediante cultivo fecal y fijación del complemento con valores del 29,8 y 29,2%, respectivamente (Benazzi *et al.*, 1996).

II.2.3. Importancia económica

La importancia económica de la paratuberculosis radica en las grandes pérdidas económicas que ocasiona en los rebaños afectados, tanto por la eliminación o muerte de animales como por el descenso en la producción. Ha sido en la especie bovina donde estos aspectos han sido más ampliamente estudiados. Hay estudios en esta especie que reflejan que gran parte de las vacas son desechadas tras la primera o segunda gestación, antes de alcanzar su pico de producción láctea, y por tanto desciende la edad media de los rebaños y con ello su potencial productivo y genético (Buergelt y Duncan, 1978). Algunos autores han estimado pérdidas de entre 903 y 979 dólares por vaca afectada en lo que a pérdida de producción de leche se refiere (Chiodini y Van Kruiningen, 1986; Van Schaick *et a*l., 1996), y otros citan cifras menores, de 100 dólares por vaca lechera y de 200 cuando en la explotación hay un 10% de animales con clínica (Ott *et al*., 1999). En el total de la industria lechera bovina de EE.UU las pérdidas podrían ascender a 1,5 billones de dólares anuales (Stabel, 1998) o, en el caso de Nueva Inglaterra, a 15,4 millones de dólares anuales (Chiodini y Van Kruiningen, 1986). En Canadá estas cifras llegan a ser de 2.992 dólares anualmente como media, y a 49 dólares por año (Tiwari *et al.*, 2008).

Las pérdidas, además del descenso en la producción, se deben también a otros factores como la eliminación prematura de animales, la pérdida de valor al sacrificio, sustitución de animales sacrificados y costes veterinarios (Merkal *et al*., 1975a; Buergelt y Duncan, 1978; Chiodini *et al*., 1984a; Benedictus *et al*., 1987; Wilson *et al*., 1993; Van Shaick *et al*., 1996; Juste, 1997; Stabel, 1998; Johnson-Ifearulundu *et al*., 1999; Ott *et al*., 1999; Aduriz *et al*., 2000; Kennedy y Benedictus, 2001; McKenna *et al*., 2006; Kudahl y Nielsen, 2009). Se ha estimado un aumento de la tasa de mortalidad en los rebaños infectados del 3% (Jonson-Ifearulundu *et al*., 1999; Ott *et al*., 1999). Respecto a las pérdidas indirectas, se produce un descenso en la producción de leche (Merkal *et al*., 1975a; Buergelt y Duncan, 1978; Benedictus *et al*., 1987; körmendy *et al*., 1989; Collins y Nordlund, 1992; Spangler *et al*., 1992; Wilson *et al*., 1993; Aduriz *et al*., 1994; Sweeney *et al*., 1994a; Hutchinson, 1996; Nordlund *et al*., 1996; Wilson *et al*., 1997;Stabel, 1998; Ott *et al*., 1999; Aly *et al*., 2010) que ocurre tanto en animales con clínica como en aquellos infectados subclínicamente. Se estima, que en animales

positivos a cultivos fecales o al test ELISA, dicha disminución estaría entre el 4 y el 16% (Benedictus *et al*., 1987; Wilson *et al*., 1993; Van Shaick *et al*., 1996; Collins y Nordlund, 1999). En otro estudio, para los bovinos infectados subclínicamente se ha citado una disminución en la producción del 4% (Goodger *et al.*, 1996). El estudio de una explotación de 500 animales reveló unas pérdidas de 49, 474 y 1.030 litros por vaca y año en tres años consecutivos, respectivamente (Körmendy *et al*., 1989). Además se ha observado una disminución en la fertilidad (Merkal *et al*., 1975a; Buergelt y Duncan, 1978; Stabel, 1998) así como un incremento en la susceptibilidad al padecimiento de mamitis asociado a la infección por *Map*, tanto en enfermos como en animales infectados pero sin clínica (Merkal *et al*., 1975a; Buergelt y Duncan, 1978; McKenna *et al*., 2006). Así, Johnson-Ifearundulu *et al*. (2000) establecieron la existencia de una correlación entre la positividad a la prueba de ELISA y un incremento de días abiertos en las vacas estudiadas, con diferencias de 28 días entre animales positivos y negativos. Además, se ha observado una disminución en los índices de crecimiento (Stabel, 1998; Kudahl y Nielsen, 2009) y de conversión del alimento (Kormendy *et al*., 1989; Stabel, 1998; Johnson-Ifearulundu *et al*., 1999) habiédose cifrado esta última del 60% al 39% (Körmendy *et al*., 1989). Se considera que, de forma global, en una explotación, se podría atribuir un 75% de las pérdidas a los animales infectados de forma subclínica que a los que padecen la enfermedad, ya que los primeros son más frecuentes en los rebaños en los que está presenta la infección por *Map* (Merkal *et al*., 1975a; Gay y Sherman, 1992; Johnson-Ifearundulu *et al*., 1999).

En cuanto al ganado ovino, existen pocos trabajos que describan las pérdidas económicas debidas a paratuberculosis. En España, un trabajo de Aduriz *et al*. (1994), refleja la relación existente entre la infección en ganado ovino y la disminución en la producción de leche, que se calcula en un 10% aproximadamente en animales positivos a pruebas serológicas, cuya venta hubiera generado un beneficio de 25 millones de pesetas (Juste y Aduriz, 1990a). Asimismo, Juste y Aduriz (1990a) calcularon unas pérdidas anuales de 100.000 pesetas en rebaños de 300 animales de aptitud cárnica. También se ha estimado que los gastos ocasionados por casos clínicos de paratuberculosis en ovino de carne y de leche ascendían a 60 y 150 dólares por animal, respectivamente (Juste, 1997).Otro estudio basado en las pérdidas producidas por mortalidad debido a la paratuberculosis en tres años consecutivos, del 2002 al 2004, en Australia sugiere unas pérdidas anuales que ascienden a los 13.715 dólares por granja y

año, dos tercios de las pérdidas totales asociadas a bajas por cualquier enfermedad (Bush *et al*., 2006).

Además de estás pérdidas que de por sí suponen un alto coste para el ganadero, hay que añadir los gastos derivados de la implantación de los programas de control de esta enfermedad, como pueden ser la contratación de servicios veterinarios, la realización de varias pruebas de diagnóstico, la adquisición de vacunas o las medidas higiénico-sanitarias tomadas para llevar a cabo el cambio de manejo. Por otro lado habría que añadir la pérdida de potencial genético en casos de sacrificios prematuros, con una disminución de la edad media de las explotaciones y la consecuente pérdida de los mejores años productivos. Igualmente, habría que añadir otras pérdidas económicas indirectas como son aquellas relacionadas con el comercio nacional e internacional en cuanto a movimiento de animales importados o exportados, restricciones de acceso al mercado, incluyendo los animales de alto valor genético, o los gastos que implican la realización de pruebas de diagnóstico en animales dedicados a la venta (Buergelt y Duncan, 1978; Aduriz *et al*., 2000; Kennedy y Benedictus, 2001; Olsen *et al*., 2002).

II.3. PATOGENIA

Se trata de un aspecto de la enfermedad del cual se desconocen todavía muchos detalles debido a varios factores, como la dificultad para el aislamiento de *Map*, el amplio periodo de incubación de la propia enfermedad o la dificultad para reproducir experimentalmente sus características típicas (Coussens, 2004; Stevenson, 2005). Parte de los conocimientos sobre la patogenia de la paratuberculosis se han adquirido tras la realización de infecciones experimentales en ovino y caprino, especies más asequibles que el bovino para este tipo de trabajos, extrapolándose estos conocimientos a la especie bovina; en ocasiones, se ha trasladado lo que ocurre en otras micobacteriosis como la tuberculosis o la lepra (García Marín *et al*., 2000).

II.3.1. Contagio

Los animales con paratuberculosis clínica representan un alto riesgo en la explotación, debido a que pueden llegar a excretar más de 10^8 bacilos por gramo de heces (Chiodini *et al.*, 1984a). La vía de contagio principal de la paratuberculosis es la digestiva, mediante la transmisión fecal-oral, al ingerir los animales material contaminado con restos fecales procedentes de estos individuos que excretan micobacterias en heces (Sweeney, 1996). Esto sucede principalmente cuando los animales jóvenes, que son los más susceptibles, maman de ubres manchadas (Julian, 1975; Chiodini *et al*., 1984a; Blood *et al*., 1989; Juste y Aduriz, 1990b; García Marín *et al*., 2000). Aunque se ha señalado que los animales adultos pueden infectarse tras la exposición a grandes dosis de la bacteria (Rankin, 1962), el riesgo de infección es mucho más bajo (McGregor *et al*., 2012) e incluso en ovinos expuestos a dosis elevadas y que se infectan, la infección no progresa hacia formas graves, como sucede en los corderos (Delgado *et al*., 2013).

El riesgo a infectarse aumenta si son ambientes muy contaminados o hijos de madres infectadas (Windsor y Whittington, 2009), siendo la probabilidad de que una vaca sea seropositiva 6,6 veces mayor para hijas de vacas seropositivas que seronegativas, ya sea por transmisión congénita o por la leche en el posparto (Aly y

Thurmond., 2005). Sin embargo, se ha sugerido una mayor resistencia a la infección durante las primeras fases de vida de terneros nacidos de madres infectadas debido a los altos niveles de anticuerpos maternales (Goudswaard, 1972; Rice y Carriere, 1969; Yokomizo *et al*., 1970).

Por otra parte, los animales también pueden infectarse a través del calostro y la leche (Riemann *et al*., 1983; Chiodinni *et al.*, 1984a; Thoen y Baum, 1988; Sweeney, 1996), ya que un animal con clínica puede excretar micobacterias por estas vías (Taylor *et al.*, 1981; Giese y Ahrens, 2000). Incluso se ha descrito la presencia de micobacterias en leche de animales con paratuberculosis subclínica (Sweeney *et al.*, 1992b; Streeter *et al*., 1995; Millar *et al*., 1996).

Asimismo, se ha propuesto la transmisión intrauterina, considerándose de escasa importancia (Chiodini *et al*., 1984a; Reddy *et al*., 1984; Rebhum, 1995; Kruip *et al.*, 2003). La micobacteria se ha aislado tanto del útero (Pearson y McCelland, 1955; Lawrence, 1956; Kopecky *et al.*, 1967; Goudswaard, 1970) como del feto (Pearson y McCelland, 1955; Lawrence, 1956; Doyle, 1958; Muhammed y Eliasson, 1979) lo que sucede sobre todo en el caso de madres con enfermedad clínica (Alexejeff-Goloff, 1929; Pearson *et al.*, 1955; Lawrence, 1956; Doyle, 1958; Hole, 1958; Seitz *et al*., 1989; Rohde y Shulaw, 1990; Lambeth *et al.*, 2004), aunque también ha sido constatado en madres afectadas subclínicamente (Lawrence, 1956; Kopecky *et al*., 1967; Sweeney *et al*, 1992b). Igualmente, la vía seminal parece poco importante a pesar de que se ha aislado *Map* de animales con la enfermedad, tanto del propio semen (Larsen y Kopecky, 1970; Larsen *et al.*, 1981; Eppleston y Whittinton, 2001; Glawisching *et al.*, 2004) como del aparato genital (Larsen y Kopecky, 1970; Larsen *et al*., 1981).

Otras posibles vías que han sido reflejadas en la bibliografía son la vía respiratoria (Corner *et al.*, 2004), así como la depredación o ingestión de cadáveres contaminados en el caso del zorro o el jabalí (Beard *et al*., 2001a; Machackova *et al.*, 2004) e incluso transmisión mediante seres invertebrados, ya que *Map* ha sido aislada de nematodos (Whittington *et al*., 2001b), lombrices (Fischer *et al.*, 2003a), insectos (Fischer *et al*., 2001; Fischer *et al*., 2003b, 2004) e incluso en amebas de vida libre (Mura *et al*., 2006).

II.3.2. Entrada de *Map* en el organismo y localización inicial

Las micobacterias patógenas atraviesan las barreras presentes en las mucosas penetrando en las células de revestimiento por endocitosis (Lugton, 1999). En concreto, el punto de entrada de *Map* en el organismo parece ser el tejido linfoide intestinal o placas de Peyer (Momotani *et al*., 1988; Liebler *et al*., 1988a, 1988b), que alcanza su máxima extensión en los animales jóvenes, siendo ésta una de las razones que podrían explicar su mayor susceptibilidad a la infección que aquellos de más edad. Los primeros estudios experimentales en ganado bovino propusieron como asiento primario de *Map* en el organismo las tonsilas y nódulos linfáticos retrofaríngeos, desde donde la bacteria se diseminaría a intestino y nódulos linfáticos mesentéricos (Payne y Rankin, 1961a; Lugton, 1999), aunque parece ser que se tratarían de localizaciones transitorias en las que no se desarrollan lesiones (García-Marín *et al*., 2000), ya que en estudios experimentales realizados en ganado ovino y caprino se ha comprobado que, en los estadios iniciales, la mayoría de las lesiones se localizan en la placa de Peyer intestinal y nódulos linfáticos mesentéricos (Brotherston *et al.*, 1961a; Nisbet *et al*., 1962; Chiodini *et al*., 1984a; Van Kruiningen *et al.*, 1986; García Marín *et al*., 1992a; Juste *et al*., 1994; Pérez *et al*., 1994b; Lugton, 1999; Sigurdardottir *et al.*, 1999; Valheim *et al*., 2002b; Verna *et al*., 2007; Reyes, 2007; Delgado *et al*., 2013; Fernández *et al*., 2014a).

La entrada de *Map* estaría mediada por las células M, epiteliales, que recubren las cúpulas de las placas de Peyer (Momotani *et al.*, 1988; García Marín *et al*., 1992a; Sigurdardóttir *et al*., 2001). Estas células, al contrario de los enterocitos, carecen de microvellosidades, enzimas digestivas y moco en superficie con lo que son muy accesibles para la entrada de microorganismos (Fetherstone, 1997). Los resultados de diferentes grupos investigadores parecen indicar que la mayoría de bacterias estarían ya degradadas o lo harían una vez dentro de las células M, las cuales presentarían los antígenos a otras células del sistema inmune asociadas con los linfocitos T del área parafolicular (Momotani *et al.*, 1988; García Marín *et al.*, 1992a; Snider *et al.*, 1992; Fujimura y Owen, 1996; Lugton, 1999; Sigurdardóttir *et al.*, 2001). En este sentido, se ha sugerido la importancia de micobacterias degradadas y formas L durante las fases iniciales de la infección, las cuales se localizan principalmente en el citoplasma de estas

células, (García Marín *et al*., 1992a). Además de por las células M, se ha sugerido que la entrada de *Map* se podría producir por células epiteliales (enterocitos) de las vellosidades intestinales (García Marín *et al.,* 1992a; Sigurdardóttir *et al*., 2001), aunque con menor importancia y sólo en aquellas que rodean las cúpulas con células M infectadas (García Marín *et al.,* 1992a).

En el inicio de la infección e invasión de las células epiteliales del intestino juega un papel muy importante la proteína de membrana de 35kDa de *Map*, actuando como factor de virulencia (Bannantine *et al*., 2003). Asimismo, *Map* presenta una proteína de unión llamada proteína de acoplamiento a la fibronectina (FAP), necesaria para la invasión, que le permite unirse a las integrinas de las células M a través de un puente de fibronectina, (Valentin-Weigand y Moriarty, 1992; Secott *et al*., 2001, 2002, 2004.). No obstante, se ha descrito que la infección puede producirse por invasión directa de las microvellosidades intestinales o por vía hematógena (Merkal *et al*., 1968; Chiodini, 1996; Sigurdardottir *et al*., 1999, 2001) lo que podría explicar la presencia de lesiones en las vellosidades sin aparentes lesiones en la submucosa (Sigurdardottir *et al*., 2001). Además, Sigurdardottir *et al*. (2005) comprobaron mediante la técnica de "manga invertida" la entrada de *Map* en el instestino a través de los enterocitos, presentes en tramos del mismo sin placa de Peyer, además de a través de las ya mencionadas células M.

Una vez dentro de las células M, tanto en su citoplasma como en el de linfocitos que se hallan en vacuolas de las mismas células M o libres en las propias vacuolas de las células M, las micobacterias son trasportadas transcelularmente (Sigurdardóttir *et al*., 2001) y captadas por los macrófagos subepiteliales e intraepiteliales adyacentes a la placa de Peyer, localizándose en fagosomas (Bendixen *et al*., 1981; Momotani *et al*., 1988; Pérez, 1992; Peris, 1992; Kaufmann, 1995; Fujimura y Owen, 1996; Lugton, 1999; Valentin-Weigand y Goethe, 1999; Corpa *et al*., 2000a; Sigurdardottir *et al*., 2001; Tessema *et al*., 2001) donde *Map* puede sobrevivir hasta 15 días (Kuehnel *et al*., 2001). En este sentido, la supervivencia de *Map* dentro de los macrófagos depende de muchos factores. Así, los macrófagos pueden controlar el crecimiento de las micobacterias, pero si éstas se encuentran en gran cantidad pueden resultar citotóxicas para los mismos o inducir su apoptosis (Bannantine y Stabel, 2002). Igualmente, estos microorganismos resisten a los mecanismos oxidativos, la producción de óxido nítrico,

así como a las enzimas lisosómicas y a la fusión fagosoma-lisosoma (Harris y Barleta, 2001; Tessema *et al*., 2001). Esto último lo alcanzan gracias a que son capaces de inhibir la maduración de fagosomas a fagolisosomas funcionales por diferentes mecanismos (Cheville *et al*., 2001; Coussens *et al*., 2001; Kuehnel *et al*., 2001; Pieters, 2001; Hostetter *et al*., 2002, 2003; Tooker *et al*., 2002; Weiss *et al*., 2004a; Kang *et al.*, 2005; Kusner, 2005; Vergne *et al*., 2005) o a permanecer en un compartimento del fagosoma que resiste la maduración a un fagolisosoma funcional (Hostetter *et al.*, 2003). Otro factor que ayuda a la resistencia de *Map* dentro de los macrófagos es que esta micobacteria cuenta con diferentes lípidos en su pared celular que reducen la función bactericida de los macrófagos (Zhao *et al*., 1997; Harris y Barletta, 2001; Tessema *et al*., 2001). Igualmente, se ha sugerido que los macrófagos con micobacterias patógenas no activan la ruta de la protein-kinasa mitógeno activada, la cual tiene un papel antimicrobiano muy importante así como en la producción de moléculas efectoras tras la infección micobacteriana (Schorey y Cooper, 2003). Además, se ha observado que *Map* es capaz de inhibir la presentación de antígenos a los linfocitos T (Weiss *et al.* 2001) y que en ganado ovino con la enfermedad la expresión de antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad de tipo II (MHC-II) y de integrinas tipo LFA-1 se ve reducida, lo cual pudiera estar relacionado con la supervivencia intracelular de la micobacteria y con la persistencia de la infección (Alzuherri *et al*., 1997). En este sentido, Coussens (2004) propone como especie modelo el ganado vacuno para estudiar la respuesta inmune frente a *Map.* Este autor revisa lo estudiado hasta el momento y concreta que, según va progresando la infección, los macrófagos situados en los sitios de infección liberan IL-1α y TRAF1 (factor 1 asociado a TNF), que inhibe la apoptosis de macrófagos, acumulándose en el lugar de infección y junto a su supervivencia hace que este número sea muy elevado. Cuando esto se combina con un fallo en la expresión de TNF-α no se forman granulomas y se produce una apariencia de lesión granulomatosa difusa en los sitios de infección (Coussens *et al*., 2004) de tal manera que con este modelo se sugiere la posibilidad de que al limitar la apoptosis de los macrófagos se asegure la supervivencia intracelular de *Map.* Los macrófagos o células dendríticas capaces de eliminar las micobacterias migrarían a los nódulos linfáticos regionales presentando antígenos y estimulando a los linfocitos T para la producción de IFN-γ y su proliferación vía IL-2/CD25 (Coussens *et al*., 2004). El IFN-γ se libera a sangre y en ocasiones va a los sitios de infección, probablemente atraido por los altos niveles de IL-8 porducidos por los macrófagos infectados (Coussens *et al*., 2004).

Por lo tanto, el que la micobacteria sea destruida, va a depender del grado de activación de los macrófagos (García Marín *et al.*, 2000), de manera que si su destrucción se logra con éxito, el animal superará la infección pero, en caso contrario, podrán originarse, a su vez, dos situaciones: que se desarrolle la enfermedad o que no lo haga y entonces el animal quede como portador asintomático pero excretando micobacterias durante largos periodos de tiempo (Rankin, 1961a, 1961b; Gilmour *et al*., 1978; Fodstad y Gunnarsson, 1979; Thomas, 1983; Chiodini *et al.*, 1984a; Blood *et al*; 1989; Snider *et al*., 1992; Thorel *et al*., 1992; Barrer, 1993; Clarke, 1997; Storset *et al*., 2001). El que ocurra alguna de las situaciones anteriores va a depender a su vez de varios factores como el tiempo de exposición y dosis recibida (Clarke y Little, 1996; Sweeney, 1996; Whitlock y Buergelt, 1996; Bannantine y Stabel, 2002), la patogenicidad de la cepa (Stamp y Watt, 1954; Saxegaard, 1990) así como de la respuesta del hospedador (García Marín *et al.*, 1994; Clarke, 1997) que a su vez está influida por aspectos como la especie (Stabel *et al*., 2003), la edad (Doyle y Spears, 1951; Larsen *et al.*, 1975a; Clarke, 1994; Cocito *et al*., 1994; Sweeney, 1996; Withlock y Buergelt, 1996), la nutrición y dieta (Doyle y Spears, 1951; Snider *et al*, 1992; Harris y Barletta, 2001; Stabel *et al*., 2003), el stress y la acción hormonal (Reddy *et al*., 1984; Kreeger, 1991; García Marín *et al*., 1994; Rebhum, 1995; Feota et al., 1999; Harris y Barletta, 2001) así como el estado inmunológico (Gilmour *et al*., 1978; Clarke *et al*., 1996).

En cuanto a la localización concreta dentro del intestino, en las etapas iniciales de la infección, se ha observado mayor positividad inmunohistoquímica frente a *Map* en las células M de la placa de Peyer ileal continua y en la yeyunal (García Marín *et al.*, 1992a) coincidiendo con la localización en la que se encuentran las lesiones iniciales en estudios experimentales (Nisbet *et al.*, 1962; García-Marín *et al*., 1988; Verna *et al*., 2007; Reyes, 2007; Delgado *et al*., 2013); Juste *et al.* (1994) describen el tejido linfoide de la válvula ileocecal como la localización donde se asientan las primeras lesiones las cuales progresarían cranealmente por la lámina propia adyacente, en relación con los espacios interfoliculares. Sin embargo, en un estudio realizado por Schleig *et al*. (2005) en el que desarrollaron un modelo *in vitro* en bovino comprobaron que no había diferencias en cuanto a la unión de *Map* a las células epiteliales de los distintos tramos del tracto intestinal, observando únicamente variaciones relacionadas con la cepa de *Map* utilizada.

II.3.3. Respuesta inmunitaria del hospedador

Map es un patógeno intracelular que sería capaz de evadir a los mecanismos de la respuesta inmunitaria innata del hospedador, evitando los procesos que tienen lugar tras su fagocitosis por los macrófagos (Cheville *et al*., 2001; Kuehnel *et al*., 2001; Pieters, 2001; Hostetter *et al*., 2002, 2003; Tooker *et al*., 2002; Weiss *et al*., 2004a; Kang *et al.*, 2005; Kusner, 2005; Vergne *et al*., 2005) induciendo una rápida expesión de IL-10 y minimizando la de TNF-α e IL-12 (Weiss y Souza, 2008). Además, *Map* es capaz de inducir una respuesta adquirida, que puede ser o no efectiva, en la que la activación de los macrófagos, tras su estímulo por diversos mediadores celulares producidos principalmente por linfocitos T es un hecho clave (Stabel, 2000). Esta estimulación inmunológica es inducida por los diferentes antígenos de *Map*, entre los que parecen destacar el lipoarabinomanano (LAM) y las proteínas de choque térmico, que son presentadas por el complejo mayor de histocompatibilidad tipo II (MHC-II) a los linfocitos T (Stabel, 2000). Se produce entonces una compleja interacción entre los diferentes procesos inmunológicos, en ocasiones contrapuestos, que va a tener como resultado que los macrófagos destruyan la micobacteria y por lo tanto el animal supere la infección, o que la micobacteria logre sobrevivir, lo que conducirá a que el animal desarrolle la enfermedad clínica o permanezca durante largos periodos de vida como portador asintomático de la infección excretando *Map* (Rankin, 1961; Gilmour *et al*., 1978; Fodstad y Gunnarsson, 1979; Thomas, 1983; Chiodini *et al.*, 1984a; Blood *et al*; 1989; Snider *et al*., 1992; Thorel *et al*., 1992; Barrer *et al*., 1993; Clarke, 1997; Storset *et al*., 2001).

II.3.3.1. Respuesta inmunitaria innata

Se trata de la primera línea de defensa que presenta el animal frente a los patógenos y consiste en el reconocimiento, sin necesidad de una exposición previa, de moléculas esenciales de los mismos, de tal forma que las mutaciones que se produzcan en estos organismos no impidan que sean detectados por el hospedador. Así, un reducido número de receptores codificados genéticamente reconocen moléculas presentes en una gran variedad de patógenos (Fearon y Locksley, 1996; Medzhitov y

Janeway, Jr., 1997; Medzhitov y Janeway, Jr., 2000; Vasselom y Detmers; 2002). El objetivo de este tipo de respuesta no sólo es contener la infección hasta que la respuesta inmune adaptativa sea inducida sino que es esencial para que ésta se encamine hacia un tipo de respuesta concreta. Así, una vez que los receptores del hospedador reconocen a los patógenos se activan mecanismos efectores que destruyen en horas a la mayoría de los mismos y se activa y orienta una respuesta inmune adaptativa, que, a través de la expansión clonal de los linfocitos, se dirige específicamente a los organismos persistentes (Fearon y Locksley, 1996; Medzhitov y Janeway, Jr., 1997; Vasselon y Detmers, 2002). Se sabe que la rápida reacción inflamatoria que sigue a una infección es principalmente mediada por monocitos, neutrófilos y células endoteliales y puede ser reproducida *in vitro* en ausencia de respuesta inmune adaptativa (Vasselon y Detmers, 2002). Los antígenos bacterianos estimulan la sobreexpresión de moléculas de adhesión en las células endoteliales, haciendo que los leucocitos se dirijan al foco de la infección; igualmente, son sobreexpresadas las integrinas β_2 en los neutrófilos. Así mismo, la activación de leucocitos estimula la producción de reactivos intermediarios del oxígeno que contribuyen a la eliminación de las bacterias de los tejidos. Los antígenos bacterianos también inducen la síntesis y liberación de citoquinas proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral (TNF) y la interleuquina-1 (IL-1). Además, la inmunidad innata induce la secreción de citoquinas efectoras como la IL-12 que controla la diferenciación de las células T CD4 y la sobreexpresión de moléculas co-estimuladoras en células presentadoras de antígenos necesarias para la proliferación de células B. De esta forma, la inmunidad innata, en respuesta a un patógeno, controla y dirige la respuesta inmune adaptativa (Vasselon y Detmers, 2002).

En el caso de inmunidad innata frente a *Map* destacan, entre otros, todos los mecanismos de maduración del fagosoma que ya se han sido citados anteriormente y que *Map* sería capaz de inhibir (Stabel, 2006). Se ha señalado que la maduración del fagosoma está directamente relacionada con la activación de los macrofagos (Hostetter *et al*, 2002) y que en la inhibición de esta maduración juega un papel muy importante el antígeno de pared micobacteriana LAM (Kang *et al*., 2005). Además de los efectos sobre la maduración del fagosoma, se ha sugerido que el LAM es un potencial factor de virulencia; así, LAM purificado de *M. bovis* y *M. tuberculosis* inhibe la producción de IL-12 tras su incubación con células dendrícas derivadas de monocitos (Nigou *et al*., 2001). Así mismo, podría potenciar la secrección de TGF-β por parte de los monocitos

(Dahl *et al*., 1996). En estudios más recientes se ha comprobado que tras el bloqueo de genes involucrados en la síntesis de la pared celular hay una reducción de la colonización de tejidos y desarrollo de lesiones, lo cual sugiere un papel de virulencia de estos genes, actuando como primera defensa de la bacteria frente a los macrófagos (Shin *et al*., 2006; Stabel, 2006).

La familia de receptores Toll (TLRs) son un grupo de receptores conservados evolutivamente, desde las moscas hasta los humanos, que juegan un papel muy importante en la iniciación de la respuesta inmune celular innata. Se trata de proteínas que unen el compartimento extracelular con el intracelular, con un dominio externo rico en repeticiones de leucina y una o dos regiones ricas en cisteína (Vasselon y Detmers; 2002). Hay autores que describen que la interacción de TLRs y las células dendríticas suele ser el primer paso en el inicio de la respuesta inmune adaptativa, seguido de su interacción con moléculas co-estimuladoras (CD28, CTLA-4, CD80, CD86) siendo finalmente las citoquinas las que envían las señales. Estos receptores ayudan a los macrófagos y a las células dendríticas a procesar la información sobre los patógenos encontrados y después proporcionan esta información a las células para que tenga lugar una apropiada respuesta inmune (Stabel, 2006). Los mecanismos de acción por los que los TLRs pueden modular la respuesta del hospedador son la regulación y la transcripción de la respuesta a varios genes tales como el que codifica para la IL-12, sintetasa inductible del óxido nítrico (iNOS), B7 y péptidos lisosomales (Sieling y Modlin, 2001). Hasta ahora, han sido identificados trece TLRs en vertebrados aunque, de ellos, en ovino y bovino estén presentes diez (Takeda *et al*., 2003, Stabel, 2006; Werling *et al*., 2006; Nalubamba *et al*., 2008; Ishii *et al*., 2008). En los primeros estudios, se conluyó que los receptores para *M. avium* eran receptores TLR2 (Lien *et al*., 1999; Means *et al*., 1999) y que tras la interacción de *M. avium* con estos receptores de los macrófagos se reducía la capacidad de éstos para responder al IFN-γ, debido a que se inhibían la expresión de genes inducidos por dicha citoquina(Alvarez *et al.*, 2003). En estudios más recientes se ha observado que además de TLR2 (en asociación heterodimérica con TLR1 y TLR6), TLR4 está directamente implicado en el reconocimiento concreto de *Map* (Ferwerda *et al*., 2007; Jo *et al.*, 2008). De hecho, se ha comprobado que mutaciones en estos receptores provocan mayor susceptibilidad a la infección paratuberculosa, tanto en ovino (Bhide *et al*., 2009) como en la especie bovina (Mucha *et al*., 2009; Ruíz-Larrañaga *et al*., 2011). El TLR4 es activado por el

lipopolisacárido (LPS) (Vasselon y Detmers, 2002) pero la mayoría de antígenos son reconocidos por receptores TLR2 (Krutzik y Modlin, 2004; Quesniaux *et al*., 2004), ya que estos son activados por una gran variedad de productos de la pared de bacterias Gram-positivas (Vasselon y Detmers, 2002). Estudios pararelos han demostrado que además de estos dos receptores (TLR2 y TLR4) TLR8 también está implicado en la patogénesis de la paratuberculosis, ya que se han confirmado cambios en la expresión de los genes que codifican para estos tres receptores en tejidos de ovejas infectadas con *Map* (Nalubamba *et al*., 2008; Taylor *et al*., 2008). Igualmente, se ha sugerido una relación entre el patrón de expresión de los TLRs y el desarrollo de las distintas formas patológicas de la paratuberculosis. Así, se ha comprobado mediante la valoración de la expresión de genes de 10 TLRs diferentes, que ovinos infectados con *Map* expresan una mayor cantidad de los mismos en el íleon, yeyuno, y los nódulos linfáticos asociados al intestino en comparación con animales controles de rebaños no expuestos a la micobacteria (Taylor *et al*., 2008). Además, y mediante su valoración con PCR a tiempo real, se ha hallado un incremento más acusado en la cantidad de TLR2 en ovinos procedentes de rebaños con paratuberculosis con lesiones multibacilares frente a los que mostraban formas paucibacilares y a los controles procedentes de explotaciones libres de *Map* (Nalubamba *et al*., 2008; Taylor *et al*., 2008). De la misma manera, y con igual método de estudio, se ha identificado una expresión específica de TLR6 en intestino de ovejas con paratuberculosis, demostrando que esto ocurre particularmente en animales con lesión multibacilar (Plain *et al.*, 2010). Los auores de este último trabajo sugieren un importante papel de los heterodímeros TLR6/TLR2 en la patogénesis de la paratuberculosis y apuntan a TLR6 como un marcadador de la exposición a *Map* y que podría ayudar al desarrollo de un patrón genético para ovejas resistentes a la infección por *Map*. Otro receptor de esta familia, TLR9, es activado por ADN bacteriano (Vasselon y Detmers, 2002). En este caso, se ha sugerido un papel protector de este receptor a la luz de los resultados de un estudio realizado por Nalubamba *et al.*, (2008) en el que se ha detectado una mayor expresión del mismo en ovejas infectadas sin síntomas de paratuberculosis que en aquellas asintomáticas. Igualmente, y para la infección tuberculosa, se ha otorgado a TLR9 un importante papel en la transición de la respuesta innata y adaptativa, por su participación en la respuesta Th1 mediante el control de la secreción de IL-12 (Pompei et al., 2007). Se ha propuesto un papel diferente de los TLRs, en concreto del TLR2, en las infecciones micobacterias según se encuentren en los periodos iniciales de la misma o cuando la infección ya está

establecida. Así, Noss *et al.* (2001) mantienen que determinados PAMPs ("patrones moleculares asociados al patógeno"), como la lipoproteína de 19 kDa de *M. tuberculosis,* en los casos iniciales, impulsaría una respuesta inmune innata proinflamatoria mediante TLR2, con una modulación de la respuesta inmune específica, pero en casos avanzados, propiciaría una infección crónica al impedir el procesamiento de antígenos por el MHC II y la activación de las células CD4.

Hay otras proteínas denominadas RP105, Nod1 y Nod2 que comparten estructura y funciones con miembros de la familia de receptores Toll. Se ha sugerido que estas proteínas juegan un papel muy importante en la respuesta frente al LPS (Vasselon y Detmers, 2002). RP105 es expresada principalmente por células B periféricas maduras (Miyake *et al.,* 1995) y se sospecha que colabora con TLR4 para desarrollar una respuesta humoral frente al LPS (Ogata *et al.,* 2000). Las proteínas Nod1 y Nod2 son proteínas citosólicas que pueden actuar como equivalentes funcionales intracelulares de los TLRs y, al igual que RP105, activan el factor nuclear κB en respuesta al LPS, crucial para la regulación de expresión de citoquinas (Vasselon y Detmers, 2002). La familia de proteínas Nod podrían funcionar como proteínas que activan la respuesta inmune para un amplio rango de patógenos (Vasselon y Detmers, 2002). Así mismo, mutaciones en Nod2 humana se ha relacionado con la susceptibilidad a padecer la enfermedad de Crohn (Hugot *et al.,* 2001; Ogura *et al.,* 2001).

Otra proteína descrita como importante en la respuesta inmune innata del hospedador es "la proteína macrofágica asociada a la resistencia natural 1" o NRAMP1 (natural resistance-associated macrophage protein 1) (Skamene *et al*., 1998; Bellamy, 1999). En los últimos años, el papel que juega esta proteína en las infecciones micobacterianas ha sido objeto de estudio (Skamene *et al.,* 1998; Blackwell *et al.,* 2001; Frehel *et al*., 2002; Blackwell *et al.,* 2003; Pererira-Suárez *et al*., 2006), ya que se sabe que mutaciones producidas en los genes que la codifican podrían estar relacionados con una mayor susceptibilidad a padecer tanto paratuberculosis (Beard *et al*., 1999a; Koets *et al*., 2000; Reddacliff *et al*., 2005; Pinedo *et al*., 2009a; Ruíz-Larrañaga *et al.,* 2010) como tuberculosis, hecho comprobado tanto en estudios en ratón (Vidal *et al*., 1995) como en humanos (Bellamy, 2000; Cervino *et al*., 2000). Se cree que esta proteína influye en la replicación intracelular de las micobacterias modificando el pH del

fagosoma (Hackam *et al*., 1998) e impidiendo su maduración (Frehel *et al*., 2002). Además NRAMP1 tiene la función de transportar Fe^{2+} a través de la membrana del fagosoma, lo cual podría privar a la micobacterias de este micronutriente esencial (Ziwilling *et al.,* 1999; Blackwell *et al*., 2001; Blackwell *et al*., 2003). Esto podría ser debido a que este Fe^{2+} particíparía en la catabolización de H_2O_2 a radicales OH^-, los cuales presentan una actividad bacteriostática y bactericida (Ziwilling *et al*., 1999; Blakwell *et al.,* 2001). Además es posible que NRAMP1 aumente la capacidad de los macrófagos que forman los granulomas para acabar con la micobacteria (Govoni *et al.*, 1995; Vidal *et al*., 1995; Blackwell *et al*., 2001; Blackwell *et al*., 2003; Pereira-Suárez *et al*.; 2006). Entre otras funciones, esta proteína hace que aumente la producción de NO, que presenta actividad antimicrobiana, por parte de los macrófagos (Barrera *et al.,*1994; Formica *et al.,* 1994; Arias *et al*., 1997; Fritsche *et al.,* 2003) y por tanto colabora con la protección frente a patógenos intracelulares. La importancia de la generación de NO y su modulación por parte de NRAMP1 para la defensa del hospedador frente a patógenos intracelulares ha sido demostrada porque la inhibición del crecimiento de la micobacteria en células resistentes a NRAMP1 puede ser abolida por la adicción de inhibidores de iNOS (Arias *et al.,* 1997) que, a su vez, regula la producción de NO. Igualmente, NRAMP1 estimula la expresión por parte de los macrófagos de ratón de MHCII, IL-1β, TNF-α (Blackwell *et al*., 2001) y TNF-α parece ser un importante coestímulo para la producción de NO (Ables *et al*., 2001). En la tuberculosis bovina, se ha observado la expresión "in situ" de NRAMP1, mediante métodos inmunohistoquímicos, especialmente visible en las lesiones granulomatosas. Con un patrón similar se observó en las mismas muestas la expresión de iNOS, con tinción inmunohistoquímica intensa en las areas necróticas de las lesiones tuberculosas y en células gigantes (Pereira-Suárez *et al.,* 2006). No obstante, aunque todas las muestras del estudio son positivas al Zhiel-Nielseen, no se valora la cantidad de BAAR en las mismas y por tanto no hay una comparación de la intensidad de la inmunotinción con la mayor o menor presencia de bacilos tuberculosos.

Las células T γδ también parecen contribuir en la respuesta inmune innata en infecciones por agentes que circulan por el intestino de rumiantes jóvenes, como es el caso de *Map* (Chávez, 1993; Pollock y Welsh, 2002; Sohal *et al*., 2008). Se ha comprobado que los corderos y terneros presentan un mayor porcentaje de estas células circulando en sangre que ovinos y bovinos adultos (Hein y Mackay, 1991; Wyatt *et al*.,

1994). Al acumularse principalmente en los tejidos epiteliales, actuarían como primera línea de defensa frente a estos microorganismos (Hein y Mackay, 1991; Hayday, 2000; Corpa *et al*., 2001). Concretamente el subtipo γδ WC1+ es capaz de reconocer antígenos sin que estén unidos al MHC II y por tanto, de jugar un papel muy importante en las primeras fases de infección (Machugh *et al*., 1997; Hayday, 2000) cuando las células αβ aún no son capaces de desarrollar una respuesta específica a nivel de mucosa intestinal (Hein y Mackay, 1991; Hein *et al*., 1991). Además, se ha propuesto que la acumulación de este subtipo de células capacita a los terneros para la secreción de citoquinas de tipo Th1 como IL-12, TNF-α e IFN-γ, protectoras frente a patógenos entéricos, favoreciendo así la aparición de una respuesta inmune celular frente a *Map* en las fases iniciales de la infección (Brown *et al*., 1994; Baldwin *et al*., 2000). No obstante, hay autores que asocian el aumento del subtipo de células en cuestión con la pérdica de células T CD4+ en las fases finales de la infección paratuberculosa en bovinos y por tanto, relacionando a las células T γδ WC1+, con funciones inmunoreguladoras y citotóxicas frente a las células T CD4+ más que inmunoprotectoras en el estadío crónico de la enfermedad (Chiodini y Davis, 1992; Koets *et al*. 2002; Koets *et al.*, 2006). En un estudio experimental con corderos en el que se infectaron animales con *Map* y de los cuales unos fueron inmunizados frente a esta micobacteria, se comprobó que el desafío con *Map* indujo un incremento en la proporción de linfocitos TCR-γδ en el nódulo linfático mesentérico yeyunal caudal, válvula ileocecal, placa de Peyer ileal y placa de Peyer yeyunal en los animales infectados no vacunados, mientras que en los corderos vacunados e infectados, con lesiones de carácter regresivo y escasas micobacterias en los tejidos, no se detectaron variaciones. Este hecho podría indicar un papel favorecedor de estas células en la progresión de la infección paratuberculosa (Reyes, 2007).

II.3.3.2. Respuesta inmunitaria adaptativa

La respuesta inmune adaptativa no participa de un modo independiente a la respuesta innata, descrita en el apartado anterior, sino que ambos tipos de respuesta actúan de forma conjunta en la lucha antimicrobiana, como en el caso de las micobacteriosis (Medzhitov y Janeway, 1997; Orme, 2004; Sohal *et al*., 2008).

La respuesta inmune adaptativa la presentan los animales vertebrados cuyos receptores se encuentran en dos tipos de linfocitos: los linfocitos T y los linfocitos B. No son receptores específicos, sino que van a reconocer a un gran número de antígenos (Medzhitov y Janeway, Jr., 1997; Fearon, 1999). No obstante, estos receptores poseen capacidad de "memoria" específica de patógeno, de larga duración (Medzhitov y Janeway, Jr., 1997; Stabel, 2006). Mientras los linfocitos B son los encargados de fabricar anticuerpos, los linfocitos T, a su vez, se clasifican en linfocitos T colaboradores o linfocitos T *helper* (Th) y citotóxicos (Tc). Los linfocitos Th tienen como función principal amplificar la repuesta inmune a través de la secreción de citoquinas. Estos linfocitos expresan el marcador CD4+ en su superficie y reconocen los antígenos que, una vez procesados, son presentados por las células presentadoras de antígenos (CPA) junto con moléculas MHC-II. Los linfocitos Tc, sin embargo, poseen el marcador CD8+ en su superficie y reconocen antígenos unidos a las moléculas del MHC de clase I (MHC I) (Kaufmann, 1991).

Las primeras células en contacto con el antígeno expresado por los fagocitos son los linfocitos T. En el caso de paratuberculosis, la respuesta inmune no es inmediata y está mediada por los linfocitos intraepiteliales localizados entre y debajo de las células epiteliales de la mucosa intestinal (Chiodini, 1996). Para que se produzca este contacto, es necesario que se lleve a cabo la presentación de antígenos. En el caso de *Map*, las CPA son los macrófagos situados bajo las células M de las placas de Peyer, que mediante el MCH-II unido al antígeno son reconocidos por los linfocitos Th (Lugton, 1999), produciéndose la activación de dichos macrófagos. Se trata del primer paso en la respuesta inmune adaptativa, lo que provoca la activación de las células Th CD4+ y la consecuente secreción de una cascada de citoquinas que a su vez hace que los macrófagos limiten el crecimiento micobacteriano o bien que proliferen más linfocitos T para detener la infección (Stabel, 2000a; Coussens, 2001, 2004).

Los linfocitos Th CD4+ presentan dos perfiles distintos de producción de citoquinas: Th1 y Th2 (Stabel, 2006). La producción de citoquinas por parte de las células Th1 parece estar regulada por la IL-12. Estas citoquinas son principalmente TNF-α, IFN-γ e IL-2. Las células Th2 producen principalmente IL-4, IL-5, e IL-10 y estimulan la producción de anticuerpos en los linfocitos B (Stabel, 2000a, 20006; Coussens, 2001; Kidd, 2003).

Las citoquinas producidas por las células linfocitarias de perfil Th1 participan en la **respuesta inmune celular** frente a microorganismos intracelulares, que son respuestas inmunes inflamatorias y citotóxicas mediadas por células. **La respuesta inmune humoral**, esta mediada por anticuerpos e inducida por tanto por las citoquinas de perfil Th2 (Stabel, 2000a, 2006; Coussens, 2001; Kidd, 2003). En el caso de la paratuberculosis, y en casos naturales, se ha relacionado la respuesta inmune celular con las primeras fases de la infección y la respuesta inmune humoral con la etapa clínica de la paratuberculosis (Molina *et al.*, 1996; Pérez *et al*., 1997; Begara-McGorum *et al.*, 1998; Burrels *et al*., 1998; Pérez *et al*., 1999; Stabel, 2000; Ostrowski *et al*., 2003). De igual manera ocurre en infecciones experimentales tanto en ovino (Juste *et al.*, 1994; Gwozdz *et al*., 2000b; Stewart *et al.*, 2004; Stewart *et al*., 2007; Verna *et al.*, 2007; Begg *et al*., 2010; Delgado *et al.*, 2012) como en bovino (Stewart *et al*., 2007). No obstante, en un estudio experimental realizado en la especie bovina, se ha observado que la respuesta inmune humoral, valorada a través de un test ELISA frente a anticuerpos de LAM, aparece poco después de la infección (134 días tras la infección) adelantándose a la respuesta celular (194 días tras la infección), obtenida al valorar la cantidad de INF-γ en sangre periférica (Waters *et al*., 2003). Recientemente, también hay varios estudios que señalan que el cambio entre respuesta Th1 y Th2 no sería tan marcado, coexistiendo ambas en largos periodos de tiempo, sin necesidad de asociarse a la fase clínica (Begg *et al.*, 2011; Vázquez *et al.*, 2013; Fernández *et al.*, 2014a).

II.3.3.2.1 Respuesta inmunitaria celular

Como se ha señalado anteriormente, el aconteciento que desencadena la respuesta inmune adaptativa, y más concretamente la respuesta inmune celular, es la presentación de antígenos, procesados en las moléculas del MHCII de las CPAs, a los linfocitos T, provocando la activación de los macrófagos. Así, una vez que los macrófagos son activados se produce IL-1, que es un mensajero celular que activa las células T (Cohen, 1990). Posteriormente, los linfocitos activados liberan IL-2, la cual a su vez hace que se produzca la expansión de clones de linfocitos TCD4+ helper (Th), y los CD8+ citotóxicos (Tc) y la producción de citoquinas tales como IL-2, IFN-γy TNF-α y el factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos (granulocite-macrophage colony stymulating factor, GM-CSF), inducido principalmente por los

linfocitos CD4+ Th1 (Kaufmann, 1995; Clarke, 1997; Begara-McGorum *et al*., 1998; Valentin Weigard y Goethe, 1999; Lee *et al.*, 2001). Estas citoquinas activan a los macrófagos, haciendo que estos eliminen las micobacterias ingeridas provocando así la activación de otras células T con el fin de contener la infección (Flesch y Kaufmann, 1990; Huygen *et al.*, 1994; Stabel, 2000b).

Según el modelo de respuesta inmune asociado tradicionalmente a paratuberculosis, en las primeras fases de la infección predomina la respuesta celular con escaso nivel de anticuerpos (Chiodini *et al*., 1984a), siendo las células T CD4+, CD8+ las primeras en ofrecer protección frente a patógenos intracelulares (Kaufmann, 1991; Koo *et al*., 2004). Son estas células, junto a las γδ+ las que, según el estudio experimental en corderos realizado por Begara-McGorum *et al* (1998) se presentan en mayor proporción en intestino y nodúlos linfáticos asociados de animales en las fases iniciales de la paratuberculosis, unido a una menor presencia de linfocitos B en estas localizaciones. Coincidien estos resultados con los obtenidos en otro estudio llevado a cabo en la especie bovina (Weiss *et al.*, 2006). No obstante, las relaciones encontradas de estas células (relación T/B) en tejidos no se corresponden con las que se muestran en sangre periférica, de ahí la importancia de las valoraciones *in situ* (Begara-McGorum *et al*., 1998).

Además, se ha comprobado en otros estudios la menor expresión de moléculas MHCI y II en superficie de macrófagos y linfocitos de bovinos infectados con *Map* (Weiss *et al*., 2001, 2006) y de cabras con infección subclínica, en este caso mediante técnicas inmunohistoquímicas (Valheim *et al*., 2004). Parece ser que la infección de macrófagos por *Map* inhibe la expresión en su superficie de moléculas de ambos MHC y evita que la presencia de TNF- α en el lugar de la infección estimule la expresión de MHC. Esto provocaría la deficiencia en la presentación de antígenos y por tanto, una incorrecta activación de la respuesta inmune adaptativa específica. De hecho, la débil expresión de MHC también se ha relacionado con una tendencia a reducir la producción de IFN-γpor parte de los CD4+, lo cual va seguido de una inadecuada activación de macrófagos (Boehm *et al*., 1997), lo que provocaría la supervivencia y replicación de las micobacterias.

Varios grupos de investigación han señalado las diferencias de expresión de citoquinas proinflamatorias entre animales infectados y controles. Así, Lee *et al*., (2001) evindenciaron mediante hibridación *in situ*, mayor expresión de las citoquinas IFN-γ, IL-1α, IL-1β e IL-6 en secciones de íleon de vacas infectadas frente a animales sanos. Con la técnica de PCR cuantitativa a tiempo real, Coussens *et al*., (2004) observaron este mismo patrón de expresión de estas citoquinas y de la IL-8 en la misma localización en vacas infectadas subclínica y clínicamente por *Map* frente a los animales controles no infectados.

Indudablemente, el IFN-γ parece ser la citoquina más crítica en el control de las infecciones micobacterianas, según indican diferentes estudios en los que se observa mayor expresión de esta citoquina en animales con enfermedad subclínica que en aquellos con enfermedad clínica o no infectados (Sweeney *et al*., 1998; Stabel, 2000b; Storset *et al*., 2001; Vesosky *et al*., 2004; Stabel, 2006; Begg *et al*., 2009). De hecho, la valoración de su producción en sangre periférica en respuesta a antígenos de *Map* se ha convertido en un método de diagnóstico utilizado para detectar animales infectados subclínicamente (Stabel, 1996; Pérez *et al*., 1999; Gwozdz, 2000b). Además, esta citoquina Th1 es crucial para la diferenciación de las células que intervienen en este tipo de respuesta, así como en la inducción de la activación de los macrófagos (Stabel, 2000a, 2006). Por lo tanto, la producción de citoquinas implicadas en su secreción tales como IL-12 también es de vital importancia para el control de infecciones micobacterianas. De hecho, en un estudio llevado a cabo en ratones con *M. tuberculosis* se comprobó tanto *in vivo* como *in vitro* que la administración exógena de IL-12 daba lugar a una mayor resistencia a la infección tuberculosa al estimular la secreción de IFN-γ por las células TCD4+. En cambio, el bloqueo mediante anticuerpos anti-IL-12 dio origen a un mayor crecimiento micobacteriano debido a que la expresión de IFN-γ se vio reducida (Cooper *et al*., 1995, 1997). Además, recíprocamente, IFN-γ favorece inicialmente la secreción de IL-12 por parte de las CPA, ya que la secreción innata que se de IFN-γ que se produce cuando *Map* entra en el organismo hace que aumente la producción de IL-12 y esta, a su vez, favorece la diferenciación de linfocitos T CD4+ a células productoras de IFN-γespecíficas de antígeno (Cooper *et al*., 1997). Una vez que la enfermedad progresa y deja atrás la fase subclínica, los niveles de IFN-γdescenderían, tanto en sangre como en tejidos (Sweeney *et al*., 1998; Stabel, 1996, 2000b;).

Como se ha reseñado anteriormente, los antígenos micobacterianos inducen la síntesis y liberación de citoquinas proinflamatorias como TNF-α. Se ha comprobado que su producción estaría estimulada por la citoquina IL-18, como se ha demostrado en en macrófagos y células intestinales de ratones infectados con *M. tuberculosis* (Sugawara *et al*., 1999). La TNF-α formada por los linfocitos T y las CPA resulta indispensable en la fase subclínica ya que resulta esencial para la formación de granulomas (Munk y Emoto, 1995; Kaneko *et al*., 1999). Su función es la de secuestrar la infección conteniendo a la bacteria y evitar su diseminación a otras localizaciones (Saunders y Cooper, 2000). En la formación de granulomas colaboran la subpoblación de células T γδ (Tanaka *et al*., 2000; Wangoo *et al*., 2005; Palmer *et al*., 2007; Plattner *et al*., 2009). Además. TNF-α, junto a otras citoquinas como la IL-1β, IL-6 presenta propiedades proinflamatorias como la de estimular las células T (Alzuherri *et al*., 1996; Dinarello, 1996; Coussens, 2001). La citoquina IL-1 es esencial para la expansión clonal de las células T, mientras que la IL-6 está implicada en la producción de proteínas de fase aguda (Alzuherri *et al*., 1996; Dinarello, 1996).

En ocasiones, la destrucción de las micobacterias no es posible y quedan latentes en el tejido linfoide asociado al intestino, escapando a los mecanismos de inmunidad citados (Begara-McGorum *et al*., 1998; Sigudardórttir *et al.*, 1999). Igualmente, se ha comprobado que al exponer a células mononucleares de sangre periférica a la micobacteria, hay una supresión de la respuesta Th1 o proinflamatoria (Coussens *et al*., 2004). Entonces pueden darse dos situaciones, o bien que se produzca una depresión de la respuesta inmune celular, o una respuesta exagerada. En animales sin respuesta inmune eficaz, la progresión de las lesiones paratuberculosas está relacionada con una reducción en el número de moléculas de MHC-II y del GM-CSF, lo que produciría una deficiente presentación de antígenos por parte de los macrófagos (Alzuherri *et al*., 1997; Navarro *et al*., 1998; Cheville *et al*., 2001) así como con una proliferación de la población de células γδ, que inhiben la actividad de los linfocitos CD4+Th1, disminuyendo la liberación de citoquinas que activan los macrófagos (Chiodini y Davis, 1993). La respuesta exagerada, sin embargo estaría relacionada con un fenómeno de hipersensibilidad retardada tipo IV (Buergelt *et al.*, 1978; Litlle *et al.*, 1996; Clarke, 1997; Stabel, 2000) originando la multiplicación de las bacterias, un cambio progresivo de respuesta Th1 a Th2 y por lo tanto el desarrollo de la enfermedad.

Si bien para controlar la infección paratuberculosa inicial es necesaria la producción de citoquinas proinflamatorias, su secrección excesiva o demasiado prolongada resultaría perjudicial a nivel local debido a la probabilidad de causar daño tisular (Clarke, 1997; Stabel, 2006). Es por ello que la inmunidad de tipo Th2 desempeña un papel crucial al controlar las respuestas desmesuradas de tipo Th1, fundamentalmente mediante las citoquinas IL-4 e IL-10. Ambas citoquinas presentan un efecto inmunosupresor frente a IFN-γ. La IL-4 lo hace de forma directa (Peleman *et al*., 1989) mientras que la IL-10 tiene función inmunosupresora sobre IFN-γde forma indirecta, por inhibir el gen IP-10, esencial para su secreción (Ito *et al*., 1999). De esta manera, al estar inhibido el IFN-γ por estas citoquinas Th2, los nuevos macrófagos en el lugar de la infección se vuelven incapaces de contener la invasión de los bacilos, por lo que sería la propia alteración de la respuesta inmune del hospedador la que sería perjudicial, permitiendo la propagación de las micobacterias en fases avanzadas. Esta inhibición de una inmunidad mediada por céluas Th1 y el cambio a una inmunidad mediada por células Th2 se relaciona con la etapa clínica de la paratuberculosis y con una diferenciación de los linfocitos B para producir anticuerpos, y por tanto, con una inmunidad de tipo humoral (Stabel 2000a, 2006) que se expone más adelante.

Para reducir el daño tisular señalado anteriormente, causado por un exceso de citoquinas proinflamatorias a nivel local, el hospedador contaría además con una subpoblación de células T con funciones inmunosupresoras denominadas células *T reguladoras* (Treg). Estas células expresan los marcadores de superficie CD4+ y CD25+, además del factor de transcripción “forkead box P3” (FoxP3) (Hori *et al*., 2003). Las células CD4+ que tras la exposición a antígenos se diferencian a Treg pueden secretar IL-10 y llamarse por ello células Tr1, o secretarTGF-β y pasar a denominarse células Th3. (Beissert *et al*., 2006). Diferentes estudios basados en estas células sugieren que, en fases subclínicas de la infección, la población de Treg aumentaría en respuesta a *Map*, de tal forma que inhibirían la respuesta inmune de la mucosa, lo que llevaría a un estado de latencia, o bien a la progresión de la enfermedad (Stabel, 2006; Weiss *et al*., 2006; Sohal *et al*., 2008). Así, Weiss *et al*., 2006 lograron aislar una mayor cantidad de células CD4+CD25+ (21%) de leucocitos mononucleares de la lámina propia del íleon de vacas infectadas subclínicamente que de animales utilizados como control no infectado (6%). Además, los linfocitos del íleon de las vacas infectadas no proliferaron en respuesta a productos obtenidos por el sonicado de *Map*, o

lo hicieron muy levemente, en respuesta a mitógenos de células T y B (Weiss *et al*., 2006). De la misma manera, en esta ocasión utilizando la tinción inmunohistoquímica y la técnica de PCR a tiempo real, De Almeida *et al*., (2008) observaron la presencia de una mayor población de linfocitos expresando FoxP3, y una mayor expresión del gen FoxP3, respectivamente, en íleon de vacas con infección subclínica en comparación con vacas sanas o con paratuberculosis clínica Sin embargo, no está claro el mecanismo acción de las Treg en la patogenia de la paratuberculosis (De Almeida *et al*., 2008).

Un tercer tipo de células T CD4+, relacionadas con la infección paratuberculosa pero independiente de la Th1 y Th2, son las denominadas células Th17. Se trata de un tipo de linfocitos que participan en la inmunidad protectora del hospedador frente a patógenos intracelulares, aunque con menor eficacia que las Th1 (Curtis y Way, 2009). En infecciones de micobacterias es la IL-23 la citoquina que controla tanto la respuesta de las células Th17 como la producción de la citoquina proinflamatoria IL-17. Tanto la IL-23 como la IL-17, en colaboración con IFN-γ, TNF-α y la IL-12, presentan un importante papel en la patogenia de la tuberculosis gracias a que inducen y mantienen una respuesta protectora (Khader y Cooper, 2008). En otro estudio realizado por Babu *et al*., (2010) sobre esta enfermedad micobacteriana, se valoró la función de diferentes poblaciones de células T en pacientes con tuberculosis latente (positivos a la prueba intradérmica de la tuberculina), encontrando una menor expresión de IL-17 e IL-23 en comparación con individuos negativos a dicha prueba. No obstante, esta menor expresión se relacionó con la mayor expresión del gen FoxP3, asociado a un aumento de células Treg. Igualmente, cuando se producía una depleción de estas células CD4+CD25+, se revertía la inhibición de células Th17 en estos pacientes con tuberculosis latente. A la luz de estos hallazgos, se puso de manifiesto, por un lado el papel inmunosupresor de las Treg sobre las respuestas Th17, y por otro lado que la latencia en la tuberculosis se relacionaría con una menor expresión de citoquinas mediadas por las células Th17. Esta población celular también ha sido implicada en la enfermedad de Crohn, tras haberse aislado células T reactivas a *Map* y secretoras de IL-17 e IFN-γ en pacientes con la inflamación intestinal característica de esta enfermedad (Olsen *et al*., 2009). No obstante, el papel de estas citoquinas en las diferentes formas inmunopatológicas de la paratuberculosis no ha sido establecido aún.

II.3.3.2.2 Respuesta inmunitaria humoral

Al igual que lo descrito en tuberculosis (Welsh *et al.*, 2005), salvo excepciones, la progresión hacia formas graves de la paratuberculosis se relaciona con un predominio de reacciones inmunes humorales, en animales con lesiones difusas de tipo multibacilar que presentan signos clínicos y excretan bacilos en las heces (Clarke, 1997; Pérez *et al*., 1997; Corpa, 1999; García-Marín *et al*., 2000; Storset *et al*., 2001; González, 2003). Es en esta fase clínica de la enfermedad cuando se produciría el cambio de respuesta inmune Th1 a Th2 señalado anteriormente, con la correspondiente inhibición de la secreción de citoquinas de tipo 1 y la consecuente respuesta de tipo 2 (Stabel., 2000a y 2006).

Los linfocitos CD4+ Th2 producen, entre otras, las citoquinas IL-4 e IL-10, las cuales suprimen la respuesta Th1 promoviendo la proliferación de linfocitos B y la producción de anticuerpos. Este tipo de inmunidad, al contrario que la celular, es muy limitada en la eliminación de *Map*, que en estas condiciones se multiplica sin gran dificultad (Boros, 1992; Alzuherri *et al*., 1997; Begara-McGorum *et al*, 1998). Por ello, la presencia de anticuerpos frente a *Map* no parece resultar en la protección de los animales infectados (Stabel, 2000a; Sohal *et al*., 2008). Una vez activadas, las células Th2 estimulan la diferenciación de los linfocitos B para que produzcan anticuerpos IgM y fundamentalmente IgG1, específicos frente a los antígenos de *Map* (Sohal *et al*., 2008). A su vez, las células B estarían implicadas en la activación de las células CD4+ (Stabel y Khalifeh, 2008). Sin embargo, este subtipo celular ha sido poco estudiado en comparación con las células T.

Khalifeh y Stabel (2004a) demostraron que la expresión de IL-10 y de "transforming growth factor beta" (TGF-β) era mayor en íleon y nódulos linfáticos asociados de vacas que manifestaban un estado más avanzado de la enfermedad, con lesiones multifocales y elevado número de micobacterias, comparado con vacas sanas o en fase iniciales de la enfermedad. De la misma forma, Tanaka *et al*., 2005, constataron una mayor expresión de IL-4, IL-10 e IL-2 en lesiones multibacilares frente a las paucibacilares en nódulos linfáticos ileales de vacas infectadas por *Map*. Igualmente, Rook, 2007 evidención que la IL-13 (citoquina de tipo Th2), junto con la IL-4, son capaces de inhibir las respuestas de tipo Th1 al inducir una inadecuada vía alternativa

de activación de los macrófagos. El TGF-β, citoquina con efectos inmunomoduladores en la paratuberculosis, presenta la capacidad de inhibir los receptores del IFN-γy MHC-II, de bloquear la activación macrofágica, además de favorecer la secreción de IL-10 y de suprimir la secreción de IL-2 (Maeda *et al*., 1995; Letterio y Roberts, 1998). Khalifeh y Stabel (2004b) observaron que al añadir esta citoquina a cultivos de PBMC de vacas con infección por *Map* se producía una reducción significativa en la secreción de IFN-γ. Consecuentes con estos resultados, fueron los hallados por Muñoz *et al*., (2009a) al comprobar *in situ*, en íleon, placas de peyer yeyunales y nódulos linfáticos asociados de bovinos y ovinos infectados natural y experimentalmente, una intensa inmunotinción frente a TGF-β en los macrófagos y células gigantes repletos de *Map* en los animales con lesiones difusas multibacilares y negativos al test del IFN-γ, mientras que la tinción inmunohistoquímica era escasa o nula en aquellas lesiones focales, multifocales o difusas paucibacilares, con escasos bacilos pertenecientes a animales positivos a dicho test. Estos resultados indican que la secreción de esta citoquina se asociaría con la incapacidad de los macrófagos de contener la diseminación de *Map*, probablemente como consecuencia de la inhibición de IFN-γ (Muñoz *et al*., 2009a).

El momento en el que se inicia la producción de anticuerpos tras la exposición a *Map* parece depender de la vía y la dosis de infección, produciéndose de forma más temprana si la dosis empleada es elevada (Waters *et al.*, 2003). Así, puede que la respuesta humoral se ha adelante incluso a la celular, como se ha descrito anteriormente. La administración de dosis elevadas de bacilos por vía intratonsilar en terneros indujo anticuerpos a los 134 días post infección (dpi), 60 días antes de encontrarse repuesta celular en estos animales (Waters *et al.*, 2003). En estudios experimentales con corderos, se observa que los títulos de anticuerpos comienzan a elevarse a los 80 (Juste *et al.*, 1994) o 110 dpi (Delgado *et al*., 2012, 2013) mientras que en otros estudios los picos de producción de anticuerpos son detectados a los 9 meses post-infección previo a la observación de signos clínicos (Begg *et al.*, 2005). En la especie caprina, hay estudios que han cifrado esta respuesta a los 180 dpi (Munjal *et al*, 2005). No obstante, estos resultados dependen del antígeno de *Map* utilizado para detectar los anticuerpos así como del isotipo del anticuerpo empleado (Koets *et al*., 2001; Bannantine *et al*., 2008).

En cualquier caso, la respuesta inmune humoral parece ser el tipo de respuesta predominante al producirse la depleción de las células proinflamatorias, clasificándose

en este momento la enfermedad como clínica y terminal (Coussens, 2004). Así se han detectado mayor cantidad de células B en las PBMC de vacas con infección natural de paratuberculosis que presentaban signos clínicos frente a aquellas sanas o subclínicas (Waters *et al*., 1999; Stabel y Khalifeh, 2008). Este predominio de la respuesta humoral se repite en multitud de ensayos llevados a cabo en las diferentes especies, y cuando la infección se ha producido tanto de forma natural como de modo experimental. (Pérez *et al*., 1997; Burrells *et al*., 1998; Storset *et al*., 2001; Begg *et al*., 2009). Sin embargo Waters *et al*., (1999) pudieron comprobar que los linfocitos B aislados de vacas con signos clínicos proliferaban en respuesta a concanavalina A (ConA, que induce división celular en los linfocitos T), mientras que no lo hacían al ser estimulados con varios antígenos de *Map*. Por el contrario, la respuesta proliferativa de las células B fue más elevada en aquellas vacas con infección subclínica. Por ello, una de las hipótesis propuestas para explicar la progresión de la infección hacia lesiones crónicas junto con la pérdida de capacidad para controlar la multiplicación de los bacilos, implicarían por un lado la alteración del fenotipo de los linfocitos B, y por otro la inhibición de su capacidad proliferativa en respuesta a los antígenos de *Map* en las fases avanzadas de la paratuberculosis (Waters *et al*., 1999; Stabel y Khalifeh, 2008).

II.4. CUADRO CLÍNICO Y LESIONAL

II.4.1. Cuadro clínico

La aparición de signos clínicos de la enfermedad en animales jóvenes es rara; cuando esto ocurre suele tratarse de rebaños con alta tasa de infección y malas prácticas de manejo (Chiodini *et al*., 1984a). Lo más habitual es que la aparición de evidencias clínicas se produzca entre los 2 y los 5 años de edad, durante la primera o segunda lactación en ganado bovino (Chiodini *et al*., 1984a; Stabel, 1998; Pérez *et al*., 2000; Brown *et al*., 2007; Radostits *et al*., 2007), aunque los animales pueden excretar micobacterias a partir de los 11 meses de edad (Kalis *et al*., 1999b).

La paratuberculosis subclínica, aunque no en todos los casos, es seguida de la paratuberculosis clínica (Sherman, 1985; Rebhun, 1995; Pérez *et al.*, 2000), generalmente desencadenada tras un episodio de estrés, que puede ser provocado por nutrición deficiente, lactación, parasitosis, alimentación en pastos secos y deficientes en minerales, o tras el parto (Allen *et al*., 1968; Chiodini *et al.*, 1984a; Pérez *et al*., 2000; Brown *et al*., 2007; Radostits *et al*., 2007). Se ha descrito que por cada vaca con síntomas clínicos de paratuberculosis, existen entre 10 y 25 infectadas que no muestran síntomas (Whitlock y Buergelt, 1996). Se calcula que la manifestación clínica de la enfermedad representa tan solo un porcentaje que oscila entre el 5 y el 10% y que puede llegar a ser del 50% del total de animales infectados (Sherman, 1985; Van Kruiningen, 1995; Whitlock, 1999).

El signo más característico de esta enfermedad es la pérdida crónica de peso (McEwen, 1939; Taylor, 1945; Stamp y Watt, 1954, Jakob y Schieger, 1969; Aller *et al*., 1973; Newsholme y Pletcher, 1981; Seaman y Thomson, 1984; Chiodini *et al*., 1984a; Gilmour y Angus, 1991; García Marín *et al.*, 1994; Pavlik *et al*., 2000). En este sentido y en un estudio reciente llevado a cabo en 2 mataderos del País Vasco se ha comprobado que la pérdidas de peso en las canales de vacas frisonas variaban entre un 3,7%, en aquellas identificadas por lesiones microscópicas hasta un 12,4% en las que fueron positivas al test ELISA, detectándose, a su vez, las mayores pérdidas en los animales con elevadas cargas micobacterianas en tejidos (22,2%) y que presentaban lesiones difusas

en el estudio histológico (26%) (Vázquez *et al*., 2012). En los casos avanzados y asociados a la caquexia suele aparecer edema submandibular, que incluso lo hace de forma intermitente meses antes de la aparición de cualquier otro signo clínico (Dunkin, 1934; Smyth y Christie, 1950), al igual que una atrofia de las masas musculares glúteas y femorales (Dunkin, 1934). Igualmente, estos signos pueden acompañarse de una bajada en la producción láctea (Goodger *et al.*, 1996; Stabel, 1998; Losinger, 2005) la cual se cifra entre el 4 y el 14%, según la fase de lactación en la que se encuentre el animal (Benedictus *et al*., 1985; Nordlund *et al*., 1996; Wilson *et al*., 1997), y en 4 litros de leche diarios al comparar con vacas no infectadas (Smith *et al*., 2009) e incluso con infertilidad y mayor predisposición a mamitis (Merkal *et al*., 1975a; Wilson *et al*., 1997; Corpa *et al*., 1998; Valentin-Weigand y Goethe, 1999) Otros signos de esta enfermedad son el mal estado del pelo o la lana y el empalidecimiento de mucosas (Beherns, 1955; Badiola *et al*., 1979). Los bovinos con paratuberculosis clínica muestran diarrea crónica o intermitente, la cual puede desaparecer, generalmente durante la gestación y volver a aparecer tras esta, coincidiendo con las demandas productivas después del parto (Blood *et al*., 1989). En estos casos se trata de heces diarreicas homogéneas, no hemorrágicas y no mucosas (Merkal *et al*., 1970; Buergelt *et al.*, 1978b). La duración de la fase clínica de la enfermedad puede ser de semanas o meses, y en su fase final los animales pierden el apetito, la diarrea puede ser sanguinolenta, y el adelgazamiento extremo con atrofia muscular, edema ventral, deshidratación, debilidad y muerte (Juste *et al*., 1983; Chiodini *et al*., 1984a; Sherman, 1985; Corpa *et al*., 1998; Pérez *et al*., 2000). Algunos animales pueden recuperarse o, al menos, mejorar transitoriamente, pero el cuadro clínico retorna, por lo general, en la siguiente lactación (Pérez *et al*., 2000). Así la mortalidad anual de un rebaño oscilaría entre el 3 y el 10% de los animales adultos (Chiodini *et al*., 1984a; Sherman, 1985). Se ha señalado que la muerte de los bovinos seropositivos y con lesiones difusas se adelanta cerca de un año, en comparación con los animales no infectados (Vázquez *et al*., 2002).

En el caso del ganado ovino y caprino, el curso de la enfermedad clínica es más rápido que en el ganado bovino (Chiodini *et al*., 1984a). Es característico el adelgazamiento crónico, y al igual que en el bovino, los signos clínicos suelen aparecer tras episodios de estrés como es el parto (Chiodini *et al*., 1984a; García Marín *et al.*, 1994; Radostits *et al*., 2007). Sin embargo, la diarrea en estas especies no es constante; se ha apuntado que aparece tan sólo en el 18% de los animales (Kumar, 1984). En

ocasiones, únicamente se observa un ligero reblandecimiento de las heces (Stamp y Watt, 1954; Carrigan y Seaman, 1990; García Marín *et al*., 1994; Clarke y Little, 1996; Brown *et al*., 2007; Radostits *et al*., 2007). Además los animales pueden presentar depresión, disnea, mal estado y pérdida de lana (Radostits *et al*., 2007).

II.4.2. Cuadro lesional

II.4.2.1. Lesiones macroscópicas

Además de las alteraciones visibles externamente, y ya reseñadas en el apartado de signos clínicos (caquexia, edemas subcutáneo en zonas declives, y ascitis), las alteraciones macroscópicas más evidentes en la necropsia de un animal con esta enfermedad se localizan en el intestino delgado y nódulos linfáticos asociados al mismo (Chiodini *et al*., 1984a; Pérez *et al*., 2000; Brown *et al*., 2007). Con frecuencia se encuentra también atrofia muscular, edemas en los tejidos subcutáneos de las zonas más declives, destacando el edema submandibular. También es habitual observar la efusión de líquidos serosos en diferentes cavidades corporales en forma de ascitis o hidropericardias. En los casos más avanzados se ha descrito la atrofia serosa de los depósitos grasos, fundamentalmente la atrofia de la grasa de los surcos coronarios y pelvis renal, sustituyéndose ésta por depósitos de tejido de aspecto gelatinoso (Rajya y Singh, 1961; Pérez *et al*., 2000).

En cuanto a las lesiones intestinales, que pueden ser difusas o afectar a tramos concretos de intestino (Chiodini *et al*., 1984a; Carrigan y Seaman, 1990), lo más destacable es el engrosamiento y aspecto edematoso de la pared del intestino delgado, principalmente en tramos de íleon, valvula ileocecal y yeyuno distal (González *et al*., 2005), dando al intestino la apariencia de “tubo de goma” (Pérez *et al*., 2000). El intestino grueso, en concreto el ciego y primeros tramos de colon, también puede verse afectado macroscópicamente de forma similar. No obstante, en casos avanzados, las lesiones pueden extenderse de forma difusa desde el duodeno hasta el recto (Chiodini *et al*., 1984a; Radostits *et al*., 2007).

En los casos avanzados de la enfermedad, a la apertura del intestino por su unión al mesenterio, la mucosa presenta un aspecto tumefacto y edematoso, con gruesos pliegues que recuerdan a las circunvoluciones cerebrales, que no desaparecen a la tracción. El ápice de estos pliegues, en ocasiones, aparece congestivo, e incluso con pequeñas úlceras, y el resto de la pared intestinal de aspecto blanquecino (Hutyra y Marek, 1930; Buergelt *et al.*, 1978; Badiola *et al.*, 1979; Juste *et al.*, 1983; Chiodini *et al.*, 1984a; Carrigan y Seaman, 1990; Corpa *et al.*, 1998; Pérez *et al.*, 2000; Brown *et al.*, 2007). Este engrosamiento no suele ser tan evidente en el caso de los pequeños rumiantes, en los que no siempre aparace (García Marín *et al.*, 1994; Corpa, 1995; Brown *et al.*, 2007) por lo que resulta muy fácil pasarlo por alto en la necropsia si el examen no es cuidadoso (Stamp y Watt, 1954; García-Marín *et al.*, 1994; Brown *et al.*, 2007). En la especie caprina se ha señalado que es frecuente observar un engrosamiento del yeyuno más prominente que del íleon, incluso en animales con signos clínicos evidentes de la enfermedad (Corpa *et al.* 2000a). Además, en el ganado ovino puede aparecer un color amarillento en la mucosa, lo que sería debido a la infección por cepas pigmentadas de *Map* (Taylor, 1945, 1951a, 1953b; Stamp y Watt, 1954; Benazzi *et al.*, 1996; Clarke y Little., 1996a; Stevenson *et al.*, 2002; Brown *et al.*, 2007).

Otra de las lesiones características, especialmente frecuente en pequeños rumiantes, es la linfangiectasia. En ocasiones, incluso es el único cambio macroscópico apreciable que sirve para el diagnóstico presuntivo de paratuberculosis (Brown *et al.*, 2007). Los vasos linfáticos de la pared intestinal presentan un recorrido tortuoso y se observan como un cordón blanquecino incluso semitransparente, discurriendo por la serosa intestinal o incluso por el mesenterio en los casos de caquexia extrema (Buergelt *et al.*, 1978; Badiola *et al.*, 1979; García-Marín *et al.*, 1994; Pérez *et al.*, 2000; Kurade *et al.*, 2004; Brown *et al.*, 2007). En ganado caprino, concretamente, pueden aparecer calcificados (Badiola *et al.*, 1979; Corpa *et al.*, 2000a). En esta especie, en ocasiones, no hay evidencias de lesiones en la necropsia y sin embargo, se observan graves lesiones histológicas (Fodstad y Gunnarson, 1979; Corpa *et al.*, 2000a). En ganado bovino no es tan frecuente observar linfangiectasia ysuele presentarse de forma más focal y menos aparente (Buergelt *et al.*, 1978; Juste *et al.*, 1983; Pérez *et al.*, 2000; González *et al.*, 2005; Brown *et al.*, 2007).

En cuanto a los nódulos linfáticos mesnetéricos, lo que más llama la atención es su tumefacción y aspecto edematoso. A la sección, no se diferencia claramente la zona

cortical de la medular, y habitualmente esta última zona aparece aumentada de tamaño y de color marrón-verdoso (Paliwal y Rajya, 1982; Buergelt *et al*., 1978; Chiodini *et al*., 1984a; Carrigan y Seaman, 1990; Corpa *et al.*, 1998; Brown *et al*., 2007). En ganado caprino es frecuente encontrar fenómenos de necrosis por caseificación y calcificación (Clarke, 1997; Corpa *et al.*, 2000a), menos frecuente en ovino (Pérez *et al*., 2000) e inexistentes en ganado bovino (Buergelt *et al*., 1978; Chiodini *et al*., 1984a). También, aunque menos frecuentemente, esta alteración se obseva en la mucosa, submucosa, serosa o vasos linfáticos de cabras afectadas (Rajya y Singh, 1961; García-Marín *et al*., 1994; Clarke, 1997; Tafti y Rashidi, 2000; Valheim *et al*., 2002b).

En bovino, y en los casos más graves, se han encontrado fibrosis y calcificaciones distróficas en las paredes de las arterias aorta y mesentérica, así como en endocardio (Buergelt *et al*., 1978; Chiodini *et al*., 1984a; Corpa *et al.*, 1998; González *et al*., 2005).

Cabe señalar que en ocaciones la magnitud de los signos clínicos no se corresponde con las lesiones encontradas al hacer la necropsia, sobre todo cuando se trata de pequeños rumiantes. Así, se pueden encontrar lesiones macroscópicas mínimas en animales que sin embargo presentaban signos clínicos graves o viceversa (Clarke y Little, 1996; Clarke, 1997; Brady *et al*., 2008; Radostits *et al*., 2007). Por otro lado, en animales que se encuentran en la fase subclínica de la infección, no se suelen apreciar cambios evidentes en el intestino o nódulos linfáticos asociados; sin embargo, algunos individuos pueden mostrar un leve engrosamiento de la pared intestinal o tumefacción de los nódulos linfáticos mesentéricos, muy difícil de detectar en la necropsia si se carece de experiencia previa (Pérez *et al*., 2000).

II.4.2.2. Lesiones microscópicas

Desde el punto de vista microscópico, la infección por *Map* se caracteriza por provocar una enteritis granulomatosa en la que se observa un engrosamiento de la mucosa intestinal, debido al desarrollo de un infiltrado inflamatorio formado por macrófagos y células epitelioides, junto con células gigantes y linfocitos, en la lámina propia (Pérez *et al.*, 2000; Brown *et al*., 2007).

Tal y como se señala posteriormente, en los animales infectados por *Map* se ha encontrado una amplia variabilidad lesional, con diferencias en cuanto a gravedad y características lesionales, asociadas en ocasiones al estado clínico del animal. En los animales infectados subclínicamente las lesiones son de tipo focal, formadas por pequeños granulomas bien delimitados en el espacio interfolicular del tejido linfoide de las placas de Peyer o en la lámina propia, sin alterar gravemente su morfología (Payne y Rankin, 1961a y b; Nisbet *et al.*, 1962; Gilmour *et al.*, 1965a; Kluge *et al.*, 1968; Larsen *et al.*, 1975a; Reddy *et al.*, 1984, Van Kruiningen *et al.*, 1986; Cardigan y Seaman, 1990; Juste *et al.*, 1994 Pérez *et al*., 1996; Sigurdardóttir *et al*, 1999; García Marín *et al*., 2000; Valheim *et al*., 2002b; Kurade *et al*., 2004; Verna *et al*., 2007; Reyes 2007; Delgado *et al*., 2013; Fernández *et al*., 2014a) pero a medida que progresa la infección, el infiltrado inflamatorio se va haciendo más extenso y progresa hacia amplias áreas de la mucosa (Stamp y Watt, 1954; Buergelt *et al*., 1978; Pérez *et al*., 1996; García-Marín *et al*., 2000; Valheim *et al*., 2002b), de forma en los casos avanzados de la enfermedad se observa un engrosamiento marcado de la mucosa intestinal, debido a la existencia de un infiltrado de células epitelioides, caracterizadas por poseer un amplio citoplasma y núcleo esférico y claro, que se extiende por toda la lámina propia y provoca el acortamiento y unión de las vellosidades así como la dilatación y oclusión de criptas de la mucosa intestinal con presencia de abundante material necrótico y células inflamatorias en su interior (Stamp y Watt, 1954; Rayja y Singh, 1961; Buergelt *et al*., 1978; Badiola *et al*., 1979; Reddy *et al*., 1984; Huchzermeyer y Bastianello, 1992; Pérez *et al*., 1996; Corpa *et al*., 2000a). Entre estas células pueden aparecer linfocitos, en número variable, según el tipo lesional (Pérez *et al*., 1996; González *et al*., 2005), células gigantes tipo Langhans, células plasmáticas y eosinófilos (Buergelt *et al.*, 1978; Badiola *et al*., 1979; Juste *et al*., 1983; Chiodini *et al.*, 1984; Pérez *et al*., 2000; González *et al*., 2005; Brown *et al*., 2007). En algunos casos, los infiltrados se encontrarían también en submucosa, túnicas musculares y serosa (Corpa *et al*., 1998; Pérez *et al*., 2000; Brown *et al*., 2007). En ovinos, además, los nervios ileales de la submucosa se pueden encontrar rodeados de agregados inflamatorios mononucleares (Gwozdz *et al*., 2001). La presencia de células gigantes es un hallazgo frecuente en la especie bovina. Se trata de células de tipo Langhans con un número variable de núcleos, en las que pueden aparecer BAAR en cantidad variable (Buergelt *et al*., 1978; Chiodini *et al*., 1984; Pérez *et al*., 2000; González *et al*., 2005; Brown *et al*., 2007). En el caso de

los ovinos esta alteración no es tan frecuente y se asocia sobre todo a lesiones de tipo paucibacilar (Clark y Little, 1996; Pérez *et al.*, 1996). Los bacilos son fácilmente detectables en lesiones multibacilares, en el citoplasma de macrófagos y células gigantes mediante la tinción de Ziehl-Neelsen (ZN) o bien, más específicamente, mediante técnicas inmunohistoquímicas (Clarke, 1997; Pérez *et al*., 2000; González *et al*., 2005; Brown *et al*., 2007; Kheirandish *et al*., 2008). No obstante, en algunos animales que presentan clínica y lesiones macroscópicas, las alteraciones observadas al microscopio son diferentes a las descritas recientemente y se caracterizan por una enteritis difusa con escasas células epitelioides o gigantes y con la lámina propia infiltrada predominantemente por linfocitos, junto con células plasmáticas. Además, en estos casos, la presencia de BAAR en el citoplasma de células epitelioides y gigantes es poco frecuente, lo que dificulta el diagnóstico de esta enfermedad (Chiodini *et al*., 1984a; Carrigan y Seaman, 1990; Pérez *et al*., 1996; Brown *et al*., 2007).

En cualquier caso, estas alteraciones aparecen en intestino delgado, especialmente en la unión de este con el ciego, en el íleon y en el yeyuno (Buergelt *et al*., 1978; Carrigan y Seaman, 1990; Corpa *et al*., 1998; Pérez *et al*., 2000; Brady *et al*., 2008) pudiendo extenderse en ocasiones a diferentes tramos de intestino grueso, sobre todo ciego y colon, siendo menos frecuente la afectación histológica de duodeno y recto (Buergelt *et al*., 1978; Carrigan y Seaman, 1990; García Marín *et al*., 1994).

La linfangiectasia observada macroscópicamente, en el estudio histológico se acompaña de una linfangitis. El infiltrado que rodea los vasos linfáticos está formado por linfocitos, células plasmáticas y, en menor medida por células epitelioides (Pérez *et al*., 1996; Corpa *et al*., 2000a; Brown *et al*., 2007). En casos avanzados, este infiltrado puede hacer prominencia sobre la pared del vaso pudiendo llegar a romperla (Badiola *et al*., 1979; Cuervo y González, 1987) y se pueden formar granulomas en la pared, que penetran hacia la luz y acaban ocluyéndola, desarrollándose entonces endolinfangitis trombóticas, donde se pueden detectar algunos BAAR (Seaman *et al*., 1981; Carrigan y Seaman, 1990; García-Marín *et al*., 1994; González,1998; Pérez *et al*., 2000; Brown *et al*., 2007).

En pequeños rumiantes sobre todo en las cabras, no es raro encontrar necrosis caseosa y calcificación en la mucosa, submucosa y serosa del intestino, así como en vasos y nódulos linfáticos (Levi, 1948; Stamp y Watt, 1954; Nakamatsu *et al.*, 1968;

Tontis y Köning, 1978; Fodstad y Gunnarson, 1979; Corpa et al. 2000). En estudios experimentales en la especie ovina, utilizando diferentes cepas de *Map,* se ha sugerido que el tipo de cepa influiría en la aparición de zonas de necrosis caseosa; en concreto esta lesión se observaría en corderos infectados con cepas de origen bovino (Verna *et al*., 2007; Fernández *et al*., 2014a). La presencia de esta alteración en el ganado bovino es muy infrecuente (Buergelt *et al*., 1978; Chiodini *et al*., 1984a; Clarke, 1997; Corpa *et al*., 2000a; Valheim *et al*., 2002b; Brown *et al*., 2007). En especies silvestres como ciervos, también en no pocas ocaciones se encuentran focos de mineralización y necrosis en los granulomas de los nódulos linfáticos mesentéricos (Clarke, 1997; Clark *et al*., 2010). En algunos casos, su detección puede ocasionar cierta confusión al tratarse de una alteración similar a una lesión tuberculosa o a la causada por otras subespecies de *M. avium* (Brown *et al*., 2007).

Los nódulos linfáticos mesentéricos presentan una linfadenitis granulomatosa caracterizada por la presencia de agrupaciones de macrófagos e incluso células gigantes, tanto en la cortical, en senos subcapsulares y peritrabeculares, como en la medular (Stamp y Watt, 1954; Buergelt *et al.*, 1978; Badiola *et al.*, 1979; Chiodini *et al*., 1984; Cuervo y González, 1987; Pérez *et al.*, 1996). En infecciones avanzadas, estas células macrofágicas se van acumulando y forman agregados extendiéndose de forma difusa por toda la cortical e infiltrando la medular de tal manera que se altera la estructura normal del nódulo (Rajya y Singh, 1961; Buergelt *et al*., 1978; Chiodini *et al*., 1984a; VanKruiningen *et al*., 1986; González *et al*., 2005; Brown *et al*., 2007).

II.4.2.3. Lesiones extraintestinales

Además de la degeneración, fibrosis y calcificación de la capa íntima y media de las arterias aorta torácica y mesentérica y endocardio descritas en bovino (Simpson, 1966; Majeed y Goudswaard, 1971; Buergelt *et al*., 1978; Paliwal y Rajya, 1982; Chiodini *et al*., 1984a; Van Kruiningen, 1995; Chiodini *et al*., 1984a; Blood *et al.*, 1989; Corpa *et al*., 1998; González *et al*., 2005; Brown *et al*., 2007), en todas las especies de rumiantes se ha descrito la presencia de de granulomas distribuidos de forma multifocal en hígado, sólo visibles microscópicamente, en el caso de animales con graves lesiones intestinales (Mathews, 1930; Nakamatsu *et al*., 1968; Buergelt *et al.*, 1978; Tontis y

Köning, 1978; Chiodini *et al*., 1984a; Carrigan y Seaman, 1990; Pérez *et al.*, 1996; Coetsier *et al.*, 1998; Corpa *et al*., 1998; Brumbaugh *et al*., 2000; González *et al*., 2005 Brown *et al*., 2007). Dichos granulomas se localizan en el intersticio hepático y en ocasiones pueden detectarse BAAR en ellos (Harding, 1957; Buergelt *et al.*, 1978; Cardigan y Seaman, 1990). Igualmente, se han descrito granulomas focales en riñones, pulmones y nódulos linfáticos regionales, siempre en casos clínicos avanzados de la enfermedad (Harding, 1957; Hines *et al.*, 1987; Clarke y Little, 1996), en los que también se ha encontrado, de forma ocasional, edema y fibrosis de los glomérulos renales y engrosamiento de la cápsula glomerular así como el depósito de sustancia amiloide en esta localización principalmente, pero también en capilares de glándula mamaria, nódulos linfáticos y glándulas adrenales. (Nakamatsu *et al*., 1968; Paliwal y Rajya, 1982) De forma menos frecuente, se han descrito lesiones granulomatosas en bazo, timo y nódulos linfáticos hepáticos (Nakamatsu *et al*., 1968).

II.4.2.4. Clasificaciones lesionales

La gran variabilidad lesional observada en los animales infectados por *Map* ha motivado la realización de varias clasificaciones atendiendo a diversos criterios, en las diferentes especies de rumiantes. Además, se han relacionado los diferentes tipos lesionales descritos con las fases de la enfermedad, la patogenia de la infección o la respuesta inmune del animal, y se ha estudiado su relación con diferentes pruebas de dignóstico (Bendixen, 1978; Buergelt *et al.*, 1978; Chiodini *et al*., 1984a; Young *et al*., 1990; Chiodini, 1996; Pérez *et al*., 1996, 1997, 1999; Stabel, 1996; Bassey y Collins, 1997; Clarke, 1997; Burrells *et al*., 1998; Coetsier *et al*., 1998; Corpa, 1999; Brumbaugh *et al*., 2000 García-Marín *et al*., 2000; Stabel, 2000a; Coussens, 2001; Storset *et al*., 2001; Koets *et al*., 2002; González, 2003, Kurade *et al*., 2004; González *et al*., 2005; Kurade y Tripathi, 2008; Begg *et al*., 2009).

Muchas de las clasificaciones realizadas han relacionado las lesiones asociadas a la paratuberculosis con el denominado “espectro inmunopatológico de las micobacteriosis”, propuesto para la lepra humana (Ridley y Jopling, 1962, 1966; Ridley, 1983) y posteriormente extendido a otras micobacteriosis (Chiodini *et al*., 1984a; Paliwal *et al*., 1985; Young *et al*., 1990) y descrito en el correspondiente apartado. Este

espectro, relaciona las lesiones microscópicas y la clínica observadas en la lepra con la respuesta inmune del hospedador, de forma que se definen cinco grupos según estos criterios: *tuberculoide, borderline-tuberculoide, borderline, borderline-lepromatoso* y *lepromatoso.* Las formas tuberculoides estarían asociadas a una elevada respuesta inmune celular, con lesiones caracterizadas por la presencia de pequeños granulomas formados por células epiteliodes rodeados de linfocitos y con escasa o nula presencia de micobacterias; las formas lepromatosas estarían asociadas a una elevada respuesta inmune humoral con lesiones caracterizadas por la presencia de gran cantidad de macrófagos ocupados por gran cantidad de micobacterias. Entre estos dos tipo se encontrarían los tipos borderline o formas intermedias que se suelen relacionar con cuadros clínicos graves.

II.4.2.4.1. Clasificación lesional en la especie bovina

Existen, en la especie bovina, ciertos aspectos particulares en las características histopatológicas de esta infección. Así, por ejemplo, y relacionado con la clínica de diarrea persistente en esta especie, se ha observado la presencia de leucocitos globulares rodeando los plexos nerviosos mesentéricos en el caso de bovinos con lesiones graves. En estos estadios avanzados de la enfermedad el íleon ha sido señalado como el tramo de intestino más gravemente afectado (Buergelt *et al*., 1978; Clarke, 1997; González *et al*., 2005). Sin embargo, a diferencia de los pequeños rumiantes, tal y como se describe más adelante, las lesiones focales se suelen encontrar más frecuentemente en los nódulos linfáticos mesentéricos (Payne y Rankin, 1961b; Larsen *et al*., 1975a; González *et al*., 2005). En concreto González *et al*. (2005) encontraron que en los aquellos animales que se encontraban en los periodos iniciales de la enfermedad las lesiones eran más frecuentemente halladas en los nódulos linfáticos ileales (aunque en los casos graves todos los nódulos mesentéricos estarían seriamente alterados).

Los estudios histopatológicos llevados a cabo para clasificar las lesiones en esta especie son más escasos que en los pequeños rumiantes domésticos. No obstante ya en 1978, Buergelt *et al* publicaron la primera clasificación relevante de paratuberculosis bovina. En ella, tras el estudio del intestino y nódulos linfáticos mesentéricos,

clasificaron en tres grupos las lesiones que observaron en 51 animales de desecho de dos rebaños con paratuberculosis.

Clase 1 o *lesiones leves*, cuando estas aparecían en forma de células gigantes aisladas, o escasas células epitelioides, en la lámina propia intestinal o en la zona paracortical de los nódulos linfáticos mesentéricos, con escasos BAAR.

Clase 2 o *lesiones moderadas*, que son descritas como pequeños grupos de macrófagos y/o células gigantes, en la lámina propia y submucosa intestinales así como en senos subcorticales y paracorticales de los nódulos linfáticos mesentéricos donde, cuando predominaban los macrófagos en la lesión, se observaban desde ninguno hasta un número moderado de BAAR.

Finalmente, las lesiones de *clase 3* o *lesiones avanzadas* en las que se observa un infiltrado formado por numerosos macrófagos y células gigantes que infiltran desde la mucosa hasta la serosa del intestino delgado, afectando incluso a los plexos nerviosos mientéricos y provocando la pérdida de la estructura histológica normal del intestino ya que dicho infiltrado provoca un acortamiento y engrosamiento de las vellosidades, dilatación de criptas con presencia de material purulento en su interior, así como una dilatación y rotura de capilares linfáticos de las vellosidades. Lesiones de igual intensidad se observan en los nódulos linfáticos mesentéricos. En este caso, la presencia de BAAR resistentes es más notable.

En 2005 se publica la última clasificación histopatológica realizada en esta especie, que se lleva a cabo valorando de forma exhaustiva de los diferentes tramos intestinales así como de los nódulos linfáticos asociados de 116 animales con infección natural de paratuberculosis, tanto clínica como subclínica (González *et al*., 2005). Para llevar a cabo esta clasificación se siguieron los criterios utilizados previamente por García Marín *et al*. (1992c) y por Pérez *et al*. (1996) para ganado ovino, como son, presencia de lesiones granulomatosas características de paratuberculosis; localización, intensidad y extensión de estas en las diferentes estructuras de la pared intestinal y nódulos linfáticos asociados; tipos celulares predominantes en el infiltrado inflamatorio así como la cantidad de BAAR. Así se establecen 3 tipos de lesiones: *focales, multifocales y difusas* y dentro de estas últimas, a su vez, los subtipos *multibacilar, linfocítico* e *intermedio*.

Lesiones focales: Se caracterizan por la presencia de granulomas pequeños y bien delimitados formados por 5-30 macrófagos con citoplasma abundante, pálido y espumoso y con núcleo de cromatina poco densa, así como con alguna célula gigante, tanto formando parte del granuloma como en localizaciones aisladas. Estas lesiones se ubican exclusivamente en el tejido linfoide, principalmente en nódulos linfáticos (ileal y yeyunal caudal). En algunos casos, se podía encontrar algún linfocito entre los macrófagos del granuloma. No se detectó necrosis. La presencia de BAAR era nula o escasa y se evidenciaba mejor por técnicas inmunohistoquímicas frente a la micobacteria que con la técnica de ZN.

Lesiones multifocales: Además de las alteraciones observadas en tejido linfoide, semejantes a las descritas en el tipo anterior, en este tipo se observan pequeños granulomas en la lámina propia de la mucosa intestinal, formados por un pequeño número de macrófagos bien delimitados y rodeados por escasos linfocitos y células plasmáticas. En ocasiones, también se observan células gigantes tanto aisladas en la lámina propia como formando parte de los granulomas que cuando aparecen lo hacen en mayor número que en las lesiones focales. Estas alteraciones se observan en el ápice de la vellosidad y aunque provocan un cierto engrosamiento de la mucosa intestinal, no modifican significativamente su arquitectura. La imagen típica es encontrar una vellosidad normal adyacente a otras alteradas. La presencia de micobacterias es moderada. En los nódulos linfáticos los granulomas eran similares a los descritos para las lesiones focales, pero aparecían en mayor número. Las lesiones multifocales, al igual que las formas focales, se observan en animales con infección subclínica.

Lesiones difusas: Se caracterizan por una enteritis granulomatosa grave cuyo infiltrado inflamatorio se localizaba en las diferentes capas del intestino provocando un acentuado engrosamiento de la pared.

Los animales con este tipo de lesión fueron divididos en tres subtipos diferentes en función del tipo celular predominante en el infiltrado inflamatorio y de la cantidad de BAAR que aparecían en las lesiones.

- *Difusa multibacilar*: Las células predominantes son los macrófagos y células epitelioides, junto con escasos linfocitos y células gigantes, que infiltran la pared intestinal de forma difusa. En la lámina propia el infiltrado adopta el aspecto de un mosaico y causa un engrosamiento severo de la pared intestinal. Las vellosidades aparecen frecuentemente fusionadas debido al infiltrado, y en general la parte más basal de la lámina propia aparece menos afectada. Las

glándulas intestinales se encuentran dilatadas, con presencia de material necrótico en su interior. En el citoplasma de los macrófagos y células epiteliodes se observan numerosos BAAR, detectados tanto mediante la técnica de ZN como mediante la inmunotinción frente a *Map*. Es frecuente que los vasos quilíferos de las vellosidades estén dilatados y con presencia de macrófagos con BAAR en su interior. La submucosa también se encuentra gravemente afectada en la mayoría de los animales debido a la presencia de un infiltrado semejante al descrito, siendo frecuente también la existencia de edema en esta capa, y en ocasiones vasculitis granulomatosas, con formación de trombos. En este tipo de lesión, el tejido linfoide se encuentra afectado en todos los casos con granulomas en zonas interfoliculares o, más frecuentemente, con un intenso infiltrado que invade los folículos linfoides. En la capa muscular se observan infiltrados inflamatorios mononucleares, y en la serosa infiltrados multifocales granulomatosos, generalmente asociados a los vasos linfáticos dando lugar a linfangitis de diversa intensidad, con formación de trombos. Estas lesiones aparecen desde el yeyuno proximal hasta la válvula ileocecal, con ocasional afectación del ciego. No se observaba necrosis en ningún caso. En cuanto a los nódulos linfáticos, especialmente el yeyunal e ileal, presentan una linfadenitis granulomatosa difusa, con macrófagos y células gigantes, en número moderado o elevado, en las zonas cortical y paracortical, ocasionando una grave alteración de la arquitectura normal de este órgano y afectando también a los vasos linfáticos aferentes. En este tipo de lesión tanto los macrófagos como las células gigantes del intestino y nódulos linfáticos contenían un gran número de BAAR, siendo también siempre positivoss a la técnica inmunohistoquímica frente a *Map* pero con intensidad variable.

- *Difusa linfocítica*: En este caso, la célula inflamatoria predominante es el linfocito que infiltra la lámina propia intestinal. Entre los linfocitos aparecen algunos macrófagos y células gigantes, inmunoteñidos intensamente frente a lisozima. En ocasiones, se pueden observar granulomas bien definidos. En todos los casos se altera la arquitectura normal de la mucosa intestinal, de forma que se observa el acortamiento y engrosamiento de las vellosidades intestinales, debido a que aparecen intensos infitrados inflamaotrios. La submucosa se encuentra menos alterada que en el caso del tipo difuso

multibacilar, presentando pequeños granulomas o células gigantes individuales, siempre rodeados por linfocitos. En el tejido linfoide, las lesiones granulomatosas se encuentran en las zonas interfoliculares de las placas de Peyer. La serosa presenta moderada infiltración granulomatosa. Al igual que ocurría en el caso del tipo difuso multibacilar, las alteraciones aparecen en intestino delgado sin afectar a duodeno, ciego, colon o recto. En los nódulos linfáticos aparece una linfadenitis granulomatosa difusa, principalmente en el ileal y yeyunal, con numerosas células gigantes, localizadas mayoritariamente en la zona cortical. Los BAAR aparecen en bajo número, observándose sólo en una minoría de los granulomas o células gigantes.

- *Difusa intermedia*: El infiltrado inflamatorio, que ocasiona el engrosamiento de las vellosidades y la separación de las glándulas inestinales, está formado por linfocitos y macrófagos, junto con algunas células gigantes, sin que exista un predominio claro de uno u otro tipo celular. La célula predominante varía entre animales e incluso en diferentes tramos del mismo animal. La submucosa siempre presenta una severa afectación con edema e infiltrado monocuclear rodeando a los granulomas, y normalmente alrededor de los vasos que presentan trombos. En el caso de animales en los que predomina el infiltrado de linfocitos en lámina propia, es frecuente encontrar un infiltrado de células mononucleares rodeando a las células nerviosas ganglionares del plexo submucoso. El tejido linfoide también presenta granulomas. Las lesiones se observan principalmente en yeyuno e íleon, aunque en algún animal el ciego también se encontraba afectado. Las lesiones en nódulos linfáticos son similares a las descritas en los otros tipos difusos. En todos los casos fue detectada la presencia de micobacterias que siempre estaba relacionada con el número de macrófagos.

González *et al*. (2005) relacionan las lesiones encontradas en la especie bovina con las previamente descritas en la ovina (Pérez *et al.*, 1996), de manera que las lesiones focales se corresponderían con las denominadas como “tipo 1” en ovejas, las multifocales con las de “tipo 2 y 3a”, las difusas multibacilares y linfocíticas con las de “tipo 3b y 3c” respectivamente. Así mismo, las formas focales y multifocales se corresponderían con las que Buergelt *et al.*, (1978) denominan “leves” y “moderadas”, también en la especie bovina, y las lesiones de “tipo difuso” con las lesiones

"avanzadas" descritas por estos últimos autores. Las lesiones difusas linfocíticas no habían sido descritas previamente en esta especie.

En cuanto al espectro inmunopatológico de las micobacteriosis, González *et al.*, (2005) señalan que las lesiones focales se situarían en extremo tuberculoide, las difusas multibacilares podrían representar las formas *borderline* lepromatosas y las difusas linfocíticas serían formas *borderline* tuberculoides; las difusas intermedias se encontrarían entre ambos tipos y las lesiones multifocales estaría relacionadas con formas iniciales de cualquier lesión difusa o de tipo *borderline*.

II. 4.2.4.2. Clasificación lesional en la especie ovina

La especie ovina es donde más clasificaciones de lesiones de paratuberculosis se han llevado a cabo; de hecho, la primera clasificación fue realizada en esta especie por Stamp y Watt (1954), basada en el estudio de 51 animales clínicamente afectados de paratuberculosis, en la que catalogan las lesiones en cuatro grupos:

Lesiones del grupo 1: en el que observan un engrosamiento notable de la mucosa intestinal del íleon y yeyuno distal, producido por cepas pigmentadas que dan lugar a una coloración amarillenta del intestino, y cuyas lesiones histológicas se caracterizan por la presencia en la mucosa, e incluso submucosa, de gran cantidad de células epitelioides cargadas de BAAR. Igualmente, los nódulos linfáticos mesentéricos presentan los senos subcapsulares y medulares repletos de células epitelioides.

Lesiones del grupo 2: el engrosamiento producido en la mucosa intestinal es menos pronunciado y sin pigmentación amarillenta. Histológicamente se observan infiltrados de células epitelioides que en algunos tramos son tan graves que provocan la atrofia de las criptas de Lieberkühn, llegando en otros tramos a presentar una imagen histológica normal. Las acumulaciones de células epitelioides están rodeadas de linfocitos. La serosa se encuentra infiltrada por células epitelioides, con necrosis, y fibrosis. Los vasos linfáticos presentan lesiones caracterizadas por el infiltrado de células epitelioides, con necrosis casesosa y fibrosis. En los nódulos linfáticos se observan células epitelioides y alguna célula gigante en los senos subcapsulares. La presencia de micobacterias era menor que en el grupo 1, no detectándose incluso en algunos focos de células epitelioides.

Lesiones del grupo 3: no presentan cambios macroscópicos en el intestino, aunque si se observa algún foco blanquecino en el parénquima de los nódulos linfáticos. Histológicamente, aparecen grupos de células epitelioides de tamaño variable y células gigantes, en la mucosa y submucosa intestinal, con pocos BAAR. El número de células gigantes es elevado. Tanto en la submucosa como en los nódulos linfáticos la lesión es de carácter similar, con presencia de focos de necrosis en ambas localizaciones. En este tipo de lesión el número de BAAR era nulo o muy bajo.

Lesiones del grupo 4: macroscópicamente se apreciaban linfangiectasias en los vasos linfáticos intestinales y la mucosa intestinal aparece engrosada y con focos de necrosis que también se observan en los nódulos linfáticos mesentéricos. Histológicamente se trata de lesiones tuberculoides circunscritas, multifocales, formadas por células epitelioides y células gigantes con áreas centrales de necrosis y calcificación, tanto en la mucosa intestinal como en los vasos linfáticos de la serosa o en los nódulos linfáticos. No se observó la presencia de micobacterias en ningún animal con este tipo de lesión.

Posteriormente, Rajya y Singh (1961), trabajando con 19 ovinos positivos a la tuberculina, clasificaron los animales en tres grupos basándose en los signos clínicos y la condición corporal:

El *grupo I*, formado por animales extremadamente débiles y emaciados, presentaba, macroscópicamente, desde congestión de placas de Peyer hasta engrosamiento notable de la mucosa intestinal, con nódulos linfáticos aumentados de tamaño. Histológicamente se observaba una inflamación granulomatosa que afectaba a todas las capas intestinales, excepto a la muscular. El infiltrado inflamatorio estaba formado principalmente por macrófagos, células epitelioides y células gigantes con abundantes bacilos y variaba, desde agregados focales rodeados por linfocitos, hasta un infiltrado difuso. En los nódulos linfáticos se observaba una infiltración de los senos subcapsulares, corticales y medulares por macrófagos cargados de BAAR, células epitelioides y células gigantes. En algún caso aparecían focos de necrosis en los nódulos linfáticos.

El *grupo II*, de animales débiles pero no emaciados, en la necropsia no presentaban un engrosamiento claro de la pared intestinal. Histológicamente mostraban un infiltrado inflamatorio localizado principalmente en la mucosa ileal y formado principalmente por células plasmáticas así como por macrófagos, linfocitos y

eosinófilos, con agregados focales de células epitelioides en las vellosidades y células gigantes en algunas secciones. El numero de BAAR, excepto en un animal del grupo, era escaso. Los nódulos linfáticos presentaban infiltrados de macrófagos y células plasmáticas en la cápsula y corteza, así como una acumulación moderada de macrófagos en los centros germinales.

El *grupo III* estaba constituido por animales aparentemente sanos, sin alteraciones significativas asociadas a paratuberculosis en la necropsia. Histológicamente, presentaban un infiltrado en la mucosa ileal formado por linfocitos con alguna célula plasmática, eosinófilos y agregados focales de macrófagos, sin BAAR. En los nódulos linfáticos la lesión consistía en una infiltración de macrófagos en los centros germinales.

Posteriormente se llevó a cabo otra clasificación lesional en esta especie por Reddy *et al*. (1984) en la que se clasifica a las lesiones en *leves, moderadas* o *graves* teniendo en cuenta su extensión. Las lesiones graves se caracterizaban por la presencia de un infiltrado difuso, formado por células epitelioides con algún linfocito y células plasmáticas.

Carrigan y Seaman (1990), en un estudio llevado a cabo con 60 animales con clínica de paratuberculosis, distinguen las lesiones en dos tipos en base al grado de atrofia de las vellosidades, el tipo de infiltrado celular y la presencia de bacilos. Así uno de los tipos lo conformarían aquellas lesiones caracterizadas por un predominio de células epitelioides infiltrando la mucosa y submucosa, con abundantes BAAR en su citoplasma, y el otro, las alteraciones histopatológicas en las que se apreciaba un infiltrado de linfocitos, junto con la presencia de una cantidad moderada de células epitelioides y escasos BAAR.

Posteriormente se llevó a cabo otra clasificación en las especie ovina y caprina por García Marín *et al*. (1992c) con la diferencia que en esta ocasión no se basaba en animales que presentaran signos clínicos o positivos a pruebas diagnósticas de paratuberculosis como en los trabajos citados anteriormente, sino que en este caso, estudiaron animales desechados por diversos motivos, de rebaños en los que existía la enfermedad. Las lesiones fueron divididas en tres tipos:

El *tipo I* correspondía a las lesiones focales, subclínicas, caracterizadas por la presencia de pequeños granulomas, formados por macrófagos y linfocitos, en el espacio interfolicular de la placa de Peyer ileocecal; sin la presencia de BAAR en el citoplasma de estas células.

Lesiones de *tipo II,* constituídas por el mismo tipo de granulomas que además se extendían a la lámina propia de la mucosa adyacente a la placa de Peyer.

Al *tipo III* pertenecían lesiones de carácter difuso y grave por toda la mucosa, con la presencia de abunatantes BAAR.

Autores del mismo grupo (Pérez *et al*., 1996), completan la clasificación anterior, realizando un trabajo más exhaustivo en la especie ovina. Para ello estudiaron 166 animales con o sin clínica asociada a paratuberculosis, procedentes de rebaños con esta enfermedad. Para llevar a cabo esta clasificación se tuvieron en cuenta los criterios ya señalados en la clasificación realizada por González *et al.* (2005) en la especie bovina. Las lesiones se catalogaron en tres tipos principales, y el tercero de ellos se dividió en tres subtipos.

Lesiones de tipo 1: Se trata de lesiones que no se aprecian macroscópicamente y subclínicas. Histológicamente, se observan granulomas, positivos a la tinción inmunohistoquímica frente a lisozina, formados por macrófagos entre los que aparece algún linfocito. Se localizan exclusivamente en el tejido linfoide, en las placas de Peyer intestinales y ocasionalmente en los nódulos linfáticos regionales, más frecuentemente en el mesentérico caudal que en los ileocecales. En este tipo de lesión no se observan BAAR.

Lesiones de tipo 2: Se trata de lesiones de mayor gravedad que las de tipo 1 en las placas de Peyer, pero que tampoco producen alteraciones macroscópicas. Los granulomas se disponen en hilera desde la parte más basal de la zona interfolicular hasta penetrar en la lámina propia adyacente. Son granulomas bien delimitados, de forma redondeada que nunca se encuentran en número suficiente para provocar una enteritis difusa. Se observan tanto en la zona basal de la lámina propia como en las vellosidades, pero siempre en zonas adyacentes al tejido linfoide, donde se encuentran también granulomas. En los nódulos linfáticos los granulomas eran similares a los descritos en las lesiones de tipo 1, pero aparecen de forma menos frecuente que en las placas de Peyer y siempre de menos tamaño que estos. No se observan BAAR en los nódulos

linfáticos, y sólo en escasas ocasiones en la mucosa. En algunos casos *Map* fueron detectadas mediante cultivo.

Lesiones de tipo 3: Se dividen a su vez en tres subtipos lesionales que tienen como característica común la presentación de lesiones tanto en las placas de Peyer como en la mucosa, asociada o no a la placa de Peyer, así como el aislamiento de *Map* mediante cultivo en todos los casos. Estos tres subtipos son:

- *Tipo 3a:* Algunos animales con este tipo de lesión presentan lesiones macroscópicas, consistentes en un leve engrosamiento de los vasos linfáticos de la serosa de algunos tramos de íleon. Histológicamente, se observan granulomas en la mucosa intestinal relacionada o no con la placa de Peyer del íleon y a veces de yeyuno. Se trata de granulomas bien delimitados, distribuidos de forma multifocal, en la lámina propia, tanto en la parte basal como en las vellosidades y entre las criptas de Liberkünhn, y aunque son de mayor tamaño y se presentan en mayor número de vellosidades que en el tipo 2, no alteran excesivamente la estructura normal de las vellosidades. En la submucosa y serosa pueden aparecer infiltrados focales de linfocitos y macrófagos alrededor de los vasos linfáticos y sanguíneos. Igualmente, en el nódulo linfático yeyunal caudal, y con menor frecuencia en los ileocecales, aparecen lesiones granulomatosas similares a las descritas. En este tipo de lesión aparecen BAAR en las lesiones de la mucosa, y en menor número en las relacionadas con tejido linfoide.
- *Tipo 3b:* Este tipo de lesión lo presentan animales emaciados que en algunos casos, muestran edema en la región intermandibular y en otros casos, diarrea. Se observa el engrosamiento de la pared intesinal, con presencia de pliegues en algunas áreas de íleon y de yeyuno, y linfangiectasias en la serosa. Los nódulos linfáticos mesentéricos e ileocecales aparecen aumentados de tamaño y con la superfice de corte edematosa. Microscópicamente se caracteriza por ser una enteritis granulomatosa difusa en yeyuno, íleon y válvula ileocecal, formada por grupos de células epitelioides que dan la apariencia de mosaico a la mucosa intestinal. En las placas de Peyer se encuentran lesiones granulomatosas tanto en las áreas interfoliculares como en los folículos y cúpulas, provocando un marcado cambio en su estructura normal. En la mucosa, tanto la relacionada como la que no lo está con las placas de Peyer, se observa un infiltrado difuso de macrófagos, entre los que se ven algunos linfocitos y células gigantes de

pequeño tamaño, que altera la morfología de las vellosidades, que se encuentran notablemente engrosadas. En la submucosa, son frecuentes los infiltrados de linfocitos y células plasmáticas que pueden llegar hasta la capa muscular. Los vasos linfáticos están dilatados y presentan una linfangitis granulomatosa trombótica, que también se observa en la serosa, junto con agregados de linfocitos y células plasmáticas alrededor de los vasos sanguíneos. En los nódulos linfáticos mesentéricos e ileocecales aparece una linfadenitis granulomatosa, de multifocal a difusa, con pérdida de su estructura normal. Aparecen abundantes BAAR, demostrados tanto por métodos inmunohistoquímicos como por ZN, en menor número en los granulomas del tejido linfoide que en la mucosa.

- *Tipo 3c:* Los animales con este tipo de lesión presentan alteraciones macroscópicas similares a las de tipo 3b. Histológicamente, presentan una enteritis granulomatosa difusa, pero en este caso las células predominantes en la lesión de la mucosa intestinal son los linfocitos, entre los que se observan macrófagos formando pequeños granulomas bien delimitados siendo, en algunos animales, notable la presencia de células gigantes de Laghans con un gran número de núcleos. En las placas de Peyer se observaron lesiones similares a las descritas en el tipo 3b, pero con un mayor número de macrófagos picnóticos y con células gigantes en el interior del granuloma. La submucosa presenta edema frecuentemente, junto a un variable número de linfocitos y células plasmáticas dispuestas en grupos. En la serosa, la lesión es similar a la descrita en el tipo 3b. En los nódulos linfáticos se aprecian granulomas con distribución multifocal, principalmente en la región paracortical y en las áreas interfoliculares, con gran cantidad de células gigantes con un número elevado de núcleos. En los granulomas se obsevan pequeños focos necróticos con o sin calcificación. En la serosa de los nódulos linfáticos se apreciaban macrófagos picnóticos e infiltrados perivasculares. La cantidad de micobacterias era escasa o nula.

En trabajos posteriores del mismo grupo, se denominaron a las lesiones de tipo 1 como *focales*, a las de tipo 2 y 3a como *multifocales*, las 3b como *difusas multibacilares* y las 3c como *difusas paubacilares* (García Marín *et al*., 1999a) para hacer una comparación con la clasificación propuesta por Clarke y Little (1996), que diferenciaba

las lesiones de animales clínicamente enfermos en formas *multibacilares o lepromatosas* y formas *paubacilares o tuberculoides*, según la cantidad de BAAR presentes en las lesiones, no contemplando las formas subclínicas o focales/multifocales.

Al igual que González *et al*. (2005) relacionó las lesiones en bovino con las de ovino y con el espectro inmunopatológico de las micobacteriosis, Pérez *et al*., (1996), hicieron lo mismo en su día. Las lesiones de tipo 1 y 2, asociadas al tejido linfoide, las englobaron en el extremo ***tuberculoide*** del espectro, las de tipo 3c en el ***intermedio-tuberculoide***, las de tipo 3b dentro del ***intermedio-lepromatoso***, y finalmente las de tipo 3a las consideraron como una forma inicial de las dos anteriores, no encontránsose formas lesionales que se puedan ubicar en el extremo *lepromatoso puro* de este espectro.

Años más tarde, Kurade *et al*., (2004) establecieron otra clasificación en ovinos infectados experimentalmente con *Map*, semejantea la propuesta por Pérez *et al*., (1996). En esta ocasión las lesiones se englogaban en 4 grados, relacionando las lesiones de *grado I* con las de tipo 1, las de *grado II* con las de tipo 2, las de *grado III* con las de de tipo 3a, pero también con las *paucibacilares* de Clarke y Little (1996), sugiriendo que, este grupo de lesiones constituirían una transición entre aquellas de tipo tuberculoide y las lepromatosas. Finalmente, compararon las lesiones de *grado IV* con las formas multibacilares ya descritas por varios autores en infecciones naturales (Rajya y Singh, 1961; Carrigan y Seaman, 1990; Clarke y Little, 1996).

Más recientemente, Kheirandish *et al*. (2008) hicieron un estudio histopatológico en 29 ovejas sospechosas de padecer paratuberculosis y clasificaron las lesiones de una forma muy similar a la propuesta por Pérez *et al*., (1996) y García-Marín *et al*., (1999a), añadiendo un nuevo grupo de lesiones difusas denominadas *intermedias* o *mixtas***,** caracterizadas por la presencia en la mucosa de un infiltrado mixto compuesto tanto por linfocitos, células plasmáticas como macrófagos epitelioides, compartiendo aspectos de las formas multibacilares y paucibacilares.

II.4.2.4.3. Clasificación lesional en la especie caprina

La primera clasificación de lesiones asociadas a paratuberculosis en cabras fue realizada por Paliwal y Rajya (1982) que en función de su gravedad, dividieron a los animales con lesiones paratuberculosas en cuatro grupos.

El *grupo 1*, formado por animales que tan sólo presentan hiperplasia de folículos linfoides en los nódulos linfáticos mesentéricos y que asocian con una infección reciente.

En el *grupo 2,* se incluyen los animales que presentan una proliferación de linfocitos, células plasmáticas y macrófagos con BAAR en los ápices de la lámina propia de las vellosidades, que asocian a estadios preclínicos. Los nódulos linfáticos muestran edema e infiltrados de macrófagos y células epitelioides en la región cortical y paracortical.

El *grupo 3,* de animales con síntomas clínicos, presenta un infiltrado de macrófagos con numerosos BAAR que distienden las vellosidades; en la placa de Peyer aparecen gran cantidad de granulomas con células gigantes que también se ven alrededor de los vasos linfáticos de la submucosa y la serosa. En los nódulos linfáticos se observa un infiltrado granulomatoso en la zona cortical, paracortical e incluso en la medular, con folículos hiperplásicos.

El *grupo 4*, de animales con enfermedad avanzada, presenta lesiones similares a las descritas pero de mayor gravedad y extensión.

Años más tarde se realizó una nueva clasificación en la que se dividieron las lesiones en tres grupos atendiendo a su extensión, tipo de células en el exudado y número de bacilos (Menchén, 1995):

El *tipo I* se caracteriza por la presencia de un ligero infiltrado constituido por linfocitos y macrófagos localizados en la placa de Peyer y algunas vellosidades del íleon, con escasos BAAR.

El *tipo II,* se divide en *IIA*, en el que se presenta un infiltrado difuso de células epitelioides, plasmáticas y linfocitos localizados en el vértice de las vellosidades sin producir cambios en su morfología y en *IIB,* de lesión similar, pero en el que además se observan nódulos de necrosis y calcificación. Ambos casos con abundantes bacterias.

El *tipo IIIA* presenta una enteritis granulomatosa difusa, con apariencia de mosaico formado por macrófagos y linfocitos en menor número, afectando a todas las

capas del intestino. Los nódulos linfáticos mostraban una lesión similar. En el *tipo IIIB*, la lesión era semejante, pero con la presencia de granulomas necróticos. El número de BAAR fue muy elevado en ambos tipos.

Años más tarde, García-Marín *et al*., (1992b) llevaron a cabo un estudio que se basó en el análisis de la válvula ileocecal, íleon y yeyuno de 42 cabras procedentes de 2 rebaños con paratuberculosis, proponiendo tres tipos de lesiones que coinciden con los tres sugeridos por los mismos autores en la especie ovina, descritos en el apartado anterior (García-Marín *et al*., 1992c). Las lesiones de *tipo I y II* fueron consideradas como formas latentes o subclínicas, mientras que las del *tipo III* se asociaron con formas clínicas de la enfermedad.

Posteriormente, Corpa *et al.* (2000a) completan la clasificación propuesta por García Marín *et al.* (1992c) utilizando los mismos criterios que Pérez *et al*. (1996) en ovino y llevando a cabo el estudio en animales adultos de cuatro rebaños. Los cuatro grupos establecidos coinciden en su mayoría con los grupos establecidos por Pérez *et al.* (1996):

El primero de ellos lo componen las *lesiones focales y multifocales*, caracterizadas por la presencia de granulomas localizados en la zona interfolicular del tejido linfoide ileocecal y esporádicamente en la lámina propia de la mucosa ileocecal adyacente a la placa de Peyer e ileal, así como en sus vellosidades. Estas alteraciones nunca eran lo suficientemente graves para modificar la arquitectura normal del intestino. Lesiones semejantes aparecen en las zonas cortical y paracortical de los nódulos linfáticos mesentéricos e ileocecales. En este tipo de lesión, los BAAR eran escasos, observándose en granulomas de la lámina propia.

Las *lesiones difusas multibacilares* se caracterizan por una enteritis granulomatosa difusa, formada por macrófagos, que es la célula principal de este tipo de lesión, distribuidos de forma difusa por las mucosa ileal y yeyunal. En la placa de Peyer los macrófagos se encuentran tanto formando parte de un granuloma bien delimitado como infiltrando difusamente el tejido linfoide, especialmente en las áreas interfoliculares. Entre los macrófagos pueden verse linfocitos y células gigantes de forma esporádica. En la submucosa y la serosa, son frecuentes los infiltrados de macrófagos y linfocitos, y los focos de necrosis, frecuentemente relacionados con los vasos linfáticos. Los nódulos linfáticos muestran una linfadenitis granulomatosa difusa

o multifocal, con la frecuente aparición de focos de necrosis de tamaño variable con calcificación, de forma más evidente en los mesentéricos que en los ileocecales. Los BAAR se demostraron tanto en intestino como en los nódulos linfáticos.

Las *lesiones difusas linfocíticas* se caracterizan por presentar una enteritis granulomatosa difusa en la que las células predominantes en el infiltrado inflamatorio son los linfocitos, que infiltran la lámina propia. Entre los linfocitos se observan macrófagos y algunas células gigantes. En otras capas del intestino, las lesiones eran similares a las descritas en el tipo anterior, con la frecuente aparición de focos de necrosis que podían verse tanto en la submucosa como en la serosa y nódulos linfáticos. Los BAAR están ausentes en la mayoría de las secciones y cuando aparecen, no lo hacen en un número elevado.

Finalmente, el grupo de *lesiones difusas mixtas*, en las que los animales presentan una enteritis granulomatosa caracterizada por un infiltrado con elevado número tanto de macrófagos como de linfocitos. Las lesiones en otras áreas son similares a las ya descritas. Las micobacterias, aunque escasas, son constantemente detectadas.

Las lesiones focales englobarían aquellas de tipo 1 y 2 de la clasificación ovina propuesta por Pérez *et al*., (1996). Las lesiones multibacilares, más frecuentemente encontradas, serían equivalentes a las 3b. Las linfocíticas se corresponderían a las 3c, y fueron más frecuentes que en el caso del estudio en ovinos. Finalmente, las formas mixtas serían similares a aquellas descritas en la clasificación de González *et al*., (2005) en paratuberculosis bovina.

Por último, Tafti y Rashidi (2000) propusieron otra clasificación, diferenciando las lesiones en *leves, moderadas* y *severas* basándose en su gravedad.

Además, clasificación de lesiones aparte, hay varios estudios que han valorado la diferente presencia de lesiones entre los diferentes tramos intestinales. Así, Valheim *et al*., (2002b), en una infección experimental de *Map* a cabras de 5 a 8 semanas de edad analizó la frecuencia de presentación de lesiones en la fase subclínica, encontrando que la mayoría de ellas se localizaban en relación al tejido linfoide de las placas de Peyer ileocecal (PPVIC) y yeyunal media (PPYm), atribuyendo la ausencia de lesiones en yeyuno distal e íleon proximal a la involución gradual que experimenta este tejido con la edad. La explicación la atribuyeron a la gran similitud morfológica que existiría entre

el tejido linfoide organizado de PPVIC y PPY en comparación con el del íleon, en cabras sanas de edad semejante (Valheim *et al*., 2002b). Otros estudios en esta especie también apuntaron que la presencia de lesiones focales se relacionaba con la válvula ileocecal, mientas que las lesiones mas graves se encontraban en tramos de yeyuno (Sigurdardóttir *et al*, 1999; Corpa *et al*., 2000a; Storset *et al*., 2001). No obtante, en otros estudios llevados a cabo tanto en caprino como en ovino, otros autores han encontrado las lesiones paratuberculosas de mayor gravedad en el íleon (Van Kruiningen *et al*., 1986; Carrigan y Seaman, 1990; García-Marín *et al*, 1992b; Clarke y Little, 1996; Clarke, 1997; Kurade *et al*., 2004).

De esta forma, y en pequeños rumiantes, las lesiones propias de la infección paratuberculosa comenzarían a aparecer y permanecerían de forma latente en las PPVIC y PPY, en las que el tejido linfoide persiste en los animales adultos, mientras que en fases más avanzadas de la enfermedad, los granulomas también aparecerían en los tramos de intestino desprovistos de dicho tejido, fundamentalmente el íleon (Nisbet *et al*., 1962; Van Kruiningen *et al*., 1986; García-Marín *et al*, 1992b; Juste *et al*., 1994; Pérez *et al*., 1996; Begara-McGorum *et al*., 1998; González, 1998; Sigurdardóttir *et al*, 1999; Valheim *et al*., 2002; Munjal *et al*., 2005).

II.4.2.4.4. Clasificación lesional en animales silvestres

Recientemente se ha realizado una clasificación de las lesiones asociadas a paratuberculosis en 95 gamos en Asturias (Balseiro *et al.*, 2008), en la que se han establecido tres grupos de lesiones en función de su localización, tipo de células en el infiltrado inflamatorio, la intensidad del mismo así como cantidad de micobacterias presentes en las lesiones.

Lesiones focales: Caracterizadas por la presencia de granulomas pequeños, bien delimitados formados por macrófagos, algún linfocito y células gigantes multinucleadas. Estas lesiones se localizaban de forma esporádica en las áreas interfoliculares del tejido linfoide intestinal y más frecuentemente en las regiones cortical y paracortical de los nódulos linfáticos mesentéricos e ileocecales. En ningún caso modificaban la estructura normal de los tejidos ni se observaban bacilos mediante

ZN, que sin embargo si se eran detectados mediante técnicas inmunohistoquímicas frete a *Map*.

Lesiones multifocales: En este tipo de lesiones los granulomas, además de en el tejido linfoide, se hallaban en la lámina propia. En las vellosidades están localizados en el ápice, causando su dilatación de forma focal, pero sin llegar a modificar la arquitectura normal del intestino. En los nódulos linfáticos se observaron granulomas en las áreas interfoliculares. Las micobacterias cuando se presentaban lo hacían en pequeño número.

Lesiones difusas: se trata de animales con una enteritis y linfadenitis granulomatosas graves. En este tipo de lesión se observaron alteraciones macroscópicas como son el engrosamiento de la pared intestinal y el aumento de tamaño de los nódulos linfáticos. Las lesiones difusas se dividieron en varios tipos, en función del tipo celular predominante y la cantidad de BAAR presentes en las lesiones:

- *Difusas multibacilares*: Histológicamente se caracterizaban por presentar un infiltrado de células epitelioides, linfocitos, y numerosas células gigantes. En la lámina propia, las vellosidades se encontraban fusionadas con frecuencia debido al infiltrado descrito, y las glándulas se encontraban ocasionalmente dilatadass con la presencia de detritus celulares en su interior. La submucosa se mostraba infiltrada por macrófagos y células plasmáticas. Las placas de Peyer presentaban un infiltrado granulomatoso intenso en los folículos linfoides o en las áreas interfoliculares. En la serosa, que estaba menos afectada, se observaron infiltrados granulomatosos multifocales asociados a los vasos linfáticos con la presencia de trombos. Estas alteraciones fueron encontradas desde el yeyuno proximal a la válvula ileocecal. Los nódulos linfáticos mostraron una linfadenitis granulomatosa difusa, con abundantes células gigantes que causaba una alteración significativa de su arquitectura normal. El número de micobacterias evidenciadas en las secciones examinadas, tanto de intestino como de nódulos linfáticos, fue elevado.
- *Difusas intermedias* (multibacilares-linfocíticas): En este caso, la enteritis granulomatosa que presentaban los animales estaba caracterizada por un infiltrado inflamatorio que provocaba la dilatación y acortamiento de las vellosidades de la lámina propia. El infiltrado estaba formado por un gran número tanto de macrófagos como de linfocitos, con la presencia de células gigantes aunque en menor número que en las difusas multibacilares. La

submucosa presentaba un infiltrado inflamatorio compuesto por células plasmáticas, macrófagos y linfocitos. En los nódulos linfáticos se observó una linfadenitis granulomatosa, sobre todo en los ileales y yeyunal proximal, con células gigantes predominantemente en la zona cortical. Los BAAR se observaron en menor número que en el caso de las lesiones difusas multibacilares.

En cuanto a la predisposición de localización de lesiones, los mismos autores a los que pertenece la propuesta de clasificación de las lesiones (Balseiro *et al*., 2008) analizaron la distribución y naturaleza de las lesiones causadas por *Map* en cérvidos encontrando que la mayoría de las lesiones latentes subclínicas se localizan fundamentalmente en los nódulos linfáticos mesentéricos antes que en el intestino. De la misma manera ocurrió en un estudio llevado a cabo en cérvidos por Clark *et al*. (2010). Así, el inicio de lesiones asociadas a la infección por *Map* en los animales silverstres se asemeja más a la propuesta para el ganado bovino que para los pequeños rumiantes.

II.4.3. Relación entre formas lesionales y respuesta inmunitaria

En otras enfermedades provocadas por micobacterias como la tuberculosis y lepra ha sido descrita la estrecha relación existente entre la respuesta inmune y las lesiones presentadas por el hospedador (Ridley y Jopling, 1962, 1966; Ridley, 1983; Yamamura *et al*., 1991; Orme *et al*., 1993). Tomando estas descripciones como modelo, se ha establecido el espectro inmunopatológico para la paratuberculosis por diversos autores (Bendixen, 1978; Chiodini *et al*., 1984a; Chiodini, 1996; Clarke, 1997; García-Marín *et al*., 2000). Así, las respuestas inmunes celular o de tipo Th1, con predominio de células CD4+ y secreción de IFN-γ, tienen lugar en las fases iniciales y subclínicas de la infección tras la exposición a *Map* y se asocian con lesiones focales y multifocales, denominadas *formas tuberculoides*. Cuando la infección progresa hacia fases clínicas algo más avanzadas, las lesiones que se observan avanzan simultaneamente dando lugar a las *formas intermedias*. En el caso de que la respuesta inmune no fuera capaz de detener la infección, las micobacterias pueden proliferar y la respuesta de tipo Th1 decaer, siendo sustituída por la respuesta humoral o de tipo Th2.

Esta respuesta se acompaña de una progresión lesional hacia formas difusas, llegando a provocar una enteritis crónica granulomatosa típica de las formas multibacilares, acompañadas de una elevada carga micobacteriana en el intestino. Corresponde en este caso a *formas intermedias lepromatosas*. Sin embargo, en el caso en que se mantenga una fuerte respuesta celular Th1 de manera prolongada e incontrolada, suficiente para contener la diseminación de *Map* pero demasiado excesiva, ésta resulta perjudicial para el hospedador y acaba causando las enteritis difusas linfocíticas o paucibacilares, con escasa presencia de bacilos, las dedominadas *formas intermedias tuberculoides* (Chiodini *et al*., 1984a; Clarke, 1997; García- Marín *et al*., 2000; Stabel, 2000a; Coussens, 2001).

No pocos han sido los estudios que confirman la relación de lesiones multibacilares con la disminución de la respuesta inmune celular junto con la seroconversión de los animales frente a *Map* tanto en infecciones naturales como experimentales en bovino (Stabel, 1996; Burrells *et al*., 1998; Koets *et al*., 2002; González, 2003), ovino (Pérez *et al*., 1997, 1999; Kurade *et al*., 2004; Kurade y Tripathi, 2008; Begg *et al*., 2009; Delgado *et al*., 2012) o caprino (Corpa, 1999; Storset *et al*., 2001). De la misma forma se ha comprobado que dentro de los animales afectados de paratuberculosis clínica aquellos con lesiones linfocíticas paucibacilares, las catalogadas como de tipo *intermedio tuberculoide,* presentaban una fuerte respuesta celular. Se trata de un tipo de respuesta celular desproporcionada, mediada por linfocitos CD4+ Th1, lo que algunos autores estiman como un fenómeno de hipersensibilidad retardada de tipo IV (Buergelt *et al*., 1978; Little *et al.,* 1996; Clarke, 1997). Aunque la presencia de linfocitos en estas lesiones es muy elevada, la expresión de CD8+ en estos casos es débil (Little *et al*., 1996). Se observa un aumento de células CD4+ y γδ (Little *et al*., 1996) y de TNF-α (Alzuherri *et al*., 1996). La respuesta inmune humoral sería escasa, al igual que la presencia de micobacterias, mientras que se observarían niveles elevados de citoquinas proinflamatorias tales como IFN-γ (Clarke, 1997; Pérez *et al*., 1999), producida principalmente por linfocitosCD4+ (Bassey y Collins, 1997). Aquellos animales con lesiones multibacilares, las catalogadas como de tipo *intermedio lepromatoso,* manifestarían una respuesta inmune humoral marcada (Burrells *et al*., 1998). En este tipo de lesiones se observa una disminución de células CD4+ y CD8+ y un aumento de las γδ. Respecto al otro lado del espectro, hay estudios que evidencian que durante las fases iniciales de la infección por *Map,* existe un

predominio de células CD4+ y una mayor respuesta linfoproliferativa en los animales infectados frente a los no infectados (Begara- McGorum *et al*., 1998; Munjal *et al*., 2005; Kurade y Tripathi, 2008; De Silva *et al*., 2010).

Las diferencias observadas en las distintas formas patológicas de la paratuberculosis confirman la influencia que ejercen las diferentes citoquinas sobre el transcurso de la infección, siendo las citoquinas de tipo 1 fundamentalmente relacionadas con las formas tuberculoides, y las de tipo 2 con las lepromatosas (Stabel, 2006). No obstante, la respuesta del hospedador frente a *Map* representa una mayor complejidad *in vivo,* ya que el paso de Th1 en fases tempranas a Th2 en fases avanzadas de la infección no se produce de forma brusca sino que, realmente, ambos subtipos se solapan en un momento dado de la infección (Stabel, 2006). Por otro lado, las respuestas inmunes mediadas por células T y B pueden suceder al mismo tiempo, o incluso en ocasiones la respuesta inmune humoral puede preceder la celular y producirse muy poco después de la inoculación por *Map* (Koets *et al*., 2001; Waters *et al*., 2003; Begg y Griffin, 2005; Bannantine *et al*., 2008; Begg *et al*., 2011; Vázquez *et al*., 2013; Fernández *et al*., 2014a), tal y como se ha enunciado anteriormente.

Por otro lado, empleando la técnica de la PCR cuantativa a tiempo real se ha podido valorar la variación de expresión de numerosas citoquinas tanto en sangre periférica como a nivel local en intestino y nódulos linfáticos asociados en las diferentes formas inmunopatológicas de paratuberculosis. Hay estudios basados en las dos formas del espectro, tuberculoides y lepromatosas, tanto en ovino como en vacuno (Tanaka *et al*., 2005; Rossi *et al*., 2009), y otros que han estudiado en la especie ovina un tercer tipo, al que se cataloga como infectado en base a los resultados de la PCR, cultivo y la presencia de anticuerpos anti-*Map*, pero sin presentar lesiones de paratuberculosis ni signos clínicos, denominado “asintomáticos” (Smeed *et al*., 2007; Gillan *et al*., 2010b). Así, Smeed *et al*. (2007) estudiaron el perfil de citoquinas en íleon de ovejas con estas tres formas de paratuberculosis. En este ensayo se puso en evidencia que el TNF-α estaba por encima de los valores normales, mientras que la IL-18 se expresó en menor cantidad, en los ovinos asintomáticos frente a los no infectados, poniendo en evidencia que los animales del grupo de animales sin lesiones pero infectados experimentan un cambio inmunológico. También detectaron una mayor expresión de IL-1β e IL-6 en animales con formas paucibacilares frente a los asintomáticos (Smeed *et al*., 2007).

Otros estudios empleando esta técnica reflejan elevadas expresiones de TGF-β, IL-10, IL-1β y TNF-α en lesiones lepromatosas de ovejas, en comparación con la mayor expresión de IFN-γe IL-12 en las tuberculoides (Rossi *et al*., 2009).

Un nuevo modelo de patogenia de enfermedades provocadas por *Map* ha sido propuesto por el grupo de investigadores españoles de Neiker, en Vizcaya. Se ha descrito tanto para la enfermedad inflamatoria intestina (IBD) (Juste, 2009b) como para paratuberculosis, en concreto la paratuberculosis bovina (Geijo, 2007). Teniendo en cuenta la presencia de *Map* en sangre y la respuesta inmune del hospedador, se establecen cuatro estadios inmunopatológicos (Geijo, 2007):

Formas apatogénicas: en las que se clasifican los individuos "sanos", caracterizadas por una respuesta inmune innata local relativamente baja comparada con la de los individuos que presentan clínica, con valores de IFN-γ_0 (niveles basales de IFN-γ en respuesta al PBS) similares entre sí. Dentro de estas se encuentran a su vez, las formas **bacteriémicas** (con presencia de ADN de *Map* en sangre) y **no bacteriémicas**. Ambos estadios desarrollarían una respuesta inmune adaptativa específica eficiente, siendo mayor la respuesta, tanto celular como humoral, de los individuos con bacteriemia. De esta forma, los individuos que presentan formas apatogénicas bacteriémicas poseerían capacidad para superar la infección, ya que gracias a la actuación de la respuesta inmune celular se evitaría la inflamación de los tejidos. Por tanto, según Geijo (2007), los animales en esta situacióntendrían una cierta resistencia natural a la paratuberculosis.

- **Formas patogénicas:** dentro de este espectro se clasifican los individuos que manifiestan signos clínicos y que presentan una respuesta inmune innata inespecífica elevada y muy similar, que parece ser la que provocaría el daño tisular, así como una respuesta adaptativa también alta, y en ambos casos alterada. Dentro de esta forma encontraríamos, atendiendo al mismo criterio que en el caso anterior, dos estadios: los individuos patogénicos **abacteriémicos**, y los patogénicos **bacteriémicos**. Los segundos presentan una respuesta celular específica mayor que los del grupo sin clínica pero inferior a la de los patogénicos abacteriémicos, lo que para Geijo (2007) podría indicar una incapacidad de estos animales para contener la infección a niveles paucibacilares, como en el caso de los abacteriémicos, permitiendo la liberación de micobacterias, que a su vez, actuarían como estímulo para la inmunidad de base humoral (la más alta de los cuatro estadios) con el consiguiente incremento en la

producción de anticuerpos. Además Geijo (2007) sugiere que este fenómeno podría corresponder al paso de una respuesta de tipo Th1 a Th2 basándose en las descripciones clásicas de la patogenia de la paratuberculosis descritas anteriormente.

Igualmente, tanto Geijo (2007) como Juste *et al*., (2009b) sugieren que los elevados niveles de IFN-γ basales observados en los individuos con enfermedad clínica, así como la inadecuada puesta en marcha de la respuesta inmune adaptativa podrían deberse a un bloqueo parcial en los receptores de esta citoquina, bien causado por la propia micobacteria o bien de origen genético.

II.5. MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO

El diagnóstico de la paratuberculosis resulta complicado, sobre todo cuando se trata de identificar de forma individual a los animales infectados, debido a varios factores como son el largo periodo de incubación de la enfermedad, y por tanto la presencia de un elevado número de animales subclínicos o portadores latentes para los que no existe ninguna prueba con buena sensibilidad y especificidad (Fernández *et al*., 1980: Chiodini *et al.*, 1984a; Kreeger, 1991; Hietala, 1992; Whitlock, 1998; Garrido *et al.*, 2000b). Por ello, se ha señalado que una única prueba resultaría insuficiente para el diagnóstico de la paratuberculosis, debiendo utilizarse varias pruebas complementarias para llegar a un diagnóstico definitivo (Goudswaard *et al.*, 1976; Thoen y Muscoplat, 1979; García Marín *et al*., 1994; Clarke *et al.*, 1996; Juste *et al.*, 2000b; Stabel y Whitlock, 2001; Aranaz *et al.*, 2006).

II.5.1. Diagnóstico clínico y epidemiológico

Los signos clínicos, aunque necesitan la complementación con datos epidemiológicos y otras pruebas laboratoriales, suelen ser muy orientativos hacia el diagnóstico de paratuberculosis, sobre todo en rebaños en los que ya se ha confirmado la presencia de la enfermedad (Merkal, 1973; Sherman, 1985; Juste y Aduriz, 1990a). Esto ocurre, sobre todo, si se observan animales de entre 2 y 4 años, que presentan adelgazamiento progresivo, diarrea intermitente, y muertes por goteo, signos más evidentes cuando se trata de hembras durante la gestación o tras el parto (McEwen, 1939; Crowther *et al*., 1976; Behrens, 1979; Chiodini *et al*., 1984a; Juste y Aduriz, 1990b; Aduriz *et al*., 1994; García Marín *et al*., 1994; Pavlik *et al*., 1999b; Garrido *et al*, **2000a**; Pérez *et al*., 2000). Hay veces que sin la presentación de signos clínicos característicos, se observan problemas de fertilidad y disminución de la producción láctea (Merkal *et al*., 1975a; Sherman, 1985; Pérez *et al*., 2000).

Se debe hacer un diagnóstico diferencial con otras enfermedades que cursan con adelgazamiento, como enfermedades hepáticas crónicas, los abscesos internos (Kimberling, 1988), carencia de oligoelementos (Radostits *et al*., 2007), gastroenteritis

parasitarias (Cardigan y Reaman, 1990), Maedi o adenomatosis pulmonar ovina, en el caso de esta especie (Blood y Radostits, 1989; Pérez *et al*., 1991) y otras enfermedades que cursan con diarreas, como formas crónicas de salmonelosis, diarrea viríca bovina o desplazamiento de cuajar (Sherman, 1985; Green *et al*., 1989; Garrido *et al*., 2000b).

Algunos autores destacan que la disminución de ciertos parámetros sanguíneos como la albúmina y proteínas séricas totales (Scott *et al*., 1995) o del calcio en sangre (Jones y Kay, 1996) podría indicar, en la especie ovina, la presencia de enfermedad, si se acompaña de signos clínicos.

No obstante, la ausencia de casos clínicos no permite descartar la posibilidad de que esta enfermedad esté presente en la explotación, ya que los animales infectados subclínicamente de paratuberculosis no suelen mostrar signos evidentes, salvo la disminución de la producción láctea (Buergelt y Duncan, 1978; Benedictus *et al*., 1987; Aduriz *et al*., 1994; Stabel, 1998; Losinger, 2005; Raizman *et al*., 2009) u otros signos inespecíficos, principalmente relacionados con problemas de carácter reproductivo (Merkal *et al*., 1975a; Corpa *et al*., 1998; Stabel, 1998). Además, la identificación de estos animales es clave ya que constituyen uno de los principales factores de riesgo en las explotaciones en cuanto a la posibilidad de propagar la infección (Olsen *et al*., 2002).

II.5.2. Diagnóstico anatomopatológico

Las alteraciones macroscópicas asociadas a paratuberculosis (descritas en el apartado 4.2.1) son muy características y podrían conducir al diagnóstico de la enfermedad (Juste y Aduriz, 1990b; Garrido *et al*., 2000a). No obstante, se debe considerar que hay otras micobacteriosis que presentan alteraciones inflamatorias similares, además de que no todos los animales infectados por *Map* muestran lesiones macroscópicas, incluso en animales con signos clínicos evidentes (Buergelt *et al*., 1978; Blood *et al*., 1989; Clarke y Little, 1996; Clarke, 1997; Corpa, 1999; Brady *et al*., 2008). En la mayoría de los animales con infecciones latentes o subclínicos no se observan lesiones en la necropsia. Para estos casos, el estudio histopatológico se ha

descrito como muy efectivo, capaz de detectar la infección cuando otras pruebas diagnósticas no suelen hacerlo (Condron *et al.*, 1995; McDonald *et al.*, 1999; Sigurdardóttir *et al.*, 1999), tratándose de una prueba con buena sensibilidad y especificidad (Whitlock, 1998; Gwzodz *et al*., 2000b; Huda y Jensen, 2003; Brown *et al*., 2007).

Benedictus y Haagsma (1986) otorgaron un gran valor diagnóstico a la biopsia del nódulo linfático mesentérico y señalan que por este método se detectaría la infección antes que utilizando otros procedimientos como el test de fijación del complemento y el examen microscópico de heces. El empleo de esta técnica evitaría la principal limitación que tiene el diagnóstico anatomopatológico, como es la necesidad de practicarlo sobre el animal muerto (González, 1998; Garrido *et al*., 2000b), si bien los elevados costes que presenta junto con la manipulación excesiva del animal que requiere (Benedictus y Bosma, 1985; Sherman, 1985) limitaría su uso a estudios experimentales o en individuos de gran valor económico (Garrido *et a*l., 2000b; Brumbaugh *et al*., 2000).

Aunque la presencia de granulomas y células gigantes relacionados con la inflamación paratuberculosa se identifica fácilmente mediante técnicas histológicas convencionales, como la tinción de hematoxilina-eosina (HE) (Garrido *et al*., 2000a), no en todos los casos es así. Es por ello que el estudio histológico de las secciones de intestino requiere un examen minucioso de numerosas secciones de tejido por parte de personal experimentado antes de poder descartar una infección por *Map* (Condron *et al*., 1994; Garrido *et al*., 2000a). En casos de infecciones iniciales o subclínicas, donde las lesiones a veces pueden pasar desapercibidas, pudiendo encontrarse apenas una sola célula gigante en el ápice de las vellosidades, o la presencia de escasos granulomas pequeños y focales en el tejido linfoide intestinal, se requiere notable experiencia (Payne y Rankin, 1961a, 1961b; Buergelt *et al*., 1978; Chiodini *et al*., 1984a; Pérez *et al*., 1996; González *et al*., 2005). Además es de suma importancia llevar a cabo una correcta toma de muestras, que debe incluir tejido linfoide intestinal, ya que es en este tejido en el que se localizan las lesiones iniciales y latentes de la paratuberculosis (Nisbet *et al*., 1962; García Marín *et al.*, 1992c; Huchzermeyer y Bastianello, 1992; Peris, 1992; Juste *et al.*, 1994; Pérez *et al*., 1996; González *et al.*, 2005). Diferentes tramos del intestino delgado y primeros del grueso, especialmente de la válvula ileocecal y placas de Peyer yeyunales (Juste *et al.*, 1988; Carrigan y Seaman, 1990;

García-Marín *et al*., 1992c; Pérez *et al*., 1996; Kheirandish *et al*., 2008), así como de los nódulos linfáticos mesentéricos, serían las muestras elegidas para un diagnóstico sensible y específico de paratuberculosis (Whitlock, 1992; Garrido *et al*., 2000a; Olsen *et al*., 2002), ya que permitirían evidenciar lesiones características de esta enfermedad tanto en individuos enfermos como incluso en animales en las fases iniciales de la infección o infectados subclínicamente (Pérez *et al*., 1996; Corpa *et al*., 2000a; González *et al*., 2005). No obstante, en estos casos, ante la sospecha de un posible caso de paratuberculosis, se recomienda esperar los resultados de otras pruebas, como el cultivo, antes de rechazar definitivamente el diagnóstico de paratuberculosis (Juste, 1984).

El diagnóstico histopatológico ha sido utilizado como referencia para validar y comparar otras técnicas (Billman-Jacobe *et al*., 1992; Shulaw *et al.*, 1993; Clarke *et al*., 1996; Pérez *et al.*, 1997, 1999; McDonald *et al.*, 1999; Gwodz *et al.*, 2000b; Hope *et al.*, 2000; Michel y Bastianello, 2000; Mason *et al.*, 2001; Rajukumar *et al*., 2001). Aunque algunos autores encontraron una sensibilidad levemente menor del estudio histopatológico frente al cultivo de tejidos en el ganado bovino (de Lisle *et al*., 1980), en general la mayoría de los trabajos confirmaron que la primera técnica fue capaz de detectar un mayor número de animales infectados por *Map* frente al cultivo tanto en ovino, caprino como bovino (Pérez *et al*., 1996; Corpa *et al*., 2000a; González *et al*., 2005).

La fiabilidad de este tipo de diagnóstico aumenta si se lleva a cabo, de forma conjunta a la observación de lesiones, la detección del agente etiológico en las mismas. Esto puede lograrse mediante la tinción de ZN, que permite identificar BAAR en tejidos (Johne y Frottinghan, 1895; Stamp y Watt, 1954); sin embargo, para que la tinción pueda realizarse, la micobacteria debe presentar la pared intacta. El que en una lesión no se detecten bacterias mediante la técnica de ZN, podría ser debido tanto a su presencia en bajo número en la lesión, incluso en el caso de alteraciones morfológicas evidentes (Stamp y Watt, 1954; Buergelt *et al*., 1978; Massone *et al*., 1991; Pérez *et al*., 1996; Coetsier *et al*., 1998), como a la degradación de la bacteria (Condron *et al*., 1994). El método de ZN no es una técnica muy específica ya que no permite diferenciar entre especies de micobacterias, y a éstas de otras bacterias que presentan ácido alcohol-

resistencia como *Nocardia* spp o *Corymebacterium* spp,. (Shinnick y Good, 1994; Thoresen *et al*., 1994; Brees *et al*., 2000).

El empleo de métodos inmunohistoquímicos, utilizando anticuerpos específicos frente a *Map*, tanto monoclonales como policlonales para evidenciar antígenos de *Map* (Olsen *et al.*, 2002) resulta de mayor especificidad, y muestra una mayor capacidad de detectar micobacterias que otras tinciones, como el ZN, sobre todo en aquellas lesiones en la que éstas aparecen en escasa cantidad o como formas de pared defectuosa (Pérez *et al*., 1990; Massone *et al*., 1991; Navarro *et al*., 1991; García Marín *et al*., 1992a; Thoresen *et al*., 1994; Plante et al., 1996; Coetsier *et al*., 1998; Brees *et al*., 2000; Balseiro *et al*., 2003; Kheirandish *et al*., 2008; Delgado *et al*., 2009). Esto es debido a que la tinción inmunohistoquímica es capaz de detectar desde antígenos de la micobacteria, hasta fragmentos de organismos tanto viables como inactivados, incluso con la pared celular defectuosa en forma de esferoplastos (Stabel *et al*., 1996; Kheirandish *et al*., 2008; Delgado *et al*., 2009). El principal inconveniente de estas técnicas es que la mayoría de los anticuerpos utilizados presentan reacción cruzada frente a otras especies de micobacterias relacionadas, por lo que su especificidad se ve reducida (Thoresen *et al*., 1994; Coetsier *et al.*, 1998; Brees *et al.*, 2000).

El desarrollo de las técnicas de biología molecular ha permitido la puesta a punto de técnicas más específicas, como la PCR *in situ*, en la cual se procede a amplificar la secuencia IS900 en tejidos fijados en formol e incluidos en parafina (Whittington *et al*., 1998; Sanna *et al*., 2000). Se ha señalado que la PCR *in situ* resultaría rápida y útil cuando sólo se dispone de material fijado en formol o cuando el resultado del cultivo es negativo, como en el caso de infecciones por algunas cepas ovinas de *Map* (Whittington *et al*., 1998, 2001b). Este método detectaría entre el 71 y 88% de las secciones histológicas positivas a la tinción de ZN, en función de las pares de bases de la secuencia utilizadas para el estudio (Whittington *et al*., 1998)

Igualmente, la hibridación *in situ* es otro método que permite detectar ADN micobacteriano en preparaciones histológicas, basándose en el empleo de una sonda cuya secuencia es específica de *Map*, concretamente un fragmento de la secuencia IS*900* biotinilado, que hibrida con el material micobacteriano en secciones de tejido incluido en parafina, una vez desparafinadas y tratadas con proteinasa K. Se trata de una

técnica eficaz en la detección de *Map* en tejidos, sobre todo cuando se trata de bacilos con pared celular defectusosa o esferoplastos habiéndose empleado tanto en paratuberculosis (Hulten *et al*., 2000a; 2000b; El Zaatari *et al*., 2002) como en la enfermedad de Crohn humana (Sechi *et al.,* 2001, 2004; Hulten *et al.,* 2001; Roholl *et al*., 2002; Romero *et al.,* 2005), y sin embargo sería incapaz de detectar bacilos de pared completa (Hulten *et al*., 2000a, 2000b; Delgado *et al*., 2009), Por lo tanto, esta técnica podría ser efectiva para detectar *Map* en lesiones focales, en las que se podrían encontrar este tipo de bacterias (Condron *et al*., 1995) y en áreas de tejido donde las técnicas inmunohistoquímicas son negativas, debido probablemente a la presencia de formas defectivas en la pared, aunque resulta más laboriosa que estas y ofrece menor intensidad de tinción (Delgado *et al*., 2009).

En un estudio reciente de Jeyanathan *et al*. (2006), en ratones infectados con *Map* y *M. tuberculosis,* se llevaron a cabo estudios *in situ* de PCR e hibridación, en este último caso utilizando como diana rRNA y se comprobó que esta última técnica presentaba una mayor especificidad que la PCR *in situ.* Sin embargo, la teórica superioridad de los estudios basados en biología molecular sobre el ZN para detectar micobacterias no se evidenció, ya que en secciones de parafina seriadas se detectaron un número similar de bacilos con ambas técnicas, atribuyendo, a tenor a sus resultados, valores similares de especificidad y sensibilidad a la tinción de ZN y a la hibridación *in situ* utilizando rRNA.

Igualmente hay estudios de hibridación *in situ* donde sehan sustituido las sondas de oligonucleótidos de DNA por sondas de péptidos de ácidos nucleicos (PNA), lo cual daría una mayor intensidad de señal, como se demostró en estudios llevados a cabo en agua potable, donde se pudo detectar la presencia de gran cantidad de rRNA de diferentes especies bacterianas, entre ellas *Map* (Lehtola *et al.,* 2005), aunque destacan el problema de la autofluorescencia. Esta prueba ha sido utilizada también con éxito para detectar *Map* en tejido fijado en formol e incluido en parafina de un caso de paratuberculosis en un rumiante y otras micobacterias en biopsias tanto de humanos como de animales por Lehmann *et al*. (2006) mediante un procedimiento de tan sólo 3 horas de duración. Así mismo, se ha llevado a cabo con éxito para diferenciar entre micobacterias del complejo *M. tuberculosis* y micobacterias no tuberculosas en tejidos fijados en formol e incluidos en parafina (Zerbi *et al*., 2001). El éxito de esta prueba

puede deberse al carácter hidrófobo de las sondas de PNA comparadas con las de ADN, lo cual permite una mejor difusión a través de la pared bacteriana (Stender *et al*., 1999 y 2002).

También se ha utilizado el microscopio de disección láser para seleccionar los granulomas sobre los que aplicar técnicas para detectar ADN de *Map* en tejidos fijados en formol e incluidos en parafina, en lesiones granulomatosas de muestras de tejido de individuos con la enfermedad de Crohn (Naser *et al*., 2002; Ryan *et al*., 2002 y 2004). Hasta el momento, no parece haber sido utilizada en el caso de animales con paratuberculosis.

II.5.3. Diagnóstico bacteriológico

Para la identificación del agente causal de la paratuberculosis se utilizan diferentes técnicas que se exponen a continuación.

II.5.3.1. Identificación de las micobacterias en frotis

Esta técnica consiste en realizar la tinción de ZN sobre frotis obtenidos de muestras de heces o raspados tanto de mucosa intestinal como de nódulos linfáticos, observándose, en el caso de ser positiva, agregados de BAAR que tengan su pared celular preservada. Se trata de una prueba diagnóstica rápida (Desmecht, 1977) y sencilla (Juste y Aduriz, 1990b). Es una técnica muy útil para confirmar el diagnóstico de paratuberculosis en animales en fases clínicas, en las que los bacilos suelen ser muy abundantes y adoptan una disposición muy característica en grumos, conservando la estructura que mantenían en el interior de los macrófagos (Hutyra y Marek, 1930; Doyle y Spears, 1951; Merkal, 1973; Thoen y Muscoplat, 1979; Zimmer *et al*., 1999).

Su sensibilidad es baja, ya que sólo detectaría a los animales con clínica y que sean grandes excretores (Merkal, 1973), no así a los animales con enfermedad subclínica o latente o aquellos con formas paucibacilares (Taylor, 1951a; Merkal *et al.*, 1968; Benedictus *et al*., 1984; Juste, 1987). En estudios en los que se han comparado

varias técnicas en muestras de heces de animales con clínica y con infección subclínica de paratuberculosis, se ha comprobado que la tinción de frotis era la menos sensible, por detrás del cultivo y PCR. Así, con el frotis de heces tan sólo se detectaría un 46% de los bovinos con clínica de paratuberculosis y positivos al cultivo (Jorgensen, 1983) o al 36,4% de los animales, si consideramos a los que también se encuentran en la fase subcínica de la infección paratuberculosa (Zimmer *et al*., 1999).

Se han realizado frotis de raspado de mucosa rectal (Doyle, 1956) que aunque tiene la ventaja de poder realizarse *in vivo*, presenta una menor sensibilidad que el frotis de heces o de mucosa ileal o nódulos mesentéricos tras la necropsia del animal debido a que tan solo aquellos animales que presenten una infección muy extendida mostrarían lesión en recto (Buergelt *et al*., 1978).

Además, es una técnica con baja especificidad debido a que suelen aparecer bacilos saprofitos morfológicamente similares a *Map*, más en la especie bovina que en la ovina, que darían lugar a falsos positivos (Merkal *et al*., 1968; Juste, 1987; Garrido *et al*., 2000a).

II.5.3.2. Cultivo

Se trata de un método utilizado como prueba de referencia para identificar animales con paratuberculosis, sobre todo en la especie bovina (de Lisle *et al*., 1980; Chiodini y Van Kruiningen, 1986; Merkal *et al*., 1987; Kreeger, 1991) y tomado como base para el establecimiento de programas de control (Chiodini *et al*., 1984a; Merkal, 1984; Brown *et al.*, 2007), debido a que el aislamiento de *Map* en un animal proporciona un diagnóstico definitivo de la existencia de infección (Chiodini y Van Kruiningen, 1986; Whittington *et al*., 2000). En los pequeños rumiantes, sobre todo en ovino, el cultivo de las muestras resulta más problemático ya que en estas especies las cepas presentan un crecimiento más lento e incluso a veces son incultivables (Dunkin y Balfour-Jones, 1935; Taylor, 1945; Taylor, 1951; Brotherston *et al*., 1961a; McCausaland, 1980; Seaman *et al*., 1981; Juste *et al*., 1988; Carrigan y Seaman, 1990; Collins *et al*., 1990; Juste *et al*., 1991b; Huchzermeyer *et al*., 1992; Shulaw *et al*., 1993;

Benazzi *et al*., 1996; Dimarelli-Malli *et al*., 2001; Machackova *et al*., 2003; Brown *et al*., 2007).

El cultivo se ha utilizado con muestras de heces, nódulos linfáticos mesentéricos o raspados de mucosa intestinal (Garrido *et al*., 2000a) y, en ocasiones, leche (Dundee *et al*., 2001; Ruzante *et al*., 2006 y 2008; Gao *et al*., 2009). En cuanto a las muestras recogidas en la necropsia, se han obtenido mejores resultados con raspados de la válvula ileocecal y nódulos linfáticos ileocecales o yeyunales debido a la mayor probabilidad de conseguir resultados positivos y a la facilidad de obtención de las muestras (Chiodini y Van Kruiningen, 1986; Merkal *et al*., 1987; Iob *et al*., 1996), aunque la localización óptima depende de la especie animal. Se considera que el límite de detección estaría establecido en 50-100 unidades de *Map* por gramo de heces (Merkal, 1973; Jorgensen, 1982; Whitlock, 1998) y que la sensibilidad aumenta cuando se cultivan tejidos (Merkal *et al*., 1987; Juste *et al*., 1991b; McDonald *et al*., 1999). Aunque sea una técnica 100% específica (Whitlock *et al.*, 1992), su sensibilidad es relativamente baja, sobre todo por los falsos negativos que ocasionan los animales con infección subclínica, disminuyendo además cuando el aislamiento se lleva a cabo en un número inferior a cuatro tubos de cultivo o por la aparición de cepas de difícil aislamiento (Merkal, 1973; Chiodini *et al*., 1984a; Chiodini y Van Kruiningen, 1986; Juste *et al*., 1991b; Huchzermeyer y Bastianello, 1992; Benazzi *et al*., 1996; Whitlock, 1998; Whittington *et al*., 1999b, 2000ª, b, c; Corpa *et al*., 2000a Eamens *et al*., 2000; Whitlock *et al*., 2000; Crossley *et al*., 2005). Incluso, se ha descrito que animales con lesiones graves pero que sin embargo tienen muy pocas micobacterias resultan negativos al cultivo (Whittington *et al*., 2000; Corpa *et al*., 2000a).

Mediante el cultivo de heces, se detectaría la mayoría de los animales infectados en la fase clínica de la enfermedad (Merkal, 1973; Jorgensen, 1982) y una media de entre el 40 y el 60% de los casos subclínicos (Whipple, 1992; Sockett *et al.*, 1992) ya que estos animales eliminarían pocas micobacterias y lo harían de forma intermitente (Merkal, 1984; Thoen y Baum, 1988; Whitlock *et al*., 1992, 2000; Whittington *et al*., 2000a). No obstante, en algunos trabajos, en la especie bovina, se ha descrito que la sensibilidad de este método en la detección de casos subclínicos puede llegar hasta el 87,7% (Zimmer *et al*., 1999). Se considera que en ganado bovino pueden detectarse animales infectados mediante cultivo fecal hasta tres años antes de que empiecen a

manifestar signos clínicos (Merkal, 1973). Igualmente, en bovino se estima que, como media, la sensibilidad a los dos años de edad es muy baja, pero que se incrementa considerablemente en animales de 5 años de edad (Nielsen y Toft, 2006). En el cultivo fecal ha de tenerse en cuenta que *Map* podría identificarse en heces de animales en los que la bacteria tras ser ingerida ha transitado por el tubo digestivo sin ocasionar infección (Sweeney *et al*., 1992b; Rebhun, 1995; McDonald *et al.*, 1999; Whittington *et al*., 2000a).

Respecto al cultivo a partir de muestas de leche, se ha señalado que presentaría una sensibilidad menor que el cultivo fecal, aunque los autores señalan que esta diferencia no es significativa y que, además, debe tenerse en cuenta que la eliminación de bacterias por heces y por leche no está sincronizada (Gao *et al*., 2009). En uno de los primeros estudios revisados sobre cultivo en leche, se comparaba la positividad de esta técnica frente al cultivo de nódulos supramamarios de vacas con infección subclínica, siendo menor en el caso del cultivo de leche (Sweeney *et al.*, 1992b). También resulta menos sensible que el cultivo de calostro de vacas infectadas (Streeter *et al*., 1995). No obstante en un estudio comparativo de ELISA y cultivo de leche, este último resultó el más sensible (Sharma *et a*l., 2008). Sin embargo al compararlo con la PCR los resultados son contradictorios: mientras para unos autores el cultivo de muestras de leche es más sensible (Sharma *et a*l., 2008), tanto en leche pasteurizada como no (Shankar *et al*., 2010), para otros lo es la amplificación de la secuencia de inserción IS*900* de *Map* (Szteyn *et al*., 2008). Los estudios más recientes en cultivo de leche de vacas con paratuberculosis han ido encaminados a optimizar la técnica del cultivo, que se revisa a continuación, basándose en el empleo de diferentes descontaminates, antibióticos y medios de cultivo así como los tiempos y concentraciones empleadas, para una más eficaz detección de *Map*. (Bradner *et al*., 2013a, b).

La técnica para el aislamiento de *Map* consta de tres pasos fundamentales: la *descontaminació*n, el *enriquecimiento* y el *cultivo*.

La *descontaminación* se realiza con el fin de eliminar otros microorganismos contaminantes presentes en la muestra objeto de cultivo, basándose en la gran resistencia que presenta *Map* a las sustancias bactericidas (Merkal y Larsen, 1962; de Lisle *et al*., 1980; Ridge, 1993; Garrido *et al*., 2000a; Olsen *et al*., 2002; Reddacliff *et al*., 2003b). En principio se utilizaban como descontaminantes sustancias como fenol,

hidróxido sódico, ácido sulfúrico, ácido oxálico, verde malaquita o la neomicina y anfotericina B (Kalis *et al*., 1999b). Posteriormente se utilizaron otros productos como el cloruro de benzalconio (Merkal *et al*., 1964; Merkal y Richard, 1972; Merkal, 1973; Lagadic *et al*., 1983), y, más recientemente, el cloruro de hexadecil piridinio (HCP) al 0,75% (Lagadic *et al*., 1983; Whipple y Merkal, 1983; Merkal, 1984; Merkal *et al*., 1985; Juste *et al*., 1991b; Whitlock *et al*., 1992; Stabel, 1997; Dundee *et al*., 2001). Recientemente se ha descrito la utilización de la enzima lítica C(18)-carboxipropilbetaina, con una sensibilidad y especificidad en el aislamiento tras su uso del 97,6 y 89,5% respectivamente (Throton *et al*., 2002), y con un menor tiempo de detección de bacterias en leche cuando se comparaba con el HCP (Ruzante *et al*., 2006); sin embargo su uso no se ha extendido.

Se considera que tanto las sustancias usadas inicialmente (Merkal y Larsen, 1962; Larsen *et al*., 1964) como las de uso más reciente reducen la viabilidad de las micobacterias de la muestra. Esto se acentúa en el caso de cepas ovinas, en las que se ha cifrado la reducción de su aislamiento en 2,7 $\log_{10}$ a 3,1 mlog_{10} (Reddacliff *et al*., 2003). Se ha sugerido la utilización conjunta de natamicina y vancomicina junto a una concentración optimizada de HCP para no inhibir significativamente el crecimiento de *Map* (Johansen *et al*., 2006). En este sentido, se ha probado el uso conjunto de N-acetil-L-cisteina e hidróxido de sodio en combinación con otras modificaciones en el protocolo de cultivo de leche traduciéndose en resultados alentadores en cuanto a la viabilidad de *Map* (Bradner *et al*., 2013b).

El *enriquecimiento* trata de concentrar las micobacterias, bien mediante sedimentación por acción de la gravedad o bien mediante centrifugación. Con la última se consigue una mejor sensibilidad del cultivo (Whitlock *et al*., 1992, 1996; Kalis *et al*., 1999b), logrando hasta un 25% más de positividad en tejidos (Redacliff *et al*., 2003) aunque aumenta el número de contaminaciones (Kim *et al*., 1989; Whipple *et al*., 1992), lo cual podría reducirse al emplear una segunda incubación con antibióticos y antifúngicos (Stabel, 1997). La concentración también podría conseguirse mediante el empleo de perlas magnéticas tapizadas con IgG de conejo anti-*Map* que al unirse a las micobacterias y tras someterlas a un fuerte campo magnético permite separarlas de la suspensión (Grant *et al*., 1998; Mason *et al*., 1999; Khare *et al*., 2004). Con esta técnica,

no sería necesario el empleo de las habituales sustancias descontaminantes, con lo que el estado fisiológico de las micobacterias no se vería afectado (Grant *et al*., 1998).

Para la *siembra* de las muestras, los medios más empleados son aquellos a base de huevo, como el Herrold (Merkal *et al*., 1964; Kim *et al*., 1989) que ofrece mejores resultados en bovino (Merkal *et al*., 1968; Juste *et al*., 1991b; Whipple *et al*., 1992; Aduriz *et al*., 1995a; Eamens *et al*., 2000; Nielsen *et al*., 2004), aunque también se ha empleado con éxito en pequeños rumiantes (Dimarelli-Malli y Sarris, 2001). También se utiliza el medio de Löwestein-Jensen (Merkal *et al*., 1964; Jorgensen, 1982; Whipple y Merkal, 1985; Juste *et al*., 1991b; Pavlik *et al*., 1999b; Whittington *et al*., 2000a) cuyo empleo es más frecuente en pequeños rumiantes (Juste *et al*., 1991b; García Marín *et al*., 1994; Aduriz *et al*., 1995; Corpa *et al*., 2000a; Whittington *et al*., 2000). Igualmente se emplean medios a base de suero como el Dubos (Gunnarsson y Fodstad, 1979; Saxegaard, 1985) o medios sintéticos como el Middlebrook 7H/11 (Merkal y Curran, 1974; Damato y Collins, 1990; Aduriz et al., 1995a), con el que se ha logrado el aislamiento de cepas ovinas de *Map* sin suplementar con micobactina (Aduriz *et al*., 1995a; Garrido, 2001), necesaria sin embargo en los medios citados anteriormente. Así mismo, algunas cepas de ovino presentan dificultad para crecer en los medios convencionales, y se han propuesto algunas modificaciones para solventar este inconveniente, como la exclusión del piruvato sódico del medio Löweatein-Jensen (Juste *et al*., 1991b). Con frecuencia, se suplementan los medios con antibióticos como la penicilina y antifúngicos como la anfotericina B (Kalis *et al*., 1999b) con el fin de reducir las contaminaciones. No obstante, según Sevilla *et al.* (2007), la preferencia por el medio no depende tanto de la especie hospedadora y sí del genotipo de la cepa, por tanto sería recomendable el uso de diferentes medios simultáneamente.

La identificación de *Map* se realiza por la morfología de las colonias, su dependencia de la micobactina, el tiempo de crecimiento, la descontaminación previa de las muestras y el empleo de medios de cultivo especiales, con lo que se consigue una alta especificidad en el aislamiento (Merkal y Larsen, 1962; Stuart, 1962; Chiodini y Van Kruiningen, 1986).

El gran inconveniente del cultivo es el tiempo que se necesita para obtener resultados debido al característico lento crecimiento de *Map* (Gunnarsson y Fodstad,

1979; Whittington *et al*., 2000a; Olsen *et al*., 2002; Huda y Jensen, 2003; Muskens *et al*., 2003b), que en el caso de vacuno es de 4 a 8 semanas (Chiodini y Van Kruiningen, 1986) y en ovino podría llegar a ser más de un año (Juste *et al*., 1991b). Además este método de diagnóstico presenta un elevado coste, sobre todo cuando se trata de un gran volumen de muestras (Collins *et al*., 1988), siendo un procedimiento caro, lento y laborioso (Collins *et al*., 1990b; Kalis *et al*., 2002). Para tratar de aminorar los costes de esta prueba se pueden utilizar lotes de heces, lo que resultaría bastante eficaz para detectar la infección en un rebaño (Kalis *et al*., 1999a, 2000; Whittington *et al*., 2000; Sergeant *et al*., 2002; Kalis *et al*., 2004). Una alternativa al uso de lotes para aminorar los costes y estimar la prevalencia en un rebaño, sería realizar un muestreo de los animales con mayor probabilidad de presentar la enfermedad, es decir, vacas a partir de la tercera lactación, animales con signos clínicos compatibles con la enfermedad y animales de desecho (Tavornpanich *et al*., 2006).

Con el fin de mejorar la sensibilidad y la rapidez (Collins *et al*., 1988; Damato y Collins, 1990; Collins *et al*., 1990b; Cousins *et al*., 1995; Whittington *et al*., 1998; Whittington *et al*., 2000a) se ha propuesto el uso del cultivo radiométrico, basado en la detección del isótopo CO_2^{14}, liberado como consecuencia del metabolismo bacteriano, el cual presenta como incovenientes la manipulación y el acumulo de material radioactivo, además de su mayor coste (Redacliff *et al*., 2003). Para mejorar estos aspectos también se ha empleado la técnica de doble incubación (Whitlock, 1998; Eamens *et al*., 2000) y la combinación del cultivo con la PCR a partir de un raspado de la superficie del medio de cultivo sólido, incluso antes de que comiencen a observarse las colonias (Secott *et al*., 1999).

También se ha utilizado el cutivo a pattir de muestras ambientales para conocer la presión de la infección por *Map* en una explotación, con mayores ventajas que el cultivo fecal, al resultar más económico y no precisaar el manejo de los animales de la explotación (Berghaus *et al.*, 2006). Se ha comprobado que los lugares en la explotación dónde se encuentra mayor número de muestras positivas son los pasillos y las zonas de almacenamiento de estiércol (Raizman *et al*., 2004).

II.5.3.3. Técnicas de identificación genética

La secuencia genética IS*900*, específica de *Map*, fue descubierta en 1989 (Green *et al*., 1989; Collins *et al*., 1989) y desde entonces ha sido utilizada para la detección de la micobacteria por métodos genéticos. La técnica más empleada es la *reacción en cadena de la polimerasa* o PCR (Mullis *et al*., 1986), que permite amplificar *in vitro* y de manera específica cantidades mínimas de ADN gracias a la acción de la ADN polimerasa, haciendo que puedan ser detectadas con facilidad, incluso en presencia de ADN inespecífico (Vary *et al*., 1990; Collins *et al*., 1993b; Challans *et al*., 1994; Pérez *et al*., 1994a; Plante *et al*., 1996; Gwozdz *et al*., 1997; Garrido *et al*., 1998; Coetsier *et al*., 2000). Cada bacilo de *Map* presenta 14-18 copias de la IS*900* (Bull *et al*., 2000), lo que facilita su detección al compararlo con otros genes o secuencias con una única copia en el genoma. Aunque la IS*900* se considera altamente específica de *Map*, se han observado resultados positivos con esta técnica en otras micobacterias distintas de *Map* con lo que se ha sugerido que tanto agentes estrechamente relacionados con *Map*, como son otras especies del género *Mycobacterium*, o incluso cocos Gram positivos como *Lactobacillus* spp (Willemsen *et al*., 2002) presentarían secuencias genéticas con considerable homología a la IS*900* ("IS*900*-like") (Cousins *et al*., 1999a, 1999b; Naser *et al*., 1999; Englund *et al*., 2002, Vansnick *et al*., 2004), pudiendo dar lugar a resultados falsos-positivos. Este hallazgo pondría en duda la especificidad absoluta asignada a esta secuencia hasta el momento. No obstante, los productos obtenidos siempre pueden distinguirse por secuenciación, lo que reduciría el riesgo de falsos positivos (Cousins *et al*., 1999b; Englund *et al*., 2002; Motiwala *et al*., 2004). Sin embargo, como consecuencia de ello, hay autores que han buscado otras secuencias diana alternativas específicas de *Map* como la IS*Mav*2 (Stratmann *et al*., 2002); f57 (Vansnick *et al*., 2004) o el locus 255 (Bannantine *et al*., 2002), entre otras. Con el fin de discernir la especificidad de estas regiones diana y su sensibilidad, se ha llevado a cabo un estudio (Möbius *et al*., 2008) consistente en la realización de 8 reacciones simples de PCR y 5 de PCR anidada, una variante de la PCR simple, comprobándose la especificidad y sensibilidad de 12 pares de cebadores diferentes (9 que identificaban la secuencia IS*900*, uno para la IS*Mav*2, otro para la f57 y otro para el locus 255) bajo condiciones de PCR similares. Se llegó a la conclusión de que la IS*900* es la secuencia diana favorita para amplificar loci específicos de *Map*. También se señala que, a pesar de que la PCR anidada era 100 veces más sensible que la simple, presentaba más

contaminaciones y reacciones cruzadas y por tanto no sería fiable para el diagnóstico de rutina.

Una gran ventaja que otorga la PCR es la rapidez en la obtención de resultados, (48-72 horas), sobre todo en comparación con las varias semanas que se precisan en el cultivo (Garrido *et al*., 2000a). Sin embargo para la detección de *Map* mediante esta técnica se presenta la dificultad de la lisis bacteriana para la obtención del ADN, debido a la gruesa pared celular de la bacteria, habiéndose utilizado diferentes tratamientos como la lisis mediante agitación con perlas de zirconio (van der Giessen *et al*., 1992a; Collins *et al*., 1993b; Challans *et al*., 1994), centrifugación y tratamiento con calor (Vary *et al*., 1990), la utilización de hidróxido sódico (Guillou *et al*., 1993), o la aplicación a las muestras ciclos de calor y hervido (Garrido *et al*., 2000a).

Para la detección de *Map* se utiliza esta técnica con mayor frecuencia en muestras procedentes de heces (Vary *et al*., 1990; Garrido *et al*., 1998b; Mason *et al*., 2001; Kawaji *et al*., 2007; Scott *et al*., 2007; Irenge *et al*., 2009), leche (Streeter *et al*., 1995; Giese y Ahrens, 2000; Grant *et al*., 2001; Djonne *et al*., 2003; Sevilla *et al*., 2003; Buergelt y Williams, 2004; Kaur *et al*., 2010) sangre o tejidos (Stevenson y Sharp, 1997; Gwozdz *et al*., 1997, 2000c; Bull *et al*., 2003; Juste *et al*., 2005; Singh *et al*., 2010). Incluso en un estudio relativamente reciente realizado por Alonso-Hearn *et al*. (2009) con la técnica de PCR a tiempo real, se ha identificado *Map* en músculo diafragmático de vacas sacrificadas en matadero, indicando que existíra una exposición humana a *Map* por el consumo de carne. Además, en este estudio encuentran una relación entre la gravedad de las lesiones intestinales, signos clínicos de paratuberculosis, elevada carga bacteriana en tejidos intestinales, eliminación de *Map* por heces y presencia de *Map* en músculo diafragmático.

La PCR a partir de sangre periférica se muestra como una alternativa muy interesante para el diagnóstico de la paratuberculosis al ser la sangre una muestra fácil de tomar, y que se suele recoger habitualmente para las pruebas serológicas. Se ha tratado de comparar la detección de anticuerpos mediante ELISA o inmunodifusión en gel de agar con la de *Map* mediante PCR sobre muestras de sangre en varios estudios. Así, en la especie ovina, se estima una sensibilidad del 66% y una especificidad del 100% (Gwozdz *et al*., 1997), aunque la sensibilidad disminuía al compararla con el

diagnóstico histológico (Gwozdz *et al.*, 2000c). En bovinos, Juste *et al*., (2005) llegaron a la conclusión de que sería muy valorada como técnica complementaria, ya que permitía detectar la fracción de animales infectados que no eran detectados mediante ELISA. Por ello, la PCR en sangre podría ser un buen método de diagnóstico precoz de animales subclínicos, tanto la técnica simple (Juste *et al*., 2005) como la anidada (Buergelt y Williams, 2004) antes de que éstos comiencen a eliminar bacterias en las heces y supongan un riesgo de infección para el resto del rebaño, aunque se ha señalado que aún se requieren más estudios para poder dar una estimación fiable de la sensibilidad y especificidad de este método (Buergelt y Williams, 2004; Singh *et al*., 2010). La PCR sobre muestas de heces presenta el problema de la aparición de falsos negativos debido a la presencia de sustancias inhibidoras de la técnica (Vary *et al*., 1990; Van der Giessen *et al*., 1992a; Collins *et al*., 1993a, 1993b; Mori *et al*., 1999; Englund *et al*., 2001; Mason *et al.*, 2001). Para minimizar este problema, se pueden incorporar plásmidos controles indicadores del buen funcionamiento de la reacción de PCR (Englund *et al*., 1999), o bien eliminar estos inhibidores mediante un paso de purificación de ADN (Whittington *et al*., 1998), neutralizando estas sustancias (Mori *et al*., 1999) o diluir el ADN extraído para conseguir diluir los inhibidores a su vez (Garrido *et al*., 2000a; Garrido, 2001), aunque con ello pueda reducirse la sensibilidad (Chui *et al.*, 2004). Es por ello que, en términos generales, la PCR se consideraría una técnica menos sensible que los métodos de cultivo de heces tradicionales (Van der Gienssen *et al*., 1992a; Englund *et al*., 1999, 2001), aunque hay autores que han encontrado valores de sensibilidad similares o superiores al cultivo (Vary *et al*., 1990; Sockett *et al*., 1992a; Collins *et al*., 1993ª, 1993b; Stevenson y Sharp, 1997; Sotohy y Awad-Masalmeh, 1999), sobre todo en la especie ovina (Garrido *et al*., 1998b; Garrido *et al*., 2000a). Esta disparidad de resultados reside en la gran heterogeneidad de las metodologías empleadas, que impiden comparar los resultados obtenidos entre diferentes laboratorios (Garrido *et al*., 2000a). Así, uno de los últimos estudios de PCR heces, ha sido el empleo de una técnica de triple PCR a tiempo real utilizando las secuencias IS*900*, IS*MAP02 y f57* de *Map*, resultando una técnica rápida, específica y que muestra una elevada sensibilidad para la detección de *Map* en muestras fecales comparada con los métodos convencionales (Irenge *et al*., 2009).

La sensibilidad de la PCR en muestras de tejido es mayor que a partir de heces, al producirse menos efectos inhibidores de la reacción (Garrido *et al*., 2000a). Se

considera que las muestras con las que se obtienen mejores resultados son la válvula ileocecal y el nódulo linfático mesentérico (Gwozdz *et al*., 1997). Además, existe la posibilidad de llevar a cabo esta técnica a partir de muestras fijadas en formol e incluidas en parafina (Plante *et al.*, 1996; Miller *et al*., 1997, 1999; Whittington *et al*., 1999). Así Miller *et al.* (1997) emplearon esta técnica en este tipo de muestras para el diagnóstico de *M. bovis* y dos años más tarde, los mismos autores (Miller *et al*., 1999) consiguieron aplicar esta técnica para el diagnóstico del complejo *M. avium* en muestras procesadas para estudios histológicos, utilizando, entre otros, los primers para las secuencias IS*900* y *hsp*X, específicas de *Map*, comprobando que en los rumiantes los primers más apropiados para la identificación de *M. avium* son los que codifican para la secuencia IS*900*, mientras que en los no rumiantes (aves y cerdos) los que lo hacen para la secuencia 16S rRNA. En cuanto a su sensibilidad, en un estudio comparativo para el diagnóstico de paratuberculosis en bovino entre esta variante de la PCR, ZN y técnicas inmunohistoquímicas, se obtuvieron unas senbilidades del 90, 86 y 100%, respectivamente, aunque las dos últimas técnicas no son 100% específicas como la primera (Plante *et al.*, 1996). No obstante, uno de los factores que limita la PCR en muestras de tejido fijadas en formol es el tiempo de fijación, aconsejando que éste no supere las 24 horas, debido a que el formol fragmenta el ADN, cifrándose en un 70% la disminución de la sensibilidad al mantener las muestras en fijación durante una semana (Plante *et al*., 1996; Miller *et al*., 1999). Para atenuar este inconveniente se ha propuesto el uso de cebadores con un menor número de pares de bases que amplifiquen la secuencia IS*900* (Miller *et al*., 1999).

En términos generales, se considera que el límite de detección mediante PCR es de 2 a 20 micobacerias a partir de cultivo (van der Gienssen *et al*., 1992a), de 35-45 micobacterias por gramo de tejido y de 10^5 por gramo de heces (Challans *et al*., 1994; Whilock, 1998). En este último caso, ya se ha indicado que la aparición de falsos negativos debido a la presencia de gran cantidad de inhibidores (Vary *et al*., 1990; Van der Giessen *et al*., 1992a; Collins *et al*., 1993a, 1993b; Mori *et al*., 1999; Englund *et al*., 2001; Mason *et al.*, 2001). No obstante, en cualquier muestra, la PCR puede verse inhibida también por otras causas como son la posible existencia de una excesiva cantidad de ADN inespecífico derivado del hospedador o de otros microorganismos, o la deficiente calidad del mismo (Khare *et al*., 2004). Estos efectos inhibidores pueden

aminorarse purificando el ADN de las formas que se han señalado para la PCR de heces.

Como alternativas a la PCR simple, se utilizan la PCR anidada y la PCR a tiempo real, ambas ya citadas en este apartado. La PCR anidada consiste en la realización de una segunda PCR que amplifica una región interna del producto obtenido tras la primera reacción (Englund *et al*., 1999; Gao *et al*., 2002; Bull *et al*., 2003; Buergelt y Williams, 2004; Stabel y Bannantine, 2005; Romero *et al*., 2005). Esta técnica se ha utilizado frecuentemente para la detección de *Map* en biopsias intestinales de pacientes con la enfermedad de Crohn con éxito, ya que se estima que en estos casos la cantidad de micobacterias presentes es muy escasa (Bull *et al*., 2003; Romero *et al*., 2005; Sasikala *et al*., 2009) y ha mostrado una mayor sensibilidad que el cultivo y la PCR convencional en tejidos de corderos infectados experimentalmente (Delgado *et al*., 2013). La PCR a tiempo real presenta la ventaja de poder cuantificar el ADN de *Map*, en este caso, y su uso es cada vez más frecuente en el diagnóstico de paratuberculosis. Sin embargo se requieren estudios a gran escala para conocer su sensibilidad (Kim *et al*., 2002; Stabel y Bannantine, 2005; Brey *et al*., 2006; Jaravata *et al*., 2006; Kawaji *et al*., 2007).

II.5.4. Diagnóstico inmunológico

Este tipo de diagnóstico se basa en la detección de la respuesta inmune, tanto celular como humoral, que el hospedador desarrolla frente a la infección por *Map* ya descritas en el correspondiente apartado.

Como también se ha citado, esta respuesta está estrechamente relacionada con la respuesta lesional (Billman-Jacobe *et al*., 1992; Pérez *et al*., 1997; García-Marín *et al*., 1999; Corpa, 1999; Gwozdz *et al*., 2000a; Balseiro *et al*., 2003; González *et al*., 2005; Vázquez *et al*., 2013), habiéndose propuesto un espectro inmunopatológico en los individuos infectados. Los animales con lesiones iniciales o latentes subclínicas presentan una elevada respuesta inmune de tipo celular, y al progresar la infección hacia fases más avanzadas y graves, empieza a predominar la respuesta inmune de tipo

humoral mientras que la celular se va debilitando (Chiodini *et al*., 1984a; García-Marín *et al*., 2000; Stabel, 2006).

Como test in vivo de detección de la respuesta inmune celular se utiliza la prueba de intradermoreacción, e *in vitro*, el test de liberación de IFN-γ, la prueba de detección del receptor de la interleuquina 2, el test de transformación linfocitaria y la inhibición de la migración linfocitaria. En el caso de la respuesta inmune humoral, se utilizan pruebas como la fijación de complemento, la inmunodifusión en gel de agar y el ELISA. Se ha señalado que ambos tipos de pruebas se complementan y por tanto no se debería sustituir una por la otra sino emplearse simultaneamente para detectar la mayoría de animales infectados en el rebaño en las diferentes fases de la misma (Pérez *et al*., 1994b; García-Marín *et al*., 1999; Stabel y Whitlock, 2001; Kurade *et al.*, 2004). No obstante, hay que tener en cuenta que en las fases finales de la enfermedad, en ocasiones, se puede instaurar un estado de anergia, por lo que estos animales no serían detectados por ninguna prueba inmunológica (Garrido *et al*., 2000a).

Un hecho a tener en cuenta es que la respuesta inmune del animal puede verse influida tanto por la vacunación frente a paratuberculosis (Gilmour y Brotherson, 1966; Burrells *et al.*, 1995) como por diversas reacciones cruzadas con microorganismos que comparten antígenos con *Map*, como otras especies de micobacterias y microorganismos del género actinomicetales como *Actynomyces spp*., *Nocardia spp*., *Corynebacterium spp*., *Dermatophilus spp*.o *Streptomyces spp*. (Johnson, 1944¸Johson *et al*., 1994; Chiodini *et al*., 1984a; Gwozdz *et al*., 2000a).

II.5.4.1. Técnicas de diagnóstico basadas en la inmunidad celular

Los animales infectados por *Map* suelen presentar una marcada respuesta inmune celular en las fases iniciales o latentes de la enfermedad o bien, en ocasiones, cuando presentan signos clínicos (aquellos animales con lesión difusa linfocítica o paucibacilar) (Chiodini *et al*., 1984a; Billman-Jacobe *et al*., 1992; Stabel, 1996; Clarke, 1997; Pérez *et al*., 1999; García- Marín *et al*., 2000; Stabel, 2000a; Coussens, 2001) y en principio, serán estos animales los que este tipo de pruebas pondrá en evidencia.

Los test basados en la detección de la respuesta inmune celular frente a *Map* se dividen en pruebas *in vivo* como la de intradermorreacción (Larsen *et al*., 1955; Gilmour, 1965; Merkal, 1973; Juste *et al*., 1983; García- Marín *et al*., 1999; Kalis *et al*., 2003), y pruebas *in vitro* (Merkal, 1973; Milner *et al.*, 1981; Sreenivasculu *et al.*, 1986; Pérez *et al*., 1994b; García-Marín *et al*., 1999; Whist *et al*., 2000; Kalis *et al*., 2003) como la detección de la inhibición de la migración linfocitaria (Bendixen, 1977), de la transformación linfocitaria (Buergelt *et al*., 1978a, 1983) o de la detección del receptor de la interleuquina 2 (Whist *et al.*, 2000), cuyo uso no está extendido, y el test de liberación de -INF-γ (Billman-Jacobe *et al*., 1992), que es la prueba más utilizada de este grupo.

El conocimiento de que las células γδ, del fenotipo CD8CD2(-)WC+1(+), predominan en las etapas tempranas de la infección, hace de estas células marcadores prometedores para definir los cambios tempranos de la infección de *Map* debido a su importante papel tanto en la inmunidad innata como en la mediada por células (Badi *et al*., 2009).

II.5.4.1.1. Puebas *in vivo*

II. 5.4.1.1.1. Intradermorreacción (IDR)

Esta prueba consiste en la medida del incremento de grosor de la piel provocado por la reacción de hipersensibilidad retardada que tiene lugar tras la inoculación intradérmica de derivados proteicos purificados de *M. avium* (PPD o tuberculina aviar) (Stuart, 1962; Chiodini *et al.*, 1984a) o bien de *Map* (johnina) (Larsen *et al*., 1955; Vindodkumar *et al*., 1999). El uso de la primera está más extendido (Lauzi *et al*., 2000) debido a que resulta más fácil su obtención y aunque para algunos autores la eficacia de la johnina sería mayor (Johnson *et al.*, 1949; Larsen, 1973), para otros no habría diferencias (Juste y Aduriz, 1990b; Pavlik *et al*., 1999b; Garrido *et al*., 2000a; Stabel y Whitlock, 2001) o incluso sería más eficaz la tuberculina aviar (Sidgurson, 1956; Stuart, 1962; Milner *et al*., 1981).

En cuanto al lugar de aplicación, en ovino el de elección es el pliegue de la cola (Fernández *et al*., 1980; Chiodini *et al*., 1984a; Juste y Aduriz, 1990a) y en las especies bovina y caprina en las tablas del cuello o en la espalda (Larsen *et al*., 1955; Gilmour y Brotherson, 1966; Chiodini *et al*., 1984a; Real Decreto 2611/1996).

La lectura del incremento se realiza entre las 48 y las 72 horas después de la aplicación intradérmica de 0,1-0,2 ml de PPD aviar o johnina (Gilmour, 1976; Fernández *et al*., 1980; Chiodini *et al*., 1984a; Blood *et al*., 1989; Pérez, 1992). En el caso de tener que repetir esta prueba sería necesario esperar de 42 a 60 días debido a la sensibilización producida en la primera inoculación (Monaghan *et al*., 1991).

La IDR, aunque se ha aplicado con éxito en la lucha contra la tuberculosis bovina, en la paratuberculosis parece tener una menor especificidad en cuanto a su diagnóstico (Olsen y Storset, 2001) y su uso se ve restringido a estudios experimentales. Al compararla con el cultivo, resulta una prueba menos sensible si se aplica de forma individual sobre animales adultos de rebaños infectados (de Lisle, 1980; Kreeger, 1991; Hietala, 1992; Pavlik *et al*., 1999), habiéndose señalado que su mayor utilidad estaría en la confirmación de una sospecha clínica de la enfermedad en el rebaño (Radostits *et al*., 2007).

En cuanto a la relación de la IDR con la fase de la enfermedad, esta prueba detectaría a los animales que se encuentran infectados de forma subclínica, en las fases iniciales o periodos latentes de la infección, es decir, aquellos con lesiones focales (Jonhson y Pratt, 1944; Stuart, 1962; Merkal *et al*., 1968; Corpa *et al*., 1998; Vindodkumar *et al*., 1999; González, 2003). Por otro lado, un porcentaje importante de animales que manifiestan signos clínicos y que son excretores de grandes cantidades de micobacterias pueden resultar anérgicos a la prueba (Billman-Jacobe *et al*., 1992; Hietala, 1992; García Marín *et al*., 1999a). En un estudio realizado en la especie ovina, se ha comprobado que el 80% de los animales con lesión focal eran positivos a la IDR, mientras sólo se observó positividad en el 38,4% de los que presentaban lesión difusa. De estos últimos, los que presentaban lesión difusa paucibacilar resultaban positivos en el 100% de los casos mientras que en las ovejas con lesión multibacilar la sensibilidad disminuía hasta el 11% (Pérez *et al*., 1999). En bovino, Balseiro *et al*. (2003) y González (2003) relacionan la positividad de esta prueba con lesiones focales y

multifocales. Así Balseiro *et al* (2003) encontraron que el 28,6% de los 134 animales estudiados eran positivos a test de la IDR, no presentaban signos clínicos de paratuberculosis pero si lesiones de tipo focal, No obstante, un porcentaje ligeramente inferior (27,9%) de estos animales, presentaban este tipo de lesiones sin resultar positivos a la IDR, no pudiendo relacionar de manera significativa la presencia de lesiones focales y multifocales con la positividad a esta prueba.

En otro estudio realizado en la especie bovina, se ha observado que animales vacunados con presencia de lesiones histológicas presentaban una respuesta negativa al realizar la IDR, por tanto, se sugiere que animales con una débil respuesta inmune celular serían más susceptibles a desarrollar la infección por *Map* (Wentink *et al*., 1993), concluyendo que quizás fuera contraproducente la eliminación de animales positivos a IDR, ya que se estarían eliminando los más resistentes.

II.5.4.1.2. Pruebas *in vitro*

II.5.4.1.2.1. Prueba de liberación de Interferón- γ (IFN- γ)

Se trata de una técnica laboratorial en la que se mide, mediante un test ELISA sandwich o de captura, la liberación de la citoquina IFN-γ por parte de los linfocitos T, tras ser estimulados con antígenos micobacterianos, mediante la utilización de un anticuerpo monoclonal frente a la misma, comparándose con la liberación de esta citoquina por los linfocitos T sin estimular (Wood *et al*., 1989; Billman-Jacobe *et al.*, 1992; Pérez *et al*., 1994b, 1999; Burrells *et al*., 1998; Waters *et al*., 2003). Esta técnica fue utilizada por primera vez en la especie humana (Gallati *et al.*, 1987), y posteriormente se desarrolló para el diagnóstico de la tuberculosis bovina (Rothel *et al*., 1990; Lauzi *et al*., 2000) y el de paratuberculosis (Wood *et al*., 1989; Billman-Jacob *et al.*, 1992;; Burrells *et al*., 1995; Corpa, 1999; McDonald *et al*., 1999; Pérez et al., 1999; Gowzdz *et al*., 2000b; Jungersen *et al*., 2002).

Los datos de sensibilidad y especificidad de la prueba varían en los diferentes estudios realizados. En bovino, empleando como antígeno la johnina, y al comparar con

el cultivo fecal, se obtuvo una sensibilidad del 71,8% en animales con infección subclínica y del 100% en casos clínicos de la enfermedad y una especificidad del 97,6% (Billman-Jacobe *et al.*, 1992). Sin embargo, en estudios posteriores se observó positividad tan solo en el 50% de los animales excretores de micobacterias (Stabel y Whitlock, 2001) y al utilizar como antígeno un preparado a partir de un sonicado de la célula de *Map* completa, la especificidad variaba entre el 88,7 y el 97,6% mientras que la sensibilidad se reducía al 40,7% (Robbe-Austerman *et al*., 2006). En este mismo estudio los valores eran más elevados (entre un 93,5% y un 98,3% de especificidad y una sensibilidad del 66,7%) al utilizar como antígeno la johnina.

Al relacionar los resultados de esta técnica con el tipo de lesión, en la especie ovina y caprina se ha observado mayor positividad en animales con lesión focal que en aquellos con lesión difusa, y dentro de este último tipo, el mayor número de animales positivos aparece entre aquellos que presentan lesiones linfocíticas o paucibacilares (Pérez *et al*., 1999; Corpa, 1999). Estos resultados apoyan a los encontrados por Burrells *et al* (1998, 1999) en los que animales con lesión tuberculoide expresaban mayor cantidad de IFN-γ que los que mostraban lesión lepromatosa. En este sentido, se ha observado que animales clínicamente enfermos, que habitualmente presentan lesiones difusas multibacilares, producen cantidades menores de esta citoquina que aquellos subclínicamente infectados, tanto en la ovina (Pérez *et al*., 1999), como en la especie bovina (Stabel, 1996; Sweeney *et al*., 1998; González, 2003; Balseiro, 2004)**.** En un estudio reciente llevado a cabo por Vázquez *et al*. (2013) también en bovinos, se ha observado que aquellos animales con lesiones focales se relacionaban con un resultado positivo al test de liberación de IFN-γ en el 36,8% de los casos, encontrando que la positividad a esta técnica aumentaba al incrementarse la gravedad de las lesiones, ya que los mayores niveles de liberación de IFN-γ se encontraron en los animales con lesión difusa, en concreto en una vaca con lesión difusa linfocítica y, por tanto, la polarización de respuestas Th1/Th2 ya explicada en el apartado de respuesta inmunitaria no fue tan marcada como se podría esperar.

La mayoría de estos resultados reflejarían la gran utilidad de esta prueba principalmente para la detección de animales infectados subclínicamente, bien de manera latente, bien de forma inicial. Así, permitiría identificar los animales potencialmente peligrosos para el resto del rebaño, antes incluso de que empiecen a eliminar micobacterias en heces (Stabel, 1996; Gwozdz *et al*., 2000b; Stabel, 2000;

Stabel y Whitlock, 2001; Huda *et al*., 2003) y antes de desarrollar la enfermedad, momento en el que algunos animales se volverían anérgicos (Hietala, 1992; Stabel, 1996; Gwozdz *et al*., 2000b; Stabel, 2000; Jungersen *et al*., 2002). Aunque un hecho a tener en cuenta, dada la estrecha relación existente entre la evolución de la infección y la respuesta inmune, es la posible existencia de falsos negativos, especialmente en aquellos animales en estadios avanzados de la enfermedad (Jungersen *et al*., 2002; Aranaz *et al*., 2006).

En estudios experimetales en los que se ha infectado a corderos con *Map* se ha puesto de manifiesto que esta prueba es la primera capaz de detectar la infección (Gwozdz *et al*., 2000b; Stewart *et al*., 2004; Begg *et al.*, 2005, Verna *et al*., 2007; Reyes, 2007; Delgado *et al*., 2012; Fernández *et al*., 2014a) y además se ha señalado que existe una relación entre la magnitud de la producción sistémica de IFN-γ de forma específica frente a antígenos de *Map* y la capacidad de controlar la infección (Gwozdz *et al.*, 2000a; Begg y Griffin, 2005). En este sentido, se ha observado una asociación negativa entre la respuesta inmune celular, medida por la liberación de IFN-γ y la futura producción de anticuerpos por parte de animales infectados experimentalmente, sugiriendo que la inmunidad mediada por células podría erradicar o controlar la multiplicación de *Map* en muchos animales (Mikkelsen *et al*., 2009).

Parece haber controversia en cuanto a la posible interferencia de la inoculación previa de tuberculinas aviar o bovina con la liberación posterior de IFN-γ. Mientras algunos autores no encuentran que la sensibilización previa mediante la IDR ejerza un efecto significativo sobre la eficacia del test del IFN-γ, al menos entre los 8 y 28 días posteriores a la postinoculación (Doherty *et al*., 1995; Ryan *et al*., 2000; Delgado *et al*., 2012), e incluso hasta los 65 días posteriores a esta (Gormley *et al*., 2004) en el caso de vacas infectadas por *M. bovis*, otros autores encontraron que la sensibilización previa que ocasiona la IDR estimularía la producción de IFN-γ en los días posteriores a la sensibilización, tanto en tuberculosis como en la paratuberculosis bovina, lo que dificultaría interpretar los test de IFN-γ (Rothel *et al*., 1992; Whipple *et al*., 2001; Stabel *et al*., 2007). Así, en un estudio realiado por Stabel *et al.* (2007) se valoró la producción de esta citoquina tras la IDR con PPD johnina por una vaca control, otra infectada subclínicamente y una tercera con clínica de paratuberculosis, obteniendo como resultado un incremento significativo en la secreción de IFN-γ del animal

subclínico, sobre todo tras 7 y 10 días posinoculación, mientras que no se observaron diferencias en la secreción en las vacas control y enferma. Según los autores, la sensibilización previa incrementaría la sensibilidad del test de IFN-γ, de tal manera que se podrían distinguir los animales subclínicamente infectados por *Map* de los controles no infectados. En cambio Rothel *et al.*, (1992) afirman que el incremento obtenido en la secreción de IFN-γ afectaría a la especificidad del test, sugiriendo no realizar dicha prueba en los animales durante al menos 59 días tras la IDR. En cualquier caso, las discrepancias en estos resultados se deberían a la heterogeneidad de los estudios en los que variaría la naturaleza de la infección, el número de animales empleados, el protocolo de IDR utilizado, o los criterios utilizados para la interpretación del test de IFN-γ (Gormley *et al*., 2004).

La prueba del IFN-γ tiene algunas limitaciones, entre las cuales cabe señalar su elevado coste económico y la rapidez con la que deben procesarse las muestras de sangre (Olsen *et al*., 2002), estimándose que para obtener resultados fiables las muestras han de ser estimuladas con las tuberculinas antes de las 8-12 horas posteriores a su extracción (Robbe-Austerman *et al.*, 2006). Además, al igual que la IDR, la infección por otras micobacterias aviares o ambientales puede interferir en la especificidad de esta prueba (Pérez *et al*., 1994b; Lauzi *et al*., 2000; Gwozdz *et al*., 2000b; Olsen *et al*., 2002) obteniéndose falsos positivos, para lo cual se han estudiado otros antígenos procedentes tanto de *Map* como de *Maa*, que sirvan para discriminar estas reacciones cruzadas así como la posible interferencia de la vacunación (Burrells *et al*., 1995; Olsen y Storset, 2001). En el caso de terneros jóvenes se ha observado una producción inespecífica de IFN-γ por parte de las células NK del sistema inmune innato (Olsen *et al*., 2005), lo que provocaría un incremento en la producción de esta citoquina a esta edad (McDonald *et al*., 1999; Olsen y Storset, 2001; Stewart *et al*., 2007), ofreciendo también falsos positivos. En la especie caprina, igualmente, la utilidad de esta técnica diagnóstica es discutida debido a que los resultados obtenidos son contradictorios, observándose una baja respuesta en animales jóvenes no infectados (Storset *et al.*, 2005) pero, contrariamente, la respuesta es elevada en animales adultos no infectados en un estudio experimental (Stewart *et al.*, 2006). En bovino también se pone en duda la utilidad de esta técnica como diagnóstica ya que no se la asocia con las formas inmunopatológicas más delimitadas ni con la detección de *Map*, y presenta una baja especificidad,

aconsejando restringir su uso para los programas de erradicación de la tuberculosis (Vázquez *et al*., 2013).

Recientemente, se ha utilizado un nuevo test, denominado ELISPOT, que ha mostrado una mayor sensiblidad, y que ha permitido diferenciar entre ovejas infectadas y no infectadas (Begg *et al*., 2009).

II.5.4.1.2.2. Test de transformación linfocitaria, Detección de la Interleuquina 2 (IL-2) e Inhibición de la migración linfocitaria.

Se trata de pruebas que en la práctica son de menor utilidad por su complejidad y porque los resultados que ofrecen no parecen compensar su utilización.

En el caso de la *transformación linfocitaria*, la prueba consiste en la demostración del efecto de transformación linfoblástica, es decir, de la regresión de linfocitos previamente sensibilizados a un estado de gran actividad nuclear, tras un segundo contacto con antígenos micobacterianos (Buergelt *et al*., 1977; Milner *et al*., 1981). Aunque se trata de una técnica con elevada sensibilidad, ya que se considera que detecta un alto número de animales infectados, más que la serología y el cultivo (Buergelt *et al*., 1977; Johnson *et al*., 1977) incluyendo aquellos animales con una pequeña carga bacteriana sin signos de infección (de Lisle y Duncan, 1981), es menos específica y se obtienen falsos positivos debido a reacciones cruzadas con otras micobacterias (Buergelt *et al*., 1977; Milner *et al*., 1981). Además se trata de una técnica laboriosa por la necesidad de trabajar con linfocitos vivos y con isótopos radiactivos.

La *detección de la interleuquina 2* se empleó inicialmente en el diagnóstico de tuberculosis en ciervos (Hesketh *et al*., 1993) utilizando cultivos de células mononucleares de sangre periférica, en los que se detectaba el grado de activación linfocitaria mediante el empleo de un anticuerpo frente al receptor de la IL-2 (IL-2R), cuya expresión está incrementada en los linfocitos activados en caso de que los ciervos sufrieran tuberculosis. Posteriormente, Whist *et al*. (2000) aplicaron la técnica al estudio de paratuberculosis midiendo la expresión del IL-2R en cabras infectadas con *Map*. Para

estimular los linfocitos y provocar la expresión de IL-2R, incubaban la sangre entera con un derivado proteico purificado de *Map* (PPD) durante 72 horas y la cuantificaban mediante el empleo de anticuerpos monoclonales inmunomarcados, siendo una técnica muy laboriosa, por lo que su uso no se ha generalizado.

La *inhibición de la migración linfocitaria* consiste en la valoración de la dispersión de un concentrado de linfocitos tras su incubación con un antígeno micobacteriano en una placa de agarosa (Bendixen, 1977). En los animales infectados, y por tanto, con linfocitos sensibilizados, el índice de migración debe ser menor que para animales no infectados, debido a que sus células producen un factor inhibitorio de dicha migración y tienden a quedar fijadas a la superficie en vez de extenderse como lo harían si no existiera dicha sensibilización (Bendixen, 1977; Sreenivasulu *et al*., 1986). Se ha empleado tanto para el diagnóstico de bovinos con infección subclínica sin éxito (Bendixen, 1977) como para detectar la respuesta inmune celular tras la vacunación en la especie ovina (Sreenivasulu *et al*., 1986).

II.5.4.2. Técnicas de diagnóstico basadas en la inmunidad humoral

Se trata de técnicas basadas en la detección de anticuerpos producidos por la infección por *Map*. Dentro de las más empleadas se encuentran *la inmunodifusión en gel de agar* y *la prueba de ELISA indirecto*. En general, las técnicas serológicas son muy utilizadas porque resultan económicas, fáciles de llevar a cabo y rápidas en la obtención de resultados (Juste y Aduriz, 1990b; Ridge *et al*., 1991; Kalis *et al.*, 2002). Se trata de pruebas con una elevada sensibilidad en animales clínicamente afectados, pero menor en animales en la fase subclínica de la enfermedad, por lo tanto no deberían sustituir, sino complementar a las pruebas de inmunidad celular para poder detectar animales dentro del rebaño en los distintas fases dentro de espectro inmunopatológico de esta enfermedad (Pérez *et al*., 1997, 1999; García Marín *et al*., 1999a; Stabel y Whitlock, 2001).

II.5.4.2.1. Inmunodifusión en gel de agar (IDGA)

Se basa en una reacción antígeno-anticuerpo en la que se enfrenta un suero problema frente a un antígeno, generalmente el antígeno protoplasmático PPA-3 de *Map*, de forma que si en el suero existen anticuerpos específicos se producirá una precipitación de los complejos antígeno-anticuerpo en el gel de agarosa, apareciendo una banda que se observa a simple vista (Juste y Aduriz, 1990b).

Se estima que posee gran especificidad, aproximándose al 100% (Colgrove *et al.*, 1989; Sherman *et al*., 1990; García Marín *et al*., 1992c; Juste *et al*., 1994; Whitlock, 1998; Gumber *et al*., 2006; Robbe-Austerman *et al.*, 2006). Sin embargo, no se considera una técnica de gran sensibilidad: en el ganado ovino, se han descrito sensibilidades entre un 8,3% y un 61,1% (Huchzermeyer y Bastianello, 1992; Dimarelli-Malli *et al*., 1992; García-Marín *et al*., 1992c; Pérez *et al*., 1994b; Hope *et al*., 2000; Sergeant *et al*., 2003; Gumber *et al*., 2006; Robbe-Austerman *et al.*, 2006), en ganado caprino entre el 39,5% y el 65,2% (Dimarelli-Malli *et al*., 1992; Gumber *et al*., 2006) y en ganado bovino entre un 18,9% y un 57% (Sherman *et al*., 1984; Colgrove *et al*., 1989; Sockett *et al*., 1992b; Ferreira *et al*., 2002). Se ha comprobado que hay una relación directa de la positividad a IDGA tanto con la presencia de casos clínicos como con la tasa de infección (Pavlik *et al*., 1999b) de forma que, en el ganado vacuno se ha encontrado un 96,9% de positividad entre los casos clínicos de paratuberculosis bovina (Sherman *et al*., 1984) y entre un 78 y un 94% en ovejas con pérdida de peso crónica (Hilbink *et al*., 1994; Dubash *et al.*, 1996; Clarke *et al*., 1996), o entre un 94% y un 100% en animales con lesiones difusas (Shulaw *et al*., 1993; Clarke *et al*., 1996; Pérez *et al*., 1997), cuando estas eran multibacilares ya que cuando se trataba de lesiones paucibacilares, el porcentaje de positividad se reducía notablemente. Por tanto, la IDGA parece ser una herramienta de gran utilidad para la identificación de animales grandes excretores de micobacterias y por tanto, los de mayor riesgo de difusión de la enfermedad al resto del rebaño (Clarke *et al*., 1996; Pérez *et al*., 1997; Gumber *et al*., 1996).

Ha sido una técnica muy utilizada durante años, debido a su bajo precio, su simplicidad y rapidez en obtener los resultados, sobre todo en ovino donde resulta un método muy específico y con razonable sensibilidad para detectar a las ovejas

infectadas en las últimas fases de enfermedad (Dubash *et al*., 1996). Aunque su uso ha ido reduciéndose, sobre todo por su baja sensibilidad en comparación con otras técnicas serológicas, recientemente se ha utilizado en un estudio sobre paratuberculosis en ciervos (Woodbury *et al*., 2008), o en estudios experimentales en cabras (Munjal *et al*., 2007).

II.5.4.2.2. ELISA indirecto

Se basa también en la reacción antígeno-anticuerpo, pero en este caso el antígeno específico de *Map* se encuentra unido a las paredes de un pocillo de la placa de polipropileno al que se le añade el suero problema. Tras el lavado de la placa se eliminan los anticuerpos que no se hayan unido de forma específica al antígeno y los que quedan unidos a este se ponen de manifiesto mediante un reactivo (anticuerpo o proteína con afinidad específica por las inmunoglobulinas) que lleva incorporado una enzima a la que se añade un sustrato, obteniéndose una reacción colorimétrica cuya densidad óptica es proporcional a la cantidad de anticuerpos unidos al antígeno de la placa.

Los antígenos más ampliamente utilizados para el ELISA de paratuberculosis son el PPA3 (Lyle y Merkal, 1983; Yokomizo *et al*., 1983a; 1983b; Hardin y Thorne, 1996; Pérez *et al.*, 1997; Garrido *et al.*, 1998a) y el lipoarabinomanano (LAM) (Sugden *et al*., 1989; Reichel *et al*., 1999). Así mismo, se han utilizado otros antígenos como A y D (Sugden *et al.*, 1988; Sugden *et al*., 1991), polipéptido recombinante a362 (Vannuffel *et al*., 1994), las proteínas constitutivas AhpC y AhpD, la secretada de 14kDa (Olsen *et al*., 2001a; Olsen *et al*., 2001b), proteínas de choque térmico o *heat shock proteins* (HSP) como la HSP65 y la HSP70 (Stevenson *et al*., 1991; Stevenson *et al*., 1992; Colston *et al*., 1994; Koets *et al.*, 2001), proteína de 35 kDa (Shin *et al*., 2004) y la IS900-glutatione-S-transferasa (Nakase *et al*., 2006) entre otros.

El reactivo que se añade posteriormente para unirse a los anticuerpos captados por los antígenos puede ser anti-IgG o anti-IgM (Clarke *et al*., 1996; Pérez *et al*., 1997) específicos de especie, o proteínas de alta afinidad por las inmunoglobulinas de diferentes especies como la proteína A o la G (Garrido *et al*., 1999, 2000a).

Como enzima suele utilizarse o peroxidasa de rábano o la fosfatasa alcalina (AP) y como sustrato orto-fenil-diamina (OPD), tetrametilbencidina (TMB), ácido sulfónico 2,2'-anzino-di(3-etil)benzotiazolina (ABTS), ácido aminosalicílico (ASA), o para-nitrofenil fosfatasa alcalina (PNPP) (Garrido *et al*., 2000a).

Los primeros en utilizar esta técnica fueron Jorgensen y Jensen (1978), tras lo cual el ELISA ha sufrido diferentes modificaciones encaminadas a aumentar su especificidad. La más notable fué la desarrolladas por Yokomizo *et al.* (1983) al proponer la preadsorción de los sueros a testar con *M.phlei*, lo que reduce las reacciones cruzadas con anticuerpos de otras micobacterias y otros microorganismos (Olsen *et al*., 2001a). Actualmente, el ELISA indirecto es la técnica serológica más utilizada (Harris y Barleta, 2001), debido a su bajo coste, rapidez, versatilidad, adaptabilidad y posibilidad de analizar un gran número de muestras (Jorgensen y Jensen, 1978; Juste *et al.*, 1990b; Collins *et al.*, 1993c; Collins, 1996; Pérez *et al*., 1997; Garrido *et al.*, 2000a; Collins, 2002).

En cuanto a su sensibilidad y especificidad, si se compara con otras técnicas serológicas, resulta más sensible y específica (Yokomizo *et al.*, 1991; Sockett *et al.*, 1992; Meylan *et al*., 1994; Sweeney *et al.*, 1995; Kalis *et al*., 2002). En general, las referencias sobre la sensibilidad de esta técnica son muy variables, dependiendo de los diferentes estudios, tanto por las modificaciones en la técnica realizadas como por las variaciones en los puntos de corte (Spangler *et al.*, 1992b; Ridge y Vizard, 1993; Collins y Sockett, 1993; Hope *et al*., 2000). Así, en bovino se estima que la sensibilidad varía entre el 15 y el 98% (Colgrove *et al.*, 1989; Milner *et al.*, 1990; Collins *et al.*, 1993c; Meylan *et al.*, 1994; Sweeney *et al.*, 1995; Garrido, 2001a; Pak *et al*., 2003; McKenna *et al.*, 2005b; Eda *et al*., 2006) y en pequeños rumiantes entre el 21,9 y el 100% (Juste *et al.*, 1988; Sugden *et al*., 1989; Molina *et al*., 1991; Dimarelli-Malli *et al*., 1992; Burnside y Rowley, 1994; Pérez *et al*., 1997; Hope *et al*., 2000; Sergeant *et al*., 2003; Gumber *et al.*, 2006). Al igual que en las otras pruebas de inmunidad humoral, la sensibilidad que presenta el ELISA se relaciona con el grado de excreción de micobacterias y el tipo de lesión, así cuanto mayor es el primero y más graves son las lesiones, más sensible es la técnica (Milner *et al*., 1990; Sockett *et al*., 1992; Billman-Jacobe *et al*., 1992; Ridge *et al*., 1992; Spangler *et al.*, 1992b; Collins *et al*., 1993c; Sweeney *et al.*, 1995; Clarke *et al*., 1996; Pérez *et al.*, 1997; Reichel *et al.*, 1999; García

Marín *et al*., 1999a; Pavlik *et al*., 2000b; Dargatz *et al.*, 2001a; Kalis *et al*., 2002; González, 2003; Sergeant *et al.*, 2003). Es por ello, que un resultado positivo a ELISA, se relacionaría con un animal infectado excretor de micobacterias en sus heces, permitiendo, por tanto, localizar los animales que eliminan grandes cantidades de micobacterias al medio ambiente (Whitlock *et al.*, 2000; Storset *et al*., 2001; Collins *et al*., 2005; Sweeney *et al*., 2006b; Stewart *et al.*, 2007) y con lesiones graves, difusas y multibacilares, caracterizadas por una eliminación fecal intensa de *Map* (Sockett *et al*., 1992; Sweeney *et al*., 1995; Pérez *et al*., 1997; García-Marín *et al*., 1999a; Kalis *et al*., 2002; Vázquez *et al.*, 2013) o incluso predecir cuando un animal va a convertirse en excretor, debido a que la detección de anticuerpos por esta técnica se realiza, generalmente, antes de que la eliminación de bacterias sea detectable (Nielsen, 2008). En este sentido, se ha comprobado que vacas positivas a ELISA tardan más tiempo en quedar preñadas, pierden más peso mientras crían los terneros y sus terneros presentan menos peso al nacimiento y a la edad de 250 días, al compararlas con vacas negativas a ELISA (Elzo *et al.*, 2009). En cambio, esta técnica se considera de eficacia limitada a la hora de detectar animales con infección subclínica, con valores de sensibilidad estimados entre el 15,8% y el 14,3% en individuos con lesiones focales y multifocales, respectivamente, en el ganado bovino (González, 2003), y del 12% y del 55% en el ganado ovino (Pérez *et al*., 1997).

Se considera que la especificidad del ELISA nunca sería inferior al 90% (Harris y Barleta, 2001). Los valores que ofrecen los diferentes estudios son parecidos, estimándose entre el 95 y el 99% en unos (Sergeant *et al*., 2003) y llegando al 100% en otros (Olsen *et al*., 2001b), si bien se considera, en general, que estos valores son inferiores con respecto a la IDGA (Pérez *et al*., 1997).

Al igual que se ha descrito para otras pruebas serológicas, la sensibilización previa de los animales mediante IDR podría interferir posteriormente en los niveles de anticuerpos séricos medidos mediante ELISA, y por tanto existiría el riesgo de obtener resultados falsos positivos, como así ha sucedido en tuberculosis caprina y bovina (Harboe *et al*., 1990; Gutiérrez *et al*., 1998). En el estudio llevado a cabo por Gutiérrez *et al*. (1998), se realizó un primer ELISA frente a tuberculosis bovina tanto en cabras infectadas como libres de tuberculosis previo a la inoculación de tuberculina aviar y se repitió dicha prueba 15 días después de la IDR, obteniéndose en este segundo caso una

mayor sensibilidad y especificidad que en el ELISA previo a la tuberculinización. En un estudio posterior, Varges *et al*., (2009) encontraron un incremento en la producción de anticuerpos anti-*Map* en 3 bovinos procedentes de un rebaño libre de paratuberculosis y tuberculosis entre los días 30 y 90 post-IDR, por lo que recomiendan un tiempo de espera de al menos 90 días después de la última IDR para poder obtener resultados fiables de diagnóstico de paratuberculosis mediante un test serológico. En el caso de la paratuberculosis, en el estudio experimental llevado a cabo por Delgado *et al*. (2012) tanto en corderos como en ovejas infectadas, se observa un incremento significativo de los niveles de anticuerpos séricos en un periodo de entre 15-20 días tras haberse llevado a cabo la IDR con PPD aviar.

El ELISA también se puede aplicar a muestras de leche (Sweeney *et al*., 1994b), incluso como indicador de la prevalencia de rebaños utilizando muestras de tanque (Nielsen *et al*., 2000b; Beyerbach *et al*., 2004; Hendrick *et al*., 2005b), pero se desaconseja su utilización en el diagnóstico de animales individuales (Hendrick *et al*., 2005b). Algunos autores afirman que parece mantener una concordancia con el ELISA en suero en cuanto a los resultados obtenidos por ambas técnicas (Sweeney *et al*., 1994; Winterhoff l*et al*., 2002; Klausen *et al*., 2003; Munjal *et al*., 2004; Salgado *et al*., 2005; Hendrick *et al*., 2005a; 2005b; Lombard *et al*., 2006; Fernández *et al*., 2014b), aunque hay estudios en los que no coinciden estos resultados al estudiar la concordancia de estas técnicas en muestras individuales (Hardin y Thorne, 1996). Por otra parte, se ha comprobado que la positividad aumenta en suero al final de la lactación, en leche al principio de la misma, y tanto en suero como en leche a partir del segundo parto (Nielsen *et al*., 2002a, b Kudahl *et al*., 2004).

II.6.TRATAMIENTO Y CONTROL

II.6.1. Tratamiento

Se han llevado a cabo estudios probando la eficacia de diferentes drogas frente a paratuberculosis como la rimino-fenacina, viomicina, diamino difenil sulfona, hidracida o estreptomicina, entre otras (Larsen y Vardaman, 1952, 1953; Larsen *et al*., 1953; Gilmour, 1966; Gilmour, 1968; Gilmour y Angus, 1971), la mayoría de las cuales habían tenido eficacia en el tratamiento de tuberculosis o lepra. En el caso de la paratuberculosis, se consiguió una mejora en la reducción de los signos clínicos pero sin embargo, el microorganismo seguía detectándose en heces. Igualmente se probó la aflatoxina, en hámsters infectados experimentalmente, consiguiéndose una reducción en el recuento de bacterias en tracto intestinal y nódulos linfáticos mesentéricos al compararlos con los no tratados (Larsen *et al.*, 1975b). En otros estudios, se comprobó que aunque durante tratamientos con la clofazimina (Merkal y Larsen, 1973) o con un combinado de estreptomicina, isoniacida y rifampicina (Slocombe, 1982) mejoraba la clínica de los animales, las presencia de lesiones y aislamientos de *Map* tras la necropsia, hizo que no se recomendara el tratamiento con estas sustancias. Incluso se probó el tratamiento con isoniacida en vacas de alto valor económico, el cual resultó efectivo en cuanto a que hicieron desaparecer de forma transitoria la sintomatología clínica, pero los animales continuaban excretando micobacterias tras el tratamiento (Baldwin, 1976). Este hecho se explicaría, al menos en parte, por la la dificultad mostrada por los fármacos antimicobacterianos para acceder a los compartimentos intracelulares del bacilo, teniendo en cuenta la multiplicación intracelular de *Map*, ante (Cocito *et al*., 1994; Aduriz *et al*., 2000).

Actualmente, la terapia antimicrobiana no se considera una opción viable para el tratamiento de la infección por *Map* porque resulta un procedimiento caro, es preciso administraresas sustancias durante un largo periodo de tiempo y cuando cesa el tratamiento la enfermedad recurre (Stabel, 1998) además de que no existe un único fármaco totalmente eficaz (Juste y Saez de Ocariz, 1990; St-Jean y Jeringan, 1991; Aduriz *et al.*, 2000). Además, debe de considerase que los animales tratados pueden ser una fuente de contagio para el resto de la explotación, por lo que únicamente en caso de

individuos con gran valor genético estaría recomendada esta práctica (St Jean y Jernigan, 1991).

Aunque en los últimos años se han seguido probando otros antibióticos como la monensina sódica (Hendrick *et al.*, 2006), con cuya administración se trató de evaluar la eficacia en la reducción de la eliminación fecal de *Map* en vacas lecheras sin grandes logros, los estudios más recientes han ido encaminados hacia la utilización de fagos antimicobacterianos o micofagos, de los que Emery y Whittington (2004) realizaron un estudio recopilatorio, aunque su uso en rumiantes con paratuberculosis es prematuro. Usando técnicas convencionales, se han aislado micofagos (lisogénicos) de diferentes especies de micobacterias incluída *M. avium* y de origen ambiental. Cuando han sido utilizados *in vitro*, los micofagos de micobacterias no patogénicas y de crecimiento rápido han actuado más eficientemente que los de aquellas micobacterias patogénicas de crecimiento lento. Aunque no se han utilizado micofagos para *Map*, la ubicuidad de los mismos predice que podrían ser aislados tanto de animales como del ambiente de lugares endémicos. Dichos fagos podrían ser liberados periódicamente desde micobacterias ambientales o incluso desde *Map* por efecto de la radiación ultravioleta de la luz solar. *Map* es susceptible de ser infectado por los fagos TM4 y ph60 (Emery y Whittington, 2004). La progresión de la enfermedad en granjas infectadas sugiere que ningún fago asociado a la actual población de *Map* interfiere en la evolución de la epidemia (Emery y Whittington, 2004). La terapia con fagos *in vivo* tiene sus limitaciones y no ha sido evaluada experimentalmente; además, en estudios *in vitro* se ha comprobado que la unión de estos sería extracelular, y por tanto se duda de su eficacia en el tratamiento de la paratuberculosis (Emery y Whittington, 2004).

II.6.2. Control

Las medidas de control frente a la paratuberculosis utilizadas hasta el momentoson fundamentalmente dos: por un lado, todas aquellas encaminadas a evitar la transmisión de la infección, y por otro, la vacunación. El primer método se ha basado en la eliminación de los rebaños de aquellos animales excretores, susceptibles de infectar al resto (Bakker *et al*., 2000; Kennedy y Benedictus, 2001). En este sentido, recientemente

se ha señalado que estos procedimientos deben complementarse con medidas de manejo, ya que, si éstas son correctas, la eliminación de los animales muy excretores sería efectiva en el control de la paratuberculosis pero en caso contrario, sería preciso también el sacrifico de los poco eliminadores (Lu *et al*., 2008). El otro procedimiento, la vacunación, utilizado desde principios del siglo XX, ha mostrado en diferentes estudios su utilidad en la reducción en la aparición de nuevos casos clínicos y la disminución de la excreción fecal, aunque aún sigue siendo un método cuyo empleo suscita una gran controversia en la especie bovina, entre otros factores por la interferencia con las pruebas de diagnóstico de tuberculosis, mientras que es muy utilizado en otras especies, en especial la ovina. (Nisbet *et al*., 1962; Juste y Casal, 1993; Pérez *et al*., 1995)

En cualquier caso, siempre es importante evitar la entrada de animales infectados a rebaños libres de paratuberculosis, para lo que se deben llevar a cabo estrictas medidas de control en el movimiento de ganado y establecer garantías sanitarias cuando se adquieren nuevos animales (Chiodini *et al*., 1984a), mediante el empleo de pruebas diagnósticas o haciéndolo de rebaños libres de paratuberculosis (Aduriz *et al.*, 2000).

II.6.2.1. Control mediante eliminación de animales infectados

El control mediante la eliminación de animales infectados ("test-and-cull"), utilizado sobre todo en la especie bovina, trata de eliminar de la explotación aquellos animales que estén infectados, especialmente los que excretan grandes cantidades de micobacterias, ya que son los que suponen una mayor fuente de contagio (Dorshorts *et al*., 2006). Sin embargo, se ha señalado que la eliminación de animales que excretan pequeñas cantidades de micobacterias podría ser más costosa que la infección que éstos causarían (Dorshorst *et al*., 2006) y para que este procedimiento de control sea efectivo, es necesario que las pruebas de diagnósitco utilizadas no se espacien mucho en el tiempo (Lu *et al.*, 2008).

Para llevar a cabo este método de control el principal problema es encontrar un método de diagnóstico eficaz (Aduriz *et al.*, 2000; Whitlock *et al*., 2000). En la actualidad se han descrito tres variantes de esta forma de control, en función,

precisamente del método de diagnóstico empleado: cultivo fecal, ELISA y PCR (Bastida y Juste., 2011). La lenta obtención de resultados, así como la baja sensibilidad de algunos de estos test son los principales problemas en el esfuerzo de controlar esta enfermedad (Kudahl *et al*., 2007).

Tradicionalmente, se ha utilizado el cultivo fecal (Rossiter *et al*., 1992; Whitlock *et al*., 1995; Ridge *et al*., 1995b; Rossiter y Burhans, 1996; Benedictus *et al*., 1999; Bendictus y Kalis, 2003; Sternberg y Viske, 2003). Sin embargo, los resultados obtenidos son muy dispares, habiéndose conseguido desde importantes disminuciones de la prevalencia en países como el Reino Unido (Wilesmith, 1982), Dinamarca (Jorgensen, 1983a), Holanda (Van Schaik *et al*., 1996), Francia (Guilbert *et al*., 1999), Suecia (Sternberg y Viske, 2003) así como en EEUU (Whitlock *et al*., 1994), hasta estudios en los que que la prevalencia ha aumentado (Rossiter *et al*., 1992; Whitlock *et al*., 1995; Pavlik *et al*., 2000). En general se acepta que es el método que detecta antes a los animales y con mayor sensibilidad (Zimmer *et al*., 1999; Whitlock *et a*l., 2000) si bien, como ya se ha citado, esta sensibilidad no es muy elevada en el caso de los animales infectados subclínicamente. Otro inconveniente es el tiempo necesario para conocer los resultados y su elevado coste. Como consecuencia del prolongado tiempo en obtener los resultados, el control de la enfermedad es lento y además, a lo largo de los años siguen apareciendo animales positivos incluso tras periodos de resultados negativos y sin signos clínicos (Bastida y Juste, 2011). Para solventar el problema del coste, se ha propuesto la utilización del cultivo fecal de lotes de anmales, que en el caso del ganado bovino deberían estar formados por cinco animales (Kalis *et al*., 2004) medida que en ganado ovino y caprino es necesaria porque de no ser así su coste sería prohibitivo (Bastida y Juste, 2011).

El ELISA como método de control para la eliminación de animales se considera muy específico pero con baja sensibilidad (Whitlock *et al*., 2000). Además, abarata los costes, es simple de llevar a cabo y con resultados más rápidos, lo cual le hace la herramienta ideal para el diagnóstico de laboratorio (Collins, 2006). Sin embargo, por el inconveniente mencionado de la baja sensibilidad, se suele emplear en combinación con el cultivo fecal (Rossiter *et al*., 1992; Whitlock *et al.*, 1995; Ridge *et al.*, 1995b; Bulaga y Collins, 1999; Aduriz *et al*., 2000), consiguiéndose incrementar el número de animales infectados. En un estudio realizado por Pavlik *et al.* (2000), utilizan la técnica

de ELISA junto con el cultivo fecal en los siete últimos años de los diez en los que se controló esta enfermedad en 5 granjas, consiguiendo disminuir la prevalencia de paratuberculosis en una de las granjas estudiadas, aunque en otras ésta se vío incrementada (Pavlik *et al*., 2000). Otros problemas añadidos a la utilización del ELISA que pueden afectar gravemente a los programas de control son las distintas eficacias de los diferentes *kits* comerciales (Garrido *et al*., 2002; Diéguez *et al*., 2009) y la influencia que el manejo de las muestras tiene sobre los resultados de esta técnica (Alinovi *et al*., 2009) La utilización de la técnica de la PCR a partir de materia fecal podría mejorar el inconveniente del elevado tiempo que precisa el cultivo (van der Giessen *et al*., 1992; Thoen y Haagsma, 1996) aunque debe tenerse en cuenta que podría detectarse ADN bacteriano en heces de animales que sin estar infectados han ingerido cantidades suficientes de micobacterias en un medio altamente contaminado (Sweeney *et al*., 1992a). En teoría, esta estrategia debería detectar a los animales positivos en las primeras fases de la infección, antes de que los animales desarrollen anticuerpos frente a *Map*, lo cual podría hacer que se redujera rápidamente la carga bacteriana de la granja (Bastida y Juste, 2011). No obstante, el coste de esta técnica es elevado y además requiere personal especializado, pero su gran sensibilidad, especificidad y rapidez en el diagnóstico la hacen una estrategia muy valiosa (Wells *et al*, 2006; Alinovi *et al*., 2009). Además, como el cultivo de heces, y a diferencia del ELISA, puede proporcionar resultados cuantitativos, de manera que los grandes y medianos eliminadores de bacterias por heces pueden ser eliminados. Al contrario que el uso de ELISA como técnica de diagnóstico para la eliminación de animales, la PCR no ha sido probada en condiciones de campo, pero se ha señalado que esta técnica de rápida detección, podría tener una gran importancia en aquellas granjas con deficientes medidas de manejo (Lu *et al*, 2008).

También se ha señalado que para evitar nuevas infecciones, habría que tener en cuenta el papel que juegan hospedadores de vida silvestre que pueden actuar como reservorios de paratuberculosis. En esta enfermedad, los conejos han sido identificados como animales claves en la persistencia de la paratuberculosis en el ambiente y un riesgo como fuente de infección para especies como los bovinos (Davidson *et al*., 2009). Mediante un modelo de simulación de la dinámica de la infección de *Map* en conejos silvestres, se ha medido el efecto que la población de conejos tendría en el control de la infección persistente en bovinos (Davidson *et al*., 2009), señalándose que

se necesitaría sacrificar más del 95% de la población de conejos para poder controlar la infección en bovinos, en el caso de la sustitución de los mismos de forma individual o por grupos sociales de una sola vez.

II.6.2.2. Control mediante medidas higiénico sanitarias

Combinados con otros procedimientos como la eliminación de animales excretores o la vacunación, es recomendable la instauración de medidas higiénico-sanitarias (Kalis *et al.*, 2001) para el control de la paratuberculosis, encaminadas a reducir el contagio al intentar disminuir el contacto directo entre animales susceptibles y animales excretores (Rossiter y Burhans, 1996).

Unas buenas medidas deben ir encaminadas a reducir la carga infectiva y limitar la introducción y transmisión de la enfermedad entre los animales, es decir, cortar el ciclo epidemiológico de *Map* (Juste y Saez de Ocariz, 1990; Kennedy y Benedictus, 2001). Se ha apuntado que el manejo higiénico-sanitario de los terneros constituye el punto crítico en un programa de control para reducir la tasa de infección. De su correcta aplicación dependerá la posibilidad de "erradicar" la paratuberculosis en un rebaño (Groenendaal *et al*., 2002). Además, para evitar la introducción de la infección en un rebaño libre de paratuberculosis se deben garantizar unas medidas sanitarias rigurosas así como controlar el movimiento del ganado, bien mediante pruebas diagnósticas, bien adquiriendo animales de explotaciones que estén libres de la enfermedad (Chiodini *et al*., 1984a; Aduriz *et al*., 2000; Carpenter *et al*., 2004).

Las medidas de manejo consisten en limpiar y desinfectar periódicamente las instalaciones (Merkal y Whipple, 1982) sobre todo los restos fecales, limpiar las salas de parto entre cada uso, separar los terneros de sus madres y alojarlos individualmente (Pavlik *et al.*, 2000; Kalis *et al*., 2001; Nielsen y Toft, 2007), alimentar a las crías con sustitutos lácteos (Meylan *et al*., 1996; Kalis *et al*., 2001) o con leche previamente pasteurizada (Stabel, 2001, 2008) o sometida a un tratamiento de 60ºC durante 60 minutos (Godden *et al*., 2006). Otras medidas importantes son la separación de los terneros de los animales adultos (Kalis *et al.*, 2001), ocupando instalaciones y pastos diferentes al menos hasta los seis meses de edad (Merkal *et al*., 1975; Sherman, 1985;

Collins *et al*., 1994; Goodger *et al*., 1996), o incluso de ser posible hasta los 12 meses de edad (Windsor y Whittington, 2010) así como el aislamiento de los animales con sintomatología clínica (Chiodini *et al.*, 1984a; Blood *et al*., 1989; Goodger *et al.*, 1996; Muskens *et al*., 2003a) y evitar el contacto de los purines con los animales, alimentos y bebida (Goodger *et al*., 1996).

En cualquier caso, se ha señalado que aunque la erradicación de la paratuberculosis bovina es un objetivo aún no conseguido con los conocimientos actuales, para lograr la disminución de la prevalecia se estima crucial aplicar estrictas medidas de manejo y contar con la concienciación e implicación de los ganaderos y veterinarios (Benedictus y Kalis, 2003; Kennedy *et al*., 2006).

II.6.2.3. Control basado en la vacunación

La vacunación se ha señalado como un método exitoso en el control de la paratuberculosis, capaz por sí solo de eliminar la enfermedad de una explotación. Los primeros ensayos de vacunación frente a la paratuberculosis fueron realizados en 1926 por Vallée y Rinjard, quienes inmunizaron bovinos mediante la inyección subcutánea de una suspensión con una cepa viva no virulenta de *Map* que se había reconstituido en parafina líquida, aceite de oliva y aceite de piedra pómez (Vallée y Rinjard, 1926). Pocos años más tarde, en Francia, Vallée *et al*., (1934) inmunizaron con esta vacuna 35.000 vacas de 895 granjas, no encontrando enfermedad en ninguna de la 6850 vacas correctamente vacunadas. Igualmente, en una experiencia realizada durante 7 años con una vacuna similar elaborada con una cepa canadiense atenuada, se vacunaron 118 granjas de Reino Unido desde 1946; se comparó la infección antes y después de la vacunación, señalando que los ganaderos quedaron muy satisfechos por la notable reducción clínica conseguida (Spears, 1959; Doyle, 1964). Este criterio fue ratificado posteriormente por Stuart (1965) y Wilesmith (1982) en estudios con la misma vacuna. Además, la primera vacuna descrita se aplicó con gran éxito de nuevo en Francia (Saint-Marc *et al*., 1992), y, con ligeras modificaciones, en otros países europeos como Dinamarca (Jorgensen, 1983b) y Holanda (Huitema, 1967; Benedictus *et al*., 1988; Kalis *et al*., 1992), así como en Australia (Hill, 1989) dando buenos resultados.

A pesar de que en bovino se empieza a estudiar sobre vacunación de paratuberculosis en 1926 (Vallée y Rinjard, 1926), en ovino no es hasta 1960 cuando se publica el primer trabajo acerca de vacunación (Sigurdsson, 1960) y en caprino, aunque se sabe que en los años 70 ya se realizaban estudios con esta especie en España (Juste y Bastida, 2011), no es hasta 1985 cuando se publica el primer trabajo llevado a cabo en Noruega (Saxegaard y Fodstad, 1985).

La mayoría de vacunas aplicadas frente a paratuberculosis, desde esta primera descrita hasta la actualidad, han estado constituidas por bacilos paratuberculosos, ya sean atenuados o inactivados, y diferentes adyuvantes oleosos. Según algunos autores, estos últimos serían los responsables de la formación de un nódulo subcutáneo en el sitio de inoculación (Juste y Sáez de Ocáriz, 1990; Köhler *et al*., 2001) señalado como un importante efecto adverso de la vacunación. Precisamente, ya en la primera vacuna de Valleé y Rinjard (1926), la idea consistía en crear un foco de infección delimitado pero persistente, que permitiera aprovechar el fenómeno de Koch para crear un estado de inmunización, capaz de prevenir el establecimiento de una futura infección (Juste y Saez de Ocariz, 1990), que en este caso protegería frente a la colonización del intestino por *Map*.

La vacunación está basada en los principios de especificidad y memoria de la respuesta inmune adaptativa. De esta forma, la reacción inmunológica resultante de un segundo contacto con un antígeno será más rápida y efectiva que la respuesta primaria (Playfairm 2001). La respuesta más eficaz contra *Map*, parásito intracelular, es la respuesta inmune celular, por lo que las vacunas contra la paratuberculosis deberían garantizar, entre otros factores, la participación de macrófagos activados capaces de destruir al bacilo en el foco de infección (Collins, 1974; Gwozdz *et al*., 2000b). Por tanto, la vacuna “ideal” frente a esta enfermedad debería poder inducir una fuerte respuesta protectora de tipo Th1, capaz de controlar la diseminación de *Map* (Bretscher *et al*., 2002).

La vacunación no requiere la eliminación de ningún animal de la explotación, aparte de los clínicamente afectados, cuya eliminación inmediata es necesaria para que resulte exitosa la vacuna; además, su utilización no interfiere con la rutina normal de la granja. (Doyle, 1964).

Se ha comprobado que la vacunación no previene la infección de los animales (Brotherson y Gilmour, 1961b; Nisbet *et al*., 1962; Larsen *et al*., 1974; García Marín *et al*., 1988; 1995b; Kalis *et al.*, 1992; Wentink *et al*., 1992; Wentink *et al*., 1994; Juste *et al*., 1994; Kalis *et al*., 2001; Windsor et al., 2003; García-Pariente *et al*., 2002, 2005; Reddacliff *et al.*, 2006; Reyes, 2007), sin embargo reduce el número de animales infectados clínica y subclínicamente (Juste *et al*., 2002) logrando una disminución de la excreción de micobacterias en heces. Además, induce una limitación de las lesiones en los animales infectados, de forma que, cuando aparecen, son de tipo tuberculoide o focales, localizadas en el tejido linfoide asociado al intestino, formadas por granulomas de pequeño tamaño, demarcadas por tejido conjuntivo, con células gigantes, escasa necrosis y calcificación y con pocas micobacterias, a diferencia de los animales no vacunados en los que estas lesiones podrían extenderse hasta la lámina propia originando una enteritis grave (Nisbet *et al*., 1962; Gilmour *et al*., 1965; Juste *et al*., 1994; Pérez *et al*., 1995; García Marín *et al*., 1995c; 1997; Reyes, 2007).

Son numerosos los estudios que recogen una reducción en la sintomatología asociada a la paratuberculosis en rebaños donde se ha vacunado (Wilesmith, 1982; Merkal, 1984; Chiodini *et al*., 1984a; Saxegaard y Fodstad, 1985; Benedictus, 1988; Argenté, 1992; Cranwell, 1993; Aduriz, 1993; Wentink *et al*., 1994; Pérez *et al*., 1995; van Schaik *et al*., 1996; Fidriksdottir *et al*., 2000; Gwozdz *et al*., 2000a; Harris y Barletta, 2001; García Pariente *et al*., 2002; García Pariente *et al*., 2005; Griffin *et al*., 2009), en la excreción de *Map* por heces (Hurley y Ewing, 1983; Jorgensen, 1983b; Chiodini *et al*., 1984a; Leslie *et al*., 1988; Körmendy, 1994; Kreeger, 1991; Argenté, 1992; Dimarelli-Malli *et al*., 1997; Mohr, 2000; Harris y Barletta,; 2001; Eppleston *et al*., 2004, 2005; Garrido *et al*., 2005; Patton *et al*., 2006; Reddacliff *et al*., 2006; Toribio *et al*., 2007; Singh *et al*., 2007; Griffin *et al*., 2009; Juste *et al.*, 2009a; Eppleston *et al*., 2011; Hüttner *et al.*, 2012; Alonso-Hearn *et al*., 2012; Dhand *et al*., 2013; Knust *et al*., 2013; Singh *et al.*, 2013; Tewari *et al*., 2014; Windsor *et al*., 2014), así como en la colonización de tejidos intestinales tras su exposición a *Map* (Brotherston y Gilmour, 1961b; Nisbet *et al*., 1962; Hore *et al*., 1971; Aduriz, 1993; Juste *et al*., 1994; van Schaik *et al*., 1996; Uzonna *et al*., 2003; Hines II *et al.*, 2007a; Kathaperumal *et al*., 2008;2009; Sweeney *et al*., 2009; Alonso-Hearn *et al*., 2012). Asimismo, la inyección subcutánea de vacunas induce respuestas inmunes periféricas celular y humoral en los animales vacunados (Juste *et al*., 1994; Corpa *et al*., 2000c; Geijo, 2007¸Reyes, 2007).

Igualmente, la vacunación reduce la mortalidad debida a esta enfermedad, observándose una disminución de las muertes debidas a paratuberculosis entre los animales vacunados con respecto a los controles (Xenos *et al*., 1988; Aduriz *et al*., 1995; Corpa *et al.*, 2000b; García Pariente *et al.*¸2002, 2005; Windsor *et al*., 2003; Eppleston *et al*., 2004; Reddacliff *et al*., 2006;), con una disminución de la frecuencia de presentación de lesiones histopatológicas graves (Corpa *et al.*, 2000b; García Pariente *et al*., 2002, 2005; Reddacliff *et al*., 2006).

En la estimación de la reducción de excretores fecales, entre animales vacunados y no vacunados, y aunque existen estudios que señalan que no hay diferencias (Kalis *et al*., 2001), la mayoría ha puesto de manifiesto una clara disminución en el número de excretores de *Map* por heces. En bovino, Jorgensen (1983b) observa una reducción del 96,9%, Garrido *et al.*, (2006), del 55% al 3,6% en un año, o incluso se citan reducciones del 100% (Juste *et al.*, 2009). En ovino, Reddacliff *et al.* (2006) ofrecen valores del 90%, o del 50% en otros estudios tras tres años de experiencia (Eppleston *et al*., 2005). En el caso del ovino, además, se ha comprobado que la vacunación retrasa la edad a la que comienzan a eliminarse bacterias en heces (Eppleston *et al.*, 2004), cifrándose este retraso en 12 meses, cuando la vacunación se realiza a los 3 meses de edad. El efecto de la vacunación sobre la infección subclínica, sin embargo, aunque también ofrece valores significativos, es menor que sobre los animales que manifiestan clínica (Reddacliff *et al*., 2006).

Por lo tanto, el principal beneficio de la vacunación es económico, al reducirse notablemente las pérdidas que esta enfermedad provoca (Larsen, 1973; Gilmour, 1976; Benedictus, 1984; Merkal, 1984; Juste y Sáez de Ocáriz, 1990), lo que ha llevado a que en algunos países como Islandia la vacunación de las corderas de reposición sea obligatoria a los cuatro meses de edad desde el año 1966 (Pálsson, 1962; Fridriksdottir *et al*., 2000) y donde se plantean dar por terminado el programa de vacunación en aquellas zonas donde no se diagnostica la enfermedad desde hace más de diez años (Fridriksdottir *et al*., 2000).

II.6.2.3.1. Tipos de vacunas

La primera vacuna utilizada frente a la paratuberculosis en 1926 (Vallée y Rinjard, 1926) se elaboró con una cepa viva avirulenta de *Map*, empleando parafina líquida, aceite de oliva y piedra pómez como adyuvante. Fue probada en ganado bovino, comprobándose que resultaba inofensiva y eficaz para controlar la enfermedad, por lo que fue recomendado su uso junto al sacrificio de los animales enfermos (Vallée y Rinjard, 1934). Años más tarde se realiza un experimento utilizando una vacuna viva similar, elaborada con bacilos apatógenos de la cepa Nº II en el Central Veterinary Laboratory de Weybridge (Reino Unido) suspendidos en parafina, administrada a terneros y cabras con una dosis 6 veces mayor (30 mg) a la utilizada anteriormente para comprobar su seguridad y eficacia, consiguiéndose resultados positivos en ambos casos (Doyle, 1945). Experiencias con esta misma vacuna ratificaron estos resultados (Spears, 1959; Doyle, 1964; Stuart, 1965b; Wilesmith, 1982; Hill, 1989).

Además del empleo de otras vacunas vivas atenuadas (Larsen *et al*., 1964; Crowther *et al* 1976; Saxegaard y Fodstad, 1985; Aduriz, 1993; Gwozdz *et al*., 2000a; Begg y Griffin, 2005) también se han utilizado vacunas inactivadas (Sidgurdsson y Ttyggvadóttir, 1949 y 1950; Sidgurdsson, 1960; Huitema, 1968; Larsen *et al*., 1978; Chiodini *et al*., 1984a; Benedictus *et al*., 1988; Leslie *et al*., 1988; Wentink *et al*., 1992; Kalis *et al*., 1992; Aduriz, 1993; Körmerdy, 1994; García-Pariente *et al*., 2002; Reddacliff *et al*., 2006; Reyes, 2007; Sweeney *et al*., 2009; Eppleston *et al*., 2011; Alonso-Hearn *et al*., 2012; Hüttner *et al*, 2012; Dhand *et al*., 2013; Knust *et al*., 2013; Hines II *et al*., 2014; Tewari *et al*., 2014; Windsor *et al*., 2014) con resultados exitosos.

Todas estas vacunas se encuentran suspendidas generalmente en una emulsión, de aceite mineral en agua, por ser un adyuvante capaz de inducir una respuesta inmune mayor y más persistente, aunque su uso lleve a otros inconvenientes como la formación de un nódulo subcutáneo fibrocaseoso en el lugar de inoculación, que puede alcanzar un tamaño considerable e incluso ulcerarse (Doyle, 1964; Chiodini *et al*., 1984a¸Aduriz *et al*., 2000; Köhler *et al*., 2001; Reyes, 2007).

En la actualidad existen tres vacunas comercializadas en diferentes países: Neoparasec®, Gudair® y Mycopar®. La primera de ellas se desarrolló en la década de

los años 80 del siglo XX y es una vacuna viva atenuada elaborada a partir de la cepa 316F de Weybridge con un adyuvante oleoso y una concentración de bacterias de $3x10^9$ unidades viables por mililitro de vacuna. Su empleo ha ofrecido buenos resultados tanto en la especie bovina (Jorgensen, 1983b; Argenté, 1992; Köhler *et al*., 2001; Klawonn *et al*., 2002) como en las especies ovina (Hilbink y West, 1990; Juste *et al*., 1994; Pérez *et al*., 1995; Sommervile *et al*., 1995; Gwozdz *et al*., 2000a; Begg y Griffin *et al*., 2005) y caprina (Marly *et al.*, 1988). La vacuna Gudair® está producida en España y se presentó en el mercado en los años 90, habiendo sido utilizada ampliamente en ovino y caprino (Tellechea *et al*., 1993; García Marín *et al.*, 1995c; 1997, 1999; Corpa *et al*., 2000c; Kennedy y Allworth, 2001; García-Pariente *et al*., 2002, Thompson *et al*., 2002; Windsor *et al*., 2003; Eppleston *et al*., 2004, 2005; 2011; Reddacliff *et al*., 2006; Toribio *et a*l., 2007; Reyes, 2007; Singh *et al*., 2007; Griffin *et al.*, 2009; Hüttner *et al*., 2012; Dhand *et al*., 2013; Windsor *et al*., 2014). Se trata de una vacuna elaborada con la misma cepa que la anterior, con 2,5 mg de bacilos desecados, inactivada por calor y presentando como adyuvante un aceite mineral altamente refinado en emulsión múltiple así como Thiomersal como conservante. Esta vacuna, además se encuentra registrada en Australia y Nueva Zelanda. En este último país se hizo un estudio comparativo de la eficacia de las dos vacunas, encontrando que la extensión de las lesiones halladas en los animales vacunados con Gudair® se reducía más rápidamente que en los grupos vacunados con la vacuna viva (Thompson *et al*., 2002). En Estados Unidos además, se comercializa Mycopar®, una vacuna inactivada elaborada con la cepa 18 de *Mycobacterium avium* subespecies *avium* y que ha sido utilizada para estudios en bovino (Patton *et al*., 2006; Tewari *et al*., 2014) y ovino (Thonney *et al*., 2005).

Se han realizado varias experiencias para comparar la eficacia de las vacunas vivas atenuadas y las inactivadas, demostrando que no existen grandes diferencias entre ambas (Larsen *et al*., 1964; Wilesmith, 1982; Marly *et al*., 1988; García Marín *et al.*, 1999). Se ha encontrado en ambos casos una acentuada disminución de los casos clínicos en ovinos adultos tras la vacunación, y la no aparición de estos casos cuando la vacuna se administraba a corderas de reposición (Aduriz, 1993; Pérez *et al*., 1995a). Sin embargo, las vacunas muertas presentan la ventaja de que en el caso de aislar bacilos paratuberculosos en los nódulos linfáticos mesentéricos o intestino se sabría que estos son debidos a una infección natural. Igualmente, en estas vacunas el bacilo no puede mutar y convertirse en virulento, siendo los productos inactivados menos propensos a

transformarse durante el almacenamiento que los productos vivos y no se produce una infección persistente con la cepa vacunal (Larsen *et al*., 1978; García Marín *et al*., 1999).

En los últimos años, y para intentar soslayar algunos de los efectos adversos de la vacunación, se han diseñado nuevos productos vacunales. Se ha valorado el empleo de antígenos secretados por la micobacteria, que podrían tener la capacidad de proteger como vacunas acelulares o de subunidades, debido a su rápida y buena presentación al sistema inmune (Weldingh *et al*., 1998; Mullerad *et al.*, 2003). Entre los más prometedores objetivos está la thiol-peroxidasa de 16,7kDa que induce liberación de IFN-γ por parte de las células de memoria efectoras que conducen a una hipersensibilidad retardada (Weldingh *et al*., 1998). Esta proteína fue identificada, expresada y purificada más tarde por Mullerad *et al*., (2003) y una vez recombinada, se ha comprobado que induce una elevada producción de IFN-γ, IL-6 y óxido nitrico (NO), y al añadir Ribi como adyuvante la expresión de NO aumenta mientras que la de IFN-γ disminuye; las reacciones de hipersensibilidad retardada en ratones sólo se observaban con la vacuna adyuvada, consiguiendo, además, un mayor título de anticuerpos (Mullerad *et al*., 2003). Las vacunas de DNA, que consisten en genes que codifican antígenos clonados en vectores de expresión de mamíferos (plásmidos) provocan una respuesta modulada por linfocitos CD4+ colaboladores y CD8+ T citotóxicos y generan una inmunidad protectiva en modelos animales (Donnely *et al*., 1995; Gurunathan *et al*., 2000a; Gurunaihan *et al*., 2000b; Modlin, 2000; Velaz-Faircloth *et al*., 1999; Cai *et al*., 2005; Donnely *et al*., 2005). Además, se han probado vacunas de proteínas y DNA, que expresan un solo antígeno micobacteriano, y se ha visto que inducen una protección parcial frente a *M. tuberculosis* (Andersen, 1994; Huygen, 2003; Kamath *et al*., 1996), *M. bovis* (Cai *et al*., 2005), *M. leprae* (Martin *et al*., 2001) y *M. avium* (Velaz-Faircloth *et al*., 1999; Kamath *et al*., 1996). El primer estudio de vacunas de ADN como método de protección frente a la infección por *Map* fue realizado con una biblioteca de expresión génica (Huntley *et al*., 2005). La técnica consiste en la obtención de lotes de clones con secuencias protectoras mediante la digestión con enzimas de restricción del ADN genómico de *Map.* Entre los lotes probados, cuatro resultaron eficaces debido a que producían una disminución en el número de colonias en el cultivo de órganos de ratones infectados contras la vacunación (Huntley *et al*., 2005). Se han probado vacunas con proteínas de *Map*, como la 85B homóloga a la 85 del complejo *M. tuberculosis*, que

induce una alta producción de IFN-γ, IL-6, IL-10 y NO, al igual que una proliferación de células esplénicas cuatro veces mayor en los ratones vacunados que en los utilizados como control (Mullerad *et al*., 2002a). El mismo grupo investigador, probó además la proteína superóxido-dismutasa de *Map*, en este caso valorando la producción por parte de los ratones inmunizados de IFN-γ, TNF-α e IL-6 (Mullerad *et al*., 2002b). Al añadir un adyuvante denominado Ribi, aumentó la producción de las dos primeras linfoquinas, pero disminuyó la de IL-4, IL-10 y óxido nítrico. Quinn *et al*. (2002) clonaron seis antígenos micobacterianos en plásmidos de expresión mamíferos y de ellos, utilizaron los plámidos que codificaban para el antígeno 85A de *M. bovis* (p85A-BCG) que inducía una respuesta Th-1; otro antígeno usado por estos autores fue el 85B de *M. avium* (p85B-Mav) que induce una fuerte respuesta inmune y podría servir como candidato para futuras vacunas acelulares. Igualmente, Sechi *et al*. (2006) describieron por primera vez la evaluación *in vivo* y confirmación de la capacidad protectiva de diferentes vacunas de DNA elaboradas frente a *Map* en ovino. Consistían en tres plásmidos que expresaban las proteínas de 65kDa de *Map* (pHsp65), la 85A de *M. avium* (p85A-Mav) y el antígeno 85A de la BCG (p85A-BCG). Las vacunas con estos plámidos que codifican antígenos micobacterianos provocaban incrementos de expresión de IFN-γ mayores que los vacunados con Gudair® a los 90 días post-vacunación, sobre todo por parte de los plásmidos p85A-Mav y p-Hsp65. No obstante, este incremento era mayor con los plásmidos p85A-BCG y pHsp65 a los 90 días tras la infección de los animales. Igualmente, en los animales vacunados con las vacunas de ADN no se observaron lesiones histológicas asociadas a *Map*, a diferencia de los animales no vacunados o vacunados con Gudair® (Sechi *et al*., 2006). No obstante, las vacunas de ADN se han usado en ratones, humanos y ovejas, pero no en vacas (Velaz-Faircloth *et al*., 1999; Huntley *et al*., 2005; Sechi *et al*., 2006; Bull *et al*., 2007;Park *et al*., 2008; Kadam *et al*., 2009).

Se ha creado una nueva vacuna con la proteína recombinante Hsp70 que, junto a un adyuvante, provoca una disminución significativa en la eliminación de bacterias por heces por parte de vacas infectadas con *Map*, además de su no enmascaramiento de métodos de diagnóstico (Keeble y Walker, 2009), como se ha citado también en el caso de la tuberculosis (Santema *et al*., 2009). Sin embargo, en los primeros estudios realizados con fracciones de bacterias, Larsen *et al* (1978) y Hurley y Ewing (1983), al comparar vacunas de bacilos completos con vacunas de bacilos fraccionados

comprobaron que resultaban más eficaces las primeras. El principal problema de las vacunas de subunidades es que activan un restringido número de clones de células T y necesitan la adicción de un adyuvante para obtener la activación de un largo repertorio de células T (Kaufmann, 2000 y 2001). En cualquier caso, este tipo de vacunas elaboradas con subunidades, sonicados de bacterias, fracciones de la pared celular o fracciones recombinantes, se ha visto que tienen menor grado de protección (Koets *et al.*, 2006; Kathaperumal *et al*., 2009).

II.6.2.3.2. Adyuvantes

En general, la cepa vacunal no parece influir demasiado en el resultado final de la vacunación. No así el tipo de formulación o el adyuvante, que ha resultado de importancia en algún experimento en el que se han comparado diferentes formulaciones (Uzonna *et al*., 2003).

Tradicionalmente, los adyuvantes han sido utilizados con el fin de obtener una respuesta inmune rápida, intensa y duradera; sin embargo, en los últimos años su importancia radica en la necesidad de incrementar la inmunogenicidad de las vacunas sintéticas, purificadas o de subunidades con escaso poder inmunizante, así como para conseguir respuestas más selectivas para un isotipo determinado de inmunoglobulina, MCH de tipo I ó II y células T- colaboradoras tipo Th1 o Th2 (Gupta y Siber, 1995). Con los adyuvantes, además, se evitarían las revacunaciones y se contribuiría a incrementar la respuesta inmune de ciertos hospedadores, como aquellos infectados con el VIH o que padezcan otras enfermedades emergentes (Gupta *et al*., 1996).

Entre la multitud de adyuvantes que existen, las emulsiones oleosas son las más frecuentemente utilizadas en las vacunas frente a *Map* (Bastida y Juste., 2011). Entre ellos, se encuentra el Montanide® ISA 266 (Imcomplete Seppic Adjuvant) (Seppic, Francia), adyuvante utilizado en la elaboración de Silirum®, la vacuna que se ha empleado en el estudio de esta Tesis Doctoral, que es una emulsión oleosa inmunoestimulante, es decir, capaz de inducir una respuesta inmune con reacciones adversas menores (Hanly *et al*., 1995). Como surfactante suele utilizarse el oleato de manitol, altamente purificado y libre de contaminantes (Hanly *et al*., 1995). De forma

general, estos adyuvantes se utilizan formando emulsiones con una solución acuosa del antígeno (Hanly *et al*., 1995). En un estudio llevado a cabo por Reyes (2007), se comparó, precisamente, la lesión local en el punto de inoculación y la respuesta inmune periférica provocada por tres adyuvantes añadidos a la cepa inactivada de la vacuna comercial Gudair®: el incluido en la propia vacuna, el Montanide® ISA 266 y por otro adyuvante del mismo grupo, el Montanide® IMS 1312. Este último no es un adyuvante oleoso, sino que se trata de una formulación acuosa dispersable que contiene compuestos orgánicos inmunológicamente activos y excipientes específicos, definida como nanopartículas (entre 0-500 nm de diámetro), en base acuosa combinadas con un nuevo estimulante registrado como una sustancia "GRAS" (Generally Recognize As Safe) diseñado con requerimientos específicos que produce reacciones inmunes humorales rápidas, intensas, de corta y larga duración, así como mediadas por células y que utilizado en porcino no produce reacciones locales ni fiebre a diferencia de otras vacunas comerciales (Seppic, 1999). En el trabajo de Reyes (2007) al vacunar 40 corderos de 30 días se concluyó la mayor idoneidad de los adyuvantes de Gudair® y el adyuvante Montanide® ISA 266 frente a Montanide® ISM 1312 debido a que este último inducía una respuesta celular débil y de corta duración, por lo que no sería eficaz frente a la infección por *Map,* y asociada a la formación de un nódulo vacunal caracterizado por la grandes depósitos de micobacterias sin relación con el adyuvante y de involución rápida (Reyes, 2007). Sin embargo los otros dos adyuvantes estudiados proporcionaban nódulos vacunales perceptibles a los 7 días post-vacunación (dpv), aumentando de tamaño progresivamente y permaneciendo de forma casi constante hasta más allá de los 240 dpv. Aunque el tamaño era menor en el nódulo inducido por el Montanide® ISA 266, en su estudio histológico se observaba una mayor proporción de linfocitos y células gigantes, con menos necrosis y una mejor distribución del antígeno que en los provocados por el adyuvante de Gudair®, atribuible a sus componenetes más refinados y biocompatibles (Reyes, 2007). Además el adyuvante Montanide® ISA 266 indujo una respuesta celular más intensa que el adyuvante de Gudair® frente a la PPD aviar en la prueba de la intradermorreacción así como una diferencia más acentuada entre la respuesta frente a este antígeno y a la PPD bovina, y además proporcionó una mayor restricción lesional al tejido linfoide (Reyes, 2007).

II.6.2.3.3. Pautas vacunales

Se han llevado a cabo diferentes ensayos para conocer cuál es la edad más propicia para vacunar los animales frente a paratuberculosis. En un gran número de estudios, se ha aplicado la vacunación en el primer mes de vida del animal, debido a que es entonces cuando la posibilidad de infectarse es mayor (Doyle, 1960; Stuart, 1962; Stuart, 1965b; Larsen *et al*., 1964; Sherman, 1985) y en el que la inmunización parece ser más eficiente (Larsen *et al*., 1964; Aduriz, 1993). No obstante, ya en el primer estudio llevado a cabo por Vallée *et al.* (1934) se vacunaron animales de todas las edades, con buenos resultados. También en Islandia, se aplicó la vacuna a animales de 10 meses de edad (Sigurdsson y Tryggvadóttir, 1949, 1950) o a los 4-6 meses en un estudio posterior (Sigurdsson, 1960), obteniéndose una importante reducción de las pérdidas económicas. En un estudio realizado con corderos y cabritos, se comprobó que aquellos vacunados a los 4-5 meses de vida presentan una respuesta inmune más intensa que aquellos vacunados a los 15 días de edad, con una producción de INF-γ más elevada y persistente y con una producción de anticuerpos más temprana, intensa y duradera, (Corpa *et al*., 1999a; Corpa *et al*., 1999b) sugiriéndose que sería debido a que a los 15 días de edad los animales presentan un desarrollo incompleto del sistema inmune (Corpa *et al*., 2000b). No obstante, en este estudio no se comprobó la respuesta de los animales frente a la infección.

En este sentido, se ha comprobado que la vacunación de animales adultos en rebaños infectados reduce significativamente el tiempo necesario para el control de la paratuberculosis (Crowther *et al*., 1976; Aduriz, 1993; Pérez *et al*., 1995a; Corpa *et al.*, 2000; García Pariente *et al.*, 2003). En la especie bovina, la mayor parte de las experiencias con vacunación se han llevado a cabo en animales jóvenes (Wentink *et al*., 1994; Van Schaik *et al*., 1996; Koets *et al*., 2006; Patton *et al.*, 2006; Geijo, 2007; Kathaperumal *et al*., 2008; Sweeney *et al*., 2009), si bien cuando se han vacunado animales adultos (Juste *et al.*, 2009; Garrido *et al.*, 2013) se ha mostrado eficaz.

Además, parece que la edad de vacunación estaría en relación con un factor que se ha estimado que puede explicar el fallo de una vacuna, como es la relación entre el momento de la vacunación y la exposición a *Map.* En la mayoría de los casos, cuando se vacuna animales a edad temprana, se estima que el contagio se produciría antes,

incluyendo la vía trasplacentaria, o al mismo tiempo que la vacunación (Sweeney *et al*., 1992b)**.** La influencia que tiene la infección con *Map* previa a la vacunación se desconoce, si bien se ha sugerido que alteraría el conjunto de citoquinas que produce el animal (Uzonna *et al.*, 2003).

La revacunación no se recomienda, ya que se ha demostrado un descenso en la resistencia de los animales tras llevar a cabo ésta (Stuart, 1965b; Gilmour, 1976; Bendixen, 1978). Se considera que se produce un deterioro en el estado inmunológico de los animales, pudiendo agravar la infección y provocar el desarrollo de la enfermedad (Stuart, 1965b; Gilmour y Angus, 1973). Además, se ha observado que con la revacunación no se produce un aumento de la hipersensibilidad ni de la respuesta inmune humoral (Sigurdsson y Tryggvadóttir, 1949; Larsen *et al*., 1974). Sin embargo, en los primeros estudios en Francia era una práctica frecuente, ya que vacunaban todos los animales independientemente de su edad, en granjas infectadas, lo cual suponía vacunar animales preclínicos que después desarrollarían síntomas. Para evitar esto, se recomendaba la revacunación. Sin embargo, en Gran Bretaña, esto se evitaba vacunando a animales menores de 30 días de edad (Doyle, 1964). Se considera imposible saber cuando sería necesario revacunar, sugiriendo hacerlo cuando la sensibilidad esté disminuyendo o cuando el nódulo vacunal esté regresando (Doyle, 1956 y 1964), cifrándose en algunos casos a los 18-24 meses después de la inoculación inicial (Spears, 1959; Doyle, 1964).

La vacuna generalmente se aplica una única vez en la vida del animal, por vía subcutánea que parece ser la que ofrece más ventajas (Vallé y Rinjard, 1926; Doyle, 1945; Spears, 1959; Larsen *et al*., 1978; Juste y Sáez de Ocáriz, 1990; Juste *et al.*, 1994; Pérez *et al*., 1995a; Corpa, 1999; García Pariente *et al*, 2002, 2005; Uzonna *et al*., 2003; Eppleston *et al*., 2004; Reddacliff *et al*., 2006; Reyes, 2007; Griffin *et al*., 2009; Hütter *et al*., 2012; Alonso-Hearn *et al*., 2012; Singh *et al*., 2013; Knust *et al*., 2013; Dhand *et al*., 2013: Tewari *et al*., 2014; Windsor *et al*., 2014) .Se han realizado estudios donde se utilizó la vía oral, con una menor eficacia (Brotherston *et al*., 1961a; Gilmour y Angus, 1974). Recientemente, se han evaluado diferentes cepas atenuadas de *Map* en su administración por vía oral en cabritos posteriormente infectados, habiéndose comprobado diferencias en el nivel de protección entre las diferentes cepas, pero en todo caso siempre inferiores a la proporcionada por la vacuna Silirum® administrada

por vía subcutánea (Hines II *et al.*, 2014). También se han evaluado la vía conjuntival, (Marly *et al.*, 1988) o la intramuscular (Körmendy, 1994), siendo siempre menos eficaces que la subcutánea. En un estudio reciente realizado por Griffin *et al*. (2009) en el que se ha probado una nueva vacuna formulada en lípido metabolizable, se ha administrado intraperitonealmente a ganado ovino con lo que se eliminan las reacciones en el sitio de inoculación, además de conseguirse una buena respuesta celular en ausencia de la producción de anticuerpos.

En cuanto al sitio de inoculación, en la especie bovina el más comúnmente utilizado es el pliegue de la papada (Huitema, 1968; Kopecky y Larsen, 1975; Kalis *et al.*, 2001; Muskens *et al*., 2002; García Pariente *et al*., 2005; Geijo, 2007; Sweeney *et al*., 2009; Juste *et al*., 2009a; Alonso-Hearn *et al*., 2012; Knuts *et al*., 2013; Tewari *et al*., 2014), aunque algunos autores han utilizado la tabla del cuello (Uzonna *et al*., 2003). Los ovinos, sin embargo, se suelen inocular en la zona pectoral (Gilmour y Brotherston, 1966; Gilmour y Angus, 1973; Aduriz *et al*., 1990) y la espalda (Peris, 1992), incluso la cara interna de las extremidades posteriores (Sigurdsson y Tryggvadóttir, 1949) o en la zona del cuello, justo detrás de la oreja (Windsor *et al*., 2002; Eppleston y Windsor, 2007). En cualquier caso, y debido a la formación de un nódulo vacunal, es recomendable que la aplicación de la vacuna se realice en una zona de tejido laxo, como el área pectoral, debido a que en ocasiones puede dificultar la marcha provocando cojeras e infiltraciones en el tejido muscular, perdurando toda la vida del animal (Juste y Sáez de Ocáriz, 1990; Aduriz *et al*., 2000). En cuanto a la vacunación detrás de la oreja, hay autores que señalan que esta localización puede acarrear otros inconvenientes de escasa frecuencia como son la mortalidad por inyección en la médula espinal cervical, pérdidas productivas por inyección en el maxilar o la axila, miasis o pérdidas económicas por lesiones en las canales (Windsor y Eppleston, 2006). En los experimentos realizados en la especie caprina se ha utilizado como zona de inoculación tanto la región de la espalda (Corpa, 1999; García Marín *et al*, 1999) como una zona algo más craneal a la misma (Hasvold *et al*., 2002).

II.6.2.3.4. Efectos adversos

Como ya se ha señalado, la vacunación presenta algunos inconvenientes, entre los que destaca la inducción de una intensa respuesta inmune que es la causa de resultados positivos en las pruebas diagnósticas de valoración de la inmunidad celular y humoral, tanto para paratuberculosis como para tuberculosis (Vallé y Rinjard, 1926; Stuart, 1962; Gilmour y Brotherson, 1966; Larsen *et al*., 1978; Chiodini *et al*., 1984; Merkal, 1984; Wentink *et al*., 1988; Spangler *et al*., 1991a; Aduriz, 1993; Corpa, 1999; Köhler *et al*., 2001; Muskens *et al*., 2002). Esta interferencia con los programas de erradicación de la tuberculosis bovina y caprina, o en ciervos (Khöler *et al*., 2001; Klawonn *et al*., 2002; Mackintosh *et al*., 2005) parece ser el mayor impedimento para que las autoridades permitan el uso de la vacuna frente a tuberculosis y, para desarrollar nuevas vacunas frente a la paratuberculosis bovina por parte de las farmacéuticas (Bastida y Juste, 2011). El test de intradermorreacción comparada, podría solventar el problema de la interferencia en la mayoría de los casos (Bastida y Juste, 2011). Actualmente es un test oficial de acuerdo a la OIE y a la legislación de la UE y consiste en la estimulación simulatánea con dos inyecciones intradérmicas en diferentes sitios con tuberculinas de *Mycobacterium bovis* (PPD bovina) y *Map* (PPD aviar). Si se obtiene una mayor reactividad a la PPD aviar indicaría una infección o vacunación con una micobacteria aviar y descartaría una infección tuberculosa, según los criterios estandarizados (Bastida y Juste, 2011). Hay numerosos estudios que señalan que mediante el empleo de la la intradermorreacción comparada se pueden diferenciar los animales vacunados (Vallé y Rinjard, 1926; Stuart, 1962; Doyle, 1964; Huitema, 1967; Larsen, 1973; Nain *et al*, 1985; Corpa *et al*., 1998; García Marín *et al*., 1999; Nedrow *et al*., 2007; Geijo, 2007). En este sentido, en el exhaustivo estudio realizado en el País Vasco por Garrido *et al.* (2013), donde se lleva a cabo el seguimiento de varias explotaciones bovinas vacunadas, durante seis años, se ha encontrado que los animales vacunados reaccionan diecisiete veces más que los no vacuandos a la IDR simple, mientras que sólo lo hacen cuatro veces más a la comparada, por lo que los autores concluyen que la IDR comparada es una herramienta muy útil para diferenciar animales vacuandos de los reaccionantes específicamente a la PPD bovina por sufrir tuberculosis. Además, en un trabajo reciente en la especie caprina, se ha señalado que dicha diferenciación se ve mejorada cuando se emplean, en las pruebas de valoración de

respuesta inmune celular comparada, nuevos antígenos "DIVA" de *M. bovis* (Pérez de Val *et al.*, 2012).

Otra de las desventajas de la vacunación es que, una vez que se ha inmunizado al animal, es imposible diferenciarlo de uno infectado de forma natural mediante las pruebas de diagnóstico inmunológico (Collins *et al*., 1994). La vacunación induce una intensa y duradera reacción positiva a la técnica ELISA tanto en terneros vacunados (Spangler *et al*., 1991; Muskens *et al.*, 2002; Geijo, 2007), como en corderos (Aduriz, 1993; Corpa, 1999; Reyes, 2007) así como una importante reacción a la tuberculina aviar y liberación de -IFN-γ periférico que también se mantiene durante largos periodos de tiempo, tanto en bovino (Stuart, 1962; Huitema, 1967; McDonald *et al*., 1999; Bakker *et al*., 1999; Muskens *et al*., 2002) como en ovino (García Marín *et al*., 1999; Gwozdz *et al*., 2000a; Corpa *et al*., 2000b; Reyes, 2007).

Como ya se ha indicado, la vacunación induce la formación en el punto de inoculación de un nódulo fibroso con cavidades que contienen material necrótico, que en ocasiones puede salir al exterior por medio de una fístula (Sigurdsson y Tryggvadóttir, 1949; García Marín *et al*., 1999b; Hines *et al*., 2007a). El tamaño de este nódulo es variable, pudiendo alcanzar en los primeros días tras la vacunación un diámetro de 15 cm en ganado bovino (Stuart, 1962; Benedictus *et al*., 1988). En ganado ovino, sin embargo, puede medir de 3 a 45 mm a los 2 meses de la vacunación, pudiendo llegar a desaparecer con el tiempo (Hagan, 1935; Sigurdssonn y Tryggvadottir, 1949, 1950; Spears, 1959; Gilmour y Brotherston, 1966; Windsor *et al*., 2002).

Se ha sugerido que la duración de la eficacia de la vacuna es paralela a la duración del nódulo vacunal. Así, en un estudio con una vacuna frente a tuberculosis elaborada con una cepa equina atenuada del bacilo, al utilizar un excipiente absorbible, los bacilos eran eliminados a los tres meses y se conseguía una protección transitoria; sin embargo, al utilizar un excipiente no absorbible se formaba un nódulo fribrocaseoso en el lugar de inoculación en el que el bacilo persistía durante dos o tres años confiriendo una inmunidad duradera (Vallée, 1924). Este mismo autor destaca que la vacuna que desarrollaría años más tarde frente a paratuberculosis, falla en aquellos casos en los que el nódulo desaparece pronto (Vallée *et al*., 1934). En este sentido, Doyle (1964) consideraba que sólo los animales que desarrollan un nódulo en el lugar

de la inoculación, sin tendencia a la supuración, serían considerados como efectivamente vacunados. Además señalan que habría resistencia a la infección mientras el nódulo persista y contenga bacilos, ya que, en su experiencia, ningún animal vacunado con microorganismos en el nódulo presenta síntomas clínicos.

Igualmente se ha indicado que el nódulo vacunal presentaba un significado diagnóstico, ya que si se ulceraba y supuraba era debido a que el animal estaba infectado previamente a la vacunación (Vallée y Rinjard, 1926). Igualmente, se consideraba que un animal estaba infectado antes de la vacunación si tras esta no se formaba nódulo vacunal (Vallée *et al*., 1934).

También se ha valorado, en un estudio realizado en Australia, las pérdidas económicas que pudieran asociarse a la presencia del nódulo vacunal, habiendo encontrado lesiones en el 65% de canales de corderos y el 18% de canales de ovejas adultas. No obstante, el coste de la eliminación del tejido afectado no fue significativo y ninguna canal se devaluó por este motivo (Eppleston y Windsor, 2007).

En otro estudio, también se ha evidenciado que el tamaño del nódulo varía según el tipo de vacuna empleado. Al comparar Neoparasec® y Gudair® se obervó que se produce ulceración y un mayor número de nódulos vacunales con diámetro mayor de 5 cm con la primera que con la segunda (García Marín *et al*., 1999).

La auto-inyección de la persona que realiza la inoculación es un problema a tener en cuenta (Jorgensen, 1983b; Sherman, 1985; Patterson *et al*., 1988; Juste y Sáez de Ocáriz, 1990), ya que puede ocasionar una inflamación granulomatosa prolongada en el lugar del incidente por inoculación del producto vacunal, requiriéndose en este caso la escisión quirúrgica e incluso drenaje del material inoculado para evitar la progresión a necrosis extensas (Windsord *et al*., 2005; Richardson *et al*., 2005).

Finalmente, se ha señalado que la vacunación frente a paratuberculosis, aunque tiene una influencia positiva en la infección de los animales, no elimina completamente la enfermedad, y según algunos autores, tras cesar de vacunar, se produciría un incremento de esta última (Emery y Whittington, 2004)

II.6.2.3.5. Evaluación de las vacunas

En la literatura consultada la mayoría de los trabajos han valorado los efectos de la vacunación frente a *Map* en bovinos, ovinos y caprinos, sobre la producción, epidemiología y también patogenia en casos de campo y experimentales como se detallará a continuación. En cuanto a los parámetros productivos, aunque también se ha valorado la eficacia de la vacunación en la producción de leche (García-Pariente *et al*., 2003; Juste *et al*., 2009a) o el beneficio económico que supone vacunar un rebaño afectado de paratuberculosis (van Schaik *et al*., 1996), se han tenido en cuenta sobre todo los efectos que la vacunación produce sobre la aparición de casos clínicos y la mortalidad; en los aspectos epidemiológicos, los efectos de la vacuna sobre el aislamiento de *Map* en heces y/o tejidos y; finalmente, la frecuencia de la lesiones para conocer la influencia de la vacunación sobre la patogenia. La mayoría de los estudios arrojan resultados favorables a la vacunación.

Estudios experimentales

En cuanto a los trabajos experimentales que valoran la **reducción en mortalidad y signos clínicos** en la especie bovina, el primero de ellos fue llevado a cabo en el año 1935 en Estados Unidos, en terneros vacunados al mes de edad, con una vacuna viva formada por seis cepas y adyuvante oleoso y en el que se obtuvo un éxito del 100% en cuanto a la presentación de casos clínicos (Hagan, 1935). En otro estudio experimental en Gran Bretaña en el que se valoró la eficacia de la vacunación mediante el seguimiento de los signos clínicos, se inmunizaron con éxito 84 animales de una semana de edad (Stuart, 1965b). En este caso se utilizó la cepa 316F y el adyuvante fue P/O/P (parafina, aceite de oliva, polvo de piedra pómez) (Stuart, 1965b).

En ovino Gwozdz *et al*. (2000a) infectaron 28 corderos a los 1-1,5 meses y dos semanas después vacunaron a la mitad de ellos con la vacuna viva Neoparasec® y obtuvieron signos clínicos en la mitad de los no vacunados y en tan solo 2 de los vacunados. En otro estudio experimental, que como el anterior fue diseñado en Nueva Zelanda, se utilizaron 170 corderos de 4 meses de edad a los que vacunaron y posteriormente infectaron (Griffin *et al.*, 2009). Se establecieron cinco grupos, uno de 30 animales control sin vacunar y cuatro de 35 animales vacunados. Uno de los grupos recibió subcutáneamente la vacuna muerta Gudair® mientras que los otros tres grupos fueron vacunados con vacunas de nueva formulación en las que se utilizó Lípido-k

como adyuvante que contenía en los tres casos la cepa 316F, en un grupo muerta y administrada subcutáneamente, en otro caso viva y administrada también por esta vía, y en el tercer grupo viva y administrada por vía intraperitoneal (Griffin *et al*., 2009). En todos los grupos se apreció una reducción en los casos clínicos respecto a los animales no vacunados, obteniéndose la mayor reducción en el grupo vacunado con Gudair® y la menor en el de la cepa viva de administración subcutánea (Griffin *et al*., 2009).

Recientemente, se ha llevado a cabo un estudio con 80 cabritos a las 8-10 semanas de edad (Hines II *et al*., 2014) para probar la eficacia de 5 vacunas vivas atenuadas de administración oral elaboradas con diferentes cepas de *Map*, la llamada 316 elaborada con MAP3695 y FadE5; la 315 elaborada con MAP1566; la 319 elaborada con MAP1566; la 318 elaborada con MAP0282c y MAP0283c; todas ellas derivadas de una vacuna mutante de la cepa K-10 y la 329 elaborada con fabG2_2, (Shin *et al*., 2006), en comparación con la vacuna Silirum®, para lo que se han vacunado 10 animales con cada producto y posteriormente se han infectado. Los otros 20 animales del estudio son controles sin vacunar, 10 infectados y 10 no infectados. Se ha comprobado que, en general, la vacunas, de mayor a menor eficacia han sido Silirum® en primer lugar, seguida de la 329, después la 318, y tras ellas la 316, 315 y 319 (Hines II *et al.*, 2014). Concretamente, en lo que se refiere a la reducción de signos clínicos, además de Silirum®, la única que ha conseguido un efecto positivo ha sido la vacuna 329 (Hines II *et al.*, 2014).

En otros estudios experimentales se ha valorado la influencia de la vacuna sobre las **tasas de infección.** En la especie bovina, en el trabajo mencionado realizado por Hagan (1935) se valoró el impacto sobre el aislamiento en tejidos, obteniendo resultados negativos. Igualmente, también en Estados Unidos se han desarrollado diferentes estudios, con resultados variables. De esta manera, Larsen *et al*. (1974) obtuvieron resultados favorables al vacunar terneros con una vacuna viva avirulenta en adyuvante P/O/P. En diferentes estudios a corto plazo (49 días) Uzonna *et al*. (2003) utilizaron la vacuna Mycopar® administrada conjuntamente con IL-12 recombinante, así como con una vacuna de una cepa de campo que usó también para la infección de los animales. En el caso de Mycopar®, además, se valoró la administración de la vacuna antes y después de la infección, mientras que la vacuna con la cepa de campo se administró a los 7 días de vida y la infección a los 28 (Uzonna *et al*., 2003). En cuanto a los resultados con la vacuna Mycopar® se observó que todos los animales infectados, tanto los vacunados como los no vacunados presentaban colonias de bacterias en

tejidos, siendo estás más numerosas y detectables en mayor número de tejidos en los animales vacunados tras la infección; además, la administración de IL-12 recombinante no influía estadísticamente sobre el número de colonias, pero si se pudo observar que hubo animales vacunados antes de la infección y a los que se administró esta sustancia en los que no se aisló ninguna colonia a diferencia de los vacunados después de la infección que todos resultaron positivos al cultivo (Uzonna *et al*., 2003). En el caso de los animales vacunados con la cepa de campo, si se encontraron diferencias significativas, con una reducción tanto en el número de tejidos positivos como en número de colonias en los tejidos de animales vacunados respecto a los no vacunados (Uzonna *et al*., 2003). En este país se han llevado a cabo otros estudios experimentales de este tipo más recientemente en los que se ha valorado una vacuna recombinante elaborada con los antígenos recombinantes de *Map* 85A, 85B, 85C y SOD (superóxido dismutasa) y dos adyuvantes, el MPLA (monosfosforil lípido A) e IL-12 inoculada a 24 terneros de entre los 5 y 10 días de edad, estableciendo cuatro grupos: el primero de ellos recibió los antígenos con MPLA e IL-12; el segundo, los antígenos y MPLA; el tercero, MPLA e IL-12; y el cuarto, tan solo MPLA. Se observó mayor número de tejidos afectados y con un significativo mayor número de colonias en los animales vacunados con los antígenos que los dos grupos control sin ellos, atribuyendo, por tanto, protección frente a *Map* a los mismos (Kathapertumal *et al*., 2008). El último estudio experimental revisado en esta especie en este país es el llevado a cabo por Sweeney *et al*., 2009 en el que se valoró la eficacia de la vacuna Silirum®, empleando 12 animales de 14 días de edad a los que se vacunó e inoculó con $1{,}2x10^9$ UFC de *Map* a los 21-22 días de edad y se sacrificaron 9 semanas después del desafío. Se obtuvieron grandes beneficios en los animales vacunados en cuanto al número de tejidos colonizados y el número de colonias respecto de los animales no vacunados (Sweeney *et al*., 2009). En Holanda también se han desarrollado estudios experimentales de este tipo con buenos resultados al emplear una vacuna de subunidades elaborada con la proteína recombinante de *Map* Hsp70 con la que se obtuvo una significante reducción en la excreción de heces (Koets *et al*., 2006).

También se han llevado a cabo diferentes trabajos en la especie ovina. Así, Brotherston vacunó a 44 corderos de un mes de edad con una vacuna muerta elaborada con una cepa ovina y otra bovina obteniendo diferencias en cuanto al cultivo en tejidos de animales vacunados respecto a los no vacunados (Brotherston y Gilmour, 1961). Un año más tarde autores de este mismo grupo realizaron otro experimento con una vacuna

muerta en el que contaron con 126 corderos de un mes de edad, obteniéndose de nuevo resultados positivos en los animales vacunados respecto a los controles aunque con menor reducción en la colonización de tejidos que en el caso anterior (Nisbet *et al*., 1962). En España, también se han desarrollado estudios experimentales en ovino con el fin de medir la eficacia de la vacunación en la reducción de la colonización de tejidos. Así, Juste *et al*., (1994), vacunaron 17 corderos de dos meses de edad con la vacuna Neoparasec® comprobándose el crecimiento de colonias en tejidos de los animales infectados y en mayor medida en los no vacunados, destacando la eficacia, por tanto, de esta vacuna. En el experimento descrito previamente de Gwozdz *et al*. (2000a) también observaron una notable reducción de la colonización por *Map* en los animales vacunados. Finalmente, Griffin *et al*. (2009), en los estudios descritos previamente, valoraron la excreción en heces de *Map*, resultando mayor la reducción respecto a los no vacunados y con el mismo resultado en los vacunados subcutáneamente con la vacuna muerta y viva y lípido K como adyuvante, seguidos de los vacunados intraperitonealmente, y en este caso, el menor efecto lo presentaron los vacunados con Gudair®.

En ganado caprino también se han realizado diversos estudios experimentales con el fin de ver los efectos de la vacunación sobre el cultivo de heces y tejidos. En Francia, Marly *et al*. (1988) contaron con veintisiete cabritos de 1 mes de edad a los que vacunaron con Neoparasec®, obteniendo notables reducciones en el número de colonias en tejidos y, sobre todo, en heces de los animales vacunados respecto a los controles. Hines II *et al*., (2007a) utilizaron 80 cabritos de 1 a 4 semanas de edad en los que se probaron diferentes formulaciones de vacuna muerta elaboradas con aislados de cabra uno de pared defectiva al que se añadió QS21 como adyuvante, otro con pared defectiva al que se le añadió alumbre como adyuvante y otros dos de pared celular no defectiva uno de ellos con QS21 y el otro con alumbre como adyuvante así como sus respectivos grupos control. El grupo de vacunados con la vacuna de pared completa y adyuvante QS21 presentaron una marcada reducción en el recuento de colonias en heces, sin embargo no se observaron diferencias significativas entre los diferentes grupos. En la colonización de tejidos por *Map*, aquellos animales vacunados con células de pared completa presentaron menos colonias por gramo de intestino, sin influir para ello el tipo de adyuvante utilizado (Hines II *et al*., 2007a). En India, también se han hecho estudios de este tipo en ganado caprino en los que se compararon los efectos sobre el cultivo fecal de una vacuna muerta elaborada con una cepa de campo de tipo B

y con alumbre como adyuvante y la vacuna Gudair®, para lo que utilizaron 85 animales de 4 a 6 meses de edad, cuya carga fecal, en los animales infectados, resultó notablemente reducida en los vacunados con ambas vacunas respecto a los no vacunados, siendo más notable en el grupo vacunados con la cepa virulenta de campo (Singh *et al*., 2007). Otro estudio experimental en esta especie (Kathaperumal *et al*., 2009) compara la vacuna recombinante elaborada con los antígenos 85A, 85B, SOD y 74F de *Map*, con y sin DDA (dimetildioctacetil amonio) como adyuvante. Para ello se cuenta con 25 cabritos de entre 5 y 10 días de edad a los que se vacuna con ambos productos, administrando a un tercer grupo sólo el adyuvante. Se observa una gran reducción en el número de colonias que colonizan tejidos en aquellos animales infectados y vacunados, siendo la reducción más importante en los que se utiliza adyuvante (Kathaperumal *et al*., 2009). Finalmente, en el estudio realizado recientemente por Hines II *et al.* (2014) se ha observado que la eliminación de bacilos por heces en los animales y la colonización de tejidos fue producida, además de por Silirum®, únicamente por la cepa 329 (Hines II *et al*., 2014), como ya ocurría para los signos clínicos.

En el caso de la valoración de la eficacia de la vacuna mediante su influencia sobre las **lesiones histopatológicas**, en vacuno, tan sólo se han encontrado dos trabajos experimentales en la bibliografía consultada realizados en los años 30 (Hagan, 1935) y 70 (Larsen *et al*., 1994) del siglo XX, llevados a cabo en Estados Unidos y ya mencionados en este apartado por valorar otros efectos de la vacuna. En los dos casos se produjo una reducción de lesiones en los animales vacunados, con mejores resultados en el estudio de Hagan (1935).

En ovino, sin embargo, se han realizado una mayor cantidad de estudios experimentales. El primero de ellos (Nisbet *et al*., 1962) observa una una notable reducción de lesiones y de su extensión en los animales vacunados respecto a los controles sin vacunar, confirmando que la vacunación no previene la infección. Resultados algo mejores obtuvieron Juste *et al*. en 1994, en el que además se describen las lesiones de los animales vacunados como bien delimitadas y circunscritas al tejido linfoide. También Gowzdz *et al*. (2000a) valoraron la eficacia de la vacunación mediante métodos histopatológicos, observando una inflamación granulomatosa menos grave en los animales vacunados que en los que no se habían inmunizado tras la infección. También en España, en nuestro grupo de investigación, se han llevado a cabo

diferentes estudios experimentales para valorar vacunas en ovino frente a la infección experimental con *Map* (Reyes, 2007), en el que se utilizaron 18 corderos de un mes de edad a los que vacunaron con dos vacunas, la comercial Gudair® y otra elaborada con bacilos inactivados de la misma cepa y el adyuvante ISA 266, dejando otros animales como control. Se pudo constatar la ausencia total de lesiones asociadas a paratuberculosis en los animales vacunados con cualquiera de las dos vacunas a los 180 días post infección, mientras que si aparecían en animales no vacunados, en algunos de ellos con carácter grave (Reyes, 2007). Begg y Griffin (2005), en otro estudio de Nueva Zelanda, contaron con 90 animales para observar la influencia de la vacunación sobre las lesiones. Para ello se hicieron tres grupos de 30 animales cada uno a los que se inmunizó con Neoparasec®, a otro con AquaVax, una vacuna viva de la cepa 316F con adyuvante salino y los otros 30 animales quedaron como controles no vacunados. El estudio histopatológico reveló la mayor eficacia de Neoparasec® en el control de la aparición de lesiones, debido a que la gran mayoría de animales no presentaron lesión alguna y sólo 4 presentaron lesión grave, mientras que los vacunados con AquaVax mostraron similar patrón de lesiones que los no vacunados, resultando todos los animales de ambos grupos con lesiones granulomatosas extensas, y por tanto, no otorgando valor protectivo alguno a la vacuna. Igualmente, este mismo grupo de investigación utilizó en otros estudios el criterio histopatológico para valorar la eficacia de Gudair® y otras formulaciones elaboradas con el lípido k cuyo diseño se ha descrito anteriormente y en el que la vacuna Gudair® ofrece mejores resultados, seguida de las dos formulaciones con la vacuna viva, con ligera mejoría de la administrada por vía peritoneal y finalmente, pero también con una importante disminución de lesiones, en los animales vacunados con la vacuna muerta formulada con Lípido k y de administración subcutánea (Griffin *et al*., 2009).

En la especie caprina, se han llevado a cabo diferentes trabajos experimentales en Estados Unidos (Hines II *et al*., 2007a, 2014; Kathaperumal *et al*., 2009) y la India (Singh *et al*., 2007) cuyo diseño se ha señalado previamente. En el estudio de Hines II *et al*. (2007a) observan un mayor grado de lesione en los anmales inmunizados con la vacuna elaborada con células de pared defectiva y adyuvante de alumbre, mientras que las otras formulaciones arrojaron resultados más favorables, siendo algo mejores los obtenidos con la elaborada con células de pared completa y con adyuvante de alumbre (Hines II *et al*., 2007a). Singh *et al*. (2007) volvió a obtener muy buenos resultados en cuanto a reducción de lesiones en los animales vacunados respecto a los controles, y de

nuevo, la vacuna elaborada con una cepa virulenta de campo y adyuvante de alumbre supero a la vacuna Gudair®. De la misma manera, en el estudio de Kathaperumal *et al*. (2009), como ocurría al valorar la colonización de tejidos por bacterias, la vacuna recombinante de antígenos que *Map* resultó muy efectiva para reducir la lesiones, y también la que se formuló adyuvada con DDA arrojó mejores resultados que la que no presentaba ningún adyuvante (Kathaperumal *et al*., 2009). En el estudio llevado a cabo por Hines II *et al*., 2014, para probar 5 vacunas orales, además de las ya citadas Silirum® y 329, el producto elaborado con la cepa 318 también ocasionó una reducción de lesiones macro y microscópicas (Hines II *et al*., 2014).

Estudios de campo

Además de estudios experimentales, también se han realizado valoraciones de la eficacia vacunal en condiciones de campo. Así, en Gran Bretaña (Doyle, 1959 y 1964; Wilesmith 1982), Estados Unidos (Hurley y Ewing, 1983), Francia (Argenté, 1988) y Holanda (Benedictus, 1988; Kalis *et al*., 1992; Wentink *et al*., 1994; van Schaik *et al*., 1996) se ha valorado la eficacia de diferentes vacunas, con resultados favorables en cuanto a la reducción de casos clínicos. Las vacunas probadas en Gran Bretaña (Doyle, 1959 y 1964; Wilesmith 1982) y Francia (Argenté, 1988) eran vacunas vivas elaboradas con la cepa 316F y P/O/P como adyuvante. Sin embargo las de Estados Unidos (Hurley y Ewing, 1983) y Holanda (Benedictus, 1988; Kalis *et al*., 1992; Wentink *et al*., 1994; van Schaik *et al*., 1996) eran vacunas inactivadas con adyuvante oleoso que en el caso de la probada por Hurley y Ewing estaba elaborada con la cepa 18 de *Mycobacterium avium* subsp. *avium*. Los estudios de campo en la especie ovina que han valorado la eficacia vacunal sobre los parámetros productivos han obtenido muy buenos resultados tanto en reducción de casos clínicos (Aduriz, 1993; Cranwell, 1993; Pérez et al., 1995), como en reducción de la mortalidad de los animales (Xenos *et al*., 1988; Aduriz *et al*., 1995; Windsor *et al*., 2003; Eppleston *et al*., 2004; Reddacliff *et al*., 2006). Estos estudios se han realizado en su totalidad con vacunas elaboradas con la cepa 316F, en unos casos viva y formulada con parafina (Xenos *et al*., 1988) o con adyuvante oleoso denominada Lio-Johne® (Aduriz, 1993; Aduriz *et al*., 1995a) o Neoparasec® (Pérez *et al*., 1995; Gwozdz *et al*., 2000a) y en otros casos muerta y con adyuvante oleoso, tanto Mycopar® (Pérez *et al*., 1995) como Gudair® (Windsor *et al*., 2003; Eppleston *et al*., 2004; Reddacliff *et al*., 2006). Además, Xenos *et al*., 1988, llevaron a cabo su estudio también en la especie caprina con la misma vacuna utilizada para la especie ovina,

obteniéndose mayores reducciones en la mortalidad cuando los cabritos eran vacunados al mes de edad que cuando se vacunaban animales adultos (Xenos *et al*., 1988), de la misma forma que ocurría especie ovina (Xenos *et al*., 1988).

Los estudios de campo que han valorado el efecto de la vacunación sobre la presencia de *Map* en heces o tejidos en la especie bovina han obtenido buenos resultados, tanto en la reducción de colonización de tejidos (Hore *et al*., 1971; van Schaik *et al*., 1996; Alonso-Hearn *et al*., 2012) como del número colonias en el cultivo fecal (Hurley y Ewing, 1983; Jorgensen, 1983; Argenté, 1992; Kormendy, 1994; Mohr, 2000; Kalis *et al*., 2001; Klawonn *et al*., 2002; Patton *et al*., 2006; Juste *et al*., 2009a; Alonso-Hearn *et al*., 2012; Knust *et al*., 2013; Tewari *et al*., 2014) de los animales vacunados respecto a los no vacunados. Sin embargo, se han publicado dos trabajos llevados a cabo en Holanda en los que los resultados han sido desfavorables tanto valorándolos por cultivo fecal (Kalis *et al*., 1992) como por cultivo de tejidos (Wentink *et al*., 1994). En ovino, Aduriz (1993) valoró la eficacia de la vacuna Lio-Johne® mediante el cultivo de tejidos, observándose una notable reducción respecto a los animales no vacunados. Sin embargo, en otro estudio de nuestro país en el que se valoraba la frecuencia de aislamiento pero no el número de colonias obtenidas, no se encontraron diferencias entre los ovinos vacunados y los que no lo estaban, a pesar de observarse una marcada reducción en la aparición de casos clínicos (Pérez *et al*., 1995). En cualquier caso, la mayoría de estudios realizados en la especie ovina reflejan una notable reducción de eliminación de bacterias por heces (Dimarelli-Malli *et al*., 1997; Eppleston *et al*., 2004, 2005; Reddacliff *et al*., 2006; Toribio *et al*., 2007; Eppleston *et al*., 2011; Hüttner *et al*, 2012; Dhand *et al*., 2013; Windsor *et al*., 2014). Resultados similares se han encontrado en ganado caprino en Estados Unidos (Leslie *et al*., 1988), Grecia (Dimarelli-Malli *et al*., 1997) y la India (Singh *et al*., 2013).

Finalmente, algunos estudios de campo también han valorado la influencia de la vacunación sobre las lesiones. En ganado bovino, tanto en Holanda (Kalis *et al*., 1992; Wentink *et al*., 1994; van Schaik *et al*., 1996) como en España (García-Pariente *et al*., 2005; Alonso-Hearn *et al*., 2012) se han obtenido muy buenos resultados, con reducciones notables de las lesiones en los animales vacunados. Todos estos estudios se han realizado con la vacuna inactivada Silirum®. En la especie ovina, el estudio llevado a cabo por Pérez *et al*. (1995) no encontró diferencias en la reducción del número de animales con lesiones de los vacunados respecto a los no vacunados, si bien las lesiones en los animales vacunados eran de carácter focal, mientras que los no inmunizados

presentaban lesiones más extensas y graves. El resto de trabajos revisados en esta especie ha dado muy buenos resultados en la vacunación en campo con considerables reducciones o ausencia total de lesiones (Sigurdsson *et al*., 1960; Nisbet *et al*., 1962; Aduriz, 1993; Sommerville *et al*., 1995; García Marín *et al*., 1995b; Thonney *et al*., 2005; Reddacliff *et al*., 2006). En caprino, tanto Saxegaard y Fodstad, 1985 vacunando cabritos de un mes de edad como Corpa *et al*. (2000b) vacunado animales adultos, y utilizando la cepa 316F inactivada han conseguido resultados muy satisfactorios, encontrando una marcada reducción lesional. Más recientemente, Singh *et al* (2013) utilizando una cepa tipo B nativa altamente patógena, obtuvieron un resultado similar.

II.6.2.3.6. Respuesta inmune asociada a la vacunación

La inmunización frente a paratuberculosis induce una respuesta inmune celular y humoral detectable por diferentes métodos diagnósticos (Larsen, 1973; Chiodini *et al*., 1984a; Spangler *et al*., 1991; Juste *et al*., 1994; García Marín *et al*., 1999; Mc Donald *et al*., 1999; Gwozdz *et al*., 2000a; Corpa *et al*., 2000b; Köhler *et al*., 2001; García Pariente *et al*., 2002; Muskens *et al*., 2002; Begg y Griffin, 2005; García Pariente *et al*., 2006; Redacliff *et al*., 2006). Se ha llegado a sugerir que la potencia inmunizante de una vacuna estaría relacionada con la capacidad de la misma para inducir una hispersensibilidad de tipo retardado, la cual se puede medir poco tiempo después de la vacunación (Gilmour, 1976; Chiodini *et al*., 1984a).

La respuesta inmune celular asociada a la vacunación se ha valorado comúnmente mediante la IDR, atribuyendo, algunos autores (Wentink *et al*., 1993) la falta de positividad a la misma a una respuesta inmunológica deficiente y una mayor probabilidad de desarrollar la enfermedad. Mediante este método, la mayoría de animales vacunados ofrecen resultados positivos a los 30 días post-vacunación en experiencias con ovinos, bovinos y caprinos (Sidgurdsson y Tryggvadóttir, 1950; Larsen, 1950; Marly *et al*., 1988), alcanzándose los máximos niveles a los cuatro meses post-vacunación, con mayor positividad a la PPD aviar que a la bovina (Pérez, 1992). Se ha citado que estos valores disminuyen a finales del primer año (Stuart, 1962) o a los 18 meses (Larsen *et al*., 1978) y que pueden seguir haciéndolo durante los cinco

primeros años posteriores a la vacunación, siendo esta disminución más acentuada para la PPD bovina que para la aviar (Huitema, 1967).

Respecto al incremento en la producción de IFN-γ específicamente inducido por *Map* en los animales vacunados, se ha observado que en la especie bovina se produce de forma temprana (McDonald *et al*., 1999; Muskens *et al*., 2002), concretamente a las 1-2 semanas post-vacunación y se detecta al menos durante dos años (Köhler *et al*., 2001). En ovinos, niveles elevados de esta citoquina se pueden encontrar ya a los 30 dpv (Corpa *et al*., 1999a; García Pariente *et al*., 2002; Reyes, 2007) y con valores máximos a los 75 dpv (Reyes, 2007), a las 7 semanas (Gwozdz *et al*., 2000a), a los 1-2 meses (Begg y Griffin, 2005) y 4 meses tras la vacunación (García Marín *et al*., 1999) según los diferentes estudios. En un estudio realizado en Australia, se obtuvo la máxima proporción de animales positivos en el primer muestreo, realizado a los 2 meses post-vacunación, manteniéndose con valores más elevados de IFN-γ que el grupo control hasta el final del estudio (54 meses post-vacunación). Además en este estudio se relacionó negativamente la positividad a IFN-γ con la eliminación de bacilos en heces y la infección (Reddacliff *et al*., 2006). Otros estudios han encontrado que este tipo de respuesta se mantiene elevada durante un año, momento en el que el número de animales vacunados positivos al test del IFN-γ es del 50% (García Pariente *et al*., 2002). En caprino, el incremento de la producción de IFN-γ se produce 30 días después de la inoculación de la vacuna (Corpa *et al*., 2000b; Valheim *et al*., 2002a) con diferencias significativas en la producción de esta citoquina por parte del grupo vacunado respecto al control desde las tres semanas post-vacunación (Valheim *et al*., 2002a).

Se considera que el IFN-γ tiene un papel crucial en la inmunidad protectora frente a las micobacteriosis y por tanto, una vacuna debería tener la propiedad de provocar una temprana inducción del mismo (Hasvold *et al*., 2002). Sin embargo, en un estudio realizado por Uzonna *et al*. (2003) con terneros vacunados a los 15 días de vida, no se encontró relación entre la producción de IFN-γ y la resistencia a la infección, a pesar de la rápida inducción en la producción de esta citoquina por parte de las vacunas empleadas en el estudio, tanto en sangre como en células del nódulo linfático regional de vacunación y nódulos linfáticos cecales (Uzonna *et al*., 2003).

La respuesta humoral se manifiesta más tardíamente que la respuesta celular, entre las 8 y las 16 semanas en el caso de los bovinos (Spangler *et al*., 1991; Köhler *et al*., 2001) y desciende a valores muy bajos a las 48-60 semanas post-inmunización (Köhler *et al*., 2001) e incluso llegando a ser los animales negativos a los 25 meses (McDonald *et al*., 1999). Se ha citado que la cantidad de animales positivos al ELISA indirecto disminuye al aumentar la edad de los mismos; sin embargo se ha detectado un número notable de positivos a los tres años de edad (Muskens *et al*., 2002). En experiencias de campo en la especie ovina se detectaron altos títulos de anticuerpos a los seis meses post-vacunación que persistían en más del 60% de animales 6 años después, siendo esta respuesta mejor detectada mediante el ELISA que la con la IDGA (Aduriz, 1993). En estudios experimentales en esta especie se ha comprobado que los mayores títulos se obtienen entre los 15 y los 120 dpv con la IDGA y entre los 30 y 75 dpv con ELISA, cuando los corderos son vacunados a los 30 días (Reyes, 2007) entre los 60 y 120 dpv en corderos vacunados a los 3 meses de edad (García Marín *et al*., 1999), entre las 16 y 51 semanas post-vacunación en corderos de 1-1,5 meses de vida (Gwozdz *et al*., 2000a) y a los 180 días tras la vacunación en corderos vacunados a los 10-15 días (Corpa *et al*., 1999a). En otra experiencia además se observó que en el caso de corderos no vacunados e infectados no aparecían incrementos significativos en la producción de anticuerpos hasta las seis semanas post-infección y valores positivos hasta los 3 meses después de la infección, mientras que los animales vacunados, tanto infectados como no infectados, desarrollaron una respuesta al ELISA fuerte e inmediata (Juste *et al*., 1994). En estudios de campo en ovino adulto en España se han detectado elevados títulos de anticuerpos hasta los 150 (García Pariente *et al*., 2002) y 180 (Aduriz, 1993) dpv, manteniendose el 80% de animales positivos al año (García Pariente *et al*., 2002). En un estudio realizado en Australia, los animales seroconvirtieron a los 2 meses post-vacunación, declinando el número de animales positivos 18 meses tras la vacunación, aunque a los 24 meses el número de positivos volviera a aumentar, lo que según los autores podría indicar un efecto memoria (Reddacliff *et al*., 2006). En este caso, la positividad a ELISA estaba inversamente relacionada con eliminación de bacterias por heces en algunas granjas, con la infección en otra, y con la mortalidad asociada a paratuberculosis en otra (Reddacliff *et al*., 2006). En el caso del ganado caprino, las diferencias en la producción de anticuerpos entre el grupo control y el vacunado se evidencian a partir de las siete a nueve semanas post-

vacunación (Marly *et al*., 1988; Valheim *et al*., 2002a) con valores máximos a los tres meses (Marly *et al*., 1988).

II.7. INFECCIONES EXPERIMENTALES

La realización de infecciones experimentales con *Map* ha sido un procedimiento muy habitual para el estudio de diferentes aspectos de la paratuberculosis, especialmente la patogenia, eficacia de vacunas, etc. La ventaja, respecto a las infecciones naturales, es que se pueden controlar los diferentes factores que influyen en la infección. Sin embargo estas experiencias resultan dificultosas debido, entre otras, a las características propias de esta bacteria como son su lento crecimiento en medios de cultivo y su tendencia a la aglutinación, lo que dificulta la administración de una suspensión homogénea y por lo tanto una dosis exacta, a los animales, o el largo periodo de tiempo necesario para desarrollar lesiones evidentes o signos clínicos (Brown, 1982; Chiodini *et al.*, 1984a; Saxegaard, 1990; Clarke, 1997), siendo frecuente que haya animales que no muestren signos de infección, especialmente en la especie ovina(Rankin, 1959; Karpinski y Zorawski, 1975; Gilmour *et al*., 1978; Pérez, 1992; Thorel *et al.* 1992). A esto hay que añadir la enorme variabilidad de diseño que existe en los diferentes modelos experimentales, lo que explica la disparidad en los resultados obtenidos (Rankin, 1961b; Van Kruiningen *et al*., 1986; Thorel *et al*., 1992; Reddacliff y Whittington, 2003; Begg *et al*., 2005; Sweeney *et al*., 2006; Reyes, 2007; Verna *et al*., 2007).

El éxito de un estudio experimental de paratuberculosis depende de factores tan importantes como tipo el inóculo, dosis, método de cuantificación o vía de administración del mismo, el intervalo en que se administra este, así como la selección de animales (Begg y Whittington, 2008). En este sentido, se ha reunido un comité internacional de investigadores en paratuberculosis (Hines II *et al*., 2007b) para proponer una guía de consenso para llevar a cabo infecciones experimentales que tengan como objetivo el estudiar la interacción de patógeno-hospedador, respuesta inmunetanto local como sistémica, así como para evaluar productos terapéuticos y vacunas. Algunas de las principales directrices que se proponen en este trabajo son:

- En los diferentes estudios debe especificarse la raza o estirpe de los animales que se utilizan, ya que se han descrito resistencias genéticas a infectarse por micobacterias en algunas estirpes de ratón (Tanaka *et al*., 1994) así como en ciervos (Mackintosh *et al*., 2002) y en la especie bovina (Koets *et al*., 2000; Mortensen *et al.*, 2004).

- Deberían mantenerse cepas de *Map* bien caracterizadas y de conocida virulencia, para poder repetir experimentos en cualquier laboratorio con el mismo y bien conocido agente infectante. Se sugiere el uso de cepas con gran similitud genética a la cepa K-10 (Li *et al*., 2005) para todas las especies, excepto para la ovina. El inóculo más empleado han sido colonias de diferentes cepas de *Map* obtenidas a partir de medios líquidos o sólidos (Chandler, 1961a, b, 1962; Payne y Rankin, 1961a,b; Brotherston *et al*., 1961; Gilmour y Brotherson, 1962; Nisbet *et al*., 1962; Gilmour *et al*., 1965; Stuart, 1965; Gilmour y Brotherson 1966; Kluge *et al*., 1968; Merkal *et al*., 1968a,b; Larsen *et al*., 1973; Gilmour *et al*., 1978; Williams *et al*., 1983a,b; Van Kruiningen *et al*., 1986; Szilagyi*et al*., 1989; Saxegaard, 1990; Juste *et al*., 1994; Burrells *et al*., 1995; Begara-McGorum *et al*., 1998; Mc Donald *et al*., 1999; Sigurdardottir *et al*., 1999; Gwozdz *et al*., 2000a, b; Gwozdz *et al*., 2001; Storset *et al*., 2001; Beard *et al*., 2001; Gwozdz y Thompson, 2002; Valheim *et al*., 2002b; Mackintosh *et al*., 2003; Redacliff y Whittington, 2003; Stabel *et al*., 2003; Uzonna *et al*., 2003; Mackintosh *et al*., 2005; Rosseels *et al*., 2006a,b; Stewart *et al*., 2006; Sweeney *et al*., 2006; Hines *et al*., 2007b; Mackintosh *et al*., 2007; Verna *et al*., 2007; Stabel *et al*., 2009; Eisenberg *et al*., 2011; Fernández *et al*., 2014a) o bien homogeneizados de tejido obtenidos a partir de un animal infectado naturalmente (Hagan, 1938; Krishnappa *et al*., 1989; Kurade *et al*., 2004; Munjal *et al*., 2005; O`Brien *et al*., 2006; Verna *et al*., 2007; Stabel y Robbe-Austerman, 2011; Stabel *et al*., 2011; Delgado *et al*., 2012, 2013). Se ha señalado que la administración de estos últimos proporciona mayores posibilidades de éxito en la infección (Stewart *et al*., 2004, 2006, 2007; Begg *et al*., 2010). Incluso, se han llegado a a administrar heces de animales infectados (Rankin, 1961 a,b,c, 1962; Koets *et al*., 2006; Santema *et al*., 2012)
- La vía de inoculación más adecuada para reproducir la infección en rumiantes es la vía oral, ya que sería la que más asemeja las condiciones naturales de la infección (Chiodini *et al*., 1984a) aunque se han utilizado las vías intravenosa (Harding, 1957; Rankin, 1958a; Rankin, 1961a, b, c; Brotherston *et al*., 1961a; Taylor, 1953a; Stuart, 1965; Kluge *et al*., 1968; Merkal *et al*., 1968a, b; Johnson *et al*., 1977; Thorel *et al*., 1984; Thorel *et al*., 1992) subcutánea (Johnson *et al*., 1977; Simutis *et al*., 2005), intraintestinal (Sigurdardottir *et al*., 2001; Sigurdardottir *et al*., 2005; Wu *et al*., 2007), intragástrica (McDonald *et*

al., 1999; Gwozdz *et al*., 2000a, b; Gwozdz *et al*., 2001; Gwozdz y Thompson, 2002; Stabel *et al*., 2003), intrauterina (Merkal *et al*., 1982), intratraqueal (Harding, 1957; Kluge *et al*., 1968; Merkal *et al*., 1968 a, b; Begg *et al*., 2005; Eisenberg *et al*., 2011), intratonsilar (Waters *et al.*, 2003), intranasal (Eisenberg *et al*., 2011) e intraperitoneal (Stabel *et al*., 2009; Stabel y Robbe-Austerman, 2011; Stabel *et al.*, 2011), que por otro lado, en el caso de animales de laboratorio es muy frecuente (Chandler, 1961a, 1962; Collins *et al*., 1983; Mutwiri *et al*., 1992; Chiodini y Buergelt, 1993; Tanaka *et al*., 1994; Veazey *et al*., 1995b, 1996; Stabel *et al*., 1996; Tanaka *et al*., 2000; Mutwiri *et al*., 2001; Stabel y Akermann, 2002; Huntley *et al*., 2005; Shin *et al*., 2006).

- Los métodos de preparación de los inóculos deberían estandarizarse. Para su cuantificación, se ha utilizado el valor de "peso seco" de *Map* cultivado en medio sólido o líquido (Kluge *et al*., 1968; Merkal *et al*., 1968a,b; Sigurdardottir *et al*., 1999; 2001), por la ventaja que ofrece el hecho de que la aglutinación de las bacterias no afecta a los resultados También se ha utilizado la medición de la la densidad óptica de suspensiones de *Map*, o el recuento de un frotis de un cultivo de *Map* diluido. También es posible determinar "equivalentes genómicos" cuantificados mediante PCR cuantitativa, pero el recuento en medio de cultivo es el único método que diferencia los organismos viables de los no viables en la muestra, mientras que el resto sobreestima el número de unidades infecciosas en la misma. Así, los autores de la revisión, recomiendan que *Map* sea cuantificada por el "método de pellet de peso húmedo", en el que el número de *Map* oscilaría ente $5x10^6$ (Juste *et al*., 1994) y $3x10^7$ UFC (Hines II *et al* 2007b), tomando como media $1x10^7$ UFC/mg (Sweeney y Hines, citado en Hines II *et al*., 2007b). No obstante, las dosis empleadas con éxito oscilan entre 10 (Saxegaard, 1990) y 200 (Payne y Rankin, 1961a, b) mg de peso seco y entre las 10^6 (Sweeney *et al*., 2006) y 10^{11} UFC, recomendándose el uso de una dosis standard de aproximadamente 10^9 UFC por dosis (100 mg de peso seco) administrado en dos días sucesivos. Debe evitarse el uso de dosis tan elevadas que provoquen enfermedad clínica en menos de 18 meses, debido a que esto no es lo que sucedería en condiciones naturales.

- - La dosis recomendada sería aquella que provoca la infección, pero no es lo suficientemente alta para "superar" intervenciones como la vacunación o la profilaxis química.
- La pauta de infección es variable, desde una sola dosis hasta varias dosis diarias o en días alternos durante semanas o meses (Brotherson *et al*., 1961a; Nisbet *et al*., 1962; Gilmour *et al*., 1965; Gilmour y Brotherson, 1966; Gilmour *et al*., 1978; Krishnappa *et al*., 1989; Szilagyi *et al*., 1989; Saxegaard, 1990; Juste *et al*., 1994; Burrels *et al*., 1995; Begara-McGorum *et al*., 1998; McDonald *et al*., 1999; Beard *et al*., 2001c; Mackintosh et al., 2003; Redacliff y Whittington, 2003; Stabel *et al.*, 2003; Waters *et al*., 2003; Uzonna *et al*., 2003; Koo *et al*., 2004; Kurade *et al*., 2004; Stewart *et al*., 2004; Begg *et al*., 2005; Mackintosh *et al*., 2005; Koets *et al.*, 2006; Rosseels *et al*., 2006a b; Sweenwy *et al*.; 2006; Delgado *et al.*, 2013; Fernández *et al.* 2014a). Se supone que el administrar múltiples y pequeñas dosis debería mejorar el establecimiento de la infección, ya que se asemejaría más a lo a que acontece en infecciones naturales. Pero una dosis única daría información real del inicio del experimento (momento exacto de la infección).
- Referente a la edad de administración, es el objetivo del estudio el que va a indicar la edad adecuada para la infección. En el caso de estudios en los que se desee reproducir los signos clínicos de la enfermedad, los animales deben ser infectados tan pronto como sea posible, incluso en el primer día de vida; sin embargo, en los estudios de eficacia de un producto vacunal, la infección podría retrasarse hasta la administración de la vacuna, debiendo tenerse en cuenta además la competencia con el sistema inmune neonatal.
- Para estos estudios deberían ser usados animales que no hayan sido previamente expuestos a *Map*, de explotaciones libres de paratuberculosis y en las que no se haya practicado la vacunación. La eliminación fecal pasiva ocurre a las 12 horas tras la inoculación, considerándose animales positivos aquellos que eliminan bacterias a partir de los 14 días post-inoculación. Se deben hacer cultivos fecales al menos mensualmente durante el curso del estudio. El estudio macro y microscópico de los órganos, realizando un sistema de cuantificación de las lesiones, así como cultivo de los tejidos para identificar BAAR, deben ser llevados a cabo en todos los estudios.

- Se deben seleccionar grupos de animales uniformes en cuanto a raza, sexo, edad, peso y tamaño y las condiciones en las que se mantienen los animales durante el experimento deben ser similares en todos los grupos infectados así como en el utilizado como control.
- Deben usarse controles positivos y negativos de calidad para validar los test diagnósticos. Los laboratorios deben llevar a cabo el análisis de las muestras "a ciegas".
- Las variables sometidas a estudio así como la duración del mismo van a depender de tipo de experimento que se lleve a cabo, debiendo incluirse medidas cuantitativas de infección (colonización de tejidos), gravedad de las lesiones y evidencia clínica de enfermedad. En los estudios longitudinales de patogenia y estrategias de control se deben llevar a cabo: cultivo fecal y de tejidos, necropsias y registro de lesiones macro y microscópicas, PCR así como la valoración de la respuesta inmune celular y humoral.
- Las muestras que deben ser tomadas dependerán de cada experimento y debe tenerse en cuenta que pueden influir en los resultados.

  Se debe utilizar un método de cultivo con el que se pueda cuantificar (o semicuantificar, por ejemplo, mediante unidades formadoras de colonias en medio sólido). Así mismo, se recomienda la descontaminación de las muestras fecales con hexadecil piridinium durante 14-16 horas y durante 3h en el caso del cultivo del tejido. Además, las muestras se deben procesar inmediatamente o congelarse a -70ºC debiendo ser descongeladas tan solo una vez y ser tratadas todas las muestras de la misma manera.
- Para el diseño experimental se debería contar con un especialista en estadística para saber el tamaño muestral necesario así como para confirmar el estado de la infección. El tamaño de las muestras debe ser lo suficientemente grande como para encontrar diferencias significativas en los resultados. Así mismo, el tamaño de los grupos no tiene porqué ser igual, especialmente si se espera obtener diferente respuesta en los grupos.
-

Al igual que Hines II *et al*. (2007b), Begg y Whitington (2008) llevaron a cabo una revisión posterior de los diferentes modelos experimentales en ovino hasta ese momento llegando a la misma conclusión: se necesita establecer un modelo con una reproductibilidad fiable.

La bovina además de ser la especie en la que se logró la primera infección experimental por Bang en 1906 (citado por Rankin, 1959), ha sido objeto del mayor número de estudios experimentales. Además del mencionado, los ensayos posteriores (Meyer, 1913) emplearon como material infectivo raspados de mucosa y nódulos. Sin embargo, la reproducción experimental de la paratuberculosis se ha llevado a cabo en diferentes especies, tanto en rumiantes como en animales de laboratorio, monogástricos y aves. A continuación se hará una revisión de las infecciones experimentales más destacadas en diferentes especies.

II.7.1. Infecciones experimentales en la especie bovina

El modelo a largo plazo de infección en la especie bovina se ha empleado para llevar a cabo estudios de eficacia de vacunación o intervenciones preventivas o terapéuticas, patogénesis a largo plazo, respuesta inmune y valoración de ensayos de diagnóstico (Hagan, 1938; Taylor, 1953a; Doyle, 1953; Rankin, 1958a; Rankin, 1961a, 1961b, 1962; Gilmour *et al*., 1965; Stuart et al., 1965b; Larsen *et al*., 1978; Thorel *et al*., 1984; Szilagyi *et al*., 1989; Saxegaard, 1990; McDonald *et al*., 1999; Beard *et al*., 2001c; Waters *et al*., 2003; Koets *et al*., 2006; Rosseels *et al*., 2006a; Wu *et al*., 2007; Stabel *et al*., 2009; Stabel y Robbe-Austerman, 2011; Stabel *et al*., 2011a; Mitchell *et al.*, 2012; Santema *et al*., 2012 Hines II *et al*., 2007b). Además, debido a las diferencias entre las razas de *Bos indicus*, se recomienda el uso de razas *Bos taurus*, habiéndose sugerido la raza Jersey como la más susceptible (datos no publicados, citado por Hines II *et al*., 2007b). Para estos estudios se ha utilizado una gran variedad de cepas de *Map*, sin embargo la K-10, como se ha citado anteriormente, se considera el prototipo de cepa a utilizar para infecciones en bovino debido a que se conoce su patogenicidad y su genotipo, si bien el pase de laboratorio que tiene dicha cepa es desconocido. Así mismo, se podrían usar otras cepa con pocos pases de laboratorio y con similares genotipos de segmentos cortos repetidos (por ejemplo, el genotipo 15 g- 5 ggt (Ghadiali *et al.*, 2004) o equivalentes (Hines II *et al*., 2007b).

En cuanto a las infecciones experimentales a corto plazo, se han realizado mediante canulación ileal (Allen *et al*., 2005 y 2009) para el estudio de vacunas, en la que se administra *Map* directamente en el íleon mediante canula quirúgica. También se

ha empleado la técnica de invasión mediante incisión quirúrgica en el íleon (Wu *et al*., 2007) para establecer un modelo de invasión intestinal a otros órganos en las horas siguientes a la infección. Además, se han llevado estudios a corto plazo mediante una alternativa quirúrgica ligando un asa intestinal (Momotani *et al*., 1988). Sin embargo, esta última técnica solo es adecuada para estudios de menos de 12 horas de duración con el objetivo de detectar *Map* en estudios ultraestructurales de interacción del patógeno y la respuesta inmune del hospedador mediante la expresión genética de citoquinas (Hines II *et al.*, 2007b).

Ya a principios del siglo pasado se sugirió que los terneros más jóvenes eran más susceptibles a contraer paratuberculosis (Meyer, 1913; M´Fadyean y Sheather, 1916) e incluso, que los adultos no llegaban a infectarse. Aunque no ha sido establecida una relación definitiva entre la dosis y la edad de infección, algunos estudios han ido encaminados a estudiar estas variables. De hecho, se considera, no solo en bovino, que uno de los factores clave para el establecimiento de la infección por *Map* en un experimento es el momento en el que este agente etiológico entre en contacto con el hospedador (Doyle, 1956; Rankin, 1959; Bendixen, 1978; Hines II *et al.*, 2007b; Begg y Whittington, 2008). Hagan (1938) realiza el primer trabajo en la especie bovina para lo que inoculó 15 terneros por vía oral con 60 g de raspado de mucosa preteneciente a animales enfermos, dosis administrada equitativamente en 3 días consecutivos. Los animales más jóvenes, tanto los 9 menores de un año, como los 3 con edades entre el año y los dos años, resultaron infectados, mientras que los 3 mayores de 2 años no mostraron signos ni lesiones de paratuberculosis; incluso uno de ellos se encontraba vivo a los 37 meses tras iniciarse el experimento sin signos de enfermedad (Hagan, 1938). La diferencia entre los grupos de animales más jóvenes es que todos los individuos entre uno y dos años murieron de paratuberculosis, mientras que en el de animales más jóvenes, ninguno desarrolló la enfermedad pero si se hallaron lesiones de paratuberculosis en la necropsia en 7 de los 9 animales. Además, este autor comprobó que ningún animal contrajo paratuberculosis de forma natural si se exponía después de los 4 meses de edad (Hagan, 1938).

Posteriormente, Doyle y Spears (1951) analizaron la frecuencia de aparición de la enfermedad en 648 casos procedentes de infecciones naturales, y comprobaron, mediante tinción de ZN de frotis de heces, que el pico de infección se encuentraba entre

el segundo y el quinto año, apareciendo los casos clínicos (41) entre los 7 y los 13 años, siendo imposible establecer cuando se infectaron los animales, y sugiriendo que los animales podrían haberlo hecho en las primeras etapas de vida, permaneciendo como portadores hasta su reactivación por condiciones adversas, o haberlo hecho en la edad adulta.

Más tarde, Taylor (1953a) infectó 12 terneros con el propósito de relacionar la infección con la edad. El desafío fue llevado a cabo con una dosis de 100 mg de una mezcla de cinco aislados de casos clínicos bovinos. Las tres edades elegidas para la infección fueron al nacimiento, tres y seis meses de edad, haciéndolo en cuatro terneros en cada caso, dos de ellos por vía oral y dos por vía intravenosa en cada uno de los grupos. Los animales fueron sacrificados entre los dos y los tres años postinfección, sin que ninguno muriera por paratuberculosis, si bien se observaron signos clínicos de la enfermedad en 3 de los 4 animales del grupo infectado al nacimiento y en uno de los infectados a los tres meses de edad. En el examen de las heces se obtuvieron más resultados positivos y anteriores en el grupo de los infectados al nacimiento, y menor en el de los infectados a los seis meses, con sólo un animal positivo en uno de los muestreos. El estudio postmorten reveló que además de los animales que presentaban clínica, se encontraron lesiones en el otro animal del grupo de infectados al nacimiento y en dos del del grupo infectado a los tres meses de edad, no observándose lesiones en la necropsia de ningún animal del grupo infectado a los seis meses de edad. Sin embargo se logró el aislamiento de *Map* tanto en el animal sin lesiones del grupo de los infectados a los tres meses como en otro animal del grupo de los infectados a los 6 meses.

El mismo año Doyle (1953) trató de comprobar si los bovinos adultos podían infectarse y de estudiar el desarrollo de la enfermedad en el caso en que se llegara a producir. Para ello administraron 3 dosis de 20 g de mucosa vía oral a 12 bovinos adultos (6 vacas y 6 machos castrados) con edades comprendidas entre los 17 meses y los 6 años. La mitad de ellos fueron estabulados y la otra mitad se mantuvieron pastando. La infección se reprodujo en cuatro aniamles, dos de los más jóvenes y 2 de los más mayores, que mostraron signos clínicos de enfermedad y excretaron bacilos en heces, de los cuales tres estaban al aire libre y uno estabulado. Estos resultados no permitieron a Doyle relacionar el éxito de la infección con el sistema utilizado para su

cría. En cuanto a la edad, Doyle sugiere que sólo unos pocos animales se infectan de adultos y que la enfermedad, en estos casos, adquiere un carácter crónico mientras que aquellos animales que muestran la enfermedad con signos clínicos evidentes, como con diarrea persistente, contrajeron la enfermedad durante las primeras etapas de su vida (Doyle, 1953).

Rankin (1958, 1959, 1961a, b y 1962) con el fin de relacionar la edad con la infección de *Map*, realizo una serie de estudios experimentales. En el primero de ellos (Rankin, 1958), infectó 6 terneros de un mes de edad con 100 mg de inóculo por vía intravenosa, utilizando como material infectivo una cepa extraída del experimento de Taylor (1953) descrito anteriormente. En cuanto a la excreción de bacilos por heces, todos los animales mostraron resultados positivos, de manera más o menos frecuente hasta su muerte. En los estadios finales del experimento se comprobó que algunos de los animales infectados no crecían al mismo ritmo que otros animales no infectados y alimentados de la misma forma Uno de ellos presentó los signos más evidentes a los tres años, tras parir, por lo que fue sacrificado por su sintomatología, mostrando lesiones macro y microscópicas sobre todo en intestino. Otros tres animales presentaron diarrea entre los 7 y diez meses postinoculación, observándose lesiones y positividad en los cultivos de tejidos tras la necropsia. Los otros dos animales no presentaron signos ni lesiones, pero si cultivos positivos en nódulos linfáticos intestinales (Rankin, 1958). En el siguiente experimento, Rankin (1961a) inoculó 6 vacas adultas, de tres años, con el mismo inóculo que en el trabajo previo mediante inyección intravenosa. En el cultivo de las heces, que se recogían mensualmente, no se observaron micobacterias; tampoco se observaron síntomas de paratuberculosis en los cuatro años que duró el experimento en ninguno de los animales aunque uno de ellos fue sacrificado antes de finalizar el mismo debido a una mastitis. En los cinco animales que finalizaron el experimento se aislaron bacterias en el cultivo de los órganos (Rankin, 1961a). Seguidamente, se publicaría otro trabajo del mismo autor (Rankin, 1961b) en el que inoculó por vía intravenosa tres terneros de un mes de edad con 100 mg de cultivo de la cepa utilizada en los experimentos anteriores (Rankin, 1958, 1961a) que fueron mantenidos junto a otros 9 terneros de varias edades (tres de una semana, tres de un mes y tres de seis meses de edad), hijos de vacas sin paratuberculosis, de tal manera que las heces (con excreción de bacterias a los dos meses postinfección) de los 3 terneros infectados fueron el material infectante de los otros 9. Se mantuvieron juntos hasta que los tres terneros infectados

experimentalmente murieron a causa de paratuberculosis a los 2 años del inicio del experimento. En los 9 animales hubo aislamientos positivos en uno o varios de los muestreos durante los 4 años, aunque en menor frecuencia que en los tres animales infectados por vía intravenosa. Seis de los nueve animales en contacto con los infectados desarrollaron paratuberculosis clínica, uno del grupo que entró en contacto a la semana de edad, los tres del grupo de un mes de edad y dos de los que contactaron a los seis meses de edad. La producción lechera de las vacas con enfermedad clínica se vió reducida respecto a las que no la presentaron. En cinco de ellos, se observaron lesiones macroscópicas y en todos ellos lesiones histológicas, además de positividad en el cultivo de varios de los ótganos (Rankin, 1961b). En el último de este grupo de experimentos, Rankin (1962) mantuvo cuatro años a 7 vacunos de cuatro años de edad en un ambiente infectado, es decir, en contacto con terneros infectados experimentalmente como se ha descrito anteriormente y con otros animales que presentaban clínica de paratuberculosis. Tan solo uno de los siete animales objeto de estudio presentó clínica de paratuberculosis, confirmada por las lesiones histológicas No obstante, cuatro de los otros seis presentaron cultivo positivo en órganos linfoides. Los cultivos de heces revelaron escasísimos resultados positivos, con un animal con dos cultivos positivos y tres con uno, en los cuatro años que se mantuvo el estudio.

Con este conjunto de experimentos, y otros estudios (Rankin, 1959) Rankin concluyó que los animales que se infectan de adultos son más resistentes a desarrollar la enfermedad que los jóvenes.

Posteriormente, Larsen *et al*. (1975a) contribuyó a este tipo de estudios con la infección de 10 animales, 2 de un mes de edad, cuatro de 9 meses de edad y 4 adultos (de 5 a 11 años) con 180 mg de cultivo de *Map* vía oral, y sacrificados a los 150 dpi. La excreción de micobacterias en heces fue estudiada mensualmente, revelando muestreos positivos en los dos animales más jóvenes y en tres de los cuatro animales infectados a los 9 meses de edad. Las lesiones en la necropsia tan solo se apreciaron en los dos animales infectados al mes de edad, caracterizadas por un aumento de tamaño de los nódulos linfáticos. El estudio histológico reveló la presencia de lesiones microscópicas en 7 animales, los 2 del grupo más joven, 3 de los infectados a los nueve meses y 2 de los adultos, sobre todo localizadas en los nódulos linfáticos, siendo más frecuente encontrar micobacterias y de forma más abundante en los tejidos de los animales más jóvenes. El cultivo positivo de órganos se obtuvo en todos los animales exceptuando

uno del grupo de edad intermedia y uno de los adultos, con más UFC en los animales infectados con un mes de edad. Con este estudio Larsen *et al*. (1975) concluyeron que los animales adultos son más resistentes a *Map*, las lesiones son menos acusadas y desarrollan menos colonias en el cultivo de los tejidos, con lo que apoya la idea de que a medida que los terneros van haciéndose adultos se incrementa la resistencia a la infección por *Map*, incluso sin exposición previa a la bacteria (Larsen *et a*l., 1975a).

Años más tarde, Sweeney (1992a) realizó otro estudio experimental que duró cuatro semanas en el que infectó mediante tubo orogástrico 6 vacas de 2 años de edad con dosis diferentes dos a dos (2,2; 0,55 y 0,14 ml/kg de peso). Se aisló *Map* del cultivo de heces desde las 18 horas posteriores al desafio, con cantidades de colonias proporcionales a las dosis recibidas. No mostraron valores considerados positivos al test ELISA, aunque sí diferencias significativas el día 21 respecto del día 0 de la infección. No se observaron alteraciones macroscópicas en el intestino pero si un aumento de tamaño de los nódulos linfáticos. Aunque de estos no se pudo aislar *Map* en su cultivo, si de la mucosa ileal de las 6 vacas. Los hallazgos demuestran que animales adultos no infectados pueden infectarse al ingerir heces de animales infectados con una dosis que falcilmente puede encontrarse en condiciones naturales.

De todos estos estudios se concluye que los animales jóvenes son más susceptibles a desarrollar paratuberculosis que los adultos aunque los animales mayores de 4 meses también pueden infectarse (Doyle, 1953; Larsen *et al.*, 1975a), a diferencia de lo que se había sugerido anteriormente, aunque es cierto que en estos últimos casos las dosis utilizadas para infectarlos fueron elevadas. Sin embargo, Doyle (1953) sugiere que si su experimento se hubiera prolongado más allá de los 26 meses, los animales se hubieran recuperado, ya que aunque presentaron cultivos positivos y lesiones histológicas de paratuberculosis, los animales se encontraban en un buen estado. En este sentido, Payne y Rankin (1961a) concluyeron, en un estudio experimental comparativo entre terneros y vacas, que el desarrollo temprano de las lesiones en vacas adultas podría estar asociado a la eliminación de la infección y por lo tanto a una mayor resistencia de estos animales a la sufrir la enfermedad.

Desde entonces, pocos han sido los trabajos destinados a ampliar los conocimientos acerca de este aspecto de la patogenia en la especie bovina (Sweeney *et*

al., 1996; Helgerson *et al.*, 2006; Windsor y Whittington, 2010; Mitchell *et al*., 2012). En uno de estos estudios, Helgerson *et al*., (2006) comprobaron que tras 36 meses de experiento, tan sólo en una de las 10 vacas introducidas en un rebaño con 2 años de edad, se aisló *Map* en cultivo, poniendo de manifiesto la gran resistencia de los animales de esta edad a la infección.

En su caso, Sweeney (1996), en una revisión centrada en la transmisión de *Map*, afirma que la probabilidad de infectarse no declina totalmente en la edad adulta y que los veterinarios se enfrentan a menudo a la cuestión de decidir a qué edad se debe considerar a la reposición resistente a la infección, otorgándose en los trabajos revisados la misma resistencia a los animales de un año de edad que a los adultos y advirtiendo que los ganaderos deberían saber que cuanto más temprana sea la exposición de los animales, en el caso de desarrollarse enfermedad, esta será más grave (Sweeney, 1996). En este sentido, en un intento de determinar la edad en la que podría considerarse a un animal "sin riesgo" a la transmisión de *Map*, Windsor y Whittington (2010) revisaron las infecciones experimentales por diferentes vías, que se han citado en este apartado, realizadas entre los años 1938 y 2006 estableciendo 3 diferentes grupos de edades con resultados significativos, así de los animales menores de 6 meses, el 75% mostraron lesiones asociadas a la infección de *Map*; en el grupo de animales con edades comprendidas entre los 6 meses y el año de edad, las lesiones compatibles con paratuberculosis se redujeron al 50%, frente al 20% de animales con lesiones paratuberculosas y mayores del año, recomendándose, como ya se había citado anteriormente, reducir la exposición al agente al menos durante el primer año de vida.

El último trabajo revisado que estudia este aspecto es el meta-análisis desarrollado por Mitchell *et al*. (2012), en el que revisan la influencia de la edad así como la dosis en la eliminación de bacterias por heces en un total de 17 trabajos que incluyen el estudio de 194 animales, 21 de ellos pertenecientes a exposición natural y 173 desafiados experimentalmete. Concluyen que en las infecciones experimentales, la exposición a *Map* de animales adultos o en los que se ha usado múltiples exposiciones, produce una menor y más corta duración de de la fase de excreción temprana temprana así como una más lenta transición a que se conviertan en excretores tardíos.

Se han llevado a cabo estudios experimentales en la especie bovina en los que se han estudiado otros aspectos de la patogenia como la entrada de las micobacterias en el

hospedador (Payne y Rankin, 1961b), corroborando lo que había visto Dunkin en 1938, Rankin en su tesis de 1957 y Williams Smith en 1958 (citados por Payne y Rankin, 1961b), que la entrada de *Map* se poduciría por las tonsilas debido al aislamiento de *Map* y a la observación de lesiones en el tejido linfoide de la zona faríngea concluyendo que las tonsilas son el punto común de entrada para la infección experimental oral de *Map* (Payne y Rankin, 1961b), recordándoles el "complejo primario" de la tuberculosis, desde donde se extendería, estableciéndose posteriormente en el intestino y aumentando de gravedad a medida que pasara el tiempo de infección (Payne y Rankin, 1961b). Más recientemente, Waters *et al*., (2003) han utilizado con éxito, precisamente, la instilación tonsilar como vía infectiva.

Otro factor objeto de estudio ha sido valorar la eficacia de las vías de infección. Además de lo estudios citados anteriormente, donde se había utilizado la vía oral y la intravenosa, Stabel *et al*. (2009) trataron de comparar la efectividad de la vía oral y la intraperitoneal y a su vez, la eficacia 2 cepas de *Map*, la K-10 y un asilado de un caso clínico, mediante la valoración del nivel de infección y del desarrollo de lesiones, con cultivos y PCR de heces y tejidos así como con el estudio histológico. Como conclusiones finales y principales de este estudio se extrajeron, además de no observar casos clínicos en ninguno de los 15 terneros infectados a lo largo de los 12 meses que duró el estudio, que la ruta más efectiva para provocar la infección es la vía oral y la cepa más infectiva es la extraída de un caso clínico de paratuberculosis.

Eisenberg *et al*. (2011) contaron con 18 terneros que fueron infectados a los pocos días de nacer y sacrificados a los 3 meses para valorar la idoneidad de la vía respiratoria como método para la infección intestinal por *Map*, obteniendo valores de IFN-γ en sangre y de aislamiento positivo en tejidos intestinales superiores en los animales infectados por aerosoles y por vía traqueal en comparación con los infectados por vía oral. Estos autores concluyen que la infección intestinal por *Map* puede ser inducida por vías nasal y traqueal en terneros jóvenes y que por tanto, los bioaerosoles de las granjas deben ser considerados como una posible fuente de infección (Eisenberg *et al.*, 2011).

La vía intrauterina, como método experimental de infección de esta enfermedad fue probada por Owen y Thoen (1983). En su estudio inocularon tres vacas con gran

cantidad de bacerias (200-400 mg de peso seco) de las cuales tan solo una eliminó bacilos por heces a los 5 meses post infección y además fue la única que se quedó preñada, y abortó a los 8 meses de gestación. No obstante, el diseño del experimento no fue el adecuado al no comprobarse que fueran vacas libres de paratuberculosis al inicio, y al no mantenerse separadas de otras tres vacas infectadas por vía oral. (Whittington y Windsor, 2009). En una revisión hecha por Whittington y Windsor (2009) sobre la infección uterina se sugiere que esta vía no es letal para el feto, salvo que la exposición sea masiva como el caso que se describe anteriormente (Owen y Thoen, 1983).

También se han realizado estudios experimentales con el objetivo de ampliar conocimientos acerca de la respuesta inmune del hospedador frente a la infección por *Map*.Waters *et al*., (2003) desarrollaron un estudio en el que además de la respuesta inmune valoraron la aptitud de la vía tonsilar como punto de inoculación. En el estudio, tres terneros se infectaron semanalmente, entre las 2 y las 5 semanas, mediante instilación tonsilar comprobándose su infección antemorten, mediante cultivo de heces y postmorten, mediante cultivo de tejidos intestinales en la necropsia de los animales realizada a los 320 días postinfección. Curiosamente, y en lo relativo a la respuesta inmune, se detectaron anticuerpos mediante ELISA frente al antígeno LAM en las etapas tempranas de la infección, a los 134 dpi, precediendo a la respuesta celular, que se inició a los 194 dpi y que fue valorada mediante la respuesta en sangre del antígeno específico blastogénico, IFN-γ y óxido nítrico. En cuando a la estimulación *in vitro* con antígenos de *Map*, las células CD4+ proliferaron, produjeron IFN-γ e incrementaron la expresión de células CD26 y CD45RO. Además, se observó la inmunodominancia de dos antígenos de 50 y 60kDa valorados por inmunoblot, en las etapas tempranas de la enfermedad.

Otro estudio con el objetivo de observar marcadores tempranos de inmunidad celular en terneros infectados experimentalmente con *Map*, fue el llevado a cabo por Stabel y Robbe-Austerman (2011). Con los mismos animales y diseño que el estudio ya descrito de Stabel *et al*. (2009), estos autores observaron que el primer marcador en emerger fue el IFN-γ, detectado a los 7 días en animales infectados por vía intraperitoneal y entre los 90 y 120 días en el resto de grupos, manteniéndose en niveles elevados hasta el final del estudio (Stabel y Robbe-Austerman, 2011). En cuanto a la

detección de la IL-10, se observó que en los animales infectados por vía oral, al mes post-infección, la producción de esta citoquina era mayor en los animales infectados por vía oral, tanto con la cepa K-10 como los infectados con raspado de mucosa de un caso clínico, pero al final del experimento la producción de IL-10 había caído en todos los grupos (Stabel y Robbe-Austerman, 2011). Los marcadores CD25, CD26 y CD45RO/CD5 presentaban una expresión significativamente mayor en los animales infectados comparados con los controles, al igual que iNOS entre los 6 y los 12 meses del estudio. Igualmente, la proliferación de linfocitos específicos de antígeno resultó mayor en los animales infectados por vía oral, entre los 9 y 12 meses postinfección (Stabel y Robbe-Austerman, 2011). En resumen, los autores indican que la infección de terneros neonatos con *Map* invoca una respuesta inmunológica temprana caracterizada por una fuerte producción de IFN-γ e inducción de la expresión de CD25 y CD45RO en la subpoblación de células T. A ello le sigue la proliferación de linfocitos específicos de antígeno, secreción de iNOS y expresión de marcadores CD26 y CD25 en la parte final del estudio, a los 12 meses (Stabel y Robbe-Austerman, 2011).

Este mismo grupo llevó a cabo otro estudio, pararelo a los ya mencionados, con el objetivo de conocer la influencia en el porcentaje todal de células B en sangre periférica y la subpoblación de CD5, CD25 y CD45RO (Stabel *et al*., 2011a). Se obsevó que tras la infección experimental, se produce una inducción en la respuesta de las células B, con diferentes respuestas producidas en relación al método experimental de inoculación. Tanto en los animales infectados por vía oral como los desafiados por vía intraperitoneal se produce un incremento en la expresión de CD25+ y CD45RO+ en los momentos iniciales del estudio, mientras que los resultados más significativos se alcanzan a los 12 meses postinfección en los terneros infectados por vía oral, tanto en los inoculados con la cepa K-10 como los infectados con raspado de mucosa de un caso clínico. No obstante, se obtuvo mayor reactividad en suero en el grupo infectado por vía intraperitoneal usando inmunoblot con un sonicado de *Map* (Stabel *et al*., 2011a).

En cuanto a la cepa a utilizar en las infecciones experimentales, Gilmour *et al.* publican en 1965 un doble estudio en el que comparan por un lado la capacidad de infección de una cepa a dosis diferentes y por el otro lado valoran el efecto de la vacunación (Gilmour *et al*., 1965a). En el primero de los dos experimentos, los investigadores infectan por vía oral, con una cepa extraída de un caso clínico de

paratuberculosis, a 26 terneros de 3 semanas de edad, una vez por semana durante 10 semanas, con dosis diferentes (10^{10} y 10^{8}), y sacrifican a animales de ambos grupos a los 1, 3, 6 y entre los 11 y 13 meses después de las 10 semanas post-infección. No se observaron signos clínicos durante el tiempo que duró el experimento. Sin embargo en el cultivo de órganos se detectó *Map* casi exclusivamente en inestino y nódulos linfáticos asociados, con mayor número de resultados positivos en los animales infectados con dosis mayores y en intestino más que en nódulos linfáticos. Tampoco se observaron lesiones macroscópicas aunque se encontraron lesiones microscópica en nódulos linfáticos y placas de Peyer en animales de ambos grupos, en el mismo número de animales, encontrándose más tempranamente en el lote de dosis más bajas.

No obstante la mayoría de estudios experimentales acerca de cepas han ido encaminados al estudio comparativo de cepas ovinas, bovinas o incluso de bisonte, aunque la mayoría de estudios en este sentido se han llevado a cabo en la especie ovina, los cuales se describirán en el siguiente apartado. En terneros, Stewart *et al*. (2007) infectaron individuos de 6 semanas de edad con una cepa aislada un caso clínico bovino mantenidos bajo estudio durante 54 meses y otros terneros de 14 semanas de edad con una cepa de un caso clínico ovino, mantenidos bajo estudio durante 35 meses. En cuanto a la excreción de bacterias por heces, ésta se produjo en alguno de los terneros infectados con la cepa bovina en alguno de los muestreos a lo largo del estudio, no así en los infectados con la cepa ovina. La respuesta inmune celular fue sustancialmente más elevada en los animales infectados con la cepa bovina durante los primeros 42 meses del experimento, mientras que los infectados con la cepa ovina no se observaban diferencias con los de los controles. En ninguno de los grupos, sin embargo, se observaron signos clínicos, aunque uno de los animales del grupo infectado con mucosa bovina permaneció como excretor persistente así como productor persistente de anticuerpos. En la necropsia no se observaron lesiones macroscópicas ni cultivo positivo de tejidos.

En un estudio anterior realizado por Stabel *et al.* (2003) se comparó la infectividad de cepas bovina y de bisonte, en terneros y crías de bisontes infectados mediante un tubo estomacal con 60 ml de raspado de mucosa de un caso clínico a los 1, 2, 3, 7 y 14 días. Se inocularon 6 terneros y 6 bisontes con cada uno de los inóculos, que se sacrificaron a los 6 meses. No se observaron signos clínicos y la excreción de

bacterias en heces fue mínima en ambas especies durante todo el experimento. La respuesta proliferativa a mitógenos de células T fue mayor en bisontes, mientras que la producción de IFN-γ fue mayor en terneros. En ningún grupo se detectaron anticuerpos mediante el test ELISA. El cultivo de tejidos demostró que la cepa bovina producía mayor colonización de tejidos en bisontes mientras que en terneros la ocasionaba la cepa de bisonte. Aunque no se observaron alteraciones en la necropsia, el estudio histológico reveló lesiones compatibles con paratuberculosis tan sólo en tres bisontes infectados con la cepa bovina y en un ternero inoculado con la mucosa del caso clínico de bisonte (Stabel *et al*., 2003).

La capacidad infectiva de cepas procedentes de otras especies animales, como los conejos, también ha sido valorada en un estudio en el que se contó con 18 terneros de entre 1 y 5 días de edad, de los que 8 se infectarion oralmente con un aislado de un conejo silvestre (grupo L), 4 con un aislado de vaca (grupo B) y los 6 restantes se mantuvieron como control (grupo C) (Beard *et al*., 2001c). Como resultados más destacados, se observó la presencia de algún resultado positivo en cultivo de heces en 5 de los animales del grupo L, y ninguno en el resto de grupos; 7 y 3 animales positivos a cultivo de tejidos intestinales de los grupos L y B, respectivamente; y lesiones histológicas en 3 y 2 de los animales de los grupos L y B respectivamente. En vista de estos resultados, se sugiere que los conejos son capaces de transmitir la enfermedad a los rumiantes domésticos y que los reservorios de vida silvestre de *Map* deberían ser tenidos en cuanta en los planes de control de paratuberculosis (Beard *et al*., 2001c).

La infección experimental de terneros con la intención de valorar la efectividad de vacunas para el control de paratuberculosis ha sido objeto de varios estudios. En el experimento antes citado, Gilmour *et al* (1965a) utilizan 20 terneros, de los cuales la mitad son vacunados al mes de edad e infectados un mes más tarde con una dosis de 10^9 unidades de una cepa obtenida de un caso clínico y los otros 10 animales se infectaron pero no se vacunaron. La mitad de los animales de cada grupo se sacrificó al mes y a los seis meses postinfección. El número de colonias contadas en los tejidos fue mucho menor y en menos tejidos en el grupo de animales sensibilizados con 1ml de una vacuna muerta que en el grupo de animales que no fueron vacunados; así mismo, el intestino delgado mostró mayor número de resultados positivos que los nódulos linfáticos. (Gilmour *et al*., 1965a). Stuart (1965b) estudia, además, el efecto de la revacunación.

Para ello contó con 85 terneras a las que se sometió a una importante carga infectiva durante 5 años. Los animales fueron vacunados a la semana de edad. La protección frente a la enfermedad resultó significativa en las 28 terneras vacunadas una sola vez, no lográndose en aquellas 28 que fueron revacunadas a los 2,5 y 4 años, resultado que el autor atribuye a que el nódulo vacunal se encontraba en crecimiento y la sensibilidad a la tuberculina era muy fuerte, además de que la exposición muy prolongada a la infección impediría el desarrollo de una inmunidad extra por la revacunación (Stuart, 1965b). Igualmente, existen estudios más recientes como el llevado a cabo por Santema *et al*. (2012) en el que se valoró una vacuna con *Map* recombinante Hsp70 con adyuvante DDA (Hsp70/DDA) para lo que se contó con cuatro grupos de 14 animales a los que se vacunó a los 0, 84, 168 y 357 días. La infección, en 7 animales de cada grupo, se realizó con 20g de heces (100-200 UFC/g) en nueve dosis repartidas a lo largo de tres semanas, con el primer desafío el día 0 del estudio. Se realizó una toma de muestras de heces y sangre cada tres semanas y el sacrificio a los 558 dpv. Los resultados más destacados del estudio basados en el análisis de heces fueron que el pico de infección, valorado mediante la excreción fecal, se encontraba a los 130 dpi, tanto en el grupo de animales infectados como en los animales no inmunizados. En cuanto a la colonización de tejidos no se encontraron diferencias significativas entre los animales vacunados y los no vacunados. Los resultados indican que la vacunación con HSP70/DDA no influye en la dinámica de los primeros estadios tras la infección experimental. En un estudio previo de Uzonna *et al*. (2003) se valoraron dos vacunas, las elaboradas con la cepa 18 de *M. avium* subespecies *avium* (Mycopar®) y una cepa de campo, junto con un adyuvante elaborado con IL-12 humana recombinante. Para ello vacunaron terneros a los 7-8 días de edad, e infectaron a unos grupos antes de la infección, a los 2-3 días de edad, y a otros después, a los 28 días, estableciendo grupos de animales vacunados e infectados, vacunados no infectados, no vacunados e infectados, vacunados con el adyuvante e infectados, vacunados con el adyuvante y no infectados, así como controles no vacunados ni infectados. El inóculo consistía en 10^{10} UFC extraídas de cultivo de heces administrado en 60 ml de leche. Los animales fueron sacrificados a los 49 dpi. Como conclusión general, se observóque la vacuna elaborada con la cepa de campo era más eficaz que Mycopar® y que el adyuvante utilizado puede prevenir la infección en algunos casos así como que su efecto global sobre la respuesta inmune basada en la detección de IFN-γ y la carga micobacteriana no fue estadísticamente significativa, además de que la vacunación es más efectiva si se realiza

de forma previa a la infección. No obstante, las dos vacunas desencadenaron una mayor respuesta tanto a nivel local como sistémico, independientemente de cuando se produjera la infección. Los resultados, en cambio, fueron diferentes en cuanto a la carga bacteriana en el cultivo, ya que en el caso de la vacuna con cepa de campo había diferencias significativas entre la positividad de los animales no vacunados frente a los que si estaban vacunados, mientras que con Mycopar® estas diferencias no eran significativas. Además, cuando se utilizó el adyuvante en las vacunas, se comprobó una diferencia reseñable en cuanto al momento de realizar la vacunación: si esta se producía después de la infección todos los animales resultaban positivos al cultivo, mientras que si la infección iba seguida de la vacunación, 2 de los 5 animales vacunados con Mycopar® y 1 de los 3 vacunados con la cepa de campo, no mostraron positividad en el cultivo.

También se han realizado estudios a corto plazo para valorar la efectividad vacunal previa a una infección experimental en esta especie (Sweeney *et al*., 2009). Para ello se contó con 12 terneros de catorce días de edad de los cuales 6 fueron vacunados con 1 ml con una inyección subcutánea en el cuello de una vacuna muerta y los otros 6 fueron mantenidos como controles no vacunados. Todos los animales fueron infectados a los 21 y 22 dpv con 1,2x 10^9 UFC. Los animales fueron sacrificados a las 9 semanas postinfección. Durante todo el tiempo que duró el experimento no hubo positividad al test ELISA, la valoración de la libereación de IFN-γtanto por linfocitos de sangre periférica como por los linfocitos de nódulo preescapular, fue mayor en los animales vacunados que en los no vacunados ya desde la primera valoración a los 7 dpv, al contrario que la cantidad de UFC tras el cultivo de órganos, que fue menor y se obtuvo a partir de menos órganos en los animales vacunados. En el estudio histológico no se observó ninguna alteración, salvo la presencia de escasos BAAR en el íleon de dos animales vacunados (Sweeney *et al*., 2009).

II.7.2. Infecciones experimentales en la especie ovina

En la especie ovina, al igual que en las anteriores, los experimentos a largo plazo se utilizan para estudiar la patogenia, eficacia de vacunas así como para evaluar técnicas de diagnóstico.

Cualquier raza puede ser utilizada, aunque la preferida es la merina, ya que es mas susceptible (Hines II *et al.*, 2007b). A los animales se les deben administrar cantidades adecuadas de calostro y deben provenir de granjas libres de la enfermedad, en las que los adultos sean negativos al ELISA indirecto y a cultivos fecales durante, al menos, un año y en los que no se haya llevado a cabo la vacunación (Hines II *et al*., 2007b). En cuanto a las cepas, han sido utilizadas cepas ovinas (Brotherston *et al*., 1961; Gilmour y Brotherston, 1962; Nisbet *et al*., 1962; Gilmour y Brotherston, 1966; Gilmour *et al*., 1978; Williams *et al*., 1983a; Gwozdz y Thompson, 2002; Gwozdz *et al*., 2000a, b y 2001; Reddacliff y Whitington, 2003; Kurade *et al*., 2004; Stewart *et al*., 2004; Begg *et al*., 2005; Verna *et al*., 2007; Delgado *et al*., 2012, 2013; Fernández *et al*., 2014a), bovinas (Kluge *et al*., 1968; Merkal *et al*., 1968a y b; Juste *et al*., 1994; Stewart *et al*., 2004; Verna *et al*., 2007; Fernández *et al*., 2014a) y de animales silvestres (Burrels *et al*., 1995; Begara-McGorum *et al*., 1998). Es aceptable utilizar cualquiera aislado de ovino con clínica que pueda ser cultivado *in vitro*. En diversos trabajos se ha utilizado como inóculo un homogeneizado de tejido linfoide o de raspado de mucosa intestinal de animales clínicamente afectados (Hines II *et al*., 2007b) que, se ha señalado que no debe ser usado como método standard para reproducir la infección (Hines II *et al*., 2007b), para lo que sería más útil emplear una cepa virulenta de pocos pases, cultivada *in vitro*, preferiblemente en el medio de cultivo Middlebrook 7H11 (Hines II *et al*., 2007b).

La ruta normal de aplicación es la oral (Brotherston *et al*., 1961; Gilmour y Brotherston, 1982; Nisbet *et al*., 1962; Gilmour y Brotherston, 1966; Kluge *et al*., 1968; Merkal *et al*., 1968a, b; Gilmour *et al*., 1978; Williams *et al*., 1983a, Juste *et al*., 1994; Burrells *et al*., 1995; Begara-McGorum *et al*., 1998; Reddacliff y Whittington, 2003; Kurade *et al*., 2004; Stewart *et al*., 2004; Begg *et al*., 2005; Verna *et al*., 2007; Delgado *et al*., 2012, 2013; Fernández *et al*., 2014a) , y además se considera la mejor debido a que semeja las condiciones naturales, como en las otras especies descritas (Hines II *et al*., 2007b), aunque se han usado otras como la intravenosa (Brotherston *et al*., 1961; Kluge *et al*., 1968; Merkal *et al*., 1968a y b) o la intratraqueal (Kluge *et al*., 1968; Merkal *et al*., 1968a y b; Begg *et al*., 2005).

Las dosis utilizadas en las diferentes experiencias se encuentran entre los 15 y los 200 mg (Kluge *et al*., 1968) de peso seco de organismos, entre los 2,6 x 10^1 (no efectiva) (Reddacliff y Whittington, 2003) y 2,6 x 10^{11} UFC y entre 0,65 y 80 g de tejido de intestino de un caso clínico macerado (Hines II *et al*., 2007b). En esta especie, se considera que tres dosis consecutivas de 10^9 microorganismos por vía oral, son suficientes para instaurar la infección (Begg y Griffin, 2005).

La edad adecuada a la que debe administrarse el inóculo depende del objetivo del estudio, pero se considera que cualquier edad hasta los 4 meses es adecuada (Hines II *et al*., 2007b).

Para determinar el estado de infección de los animales se deben realizar, al menos, necropsias y estudios histopatológicos y de cultivo bacteriano. Además el método utilizado para clasificar las lesiones macro y microscópicas debe establecerse de tal manera que pueda ser analizado mediante estadística como el desarrollado por Juste *et al*. (1994) en esta especie. Deberían observarse los animales hasta que al menos algunos de ellos desarrollase signos clínicos. (Hines II *et al*., 2007b).

Diversas han sido las infecciones experimentales realizadas en esta especie en nuestro país, destacando las llevadas a cabo por nuestro grupo de trabajo. Así la más reciente es la que ha tenido como objetivo establecer el efecto de diferentes cepas ovinas y bovinas sobre la patogénesis de la paratuberculosis ovina (Fernández *et al*., 2014a). Para ello se contó con 30 corderos de 1,5 meses de edad de raza Assaf a los que se dividió en 5 grupos, cada uno de ellos de 6 animales. Uno de los grupos fue el control sin infectar y los otros 4 fueron infectados por vía oral con 4 cepas diferentes, dos ovinas (S-type), la 22G y la pigmentada Ovicap49; y dos bovinas (C-type), la 764 y la cepa de referencia K-10. Los animales fueron sacrificados en dos momentos de la experiencia, a los 150 y 390 días postinfección. Se obervó que las respuestas celular y humoral fueron superiores en los grupos infectados con las cepas bovinas, y que los animales infectados con las cepa ovinas no desarrollaron una respuesta inmune celular consistente, observándose en estos animales, tras el sacrificio, que las lesiones se restringían al tejido linfoide, y con igual intensidad en los animales sacrificados a los 150 y 390 días post-infección. En los grupos infectados con las cepas bovinas, sin embargo, las lesiones, caracterizadas por granulomas bien demarcados con fibrosis, disminuían en intensidad en el segundo sacrificio respecto del primero. Estos resultados

sugieren a los autores la gran influencia que la cepa de *Map* tendría en la patogenia de la paratuberculosis bvina, mostrando, las infecciones con cepas bovinas un carácter regresivo y la tendencia a disminuir a medida que la infección progresa (Fernández *et al*., 2014a). Otro trabajo anterior de nuestro grupo, con similar objetivo de evaluar las diferentes respuesta inmunopatologicas inducidas por diferentes cepas, contó con 28 corderos de 1 meses de edad divididos en seis grupos, dos de ellos infectados con 2 cepas bovinas con diferente patrón B*st*EII-IS900-RFLP (patrones E y A), de 4 y 5 animales respectivamente; otros dos, de 5 animales cada uno, infectados uno con una cepa bovina de patrón genético diferente, y y el otro con un homogeneizado de mucosa intestinal bovina. Los 5 animales del siguiente grupo fueron desafiados con raspado de mucosa de un caso clínico ovino. Finalmente el sexto grupo, lo compusieron 4 animales no infectados y tomados como control. A los 150 días post infección los animales fueron sacrificados. Se comprobó que las lesiones estaban ampliamentre realacionadas con el tipo de cepa. Así las lesiones del grupo infectado con la cepa ovina fueron mucho más graves que las de los otros cuatro grupos, relacionándose principalmete con el tejido linfoide intestinal, sin necrosis, fibrosis, ni células gigantes, que, sin embargo, si aparecían en los grupos infectados con cepas bovinas. Además, en estos grupos, las lesiones aparecían principalmente en nódulos linfáticos mesentéricos, habiendo diferencias incluso entre ellos, con mayor número de lesiones y más extensas en los grupos 1 y 2 (Verna et al., 2007).

Otro de los objetivos propuestos por este grupo de trabajo fue estudiar la influencia de la edad en el desarrollo de la respuesta inmune (Delgado *et al*., 2012) y de lesiones asociadas a la paratuberculosis ovina (Delgado *et al*., 2013). Para ello se infectaron 16 corderos de 1,5 meses de edad y 23 ovejas adultas, tenieendo como controles sin infectar 8 corderos y 7 ovejas, todos de raza Churra. Los animales infectados fueron divididos, a su vez, en dos grupos para su inoculación, así a un grupo se le administró una dosis baja ($1{,}2x10^3$ *Map*/ml) del inóculo y al otro una dosis elevada ($3x10^8$ *Map*/ml). Los animales fueron sacrificados a los 110 y 210 días post infección. Los anticuerpos y el nivel de IFN-γ en sangre, así como la respuesta a la IDR aparecieron de forma más temprana y con más intensidad en ovejas adultas, lo que sugiere una mayor eficiencia en el control de la progresión de la infección que en corderos, posiblemente debido a la existencia de contactos previos con la micobacetria en ovejas adultas (Delgado *et al.*, 2012). Las lesiones asociadas con paratuberculosis tan

solo fueron halladas en los animales infectados con dosis altas (en el 92,3% de ovejas y el 100% de corderos), lo cual sugiere la posibilidad de infección de animales adultos por *Map*, pero mientras en las ovejas las lesiones eran escasas y restringidas al tejido linfoide, en los corderos eran más numerosas y se extendían hasta la lámina propia (Delgado *et al.*, 2013).

La infección experimental de nuestro grupo realacionada con la vacunación, y más concreatamente con la valoración de diferentes adyuvantes, fue la llevada a cabo por Reyes en su tesis doctoral (2007) cuyo estudio se ha tratado en el apartado de vacunación. En nuestro país también se han llevado a cabo otros estudios experimentales para valorar la eficacia de la vacunación en esta especie, como el desarrolado por Juste *et al*. en 1994 en el que se inocularon 13 corderos de Rasa Aragonesa, de los cuales 8 fueron vacunados y 5 no; además se tuvieron otros 4 animales como controles no infectados, 2 de ellos vacunados y los otros 2 no. Los animales vacunados e infectados mostraron una rápida y fuerte respuesta al ELISA indirecto, con aislamientos fecales de la micobacteria a lo largo del experimento y con resultados positivos en el cultivo de órganos tras los sacrificios llevados a cabo a los 15, 45, 120 y 220 dpi. El estudio histológico reveló datos variables en los diferentes momentos del sacrificio, pero en general se obaservó que, al igual que a nivel bacteriológico, la vacunación confería una protección en cuanto al desarrollo de lesiones histológicas. Estas comenzaron a aparecer a los 45 dpv y se caracterizaban, generalmente, por ser focales y localizadas en áreas interfoliculares de las placas de Peyer.

II.7.3. Infecciones experimentales en la especie caprina

En la especie caprina, como recomendaciones generales adicionales a las descritas en el apartado II.7, en los modelos experimentales de larga duración, la selección de cabritos se debe hacer de granjas en las que los adultos hayan sido negativos a las pruebas de ELISA indirecto y al cultivo fecal durante al menos 1 año y que no se hayan vacunado, sin que sean de una raza específica. A estos cabritos se les debe administrar calostro de alta calidad (Hines II *et al*., 2007b).

Para la infección, en los caprinos, se han utilizado cepas tanto caprinas (Sigurdardottir *et al.*, 1999; Sigurdadottir *et al*., 2001; Storset *et al*., 2001; Valheim *et*

al., 2002b; Munjal *et al*., 2005; Hines II *et al* 2007a), como bovinas (Levi, 1948; Sigurdardottir *et al*., 2001; Stewart *et al*., 2006), ovinas (Stewart *et al*., 2006) e incluso humanas (Van Kruinningen *et al*., 1986). En algunas ocasiones el inóculo se ha obtenido de cultivos (Levi, 1948; Van Kruiningen *et al*., 1986; Sigurdartottir *et al*., 1999; Sigurdardottir *et al*., 2001; Storset *et al*., 2001; Valheim *et al*., 2002; Munjal *et al*., 2005; Stewart *et al*., 2006; Hines II *et al*., 2007a), mientras que en otras procedía de raspados de mucosa de un caso clínico de paratuberculosis (Levi *et al*., 1948). Se recomienda el uso de una cepa aislada en cultivo de un caso clínico, virulenta, de pocos pases, de una cepa con genotipo típico bovino o semejante a la cepa K-10 bovina (Hines II *et al*., 2007b) Para la preparación del mismo, deberían seguirse las mismas indicaciones que en el caso de los inóculos bovinos.

Las rutas empleadas han sido la intratraqueal e intravenosa (Harding, 1957) y sobre todo la oral (Harding, 1957; Van Kruiningen *et al*., 1986; Sigurdardottir *et al*., 1999; Storset *et al*., 2001; Valheim *et al*., 2002; Munjal *et al*., 2005; Stewart *et al*., 2006; Hines II *et al*., 2007a), siendo todas efectivas en causar infección, aunque se considera que la ruta oral es la mejor y además la que más se asemeja a las condiciones naturales. La cantidad del inóculo varía de 2,37 mg de un aislado (Sigurdardóttir *et al*., 2001) a 20 g de mucosa (Stewart *et al*., 2006) y entre 10^7 UFC (Van Kruiningen *et al*., 1986; Sigurdardottir *et al*., 2001) y 10^{10} UFC (Munjal *et al*., 2005; Steward *et al*., 2006). Se considera que dos dosis de 10^9 organismos deberían ser suficientes para establecer la infección en cabritos. La edad de infección varía desde 2 días (Van Kruiningen *et al*., 1986) hasta 10 meses de edad (Stewart *et al*., 2006), dependiendo del objetivo del estudio. Para determinar el nivel de infección, se recomienda el empleo de una combinación de cultivo, PCR, e histopatología usando métodos cuantitativos y semicuantitativos. Las lesiones deben ser valoradas con un sistema que permita realizar un estudio estadístico. En el caso del cultivo, se deben seguir las mismas indicaciones que en la especie bovina (Hines II *et al*., 2007b).

El primero de los estudios llevado a acabo por Levi (1948) consistió en varios experimentos. Como resultados más interesantes desatacan que la infección en cabras puede ser desarrollada con una pequeña cantidad de inóculo, en este caso de 24 a 43 mg de raspado suministrado en 3-8 dosis. Además, como ya sucedía en la especie bovina, las cabras podrían infectarse por vía oral y la resistencia a la infección por esta vía se

incrementa con la edad. Igualmente se observó que aquellos animales mantenidos bajo condiciones experimentales durante 9 meses, desarrollaban, como mínimo, lesiones histológicas, sugiriendo que aquellos que no desarrollaron signos clínicos y lesiones macroscópicas hubieran sucumbido a la infección de haberse mantenido más tiempo en condiciones experimentales (Levi, 1948)

Estudios posteriores, desarrollados n Noruega, han tenido diversos objetivos. Sigurdardottir *et al*., (1999) llevaron a cabo un estudio con el fin de determinar si los métodos de diagnóstico convencionales serían capaces de determinar la infección en las etapas tempranas. Para ello se infectaron 8 cabras con una suspensión en leche de 100 mg de *Map* y 4 cabras fueron mantenidas como control, y sacrificándose entre las 3 y las 49 semanas; la edad de los animaless estaba comprendida entre 1,5 y los 12 mesess. De los animales infectados, en 3 se observaron lesiones histológicas compatibles con paratuberculosis: 3 de los animales mantenidos más tiempo bajo condiciones experimentales de los que se tiene datos de la necropsia (sacrificados a las 17, 24 y 37 semanas post-infección), de los cuales 2 fueron positivos a bacteriología, y uno de ellos, a su vez, positivo a test inmunológicos (IDR, ELISA y Fijación del complemento), señalando por tanto estos autores la mayor sensibilidad de la histología frente las otras técnicas de diagnóstico empleadas (Sigurdardottir *et al*., 1999).

En cuanto a estudios experimentales a corto plazo, también llevados a cabo por el grupo noruego, se realizaron para estudiar las interacciones iniciales del hospedador y la bacteria, como el caso de Sigurdardottir *et al.* (2001) en la que se exponen cuatro segmentos de intestino delgado mediante incisión en el flanco derecho y las bacterias son inyectadas a la luz de los mismos. Otro experimento fue el realizado por estos autores años más tarde (Sigurdardóttir *et al*., 2005), en el que tras la necropsia del animal se extrae el intestino y de este, se toman tramos de aproximadamente 1 cm y se invienten, lavan y se cultivan 60 minutos a 37ºC en una solución que contiene micobacterias marcadas radioactivamente, tras lo cual se lava el tejido. Se mide la radiactividad del medio y la del tejido tras la incubación, calculándose así la captación de bacterias. Comprobaron que *Map* puede entrar a través de la mucosa del yeyuno, tanto por zonas con placas de Peyer como sin ellas, y por tanto, no solo a través de las células M, como se había scomprobado preeviamente, sino a través de enterocitos (Sigurdrdottir *et al*., 2005).

II.7.4. Infecciones experimentales en otras especies

Otras especies utilizadas como modelo de infección de paratuberculosis son los cérvidos, (Williams *et al*., 1983a y b; Mackintosh *et al*., 2003 y 2005; O`Brien *et al*., 2006; Mackintosh *et al*., 2007), en su mayoría el ciervo rojo (*Cervus elaphus*) que parece tener mayor susceptibilidad (Mackintosh *et al*., 2003), o cruces de muflón (Williams *et al*., 1983a), así como el alce (Williams *et al*., 1983b) y bisonte (Stabel *et al*., 2003). En ellas, se han desarrollado modelos a largo plazo para estudios de patogénesis y de eficacia de vacunas (Mackintosh *et al*., 2008) que también pueden ser usados para ensayos de diagnóstico y de resistencia heredable, la cual ha sido comprobada por Mackintosh *et al*. (2000) en cérvidos. Esta especie parece ser muy útil para evaluar marcadores para el diagnóstico de la infección (Griffin *et al*., 2005) puesto que los ciervos experimentalmente infectados muestran un amplio espectro, inmunológico, patológico y clínico. La mayoría de ciervos naturalmente infectados presentan cepas bovinas, por tanto esta especie pudiera ser una alternativa para el modelo de infección de la especie bovina. Lo descrito para las cepas, dosis y rutas de inoculación e infección en los modelos bovinos y caprinos puede ser aplicado para esta especie (Hines II *et al*., 2007b).

En cuanto a los animales de laboratorio, se han llevado a cabo muchos estudios experimentales en diferentes especies para estudiar su aptitud a la hora de reproducir esta enfermedad. Entre ellas los hamsters (Francis, 1943; Hirch, 1956; Gilmour *et al*., 1963; Larsen *et al*., 1975b; Larsen y Miller, 1978), cobayas (Francis, 1943; Merkal *et al*., 1982; Collins *et al*., 1983; Steadham *et al*., 2002), jerbos (Larsen *et al*., 1976), conejos (Francis, 1943; Hirch, 1956; Rankin, 1958b; Harding, 1959; Collins *et al*., 1983; Körmendy *et al*., 1986; Mokresh *et al*., 1989; Mokresh y Butler, 1990; Vaughan *et al*., 2005), ratas (Chandler, 1961a; Koets *et al*., 2000), y ratones (Collins *et al*., 1983; Hamilton *et al*., 1989, 1991; Adams *et al*., 1993; Tanaka *et al*., 1994, 2000; Veazey *et al*., 1995a, 1995b; Stabel *et al*., 1998; Thomsen *et al*., 2001), siendo los modelos murinos los más utilizados, aunque no se consideran los más adecuados, al no reproducirse la enfermedad de la misma manera que en los rumiantes (Rankin, 1959; Stevenson, 2006; Begg y Whittington, 2008). Su uso está principalmente encaminado a estudios de eficacia vacunal o análisis preliminares de patogenia. Además, gracias a su

fácil manejo, mantenimiento económico, desarrollo más rápido de la infección –lo que ayuda a acortar el tiempo de las experiencias-, características inmunológicas similares a la de los rumiantes, y, en el caso de ratones, la existencia de animales mutados genéticamente que permiten estudiar diversos aspectos de la interacción hospedador-*Map* a nivel molecular, el uso de animales de laboratorio es muy interesante para estudiar la paratuberculosis (Stevenson, 2006; Hines II *et al*., 2007b; Begg y Whittington, 2008).

El modelo experimental murino es uno de los más empleados para la valoración preliminar de vacunas (Scandurra *et al*., 2010) o para estudiar la implicación de determinados genes en la mayor o menor resistencia a la infección (Tanaka *et al*., 2000; Shin *et al*., 2006). Las cepas de *Map* utilizadas con más frecuencia han sido aisladas de bovinos (Francis *et al*., 1943; Chandler, 1961a, 1961b; Mutwiri *et al*., 1992, 2001; Scandurra *et al*., 2010) o cepas de origen humano -cepa Linda- (Hamilton *et al*., 1989, 1991; Adams *et al*., 1993). Se ha señalado que los ratones presentan signos clínicos similares a los rumiantes, como la pérdida de peso (Mutwiri *et al*., 1992) así como características inmunológicas y células predominantes en las lesiones similares las observadas en la paratuberculosis bovina, es decir macrófagos, células epitelioides, células gigantes y linfocitos (Lominski *et al*., 1956; Chandler *et al*., 1961a; Chandler *et al*., 1962; Hamilton *et al*., 1991; Mutwiri *et al*., 1992; Admas *et al*., 1993; Chiodini y Buergelt, 1993; Tanaka *et al*., 1994; Veazey *et al*., 1995b; Stabel *et al*., 1998; Tanaka *et al*., 2000; Mutwiri *et al*., 2001; Stabel y Ackermann, 2002; Shin *et al*., 2006). No obstante el grado de colonización bacteriana y el tipo de células observadas en las lesiones granulomatosas dependen de la base genética del ratón así como de la cepa micobacteriana (Mullerad *et al*., 2002b; Shin *et al*., 2006; Tanaka *et al*., 1994). La elección de la estirpe del ratón depende del estudio que se quiera realizar, y aunque tanto en aquellas resistentes como en las susceptibles se observan lesiones granulomatosas, su número y el grado de colonización descienden considerablemente en las estirpes resistentes. En la mayoría de estudios, las lesiones se desarrollan inicialmete en hígado y bazo antes que en intestino (Francis, 1943; Harding, 1959; Mutwiri *et al*., 1992) -aunque en alguna experiencia se consiguiera la reproducción de la infección intestinal con éxito (Lominski *et al*., 1956), incluso limitada a nódulos linfáticos mesentéricos (Veazey *et al*., 1995). Hay quienes han señalado que el periodo de incubación necesario para observar lesiones en ratones es casi tan largo como la

esperanza de vida de los animales (Rankin, 1958a) y para reducirlo sería necesario el uso de ratones inmunodeprimidos (Hamilton *et al*., 1991; Mutwiri *et al*., 1992) aunque al presentar una respuesta inmune alterada, las respuesta inflamartoria de las lesiones no ofrecería la imagen granulomatosa típica (Mutwiri *et al*., 1992). En lo que respecta a las dosis empleadas, se ha establecido una relación entre el número y tamaño de las lesiones con la dosis administrada, siendo en ambos casos mayor en animales infectados con dosis elevadas ($4x10^9$ UFC por animal) que con dosis bajas ($4x10^6$ UFC por animal) de *Map*, (Tanaka *et al*., 2000). Otros autores utilizaron dosis menores ($1\text{-}2x10^5$ UFC por animal), tanto por vía oral como intraperitoneal, detectando aún así signos de infección en todos los animales, con pérdida de peso y emaciación (Mutwiri *et al*., 1992). En este caso, además, los ratones fueron más resistentes a la administración oral que intraperitoneal de *Map*, siendo esta última la ruta de infección más empleada en experimentos con estos animales de laboratorio. Se ha recomendado una dosis de 10^8 UFC por animal (aproximadamente 10 mg) de la cepa K-10 u otra relacionada, administrada intraperitonealmente (Hines II *et al*., 2007b) ya que esta vía preseta una reproductibilidad del 100%, comparada con otras rutas (Mutwiri *et al*., 1992).

Así mismo, se ha comprobado la existencia de estirpes de ratones genéticamente resistentes o sensibles a *Map* (Frelier *et al*., 1990), de manera que su elección para el diseño experimental influye altamente en el establecimiento de la infección por *Map*. Así, mientras las cepas BALB/c (Chiodini y Buergelt, 1993; Tanaka *et al*., 1994) o C57 (Chandler, 1961b; Veazey *et al*., 1995a, 1995b) parecen ser más susceptibles a la infección paratuberculosa, las C3H (Frelier *et al*., 1990; Tanaka *et al*., 1994; Veazey *et al*., 1995a,) o la “Swiss white” (Chandler, 1961b) presentarían una mayor resistencia.

En conejos, las infecciones experimentales han conseguido reproducir lesiones similares a las de la paratuberculosis e incluso sus síntomas, como son la diarrea intermitente y adelgazamiento con pérdida de los depósitos grasos del animal (Francis, 1943; Hirch, 1956; Rankin, 1958b; Mokresh *et al*., 1989). Se ha referido que las vías de administración del inóculo parecen jugar un papel crucial en localización posterior de las lesiones, ya que si los animales son infectados por vía parenteral, las lesiones granulomatosas aparecerían, además de en intestino y nódulos linfáticos mesentéricos, en diferentes órganos extradigestivos como el hígado, bazo, pulmón e incluso riñones (Rankin, 1958a; Harding, 1959; Körmendy *et al*., 1986; Mokresch y Butler, 1990), mientras que si el inóculo se administra vía oral, las alteraciones quedarían confinadas

principalmente al intestino delgado y nódulos linfáticos asociados (Mokresh *et al*., 1989; Mokresh y Butler, 1990; Vaughan *et al*., 2005). La edad de los animales resultaría crítica para llevar a cabo una infección experimental con éxito. Se ha señalado que el uso de gazapos de pocos días sería lo más adecuado (Mokresch y Bulter, 1990). El desafío en animales adultos otorga resultados más dispares, así mientras Rankin (1958b) no consiguió reproducir lesiones ni aislar bacterias de ningún animal de esta edad, Vaughan *et al.* (2005) obtuvo evidencias, mediante lesiones macroscópicas y cultivo radiométrico, pero tan solo en de dos de los cuatro conejos adultos infectados. Recientemente (Elguezabal *et al.*, 2014), se ha desarrollado un modelo de infección en conejos que ha demostrado su utilizadad en la valoración de la eficacia de vacunas.

El hámster ha sido señalado por algunos autores como la especie, dentro de los animales de laboratorio, más apropiada para el estudio experimental ya que *Map* se multiplicaría de manera más rápida en los tejidos que en otros animales de laboratorio (Hirch, 1959), En el lado opuesto se encuentran las ratas, que parecen muy poco apropiadas para el estudio experimental de paratuberculosis. Así Koets *et al*. (2000) no encontratron lesiones asociadas a esta enfermedad tras 9 meses en ninguna de las 28 ratas inoculadas por vía oral. En cuanto al jerbo, tras 14 semanas de infección Larsen *et al*. (1976) llegaron a la conclusión de que, aunque es una especie que puede infectarse por *Map*, no se trata de un modelo de elección para el estudio de esta enfermedad.

Otras especies monogátricas empleadas como modelo experimental de paratuberculosis han sido las aves (Larsen y Moon, 1972; Collins *et al*., 1983; Van Kruiningen *et al*., 1991; Valente *et al*., 1997). Para infectar pollos se han empleado tanto cepas de *Map* aisladas de vacuno (Larsen y Moon, 1972) como de pacientes con la enfermedad de Chron (van Kruiningen *et al*., 1991). En este último caso, se utilizaron la vía oral, la intracardiaca y la intraperitoneal, resultando más efectiva en cuanto a relación de animales infectados la intraperitoneal. Las lesiones se encontraron principalmente en ciego, bolsa de Fabricio, pulmones, hígado o pericardio. No obstante, aunque en tan solo dos de seis de los animales inoculados por vía oral se encontraron lesiones granulomatosas, estas fueron halladas más frecuentemente en tejido linfoide intestinal coincidiendo con lo observado en rumiantes (Nisbet *et al*., 1962; Juste *et al*., 1994; Pérez *et al*., 1996; Kurade *et al*., 2004). El caballo es una especie que también se ha utilizado para el estudio de paratuberculosis (Larsen et al., 1972). Mediante la

infección experimental de potros con un aislado bovino de *Map* por vía endovenosa y oral se comprobó que ambas vías eran adecuadas para conseguir la infección ya que, además de que dos animales infectados por vía endovenosa presentaron diarrea y adelgazamiento a los 35 y 84 dpi, todos los animales del experimento desarrollaron lesiones granulomatosas, siendo de mayor gravedad en los dos potros con clínica que presentaban una enteritis y linfadenitis granulomatosa difusa, así como engrosamiento de la porción distal del intestino delgado y nódulo linfático mesentérico adyacente (Larsen *et al*., 1972). Finalmente el ganado porcino ha sido utilizado con éxito para reproducir la infección granulomatosa utilizando para ello tanto cepas aisladas de ganado porcino (Ringdal, 1963; Jorgensen, 1969) como de ganado vacuno (Jorgensen, 1969; Larsen *et al.*, 1971). Aunque no se han observado signos clínicos de paratuberculosis en esta especie, si se han hallado las típicas lesiones en intestino y nódulos linfáticos asociados tras la infección oral (Jorgensen, 1969; Larsen *et al*., 1971) e intravenosa de *Map* (Larsen *et al.*, 1971) acompañado, en algunos casos, de excreción de bacterias por heces (Larsen *et al.* 1971).

II.8. RELACIÓN ENTRE LA PARATUBERCULOSIS Y LA TUBERCULOSIS BOVINA

La tuberculosis es una enfermedad infecciosa crónica causada por micobacterias incluidas en el complejo *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC) que afecta al hombre y a los animales mamíferos. Se transmite principalmente por vía aerógena y produce tos, fiebre, pérdida de peso y lesiones granulomatosas en los órganos afectados. La tuberculosis en rumiantes está causada fundamentalmente por *Mycobacterium bovis* y *Mycobacterium caprae*. *M. bovis* es el principal agente etiológico de la tuberculosis bovina y *M. caprae* infecta más frecuentemente al ganado caprino, aunque ambas micobacterias pueden infectar indistintamente a bovino, caprino u ovino y a otras especies de mamíferos (domésticos y de vida libre) y al hombre (Aranaz *et al*., 2003, 2004; Crawshaw *et al*., 2008; Rodríguez *et al*., 2009; Schiller *et al*., 2010). La tuberculosis bovina es una enfermedad infecciosa de curso crónico, progresivo y caqueztizante que afecta principalmente al aparato respiratorio del ganado bovino, sobre todo a los pulmones y nódulos linfáticos asociados, aunque en fases avanzadas puede afectar a otros órganos (Huchzermeyer *et al*., 1994).

II.8.1. Relación lesional

Al igual que la paratuberculosis, la tuberculosis cursa con una inflamación granulomatosa, que desde el punto de vista histológico se caracteriza por la presencia de macrófagos, células epitelioides, células gigantes de Langhans y linfocitos (Potel, 1974; Bernabé *et al*., 1991; Dungworth, 1993; Gutiérrez Cancela y García Marín, 1993; Huchzermeyer *et al*., 1994) en diversos órganos según el momento de la enfermedad, pero en el caso de la tuberculosis, además, es característica la presencia de necrosis por caseificación con o sin calcificación, en los focos inflamatorios. Según la localización y extensión las lesiones tuberculosas se han clasificado en diferentes subtipos: miliares, acino-nodosas, cavernosas y perladas (Pallaske, 1962; Nieberle y Cohrs, 1966; Gutiérrez Cancela, 1996). Esta enfermedad puede afectar a cabras (Gutiérrez *et al*., 1995), difícilmente a ovejas , pero si a animales silvestres (Muirhead *et al*., 1974; Little *et al*., 1975; Cornet *et al*., 1981; de Lisle y Havill, 1985; Clifton-Hadley y Wilesmith, 1991; Collins *et al*., 1994; Serraino *et al*., 1999) e incluso al hombre (Pritchard, 1988),

si bien se ha considerado que la posibilidad de trasmisión de tuberculosis causada por *M. bovis* entre personas como algo anecdótico (van Soolingen *et al*., 1994).

En las primeras descripciones de la paratuberculosis, Johne y Frottingan (1985), llegaron a sospechar de la presencia de una tuberculosis intestinal anómala, por la similitud lesional y la existencia de BAAR en los tejidos afectados. Sin embargo, existen diferencias lesionales entre las dos enfermedades que hacen posible su diferenciación, como son tanto su localización principal, que en el caso de la tuberculosis es el aparato respiratorio (Pallaske, 1982; Potel, 1974; Dungworth, 1993; Bernabé *et al*., 1996; Gutiérrez Cancela, 1996), y la presencia de necrosis por caseificación en este último caso (Pallaske, 1962; Gutiérrez Cancela, 1996). En la paratuberculosis, además de tratarse de una enteritis granulomatosa, la caseificación es infrecuente en bovino, (Momotami y Yoshino, 1985), aunque en la especie caprina esta alteración suele aparecer (Stamp y Watt, 1954; Carringan y Seaman, 1990: Pérez *et al*., 1996; Clarke, 1997; Corpa *et al.,* 2000a) en los nódulos linfáticos mesent´ricos. Además, las lesiones en otros órganos como tonsilas, riñón, hígado o bazo, en la paratuberculosis, si existen, son visibles sólo microscópicamente y en casos avanzados de la enfermedad. Sin embargo, la generalización de la tuberculosis por vía sanguínea, puede ocasionar lesiones graves en serosas o en hígado, bazo y glándula mamaria, así como en el intestino y sus nódulos linfáticos al ser deglutido el agente tuberculoso a partir de lesiones en tonsilas o nódulos linfáticos retrofaríngeos (Stamp, 1944; Cuezva-Samaniego, 1966). En esta localización, además se ha señalado la diferente presencia de micobacterias entre ambas enfermedades, siendo menor en el caso de la tuberculosis bovina (Momotami y Yoshino, 1984), aunque existen estudios que encuentran una gran cantidad de bacilos en lesiones intestinales de la tuberculosis caprina (Gutiérrez Cancela, 1996). En ocasiones, se ha diagnosticado la presencia de ambas enfermedades juntas, tanto en bovino (Momotami y Yoshino, 1984; González, 2003) como en la especie ovina (Jorge *et al*., 2000) y caprina (Bernabé *et al*., 1991; Gutiérrez Cancela, 1996; Corpa, 1999).

En cuanto a las lesiones microscópicas, en la tuberculosis se observan granulomas con caseificación central en la mayoría de especies (Cassidy, 2006) la cual es importante para la expansión de la lesión (Fenhalls *et al.,* 2000), habiéndose descrito que la vacunación exacerba este proceso (Tripathy, 1987; Moreira *et al*., 2002; Turner

et al., 2000; Taylor *et al*., 2003). Se ha desarrollado una clasificación para los granulomas encontrados en los nódulos linfáticos, estableciendo 4 estadios (Wangoo *et al*., 2005): en los estadios I yII se encuentran lesiones tempranas, sin la aparición de necrosis; en el estadio III los granulomas presentan múltiples capas concéntricas de macrófagos y tejido fibroso y ya en el estadio IV la lesión característica se describe como, la ya citada, necrosis caseosa central rodeada del infiltrado inflamatorio granulomatoso y tejido fibroso. Basándose en esta clasificación y en la cantidad de BAAR encontradas en cada sección Cassidy (2008) hicieron un estudio sobre 6457 muestras de nódulos linfáticos de cabeza, tórax, abdomen, cervical y poplíteo de animales con tuberculosis bovina de Inglaterra y Gales. De estas muestras, tan sólo el 4,1% procedían de animales con lesión macroscópica y mostraron cambios microscópicos en el 69,8% de los casos mientras que se logró el aislamiento bacteriológico en el 74,7% de las muestras. La presentación más común de las lesiones fue el estadio IV solo, seguido por los cuantro estadios simultáneamente, aunque se obtuvieron muchas combinaciones. La mayoría fueron lesiones paucibacilares, pero había un número importante de casos en que no se observó ningún BAAR; además en el 35% de los casos se encontraba afectado más de 80% del tejido del nódulo, mientras que el 11,2% de las secciones presentaba una afectación menor al 20% del tejido. (Cassidy, 2008).

II.8.2. Relación entre las pruebas de diagnóstico

Para el diagnóstico de la tuberculosis se pueden emplear diferentes técnicas como la intradermorreacción, el test de liberación de IFN-γ, o el ELISA indirecto (Wood *et al.*, 1992; Domingo *et al*., 1995; Gutiérrez Cancela, 1996; Corpa *et al*., 1998; Liebana *et al.*, 1998; Gonzalez Llamazares *et al.*, 1999; Gormely *et al*., 2006; Swift y Rees., 2013). Como ya se ha señalado en el capítulo de métodos de diagnóstico, existen reacciones cruzadas entre diferentes infecciones micobacterianas, y una de las causas por las que en un rebaño aparecen animales falsamente positivos en campañas oficiales de tuberculosis bovina a la prueba de intradermoreacción puede ser la presencia de paratuberculosis en el rebaño, lo que hace plantearse la idoneidad de esta prueba para la erradicación de tuberculosis (Aranaz *et al*., 2006; Swift y Rees, 2013). Esto podría

evitarse mediante la realización de la prueba de la intradermoreacción comparada (Vallé y Rinjard, 1926; Stuart, 1962; Doyle, 1964; Huitema, 1967; Nain *et al*, 1985; Corpa *et al*., 1998; García Marín *et al*., 1999; Nedrow *et al*., 2007; Geijo, 2007), ya que se ha observado que en estos casos se produce una mayor reacción a la PPD aviar que a la bovina (Johson *et al*., 1949; Stuart, 1962). Además, en los estudios revisados en la bibliografía en los que se estudia la respuesta en animales con infección mixta, tanto en bovino (Momotami y Yoshino, 1984) como en caprino (Bernabé *et al*., 1991; Gutiérrez *et al*., 1998), la respuesta a la PPD bovina es mayor que a la PPD aviar, aunque en esta última especie la presencia de una infección mixta reduce notablemente la sensibilidad en la intradermorreacción (Alvarez *et al*., 2008). En este estudio, y usando el cultivo como técnica de referencia, la IDR comparada fue la que detectó menos animales positivos a tuberculosis en rebaños con una infección natural mixta de tuberculosis y paratuberculosis, seguida de la IDR simple y el test de IFN-γ sugiriendo, por tanto, que la IDR comparada no es una prueba adecuada para el diagnóstico de tuberculosis en cabras, cuando hay coexistencia de tuberculosis y paratuberculosis en la misma granja (Álvarez *et al*., 2008). Además, los autores de este trabajo sugieren emplear conjuntamente la IDR simple y el test de IFN-γ, ya que detectan distintas poblaciones de animales infectados, además del empleo de estudios post-mortem debido a la existencia de animales con tuberculosis que no se detectan por ninguna de las tres pruebas comentadas, y que sí presentan lesiones en matadero (Álvarez *et al*., 2008).

En cualquier caso, el test de IDR sigue siendo considerado como prueba standard para el diagnóstico de tuberculosis (Swift y Rees, 2013), aunque ya se sabe que se ve afectada su sensibilidad por la gravedad y estado de la infección así como por la reacción cruzada con otras micobacterias. Por tanto, un resultado positivo a IDR siempre requiere confirmación posterior mediante la observación de lesiones en el cadáver o resultado positivo a cultivo de nódulo linfático. El test de IFN-γ también se usa para confirmar la infección, aunque también surgen falsos positivos cuando el animal está infectado por otras micobacteerias (Swift y Rees., 2013).

La vacunación frente a paratuberculosis también interfiere con las campañas de erradicación de la tuberculosis mediante la prueba de IDR, como ya se ha señalado (Doyle, 1945; Vallé y Rinjard, 1926; Stuart, 1962; Doyle, 1964; Huitema, 1967; Larsen *et al*., 1978; Chiodini *et al*., 1984; Merkal, 1984; Sherman, 1985; Wentink *et al*., 1988;

Köhler *et al*., 2001), motivo por el cual en países como España esta práctica se encuentra prohibida. Sin embargo, en este caso también pueden ser diferenciados los animales utilizando la IDR comparada (Valleé y Rinjard, 1926; Stuart, 1962; Doyle, 1964; Huitema, 1967; Larsen, 1973; Nain *et al*, 1985; Corpa *et al*., 1998; García Marín *et al*., 1999; Nedrow *et al*., 2007; Geijo, 2007; Garrido *et al.*, 2013) y restringiendo la vacunación a aquellos rebaños libres de tuberculosis.

Para la interpretación de los resultados de la intradermorreacción comparada, Ritchie (1953) propuso unos criterios que se resumen en la tabla II.8.1. Según el último Real Decreto 1047/2003 los criterios de interpretación son los siguientes

- Reacción negativa, cuando la reacción bovina es negativa, o positiva o dudosa, pero igual o inferior a una reacción positiva o dudosa a la aviar, y ausencia de signos clínicos en ambos casos.

- Reacción dudosa, cuando la reacción bovina es positiva o dudosa y de 1 a 4 mm superior a la reacción aviar, y ausencia de signos clínicos.

- Reacción positiva, cuando la reacción bovina es positiva y supera en más de 4 mm a la reacción aviar, o presencia de signos clínicos.

Tabla II.8.1. Interpretación de los resultados de la prueba de la tuberculina comparada según Ritchie (1953).

Reacción	Dictamen	
	Rebaños con casos recientes de tuberculosis	Rebaños libres de tuberculosis
B+, A-	Sacrificio	Sacrificio
B+, A+ (B 4mm> A)	Sacrificio	Sacrificio
B+, A+ (B 3-4mm> A)	Sacrificio	Repetir
B+, A+ (B 1-2mm> A)	Repetir	Repetir
B+, A+ (A=B)	Repetir	Negativo
B+; A+ (A 1-2 mm> B)	Repetir	Negativo
B+, A+ (A 2mm> B)	Negativo	Negativo
B-, A+	Negativo	Negativo
B-, A-	Negativo	Negativo

B+: Reacción positiva a la tuberculina bovina; B-: Reacción negativa a la tuberculina bovina
A+: Reacción positiva a la tuberculina aviar; A-: Reacción negativa a la tuberculina aviar

En un estudio sobre siete granjas del País Vasco en las que se llevaban a cabo como medidas de control de paratuberculosis la vacunación, en cinco de ellas, y el sacrificio de animales positivos a cultivo y a ELISA, en las otras dos, se obtuvo como conclusión principal que la vacunación frente a paratuberculosis produce únicamente una limitada reacción cruzada en la prueba de IDR frente a la tuberculosis bovina (Garrido *et al*., 2013). Cuando se tiene en cuenta el tiempo que ha pasado desde que los animales fueron vacunados y su edad, se observa que la IDR simple es positiva en el 9,42% para los animales vacunados y en el 0,56% de los animales de granjas no vacunadas; mientras que la IDR comparada es positiva en el 0,10 % de los animales vacunados y en el 0,03 % de los animales sin vacunar. El rango de animales pertenecientes a granjas vacunadas y positivos a IDR simple varía desde 20,78% a los dos años post-vacunación y 5,04% a los cuatro años post-vacunación, obteniéndose diferencias significativas con el momento de aplicar la vacuna en todos los muestreos (un muestro anual hasta los cinco años) excepto en el llevado a cabo a los cuatro años

post-vacunación. Los animales de granjas en las que se no se llevó a cabo la vacunación nunca excedieron el 0,78% de positividad. En cuanto a la IDR comparada, solo se observaron respuestas positivas en 2 animales vacuandos (0,41%) al año postvacunación (vacuandos de adultos) y en 1 animal a los cuatro años (vacunado cuando era ternero), así como en 1 (0,15%) animal a los cinco años de muestreo en el grupo de animales no vacuandos. Al comparar las dos estrategias de control se obtuvieron diferencias significativas en los resultados positivos a la IDR simple en todos los momentos del experimento salvo en el día 0; sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos al aplicar la IDR comparada (Garrido *et al*., 2013). Al tener en cuenta el tiempo transcurrido desde la vacunación a la realización de la IDR, se obtuvieron resultados altamente significativos ente la prueba simple realizada al inicio del estudio y a los 2 años, en las granjas de animales vacunados. Al comparar esta variable en los dos grupos se obtienen diferencias significativas hasta los 2 años post-vacunación. Del tercer año en adelante, aunque las proporciones se mantuvieron altas, las diferencias no resultaron significativas. Tampoco la edad de vacunación arrojó resultados significativos en este estudio, aunque se encontraron frecuencias ligeramiente menores en cuanto a los resultados positivos en animales vacunados antes del año de edad, comparado con los inmunizados a edad más elevada (Garrido *et al*., 2013). En conclusión, los resultados de estos autores muestran que cuando se aplica la IDR simple para el diagnóstico de tuberculosis en animales vacunados frente a paratuberculosis, estarían mal diagnosticados el 6,55% de los animales, mientras que si se aplica la IDR comparada esta cifra se reduce muchísimo, hasta el 0,15% (Garrido *et al*., 2013).

La prueba de liberación de IFN-γ ha sido utilizada también para discriminar entre infecciones provocadas por tuberculosis o paratuberculosis cuando se obtenían resultados dudosos o inespecíficos con la prueba de IDR en ganado bovino (Lauzi *et al*., 2000). Se ha demostrado que esta técnica es capaz de diferenciar entre ambas infecciones en ganado bovino (Wood *et al*., 1989; Domingo *et al*., 1995) y caprino (Gutiérrez *et al*., 1998). Sin embargo, e han detectado también resultados anómalos como animales positivos a tuberculosis siendo animales infectados o vacunados frente a paratuberculosis, en una región dónde esta enfermedad se encontraba erradicada (McDonald *et al*., 1999). La aparición de animales con lesiones exclusivamente de tuberculosis con reacciones superiores a la PPD aviar hace pensar en la presencia de

reacciones cruzadas con micobacterias ambientales no patógenas (Domingo *et al*., 1995), que provocarían resultados falsos positivos, tanto con la PPD bovina como con la PPD aviar, en animales que no presentan lesiones y que proceden de regiones libres de tuberculosis (Lauzi *et al*., 2000). Se ha señalado que la presencia de paratuberculosis, en granjas con tuberculosis, en países como España podría implicar un serio impedimento en la sensibilidad del test de IFN-γpara detectar tuberculosis tanto en bovino (Álvarez *et al*., 2009) como en caprino (Alvarez *et al*., 2008).

Para el diagnóstico de tuberculosis se utiliza un ELISA indirecto que permite detectar anticuerpos séricos frente a *M. bovis* que muestra diferente sensibilidad en animales con diferente tipo de lesión, siendo más sensible en la detección de animales con lesiones generalizadas, y menos en los que presentan lesiones focales, que suelen ser negativos a esta prueba (Ritacco *et al*., 1991; Gutiérrez Cancela, 1996). Uno de los inconvenientes de esta técnica es la existencia de reacciones cruzadas con paratuberculosis y otras micobacterias ambientales (Osterstock *et al*., 2007). En este caso, pueden aparecer tanto animales con tuberculosis positivos a pruebas de paratuberculosis (Yokomizo *et al*., 1983; Goswami *et al*., 2000; Olsen *et al*., 2001a; Liembaum *et al*., 2009) como animales con paratuberculosis que resultan ELISA positivo para tuberculosis (Juste *et al*., 1992b). Para intentar resolver este problema, se han utilizado antígenos como la proteína MPB70 de *M. bovis* (Harboe *et al*., 1990) con alta sensibilidad y capacidad de diferenciar ambas micobacteriosis en cabras (Acosta *et al*., 2000) o el antígeno MPB83 que ofrece resultados negativos en todos los sueros de animales infectados con *Map* estudiados (Green *et al*., 2009). En el caso de *Map*, se ha utilizado el antígeno recombinante a362 (Vannufel *et al*., 1994), aunque posteriormente se señaló que también podía estar presente en *M. bovis* (Nielsen *et al*., 2001). En el caso de la paratuberculosis, se ha propuesto el uso de los antígenos AhpC y D, así como la proteína de secrección de 14kDa que no reaccionarían con sueros de vacas tuberculosas, pero su sensibilidad no es muy elevada para detectar bovinos con paratuberculosis (Olsen *et al.*, 2001a, b).

Para incrementar la especificidad de la prueba, se ha llevado a cabo la incubación previa de los sueros problema con antígenos de las micobacterias causantes de la reacción cruzada. Así, para la realización del ELISA para el diagnóstico de paratuberculosis, se realiza una pre-incubación de los sueros con *M.phlei*, con lo que se disminuirían los falsos positivos debidos tanto a micobacterias ambientales como a

infecciones causadas por *M.bovis* (Yokomizo *et al*., 1983; Milner *et al*., 1987; Cox *et al*., 1991). En el caso del ELISA para el diagnóstico de tuberculosis, los sueros se pre-incuban con PPD aviar o bien con PPD bovina con suero anti-PPD aviar, con lo que se aumenta la especificidad, pero disminuye la sensibilidad (Hanna *et al*., 1989). Al igual que en las pruebas de inmunidad celular, los animales vacunados frente a paratuberculosis, también interfieren con el ELISA (Muskens *et al*., 2002).

II.9. RELACIÓN DE *Map* CON PATOLOGÍAS HUMANAS: LA ENFERMEDAD DE CROHN Y OTRAS IMPLICACIONES EN LA SALUD PÚBLICA

La enfermedad de Crohn es un trastorno gastrointestinal de la especie humana, con signos parecidos a los de la paratuberculosis en rumiantes, caracterizado por malestar general, pérdida de peso crónica, dolor abdominal y diarrea (Chiodini *et al*., 1989) que se presenta con mayor frecuencia en individuos de edades comprendidas entre los 16 y 25 años, aunque existe una tendencia a que cada vez sean más los menores de 16 años afectados por esta enfermedad y, por otro lado, y aunque de forma ocasional, que también se encuentren afectados individuos entre los 55 y 65 años (Armitage *et al*., 2001; Chacon *et al*., 2004; Grant, 2005). Además, la incidencia de esta enfermedad parece ir en aumento, con un número creciente de casos descritos a nivel mundial (Shivananda *et al*., 1996; Grant, 2005; Wells y Blennerhassett, 2005).

Se encuentra englobada, junto a la colitis ulcerativa y la colitis crónica indeterminada o sin clasificar en el término "Enfermedades Inflamatorias Intestinales" (*Inflamatory Bowel Disease* –IBD-), caracterizadas las tres por una inflamación crónica y local del intestino (European Commission, 2000; Khor *et al*., 2011; Baumgart y Sandborn, 2012).

No se sabe con certeza que es lo que provoca la IBD. Una de las hipótesis más aceptadas se inclina hacia una etiología multifactorial, donde una respuesta inmune inadecuada del huésped tendría un papel crucial en el establecimiento de la inflamación local (Grant, 2005; Juste *et al*., 2009b; Mendoza *al*., 2009). Además la etiopatogenia de este complejo se vería influída por el medio ambiente, predisposición genética, así como por la propia flora bacteriana comensal del intestino (Grant, 2005; Goyette *et al*., 2007). De las tres patologías englobadas en la IBD, la enfermedad de Crohn es dónde más se está estudiando la posible implicación de *Map* en su etiología. Así, la comunidad científica es cada vez más favorable a aceptar una posible relación entre esta micobacteria y la enfermedad de Crohn, si bien, aún se requieren muchos estudios para poder confirmar a *Map* como el agente causal (Grant, 2005; Pierce, 2009) ya que también hay quienes se muestran reticentes a dar por buena esta relación etiológica. Se

ha sugerido la implicación de diferentes agentes intracelulares además de *Map*, como *Escherichia coli* o *Candida* spp. en relación con una mayor susceptibilidad genética relacionada con una función dificultada en la defensa frente a organismos intracelulares (Pineton de Chambrun *et al*., 2008).

El primero en formular la hipótesis de que esta enfermedad pudiese estar provocada por una micobacteria fue Dalzeil (Dalzeil, 1913), ya que observó similitudes clínicas e histopatológicas entre la paratuberculosis, la tuberculosis intestinal y lo que el llamaba enteritis granulomatosa crónica, que posteriormente fue descrita como enfermedad de Crohn por Crohn *et al*. (1932). Sin embargo, la relación entre la enfermedad y una etiología micobacteriana no ha podido ser confirmada con certeza hasta el momento. A mediados de los años años 80 del pasado siglo se logró el aislamiento de diferentes cepas de una micobacteria, en forma de esferoplasto (con pared defectuosa), a partir de pacientes con la enfermedad de Crohn (Chiodini *et al*., 1984b, c; 1986), que posteriormente se clasificaron como *Map* (Thayer *et al*., 1984; McFadden *et al*., 1987). Con una de estas cepas, además, se pudo reproducir la enfermedad en cabritos en los que probocaba una ileítis granulomatosa semejante a la paratuberculosis (Van Kruiningen *et al*., 1986). Los mismos autores inocularon esta cepa a pollos, y los resultados obtenidos fueron similares a los de Larsen y Moon (1972) que infectaron pollos de la misma edad con una cepa de *Map* de origen bovino (Van Kruiningen *et al*., 1991). Sin embargo, la enfermedad de Crohn no presenta una mayor prevalencia entre la población directamente expuesta a casos clínicos de paratuberculosis, como ganaderos o veterinarios (Jones *et al*., 2006) aunque, en este sentido, se ha señalado que la paratuberculosis clínica tan solo se desarrolla en una pequeña parte de los animales infectados (Chiodini *et al*., 1984a; Whitlock y Buergelt, 1996; García Marín *et al*., 2000) y que hay otras micobacteriosis humanas, como la tuberculosis en la que tan solo entre un 5 y un 10% de los individuos infectados desarrollan la enfermedad (van Crevel *et al*., 2002; Greenstein, 2003).

El aislamiento de *Map* a partir de tejido con lesiones procedente de pacientes con la enfermedad de Crohn es muy difícil (Chiodini y Rossiter, 1996) y a veces imposible (Collins *et al*., 2000), quizá debido a que inicialmente los microorganismos se obtienen de los tejidos como esferoplastos (Chiodini *et al*., 1986; Wall *et al*., 1993) y por tanto requieren condiciones especiales para su aislamiento (Burham *et al*., 1978;

Chiodini *et al*., 1984b; Chiodini *et al*., 1986; Markesich *et al*., 1988; Gitnick *et al*., 1989; Hulten *et al*., 2000a; Hulten *et al*., 2001). Por esta razón, las micobacterias observadas en las lesiones de Crohn no se teñirían con la tinción estándar para BAAR, pero al realizar subcultivos llegan a desarrollar una pared celular que se tiñe positivamente con la tinción de ZN (Chiodini *et al*., 1986).

Se ha aislado *Map* de muestras de leche materna (Naser *et al*., 2000**b**). Además, con un método de cultivo de corta duración y un medio líquido modificado (7H9), Schwartz *et al*. (2000), lograron el aislamiento de *Map* a partir de un 37% de pacientes con enfermedad de Crohn y tan solo en un 5,6% de los controles. En concreto, estos autores obtuvieron resultados positivos en el 86% de muestras obtenidas mediante resección quirúrgica y en el 20% de muestras obtenidas mediante biopsias, sugiriendo que *Map* podría estar localizado en la submucosa de las zonas lesionadas más que en la superficie mucosa, debiendose tener esto en cuenta en posteriores estudios. En un estudio similar, Bull *et al*., 2003, detectaron *Map* en el 92% de pacientes con enfermedad de Crohn mediante una técnica optimizada de PCR anidada, y en el 26% de los pacientes control. En este mismo estudio, además, se aisló *Map* del 42% de biopsias de enfermos de Crohn, y en tan solo el 9% de muestas de los individuos control, mediante el cultivo líquido MGIT. Sechi *et al* (2005) utilizando también biopsias de mucosa intestinal aislaron *Map* del 83,3% de pacientes de Crohn y del 10,3% de indivisos control. Además Naser *et al*., (2004) cultivaron *Map* a partir de sangre periférica del 50% de pacientes con Crohn, 22% con colitis ulcerativa, mientras que no aislaron el bacilo en ninguno de los 15 individuos controles sin IBD. También Juste *et al*., (2009b) han hallado la presencia de *Map* mediante PCR anidada en el 17% de muestras de sangre de enfermos de IBD y con tratamiento frente a la enfermedad, mientras que el porcentaje de muestras positivas en donantes sanos era significativamente más elevada (43%). Además, los enfermos mostraron valores más bajos de liberación de IFN-γ tras su estimulación con PPA-3 de *Map*, mientras que los valores de liberación de esta citoquina tras su estimulación con PBS (γ-IFN basal) y de anticuerpos frente a *Map* valorados mediante ELISA, si resultaron mayores en los pacientes con IBD. Estos resultados sugerirían que el tratamiento frente a micobacterias está asociado a un descenso en positividad en PCR y en liberación de IFN-γ, extrayendo como conclusión principal la interacción existente de *Map* con la respuesta inmune y el

tratamiento, y por tanto, apoyando el papel de *Map* en la etiología de IBD (Juste *et al*., 2009b).

A pesar de estos resultados que apoyarían que el agente etiológico de IBD sería *Map*, anteriormente se había demostrado la presencia de *Map* en pacientes con colitis ulcerosa (McFadden *et al*., 1992), por lo que también se ha sugerido la posibilidad de que una mucosa dañada posibilite la entrada de *Map* a los tejidos y al torrente sanguíneo tras ser fagocitado por los monocitos circulantes, por lo que la presencia de *Map* en sangre pudiera ser un factor secundario y no la causa del proceso inflamatorio (Selby, 2004). Esta hipótesis se apoyaría en el hecho de la amplia exposición medioambiental a la micobacteria a través de leche, agua potable y otras fuentes (Greenstein y Collins, 2004), y justificaría los resultados positivos de diferentes pruebas tanto en enfermos de Crohn, de otras enfermedades intestinales así como de individuos sanos (Sanderson *et al*., 1992; Naser *et al*., 1999; Schwartz *et al*., 2000; Bull *et al*., 2003; Naser *et al*., 2004).

También hay resultados discrepantes en cuanto a las pruebas serológicas específicas frente a *Map*. Estas han sido más frecuentemente positivas entre los enfermos de Crohn que entre los individuos sanos (Collins *et al*., 2001) aunque hay estudios que encuentran resultados bastante dispares (Thayer *et al*., 1984; Cho *et al*., 1986; McFadden y Houdayer, 1988; Stainsby *et al*., 1993; Vannuffel *et al*., 1994; Rowbotham *et al*., 1995b). Esta disparidad es atribuida al diferente estadio del desarrollo de la enfermedad en que se encuentran los pacientes y a que, en ocasiones, estos estén siguiendo un tratamiento inmunosupresivo (Olsen *et al*., 2002). Estos mismos autores sugieren la utilización de antígenos más específicos y mejor definidos y no los extractos crudos de la micobacteria completa o derivados proteicos purificados (PPD). Con el empleo de algunos de estos antígenos como el HupB (Cohavy *et al*., 1999), proteínas recombinantes como la p35 y p36 (Naser *et al*., 1999b, 2000a; Shafran *et al*., 2002b), o las proteínas de secrección de 14kDa (Olsen *et al*., 2001), la respuesta inmune es más intensa en personas enfermas. Esta respuesta inmune también es mayor en personas que trabajan en los mataderos y por tanto en mayor contacto con este agente, aunque esto no es suficiente para asegurar de que se trate de una zoonosis (Juste *et al*., 1992c). Una técnica relativamente nueva es la desarrollada por Nakase *et al*. (2006) en la que se detectan anticuerpos específicos frente a la secuencia IS*900*, mediante la fusión de la enzima glutatión-S-transferasa a una proteína recombinante que codifica un fragmento de esta secuencia (IS900-GST), con mayores niveles de los

mismos en pacientes de enfermedad de Crohn. Además, y tomando como base la respuesta inmune, Juste *et al*, (2009b) han propuesto una nueva hipótesis para interpretar la patogenia de la enfermedad de Crohn, que podría ser también válida para la paratuberculosis bovina (Geijo, 2007), en la que los individuos afectados presentarían una cierta deficiencia genética en la inmunidad innata que provocaría una disminución en la producción de citoquinas, favoreciendo así la proliferación de la micobacteria. De esta manera, y como se avanzaba en párrafos anteriores, este grupo demuestra que los niveles basales de IFN-γ producido de manera inespecífica fueron notablemente superiores en los pacientes con IBD en comparación con el grupo control, lo que indicaría una respuesta inmune innata intensa y descontrolada, causante del daño tisular. Según estos autores, esta situación sería muy similar a la del síndrome denominado "susceptibilidad mendeliana a enfermedades micobacterianas" (Mendelian susceptibility to Mycobacteria, MSMD), donde los individuos infectados por micobacterias de baja virulencia tienen niveles de IFN-γ más elevados de lo normal debido a fallos en los receptores de esta citoquina (Casanova, 2000). De manera parecida, el bloqueo parcial de dichos receptores podría explicar la inadecuada respuesta inmune adaptativa específica en los pacientes de IBD (Juste *et al*., 2009b).

La secuencia IS*900* específica de *Map* ha sido detectada en pacientes con la enfermedad de Crohn en numerosos estudios, (Sanderson *et al*., 1992; Dell'Isola *et al*., 1992; Dell'Isola *et al*., 1994; Fidler *et al*., 1994; Lisby *et al*., 1994; Clarkston *et al*., 1998; Abubakar *et al*., 2008; Juste *et al*., 2008; Elguezabal *et al*., 2012) además de los ya descritos (Bull *et al*., 2003; Sechi *et al*., 2005; Juste *et al.*, 2009b) aunque, en otros no se ha encontrado esta relación (Cellier *et al.*, 1998; Rowbotham *et al.*, 1995), ya que el ADN de la micobacteria ha sido hallado en un 9% de individuos con enfermedad de Crohn (Hulten *et al*., 2001), pero también en un 7,3% de individuos sin enfermedad intestinal (El-Zaatari *et al*., 2001).

Se ha utilizado la técnica de microdisección láser de granulomas de pacientes de Crohn y posterior PCR frente a *Map* (Ryan *et al*., 2002, 2004), obteniendo resultados diferentes: por un lado apoyando la teoría de la participación de *Map* en la patogénesis de la enfermedad de Crohn (Ryan *et al*., 2002) sugiriendo además que el ADN de la bacteria modificaría la respuesta local de citoquinas, pero por el otro poniendo en duda esta teoría al obtener resultados negativos en todos los pacientes a la PCR realizada para

las secuencias de inserción IS*900* e IS*1311* y sin embargo resultados positivos en muestras de paratuberculosis bovina utilizadas como control (Baksh *et al*., 2004). Además, se evidenció ADN de *Escherichia coli* en un mayor número de granulomas relacionados con la enfermedad de Crohn que en otro tipo de granulomas, de una forma muy parecida a lo sucedido al estudiar ADN de *Map* (Ryan *et al*., 2004). Esto último sugiere, según Ryan *et al*. (2004) que las bacterias de la luz intestinal tienen tendencia a colonizar tejidos inflamados o que, por otra parte, las células presentadoras de antígenos presentan un incremento de la captación de ADN bacteriano, lo que dificultaría el descubrimiento de la etiología de esta enfermedad al poder relacionarse cualquier bacteria con las lesiones (Ryan *et al*., 2004).

La hibridación *in situ* empleando la secuencia de inserción IS*900* también ha sido utilizada para el estudio de la etiología de esta enfermedad (Hulten *et al*., 2001; Sechi *et al*., 2001, 2004; Romero *et al*., 2005), reportando la presencia de ADN de *Map* en aproximadamente el 70% de las muestras procedentes de pacientes de la enfermedad de Crohn, sin ser capaces de demostrar esta presencia mediante PCR o la presencia de BAAR mediante la técnica de ZN (Sechi *et al*., 2001, 2004). En el primer caso quizá debido a la fragmentación del ADN en muestras incluidas en parafina, y en el segundo caso quizá debido a la participación de formas defectivas de pared o esferoplastos en la infección (Chiodini et al., 1986; Grant, 2005) como si ocurre en los casos de paratuberculosis, en los que la micobacteria se encuentra con su pared intacta, esencial para poderse teñir mediante ZN (Coetsier *et al*., 1998) Además, en este sentido, y como un argumento a favor de *Map* como agente etiológico de Crohn, está el hecho de que en la paratuberculosis existan formas patológicas caracterizadas por la presencia de escasos (o nulos) BAAR tales como las focales, multifocales, e incluso las formas difusas linfocíticas o paucibacilares (García-Marín *et al*., 1992c; Pérez *et al*., 1996; Corpa *et al*., 2000a; Balseiro *et al*., 2003; González *et al*., 2005; Brown *et al*., 2007; Kheirandish *et al*., 2008), y sin embargo, nunca se ha puesto en duda el papel de *Map* como agente etiológico de la paratuberculosis.

Otro aspecto a favor de la etiología micobacteriana en la enfermedad de Crohn es el hecho de que los pacientes mejoren al aplicar terapia antimicrobiana. Así, Gui *et al*. (1997) mostraron la eficacia de antibióticos anti-tuberculosos elaborados a partir de una mezcla de rifanbutina y claritromicina. Sin embargo, Thomas et al., 1998, usando

también rifampicina y otros antibióticos frente a *M. tuberculosis*, como isoniazida y etambutol, no lograron la curación de pacientes de Crohn. No obstante, Borody *et al*. (2002) al aplicar una triple combinación de macrólidos a pacientes con formas graves de la enfermedad, encontró que la mitad de ellos se curaron. En otro estudio realizado por Shafran *et al*. (2002) en el que se llevó a cabo una antibioterapia a base de macrólidos en pacientes con anticuerpos séricos, éstos sufrieron una recuperación clínica significativa. Greenstein *et al*., (2007a, 2007b, 2008), comprobaron que los diferentes productos empleados para el tratamiento de la IBD como el ácido 5-aminosalicílico, el metotrexato, la 6-mercaptopurina, la ciclosporina A, y los macrólidos rapamicina y tacrolimus, poseían una acción sinérgica, aunandóse su efecto inmunosupresor y anti-*Map*. Esto explicaría la menor proporción de resultados positivos a *Map* mediante PCR en sangre de pacientes de IBD estando en pleno tratamiento (Juste *et al*., 2008, 2009b).

Ya se ha descrito previamente que hay autores que relacionan la enfermedad de Crohn con una deficiencia genética de la inmunidad innata, por lo que los tratamientos inmunosupresores serían eficaces (Present *et al*., 1999; Lim y Hanauer, 2004) al limitar la respuesta crónica provocada por la proliferación bacteriana, debido a un fallo en la producción de citoquinas, dando lugar a una activación de las células T y al establecimiento de la enfermedad (Yamamoto-Furusho y Korzenik, 2006). Por otro lado, los tratamientos inmunosupresores convencionales presentan también un efecto anti-*Map*, como se ha citado anteriormente, lo que sería compatible con explicar la etiología bacteriana y el control de las manifestaciones de la enfermedad (Greenstein *et al*., 2007ª, 2007b).

El hecho de que *Map* no se haya conseguido identificar en todos los casos de enfermedad de Crohn sugiere que este proceso puediera estar causado por factores diferentes de esta micobacteria, tales como genéticos, autoinmunes, ambientales o incluso por otros microorganismos (Quirke, 2001). En cuanto a los factores genéticos, se ha señalado un incremento de la susceptibilidad a la enfermedad de Crohn asociado a una mutación en el gen *CARD15/NOD2* localizado en el cromosoma 16 que codifica para la proteína NOD2 ((Hugot *et al*., 2001; Ogura *et al*., 2001a; Parrish *et al*., 2009 Pinedo *et al*., 2009b; Ruiz-Larrañaga *et al*., 2010a). En enfermos de Crohn, se ha relacionado una reducción en la expresión de la defensina-α en las mucosas con una mutación en este gen (Sartor, 2005), lo cual hace que aumente el número de

microorganismos capaces de invadir las mucosas. Igualmente, los pacientes con mutaciones en el gen *CARD15/NOD2* podrían mostrar una respuesta inmune innata inadecuada, permitiendo que las micobacterias se establezcan produciendo una respuesta crónica a nivel local que impida la transición hacia una respuesta inmune específica (Behr y Schurr, 2006). En un estudio realizado a partir de biopsias de íleon, el 70% de los pacientes enfermos de Crohn y en los que se había encontrado ADN de *Map* mediante PCR, presentaban una mutación en el gen *CARD15/NOD2* (Sechi *et al*., 2005). El gen *nramp1* (*Natural resistance associated with macrophage growth*) también se ha asociado a la enfermedad de Crohn (Sechi *et al*., 2006**b**), sin embargo, en este caso no se encontró asociación con ADN de *Map.* Otros genes asociados a la enfermedad inflamatoria intestinal son los genes *OCTN1 y OCTN2*, cuyo alotipo TC combinado con mutaciones en el gen *CARD/NOD2* se asocia a ileocolitis o a ileitis (Gazouli *et al*., 2005) y los genes *DLG5*, *MDR1* y *PPARG* (Sartor, 2006).

De confirmarse el papel de *Map* como agente etiológico de la enfermedad de Crohn las repercusiones en la salud pública serían muy importantes, siendo preocupante sobre todo la presencia de la micobacteria en la cadena alimentaria. Por ello, se han abierto ya varias líneas de investigación para valorar la presencia de *Map* en la leche, la carne o productos derivados, así como en el agua (Eltholth *et al*., 2009), que pudiera participar en una posible transmisión a la especie humana.

Juste (2010), en base diferentes publicaciones, ha observado una fuerte asociación entre la incidencia de Crohn y la frecuencia de la persistencia de lactasa en humanos así como con otras variables relacionadas con el consumo y producción de rumiantes. Además, apunta el autor, que lo más probable es que la crianza de rumiantes sea el caballo de Troya para introducir IBD en la especie humana, cuyas observaciones inmunológicas, terapéuticas y patogénicas apoyan la idea de que esta enfermedad tenga una etiología micobacteriana (Juste, 2010). No obstante, la persistencia de la lactasa asociada a la IBD es un asunto aún controvertivo ya que, precisamente investigadores de este grupo (Elguezabal *et al.*, 2012) ante la presencia de *Map* en la cadena alimentaria, especialmente en la leche, sospecharon la existencia de una asociación entre la persistencia de esta enzima e IBD. La mutación del gen de la lactasa provocaría su persistencia y la adaptación a la cría de animales de leche, a un incremento en la exposición de la población a la infección por *Map.* Sin embargo, al genotipar el gen de

la lactasa en pacientes del norte de España con Crohn y Colitis Ulcerativa no pudieron concluir una asociación significativa entre la persistencia de la lactasa y el padecimiento de IBD (Elguezabal, *et al*., 2012) pero sin embargo si encontraron relación de esta enfermedad con la presencia de *Map,* así como con una mutación en el mencionado gen *NOD2* (Elguezabal *et al.,* 2012), sin una interacción mutua entre ambos.

Es presisamente la resistencia del bacilo en leche y en productos lácteos como el queso un asusnto muy preocupante para la salud pública, máxime cuando se ha comprobado que, en ocasiones, la pasteurización de la leche para la producción de quesos puede resultar insuficiente para inactivar totalmente los bacilos presentes (Stabel y Lambertz, 2004; Rademaker *et al*., 2007). Además, y lo que es aún más relevante, se ha observado que durante la producción de queso (en concreto el queso Cheddar), la concentración de *Map* aumenta 10 veces y que se podía aislar el bacilo mediante cultivo durante las 27 semanas del proceso de maduración del queso (Donaghy *et al*., 2004).

Map también puede penetrar en la cadena alimentaria a partir de la contaminación de la carne o productos derivados (Grant, 2005). En un estudio realizado sobre 47 vacas de leche y carne en las que se analizó el músculo diafragmático mediante cultivo y PCR frente a *Map,* se detectó la micobacteria en el 13% de las muestras, encontrándose una relación directa entre la gravedad de la lesión entérica, los signos clínicos de paratuberculosis, la carga bacteriana en tejidos intestinales, la excreción de *Map* y la diseminación de *Map* en el músculo diafragmático (Alonso-Hearn *et al.,* 2009), aunque se localizara la bacteria en 2 animales asintomáticos, lo cual pone de relevancia a los animales subclínicos como posible fuente de infección (Alonso-Hearn *et al.,* 2009). En Estados Unidos, se ha observado que el consumo de carne picada representa una posible fuente de infección por *Map* para los consumidores (Manning y Collins, 2001). No obstante, en otro estudio realizado sobre este producto, en concreto sobre los músculos *longissimus colli* y *extensor carpi radialis*, a menudo incluidos en la carne picada, descartaron la presencia de *Map* mediante cultivo en los animales estudiados (Antognoli *et al*., 2008).

Los mecanismos por los que el bacilo se disemina desde el tracto gastrointestinal al resto de tejidos no ha sido determinado, pero se baraja la posibilidad de la vía hemática, a través de bacteriemias esporádicas (Hines *et al*., 1987). No obstante se estima crucial la toma de medidas preventivas desde que un animal entra en el matadero

hasta que es procesado para su venta para que no haya una diseminación de la infección desde un posible foco primario (Manning y Collins, 2001). Igualmente, se ha señalado que se requieren estudios más amplios, con un mayor número de músculos esqueléticos involucrados, especialmente aquellos más comúnmente utilizados para la venta al consumo humano, para esclarecer los posibles riesgos de exposición humana a *Map* a partir de la carne, y sus posibles implicaciones para la industria cárnica (Alonso-Hearn *et al*., 2009; Eltholth *et al*., 2009). Las medidas deberían ir enfocadas hacia la reducción de la contaminación fecal de las canales así como la optimización de las diferentes fases de procesado de la carne para eliminar el bacilo (Eltholth *et al*., 2009).

Otro foco de posible infección y riesgo importante para la salud pública es el agua. Algunos autores estiman que los procesos normales de sedimentación, filtrado y desinfección no serían lo suficientemente eficientes para eliminar el bacilo (Whittington *et al*., 2005; Hilborn *et al*., 2006), lo que explicaría su detección posterior en agua del grifo procedente de aguas residuales de explotaciones ganaderas o desde de zonas de pastos, donde los animales excretan grandes cantidades de *Map* que contaminarían estas aguas antes de potabilizarse para el consumo humano (Pickup *et al*., 2005; Whan *et al*., 2005).

El hecho de haber encontrado *Map* como infección oportunista en enfermos de SIDA (Richter *et al*., 2002) es otro elemento que incrementa su importancia desde el punto de vista de la salud pública. Estos autores también indican que el hecho de no haberse diagnosticado en mayor número previamente no está claro si se debería a su limitado y difícil crecimiento, o a su confusión con *M. avium*, o que realmente su implicación en casos de pacientes inmunodeprimidos sea esporádica.

No obstante, las asociaciones patológicas, inmunológicas, terapeúticas y epidemiológicas que existen entre *Map* e IBD, no son consideradas pruebas suficientes, a día de hoy, para llegar a un consenso sobre el papel que juega esta micobacteria en la etiología de esta enfermedad; por otra parte, se pone a las granjas de rumiantes bajo sospecha y provoca un difícil equilibrio entre la seguridad de la salud pública y la aplicación de medidas de control prácticas (Juste, 2010).

III.MATERIAL Y MÉTODOS

III.1. ANIMALES ESTUDIADOS

III.1.1. Selección de animales

Se han utilizado 18 terneros machos castrados de raza Frisona de dos meses de edad. Todos ellos fueron seleccionados de una granja de producción lechera libre de casos clínicos de tuberculosis y paratuberculosis en los últimos 10 años. En la tabla III.1 se muestran los resultados obtenidos en los test de Intradermorreacción (IDR) comparada, ELISA indirecto frente a paratuberculosis, prueba de liberación de IFN-γ en respuesta a la estimulación con PPD aviar e inmunodifusión en gel de agar (IDGA), antes de la vacunación (día 0). Todos los resultados fueron negativos. Además, antes de iniciar el experimento, se llevó a cabo el diagnóstico de diarrea vírica bovina (BVD) mediante un test ELISA en muestras de suero frente al virus que causa esta enfermedad, para la detección tanto de antígenos como de anticuerpos, obteniéndose en todos los casos resultados negativos.

Las madres de estos animales fueron negativas a las pruebas de IDR comparada, liberación de IFN-γ y tests de ELISA e IDGA para el diagnóstico inmunológico de paratuberculosis, así como al cultivo de heces para la detección de *Map*.

Todos los animales se mantuvieron en las instalaciones del Instituto de Ganadería de Montaña (CISC-ULE), en Grulleros (León), donde fueron alimentados con pienso de crecimiento y mantenimiento, heno, paja y agua a libre disposición. Los terneros se mantuvieron durante un mes en periodo de aclimatación, antes de comenzar los tratamientos experimentales.

III.1.2. Grupos y tratamientos

Los animales fueron sometidos a una infección experimental con *Map*, previa vacunación. En función del tratamiento recibido se establecieron cuatro grupos en los cuales los terneros fueron repartidos al azar, de forma que ocho animales fueron

vacunados e infectados (grupo VI), seis terneros se infectaron sin vacunación previa (grupo NVI) y los otros dos grupos fueron controles sin infectar, uno vacunado (grupo VNI) y otro sin vacunar (grupo NVNI), formados por 2 animales cada uno.

Los dos primeros grupos fueron mantenidos juntos en el mismo habitáculo. Los dos grupos controles se encontraban, también juntos, en instalaciones semejantes separadas de los dos grupos infectados por 300 metros. En ambos casos recibieron la misma alimentación y prácticas de manejo.

Tabla III.1. Selección de animales

Resultados de las pruebas de IDR (+, ≥ 2 mm), IFN-γ, PPD aviar- (índice+, ≥ 2), ELISA (índice+, ≥ 800) e IDGA (+, banda de precipitación) el día 0, antes de la vacunación.

Animales	IDR (mm) PPD Aviar	IDR (mm) PPD Bovina	Liberación IFN-γ (PPD-aviar)	ELISA	AGID
Animales vacunados e infectados					
3301	0	0	1,86	205	Negativo
3303	0	0	1,28	250	Negativo
5931	0	0	1,46	165	Negativo
5953	0	0	1,01	420	Negativo
7461	0	0	1,51	157	Negativo
7930	0	0	1,61	154	Negativo
9108	0	0	1,58	290	Negativo
9109	0	0	1,03	166	Negativo
Animales no vacunados e infectados					
3300	0	0	1,2	313	Negativo
3302	0	0	1,44	326	Negativo
5933	0	0	1,37	238	Negativo
5956	0	0	1,26	149	Negativo
7460	0	0	1,4	171	Negativo
9107	0	0	1,11	398	Negativo
Animales vacunados y no infectados					
5954	0	0	1,3	110	Negativo
9106	0	0	1,28	400	Negativo
Animales no vacunados y no infectados					
5932	0	0	0,95	233	Negativo
7931	0	0	1,11	383	Negativo

VI: vacunado e infectado. NVI: no vacunado e infectado. VNI: vacunado no infectado. NVNI: no vacunado, no infectado. Resultado de liberación de IFN-γ y ELISA expresado como un índice descrito en el apartado III.1.4.1.3.

III.1.2.1. Vacunación

A los tres meses de edad, los animales de los grupos VI y VNI fueron sensibilizados con 1 ml de la vacuna inactivada frente a paratuberculosis Silirum® (C. Z. Veterinaria S.A., Porriño, Pontevedra, España). Esta vacuna contiene 2,5 mg de microorganismos de la cepa 316F de *Map* por ml. Se trata de una vacuna inactivada por calor que presenta como adyuvante un aceite mineral altamente refinado (Montanide® ISA 266, Seppic, París, Francia).

A los animales de los grupos no sensibilizados (NVI y NVNI) se les administró 1 ml de solución salina. En ambos casos la administración se realizó mediante inyección subcutánea en la piel del pliegue del cuello, en la base del mismo, a la entrada del pecho.

III.1.2.2. Infección experimental

III.1.2.2.1. Preparación del inóculo

El inóculo infectante se obtuvo directamente, mediante raspado y purificación, a partir de mucosa intestinal de tres vacas con paratuberculosis clínica procedentes de la misma explotación y diagnosticadas histológicamente como formas difusas multibacilares de esta enfermedad, en las que se confirmó la elevada excreción fecal mediante un frotis de heces teñido con la técnica de ZN. Tras la necropsia se tomaron varios tramos de íleon que fueron mantenidos a -20ºC hasta su utilización. El inóculo fue extraído, como máximo, en los dos días previos a su administración, manteniéndose hasta entonces a 4ºC. La extracción y purificación de las micobacterias del inóculo se realizó siguiendo la técnica modificada de Rathnamothan y Spencer (1986), tal y como se describe a continuación. Los reactivos empleados se muestran en la tabla III.2:

- Descongelar los tramos de íleon a temperatura ambiente.
- Lavar el tramo de intestino con agua destilada y PBS 1X para eliminar los posibles restos de contenido.

- Raspar la mucosa intestinal sobre una placa de Petri de 9 cm de diámetro (Deltalab, España) con una hoja de bisturí estéril (Paramount Surgiment Ltd, India), hasta obtener 20 g.

- Mezclar 5 gramos de mucosa con 2 ml de una solución de Ampicilina (Sigma®, España) (150 mg/ml de agua destilada estéril), y verter en una bolsa de plástico (Seward Stomacher®, Gran Bretaña).

- Homogeneizar el raspado de mucosa en un Stomacher (Seward Stomacher®, Gran Bretaña) durante 60 s a máxima velocidad.

- Transferir el contenido a un homogeneizador manual de vidrio de 25 ml y macerar hasta obtener una fina mezcla.

- Verter el contenido macerado a un vaso de precipitados y añadir 175 ml de una solución de tripsina (Sigma, España) al 0,5% en PBS 1X.

- Incubar la mezcla 30 minutos a 23ºC, al baño María.

- Distribuir la mezcla en cuatro tubos cónicos de 50 ml (Eurotubo®, Deltalab, España) y centrifugar a 3500 rpm durante 20 min a temperatura ambiente.

- Retirar el sobrenadante y resuspender el sedimento en agua destilada.

- Centrifugar a 3500 rpm durante 20 min a temperatura ambiente.

- Retirar el sobrenadante y volver a centrifugar con las mismas condiciones.

- Eliminar los restos de tejido que cubren el botón de micobacterias.

- Resuspender el botón de micobacterias en 10 ml de agua destilada.

- Verificar la presencia de BAAR mediante la tinción de extensiones con la técnica de ZN tal y como se describe a continuación, con los reactivos que se citan en la tabla III.3.

Técnica de ZN para extensiones:

- Secar el portaobjetos a temperatura ambiente.

- Fijar la extensión con metanol.

- Anadir carbolfucsina hasta cubrir el portaobjetos y calentar la extensión con una llama hasta que se observe vapor, pero sin que la carbolfucsina llegue a hervir, y mantener durante 5 min.

- Lavar con agua corriente.

- Decolorar con alcohol ácido durante 2 min.

- Lavar en agua corriente.

- Contrastar con azul de metileno durante 1 min.

- Lavar con agua corriente.
- Deshidratar y montar.

Tabla III.2 Reactivos empleados en la técnica modificada de Rathnanohan y Spencer (1986)

- **Tampón PBS**
  - **Solución madre (10X)**

    - NaCL (Merck, EE.UU): 80 g
    - KCl (Panreac, España): 3g
    - Na_2HPO_4 (Prolabo, Francia): 2g
    - Agua destilada: 1000 ml

  - **Solución de trabajo (1X)**

    - Solución madre diluida 1:10
    - Ajustar pH entre 7,4 y 7,6

Tabla III.3. Reactivos empleados en la técnica de Zielh-Nielsen para extensiones

- **Metanol** (Merck, EE. UU.)

- **Carbolfucsina** (Sigma Diagnostics, EE. UU.)

- **Alcohol-Ácido**

  - Alcohol de 70º (Dávila-Villalobos S.A., España): 100 ml
  - Ácido clorhídrico (Merck, EE. UU.): 1 ml

- **Azul de Metileno**
  - **Solución madre**

    - Azul de Metileno (Panreac, España):1,4 g
    - Alcohol de 96º (Dávila-Villalobos S.A., España): 100 ml

  - **Solución de trabajo**

    - Solución madre: 10 ml
    - Agua destilada: 90 ml.

La cuantificación de los BAAR del inóculo se realizó mediante su recuento en un microscopio Leitz Laborlux 11, con un objetivo de 100X. Para ello, se realizó una

extensión de 10 µl del inóculo diluido 1:1000 sobre un área de 1 cm^2 de un portaobjetos. Se dejó secar y se tiñó mediante la tinción de ZN descrita previamente. Se contaron los BAAR presentes en 50 campos microscópicos y se halló su media por campo, calculando el número de BAAR por ml de inóculo mediante la fórmula:

Nº de micobacterias/ml= nº de micobacterias/campo x F.M. x 100

F.M. es el factor microscópico que se obtiene mediante la ecuación: $F.M=10.000/ \pi r^2$. En este caso, para el microscopio y objetivos citados, este factor es 360.242.

De esta forma, se calculó una concentración del inóculo de $1,15x10^{10}$ micobacterias/ml.

III.1.2.2.2. Caracterización molecular del inóculo

En el inóculo se verificó la presencia de la secuencia de inserción IS*900* característica de *Map* mediante la realización de la extracción y purificación de ADN micobacteriano y amplificación, según Garrido *et al.* (2000b) por medio de PCR con los cebadores RJ1 (5´-GTT CGG GGC CGT CGC TTA GG-3´) y PT91 (5´-CCC ACG TGA CCT CGC CTC CA-3´) que amplifican un segmento de 389 pares de bases de dicha secuencia. Además, se comprobó que la cepa presentaba un patrón bovino, mediante la técnica de PCR-REA (Marsh *et al*., 1999) basada en la detección de polimorfismos de la secuencia de inserción que permite diferenciar entre *Maa* y las cepas C (de patrón bovino), S (de patrón ovino) y B (de bisonte) de *Map*, (Marsh *et al.*, 1999, Whittington *et al*. 2001b) (Figura III.1). Así mismo, en el Instituto Vasco de Investigación y Desarrollo Agrario (Neiker-Tecnalia, Derio, Vizcaya) se llevó a cabo el tipado de la cepa mediante campo pulsado (SnaBI-SpeI PFGE) obteniendo el perfil tipo 2-1, que es el más extendido en España (Sevilla *et al*., 2007).

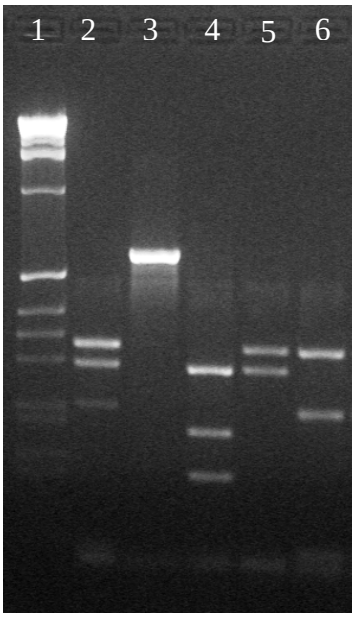


Figura III.1: Fotografía de la PCR-REA de la secuencia IS*1311*, en un gel de agarosa al 2%, teñido con bromuro de etidio.
1: Marcador de peso molecular. 2: Patrón tipo C (bovino) (inóculo del presente trabajo). 3: Amplicón bovino sin digerir con los enzimas de restricción (inóculo del presente trabajo). 4: Patrón tipo *Maa*. 5: Patrón tipo S (ovino). 6: Patrón tipo B (bisonte).

III.1.2.2.3. Pauta y dosis de infección

Dos meses después de la vacunación, cuando los animales tenían 5 meses de edad (60 dpv), se llevó a cabo la infección de los terneros de los grupos VI y NVI. A cada animal se le administraron $6{,}9 \times 10^{10}$ BAAR del inóculo por vía oral mediante pistola dispensadora. La dosis total fue administrada en 6 tomas, donde las micobacterias eran diluidas en 20 ml de solución salina, con un intervalo mínimo de dos días, de tal forma que la última dosis fue administrada 20 días después de la primera. Para homogeneizar la dosis administrada a cada animal, además de mantener el inóculo en agitación durante las inoculaciones, se administraban 10 ml alternando terneros de los diferentes grupos y registrando el orden en que se inoculaban, de forma que los 10 ml restantes se administraban en orden inverso al inicial.

Figura III.2. Administración del inóculo por vía oral

Los animales de los grupos no infectados (VNI y NVNI) se mantuvieron como control de la infección. A estos animales se les administró solución salina con las mismas pautas seguidas para los animales infectados.

Tabla III.4. Animales del estudio distribuidos según el tratamiento recibido y el momento de sacrificio

Número	Identificación	Edad†	Inmunización	Infección	Sacrificio
Animales vacunados e infectados					
3	3303 5953 7930	3	1 ml Silirum®	6 dosis $6{,}9x10^{10}$ BAAR	180 dpv
5	3301 5931 7461* 9108 9109	3	1ml Silirum®	6 dosis $6{,}9x10^{10}$ BAAR	330 dpv
Animales no vacunados e infectados					
2	5933 7460	3	1 ml solución salina	6 dosis $6{,}9x10^{10}$ BAAR	180 dpv
4	3300 3302 5956 9107	3	1ml solución salina	6 dosis $6{,}9x10^{10}$ BAAR	330 dpv
Animales vacunados y no infectados					
2	5954 9106	3	1 ml Silirum®	6 dosis solución salina	330 dpv
Animales no vacunados y no infectados					
2	5932 7931	3	1 ml solución salina	6 dosis solución salina	330 dpv

†: Edad en meses de los animales en el momento de la vacunación. VI, vacunado e infectado. NVI, no vacunado e infectado. VNI, vacunado no infectado, NVNI, no vacunado no infectado. dpv, días post-vacunación. *, uno de los cinco animales murió en el transcurso del estudio a los 250 dpv

III.1.3. Periodo de estudio y toma de muestras "in vivo"

A los 180 dpv (120 dpi), se llevó a cabo el sacrifico de tres animales del grupo VI y dos del grupo NVI, manteniéndose los restantes hasta los 330 dpv (270 dpi), momento en el que todos fueron sacrificados (Tabla III.4).

Durante este periodo y desde el día 0 –que coincide con el día de la vacunación-, hasta el final del experimento (330 dpv), se tomaron muestras de suero, sangre completa y heces a los 0, 15, 30, 45, 60, 90, 105, 120, 135, 150, 180, 210, 240, 270, 300 y 330 dpv.

La toma de muestras de suero y sangre completa fue realizada de la vena caudal (Figura III.3) con una aguja de 1,2 x 2,5 mm (Venoject®) en tubos de vacío (Venoject®) de 5 ml sin tratamiento previo en el caso del suero y en tubos de vacío con heparina de litio (Venoject®) de 10 ml en el caso de la sangre entera. La toma de muestras de heces se realizó mediante toma directa del recto, utilizando un guante plástico de exploración.

Figura III.3. Toma de muestras de suero y sangre completa de la vena caudal

Estas muestras fueron trasladadas al laboratorio y se conservaron para su procesado tal y como se indica en el capítulo correspondiente, en función de la técnica a desarrollar.

III.1.4. Estudios realizados

III.1.4.1. Estudios "*in vivo*"

III.1.4.1.1. Seguimiento clínico

Antes de proceder a la inmunización de los animales frente a paratuberculosis, estos fueron sometidos a un periodo de aclimatación en las instalaciones donde se desarrollaría el experimento en el que fueron tratados preventivamente con el coccidiostático Vecoxan® (Laboratorios Dr. Esteve, S.A, España). En estos primeros días se observó diariamente a los animales para comprobar posibles incidencias o signos clínicos.

En los 14 días posteriores a la vacunación y mensualmente hasta el final de experimento (330 dpv) se examinó clínicamente a los animales. Concretamente se valoraron cambios en su comportamiento, en la ingesta de comida o cualquier otro signo de enfermedad y, especialmente en las primeras horas tras la inoculación de la vacuna, signos de reacción anafiláctica. Asimismo, se llevó a cabo la medición de la temperatura rectal de todos los animales a las 0, 8, 24, 48, 72, 96 y 120 horas post-vacunación.

II.1.4.1.2.Valoración del nódulo vacunal

El tamaño del nódulo vacunal que apareció en el punto de inoculación de la vacuna fue valorado (Figura III.4) y medido, por la misma persona, en los mismos momentos en los que se llevó a cabo la toma de muestras (Apartado II.1.3),

adjudicándole un valor correspondiente al mayor tamaño en centímetros en cualquiera de sus tres dimensiones. Además, se procedió a la observación de todas las alteraciones que aparecieron en la zona de inoculación.

Figura III.4. Valoración del nódulo vacunal

III.1.4.1.3. Estudio de la respuesta inmune periférica

III.1.4.1.3.1. Respuesta inmune humoral

El estudio de la respuesta inmune humoral se llevo a cabo mediante las técnicas de ELISA indirecto e IDGA.

Las muestras de sangre no heparinizada se dejaron a temperatura ambiente hasta su adecuada coagulación y posteriormente de cada muestra se extrajo el suero tras su centrifugación a 1000g durante 5 minutos. El suero extraído se mantuvo a -20ºC hasta su procesamiento.

III. 1.4.1.3.1.1. ELISA indirecto

III.1.4.1.3.1.1.1. ELISA indirecto frente a paratuberculosis

El test ELISA se realizó según el protocolo descrito por Pérez *et al.* (1997) en ganado ovino con algunas modificaciones. Los reactivos utilizados en esta técnica se describen en la tabla III.5. En placas de polietileno de fondo plano de 96 pocillos (Brad-Ford®, Italia) se llevó a cabo la adsorción con 100µl/pocillo del antígeno protoplasmático PPA-3 de *Map* (Allied Monitor, Lab. Inc. Missouri, EE. UU.), a una concentración de 0,04 mg/ml durante toda la noche a 4ºC y posterior lavado con agua salina de lavado tres veces, y una vez con PBS-TG. En otra placa de las mismas características que la anterior, pero sin adsorber, a cada pocillo se le añadieron 50 µl de *Mycobacterium phlei* (Allied Monitor Lab. Inc. Missouri, EE. UU.) e igual volumen del suero del animal a analizar, dejándolo toda la noche a 4ºC. A continuación se dispensaron, en cada pocillo de la placa adsorbida, 100µl de suero a una dilución 1/100 en PBS-TG. Igualmente se pusieron 3 controles positivos y 3 negativos según se muestra en la figura (Fig. III.5). Tanto las muestras que se utilizaron como controles como los sueros problema se procesaron por duplicado. Tras la incubación de las placas 2 h a temperatura ambiente en una cámara húmeda, estas eran lavadas 3 veces con PBS-TG 300 µl por pocillo. A continuación se añadieron 100 µl por pocillo de proteína G marcada con peroxidasa de rábano picante (Bio-Rad Laboratories®, Barcelona, España) a una dilución de 1/1500 en PBS-TG incubándose 2 h a temperatura ambiente en cámara húmeda (Gutiérrez, 1996; Garrido, 2001). Posteriormente cada pocillo se lavó tres veces con 300 µl de PBS-T, añadiéndose a continuación 100 µl/pocillo de sustrato e incubándose durante 15-20 min a temperatura ambiente en cámara húmeda en oscuridad. Finalmente se detuvo la reacción al dispensar 100 µl de la solución de frenado.

Para la lectura de las placas se utilizó un espectrofotómetro (EL-340 Bio-tek Instruments) con un filtro de 405 nm.

Los resultados fueron expresados con un índice obtenido del cociente resultante de la división del valor medio de la densidad óptica (D.O) de cada suero problema entre el valor medio del control positivo de cada placa, y multiplicado por 1000. Se consideraba que un suero era positivo, sí tenía un valor igual o superior a 800, dudoso si se encontraba entre 600 y 800 y negativo sí lo hacía por debajo de 600.

Figura III.5. Esquema de disposición de los sueros en la placa de ELISA

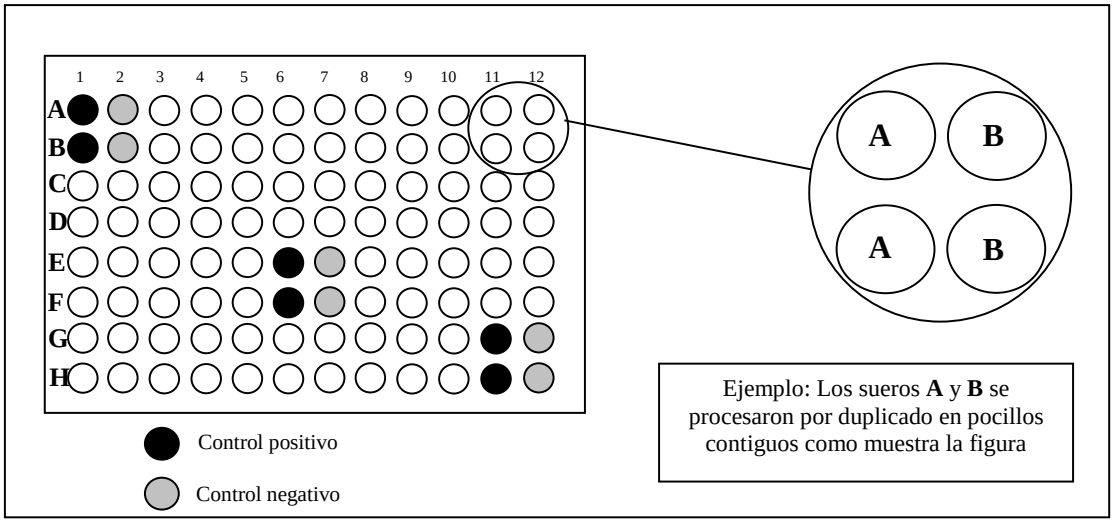


Tabla III.5 Reactivos empleados en el test ELISA indirecto de Paratuberculosis

• **Tampón carbonato** - Carbonato sódico (Na_2CO_3):5,3 g - Agua destilada: 1000 ml - Ajustar a pH 9,6 con HCl
• **Solución salina de lavado** - Cloruro sódico: 8,5 g - Tween 80: 0,5 ml - Agua destilada: 1000 ml
• **Solución del antígeno:** - Antígeno PPA-3: 0,04 mg - Tampón carbonato: 1 ml
• **PBS-TG** - Fosfato monosódico monohidratado: 1,8 g - Fosfato disódico anhidro: 12,36 g - Cloruro sódico: 8,5 g - Agua destilada: 993 ml - Ajustar a pH 7,6 con NaOH. - Tween 80: 0,5 ml - Autoclavar 121º C durante 25 min - Gelatina: 1 g
• **Suspensión de *M. phlei*** - *Mycobacterium phlei*. 5 g - Solución salina (NaCl al 0,85%)1000 ml
• **Tampón citrato 0,05 M** - A: Ácido cítrico monohidrato ($C_6H_8O_7.H_20$): 22,97 g - B: Citrato sódico tribásico ($Na_3C_6H_5O_72.H_2O$): 29,41 g - Mezclar 660 ml de solución A con 479 ml de solución B. - Completar hasta 2 litros con agua destilada - Ajustar a pH:4
• **Sustrato ABTS (2,2`-azino-di-(ethyl-benzy-thiazoline sulfonate)** - ABTS: 5,48 mgr (0,0054 g). - Tampón citrato: 50 ml - Añadir 19 µl de solución madre 1/25 de agua oxigenada (5µl de agua oxigenada comercial de 30 volúmenes en 120 µl de agua destilada).
• **Solución de frenado** - Ácido fluorhídrico (45%) 0,1 M: 889,33 µl - Agua destilada: 20 ml

III.1.4.1.3.1.1.2. ELISA indirecto frente a tuberculosis

Esta técnica (Tabla III.6) se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito por Gutiérrez Cancela *et al.* (1997), con leves modificaciones y empleando como antígeno el extracto proteico purificado (PPD) bovino (CZ Veterinaria, Porriño, Pontevedra, España). La placa (Nunc™, Dinamarca) fue adsorbida con 200 µl de la solución de PPD bovina a una concentración de 0,005 mg/ml durante toda la noche a 4ºC. Después de 3 lavados de los pocillos con 200 µl/pocillo de solución de lavado, se añadieron 200 µl del suero problema a una dilución 1/100 en PBS-T. Tras una hora de incubación en cámara húmeda a temperatura ambiente, se realizaron 3 nuevos lavados con PBS-T. A continuación se añadieron 200 µl/pocillo de proteína G marcada con peroxidasa de rábano (Bio-Rad Laboratories, Barcelona, España) a dilución 1/1500 en PBS-TG y se incubó durante 1 h en las mismas condiciones.

Tras 3 lavados con 200 µl/pocillo de PBS-TG se añadieron 200 µl/pocillo de sustrato ABTS y se incubó durante 15-20 min a temperatura ambiente en cámara húmeda y en oscuridad. Finalmente se detuvo la reacción al dispensar 40 µl de la solución de frenado. La lectura se realizó en un espectrofotómetro (EL-340 Bio-tek Instruments) con un filtro de 405 nm.

Para la interpretación de los resultados, se empleó un suero control positivo previamente conocido, dispensando los sueros como se indicó en el ELISA frente a paratuberculosis y obteniendo un índice o cociente para cada suero problema de forma semejante: cuando el cociente fue inferior a 500 la muestra se consideró negativa. Si el valor del cociente se encontraba entre 501 y 800 se consideró dudosa y cuando el cociente fue superior a 800 el suero se consideró positivo.

Tabla III.6. Reactivos utilizados en el test ELISA indirecto para tuberculosis.

- **Tampon carbonato**

  - Carbonato sódico (Na_2CO_3):5,3 g
  - Agua destilada: 1000 ml
  - Ajustar a pH 9.6 con HCl

- **Solución salina de lavado**

  - Cloruro sódico: 8,5 g
  - Tween 80: 0,5 ml
  - Agua destilada: 1000 ml

- **Solución del antígeno:**

  - Antígeno PPD bovina: 5 µg.
  - Tampón carbonato: 1 ml

- **PBS-TG**

  - Fosfato monosódico monohidratado: 1,8 g
  - Fosfato disódico anhidro: 12,36 g
  - Cloruro sódico: 8,5 g
  - Agua destilada: 993 ml
  - Ajustar a pH 7,6 con NaOH.
  - Tween 80: 0,5 ml
  - Autoclavar 121º C durante 25 min
  - Gelatina: 1 g

- **Suspensión de *M. phlei***

  - *Mycobacterium phlei*. 5 g
  - Solución salina (NaCl al 0,85%)1000 ml

- **Tampón citrato 0,05 M**

  - A: Ácido cítrico monohidrato ($C_6H_8O_7.H_20$): 22,97 g
  - B: Citrato sódico tribásico ($Na_3C_6H_5O_72.H_2O$): 29,41 g
  - Mezclar 660 ml de solución A con 479 ml de solución de B.
  - Completar hasta 2 litros con agua destilada
  - Ajustar a pH:4

- **Sustrato ABTS (2,2`-azino-di-ethyl-benzy-thiazoline sulfonate)**

  - ABTS: 5,48 mg (0,0054 g).
  - Tampón citrato: 50 ml
  - Añadir 19 µl de solución madre 1/25 de agua oxigenada (5µl de agua oxigenada comercial de 30 volúmenes en 120 µl de agua destilada).

- **Solución de frenado**

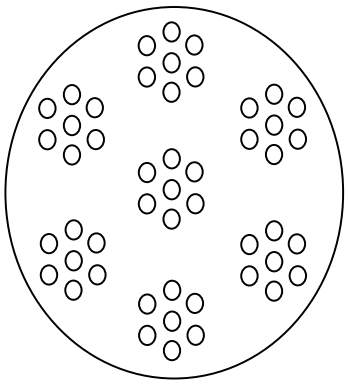
  - Ácido fluorhídrico (45%) 0,1 M: 889,33 µl
  - Agua destilada: 20 ml

III.1.4.1.3.1.2. IDGA

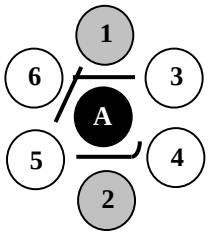
Esta técnica (Tabla III.7) se realizó en placas de Petri de 9 cm de diámetro a las que se añadían 15 ml de gel de agarosa caliente, que se dejaba enfriar a temperatura ambiente. Una vez que el gel se enfriaba y solidificaba se perforaban siete rosetas formadas, cada una, por siete pocillos de 3 mm de diámetro (figura III.6). El pocillo central se rellenaba con 20 µl de antígeno (PPA-3) a una concentración de 4 mg/ml. En dos pocillos opuestos se dispensaban 20µl de suero control positivo y en los otros cuatro, los sueros de los animales a analizar. Las placas se cubrían e incubaban en cámara húmeda a temperatura ambiente.

Para la interpretación de los resultados (figura III.6) se hacían dos lecturas, una a las 24 horas y otra a las 48 horas. Si aparecía una banda de precipitación opaca entre el pocillo del antígeno y los pocillos controles positivos, se interpretaba que la técnica se había llevado a cabo correctamente. Un suero problema era positivo si la banda era similar y se continuaba con la que aparecía para los sueros controles positivos. Un resultado era interpretado como dudoso o positivo débil si el suero provocaba la incurvación de la banda o esta banda no estaba bien formada y negativo si no aparecía banda.

Figura III.6. Esquema de una placa de IDGA e interpretación de los resultados



Detalle de una placa con 7 rosetas



A: 20µl de PPA-3
1 y 2: 20 µl de sueros controles positivos.
3, 4, 5 y 6: 20 µl de sueros problema
4. Resultado dudoso
6. Resultado positivo
3 y 5 Resultados negativos

Tabla III.7. Reactivos empleados en la técnica de IDGA

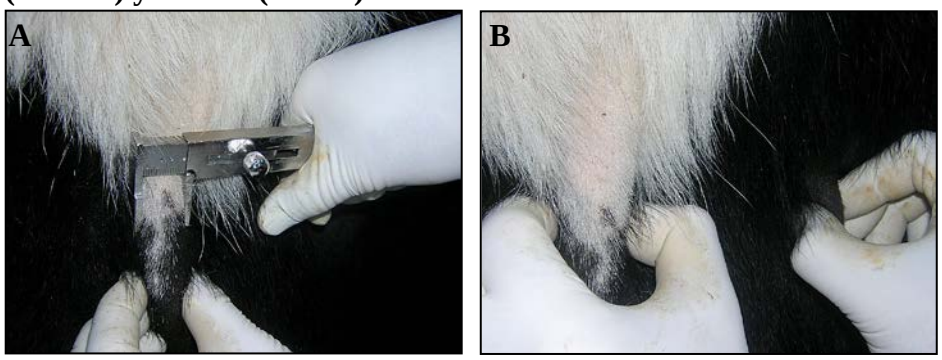
• **Gel de agarosa** - Solución TRIS 0,8M: 0,6 ml - TRIS ácido (Sigma-Aldrich, España): 12,6 g - TRIS básico (Merck, Alemania): 9,63 g - Agua destilada: 100 ml Ajustar a pH 9 con HCl - Cloruro sódico: 0,12 g - Agarosa (Sigma-Aldrich, España): 0,15 g - Agua destilada: 14,25 g - Azida sódica 0,1%: 0,15 ml Se calienta en agitación hasta que quede transparente, pero sin que llegue a hervir
• **Tampón carbonato** - Carbonato sódico (Na_2CO_3): 5,3 g - Agua destilada: 1000 ml. Ajustar a pH 9.6 con HCl
• **Antígeno PPA-3** - Antígeno PPA-3 (Allied Monitor Lab. Favette, EE. UU.): 4 mg - Tampón carbonato: 1ml

III.1.4.1.3.2.1. Intradermorreacción (IDR) comparada

La prueba de IDR comparada fue llevada a cabo a los 0, 45, 150 y 330 dpv de acuerdo a las recomendaciones de la cuarta edición del Manual de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE). Para la realización de esta prueba se afeitaba el pelo en la zona dorsal del cuello del animal, en su lado derecho, en dos bandas de una dimensión aproximada de 5 cm de ancho por 10 cm de alto, paralelas, con una separación de 4-5 cm entre ambas. Una vez afeitadas se medía con un calibre el pliegue de estas zonas y posteriormente, en la zona central de la piel afeitada más caudal del animal, se realizaba la inyección intradérmica de 0,1 ml de PPD aviar extraído de la cepa D4-ER de *Mycobacterium avium* de concentración 0,5 mg/ml y 25.000 UI/ml (CZ Veterinaria, Porriño, Pontevedra, España) y en la zona afeitada más craneal se inyectaban 0,1 ml de PPD bovino de la cepa AN5 de *Mycobacterium bovis* (CZ Veterinaria, Porriño, Pontevedra, España) de concentración 1 mg/ml y 25.000 U Ph Eur/ml. Para confirmar la correcta inoculación, se palpaba el lugar de inyección en el

que debía apreciarse un pequeño abultamiento. La lectura de la prueba se realizaba a lass 72 h, midiendo el grosor de la piel en los puntos de inoculación con un pie de rey (Fig III.7), expresándose el resultado de las mediciones en mm.

Fig.III.7. Intradermorreacción (IDR). A: Medida del grosor cutáneo a las 72 horas post-inoculación. B: Comparación de la reacción aviar (delante) y bovina (detrás).



Esta prueba se llevaba a cabo siempre tras la obtención de las muestras de sangre para los otros estudios, de tal manera que la intradermorreacción no pudiera interferir con el resultado de las otras pruebas.

Para el diagnóstico de paratuberculosis, se tuvo en cuenta únicamente la lectura de la IDR con PPD aviar considerándose como (Wentink *et al.*, 1993):

- Reaccionantes positivos: Respuesta a PPD aviar > 2 mm
- Reaccionantes dudosos: Respuesta a PPD aviar = 2 mm
- Reaccionantes negativos: Respuesta a PPD aviar < 2mm.

Según el Anexo I del Real Decreto 1047/2003 del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación para la interpretación de la prueba de intradermotuberculinización de comparación, usada para la determinación y el mantenimiento de la calificación de explotación oficialmente libres de tuberculosis, se establecen los siguientes grupos:

- ”Positiva”: Reacción bovina positiva que sea superior en más de 4 mm a la reacción aviar, o presencia de signos clínicos (edema difuso o extenso, exudación, necrosis, dolor o inflamación de los nódulos linfáticos regionales).

- "Dudosa": Reacción bovina positiva o dudosa que sea de 1 a 4 mm superior a la reacción aviar, y ausencia de signos clínicos.
- "Negativa": Reacción bovina negativa, o reacción bovina positiva o dudosa pero que sea igual o inferior a una reacción aviar positiva o dudosa, y ausencia de signos clínicos en ambos casos.

III.1.4.1.3.2.2. Valoración de la producción de IFN-γ

Esta técnica se llevó a cabo en las muestras de sangre heparinizada, que fueron procesadas siempre antes de las 8 primeras h post-extracción. Se procedía a la incubación de tres alícuotas de 1,5 ml de sangre, con 100 µl de PBS, con 30 µg de PPD aviar y con 30 µg de PPD bovina (CZ Veterinaria, Porriño, Pontevedra, España) idénticas a las utilizadas en la prueba de la IDR comparada, ambas previamente diluidas hasta completar 100 µl en PBS durante 20 horas a 37 ºC. Tras la incubación, el plasma era obtenido mediante la centrifugación de los viales durante 5 min a 5000g y trasvasado a otro vial en el que se almacenaba a -20ºC hasta su procesamiento.

La producción de IFN-γ por los linfocitos se cuantificó mediante un ELISA de captura utilizando el kit comercial "BOVIGAM™ Bovine γ Interferon Test Kit" (Prionics AG, Suiza) que utiliza un anticuerpo monoclonal frente a dicha citoquina bovina. La realización de este test se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante. Tras descongelar los plasmas y atemperar todos los componentes del kit (Tabla III.8), excepto el cromógeno y el conjugado concentrado, manteniéndolos a temperatura ambiente durante 30 minutos, se añadieron 50 µl del diluyente verde en cada pocillo de la placa, y sobre éstos se dispensaban 50 µl del plasma a analizar, siempre por duplicado como se muestra en la figura III.8. Los controles positivos y negativos eran suministrados por el kit comercial. Se procedió a la incubación durante 60 min a temperatura ambiente en cámara húmeda, tras lo cual se eliminó el contenido de los pocillos volcando la placa, que se lavó cuatro veces con la solución de lavado. Posteriormente, se añadieron 100 µl del conjugado diluido en cada pocillo, incubándose nuevamente durante 60 min en las mismas condiciones que en el paso anterior, tras lo cual se llevaron a cabo otros cuatro lavados. A continuación se añadieron 100 µl de la solución de cromógeno y el sustrato a la concentración indicada y se incubaron las

placas a temperatura ambiente y en oscuridad durante 30 min. Transcurridos estos, se añadieron 50 µl de solución de frenado. La lectura de la absorbancia o densidad óptica (D.O.) se realizó en los 20 min siguientes en un espectrofotómetro (EL-340 Bio-teck Instruments) con filtro de 450 nm.

Para la interpretación de los resultados se siguió el criterio empleado por Gutiérrez (1996) en la tuberculosis bovina y Pérez *et al.* (1999, 2002) en la paratuberculosis ovina. Se obtuvo el valor de la absorbancia de cada plasma mediante la media aritmética del valor de los dos pocillos del mismo plasma. La prueba se repetía si los dos valores diferían en más de un 30%. Para considerar la placa como válida, el control positivo debía tener un valor superior a 0,700 y el negativo y los tubos no estimulados (PBS) inferior a 0,130, tal como se indica en las instrucciones. La absorbancia se transformó en un cociente o índice obtenido al dividir la D.O de los plasmas estimulados con ambos antígenos (PPD bovina y PPD aviar) entre la D.O. del plasma incubado únicamente con PBS. Cuando se obtenía una absorbancia superior a 3, es decir un valor que no podía medir el espectrofotómetro se otorgaba a ese plasma el valor máximo de 3.

Para el diagnóstico de paratuberculosis se consideraba sólo el cociente del tubo estimulado con PPD aviar:

- Reaccionantes aviares positivos: índice de PPD aviar ≥ 2
- Reaccionantes aviares dudosos: índice de PPD aviar ≥1,5 <2
- Reaccionantes aviares negativos: índice de PPD aviar < 1,5

Para el diagnóstico de tuberculosis se considera:

- Reaccionantes bovinos positivos: Cociente del plasma estimulado con PPD bovina mayor de 2 y mayor que el cociente del plasma estimulado con PPD aviar.
- Reaccionantes aviares positivos: Cociente del plasma estimulado con PPD aviar mayor de 2 y mayor que el cociente del plasma estimulado con PPD bovina.
- Reaccionantes dudosos: Ambos cociente inferiores a 2.

Figura III.8 Esquema de disposición de los sueros y los controles en una placa del test BOVIGAM™

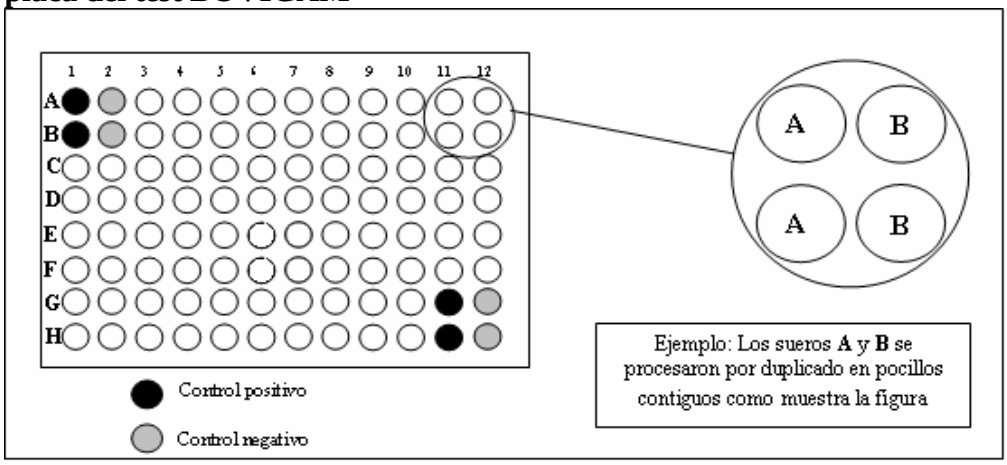


Tabla III.8. Componentes del Kit BOVIGAM™ (Bovine gamma Interferon Test)

- **Plascas adsorbidas con el anticuerpo monoclonal frente a INF-γ bovino**
- **Control positivo INF-γ bovino**
- **Control negativo INF-γ bovino**
- **Diluyente verde: Tampón diluyente del plasma**
- **Solución de lavado concentrada 20X**
- **Conjugado concentrado 100X: Anticuerpo anti IFN-γ bovino marcado con peroxidasa**
- **Diluyente azul: Tampón diluyente del conjugado**
- **Substrato enzimático en solución tamponada**
- **Solución del cromógeno concentrada 100X**
- **Solución de frenado de la reacción enzimática**

III.1.4.1.4. Estudios bacteriológicos en heces

III. 1.4.1.4.1. Cultivo de heces

Los estudios bacteriológicos fueron realizados en las instalaciones del Instituto Vasco de Investigación y Desarrollo Agrario (Neiker-Tecnalia, Derio, Vizcaya).

Las muestras de heces fueron congeladas a -20ºC hasta el momento de procesarlas. Se utilizaron medios a base de huevo. Cada muestra se sembró en cuatro tubos, 2 tubos con medio de Herrold (HEYM) con micobactina J (MJ) y dos tubos con medio de Löwenstein-Jensen (LJ) con MJ cuyos componentes se describen en la tabla III.9.

Los medios se elaboraron de la siguiente forma:

- **Medio Löwenstein-Jensen:**

- Mezclar el medio base, la glicerina y el agua purificada de clase 2.
- Calentar hasta su disolución y añadir la MJ disuelta en etanol.
- Ajustar el pH a 7,1 y autoclavar la mezcla durante 15 min a 120ºC.
- Dejar que baje la temperatura a 50ºC aproximadamente y añadir los antibióticos, el antifúngico y los huevos enteros previamente esterilizados mediante inmersión en etanol durante 2h.
- Dispensar el medio de cultivo en tubos de cristal estériles a razón de 8 ml por tubo.
- Coagular el medio en estufa a 90ºC durante 4 h.
- Mantener en estufa a 37ºC con los tapones sin apretar hasta la desaparición del líquido de superficie.
- Cerrar totalmente los tubos.
- Guardar a 4ºC hasta su utilización.

- **Medio Herrold:**

- Mezclar el agua purificada de clase 2, la peptona, ClNa, el bacto-agar, el extracto de carne bovina y la glicerina.

- Calentar hasta su disolución y añadir la MJ disuelta en etanol y el piruvato.

- Ajustar el pH a 7,5 y autoclavar durante 15 min a 120ºC.

- Dejar que baje la temperatura a 50ºC aproximadamente y añadir las yemas de 3 huevos esterilizados mediante inmersión en etanol durante 2 h.

- Una vez que esté todo bien disuelto, añadir el verde malaquita y los antimicrobianos.

- Dispensar el medio de cultivo en los tubos de cristal estériles a razón de 8 ml por tubo, dejándolos en posición inclinada hasta su coagulación.

- Mantener en estufa a 37ºC con los tapones sin apretar hasta la desaparición del líquido de la superficie.

- Cerrar totalmente los tubos.

- Guardar a 4ºC hasta su utilización.

Tabla III.9. Reactivos empleados en la elaboración de los medios de cultivo para el aislamiento de micobacterias.

Reactivos	Löwenstein-Jensen	Herrold
Löwenstein Medium Base (Difco, EE. UU.)	28 g	-
Glicerina (Panreac, España)	10 g	31,5 g
Micobactina J (Allied Monitor, EE. UU.)	2 mg	2 mg
Agua purificada de clase 2	370 ml	870 ml
Huevos	624 ml	3 yemas
Penicilina sódica Penilevel 1.000.000 U.I. Bencil penicilina sódica. (Laboratorios Ern S.A, España)	1.000.000 U.I	1.000.000 U.I
Cloranfenicol (Sigma-Aldrich, EE. UU.)	100 mg	100 mg
Anfotericina B (Sigma-Aldrich, EE. UU.)	50 mg	50 mg
Bacto Peptona (B.D., EE. UU.)	-	9 g
ClNa (Panreac, España)	-	45 g
Bacto agar (Difco, EE. UU.)	-	15,3 g
Extacto de carne bovina. Beef extract. (Difco, EE. UU.)	-	2,7 g
Piruvato sódico (Merck, EE. UU.)	-	4,1 g
Verde malaquita 2% (Merck; EE. UU.)	-	5 ml

El protocolo empleado para la siembra de heces, fue una modificación del método de cultivo descrito por Juste *et al*. (1991):

- Pesar 2 g de heces en el caso de muestras individuales (a partir de los 180 dpv) y añadir a una bolsa plástica de Stomacher. En el caso de las muestras recogidas hasta los 150 dpv se realizaron 5 “pooles” o lotes en cada muestreo, con 1g de heces de cada animal que componía el “pool”. Dos de los “pooles” correspondían a los animales del grupo VI (con cuatro terneros cada uno), dos al grupo NVI (con tres animales cada uno) y el “pool” restante estaba formado por los cuatro animales no infectados. En los casos en los que se obtuviera un resultado positivo, se sembraban de nuevo 2 g de heces de cada animal que lo componía, por separado.

- Añadir 38 ml de cloruro de cetil piridinio (CPC) 0,75% (RonaCare™ CPC. Merck; EE. UU.).

- Homogeneizar en un digestor Stomacher 80 (Laboratorios Blender, Seward Medical Limited, Londres, Reino Unido) durante 30 s.

- Situar la bolsa en posición vertical en un soporte para bolsas durante 15-30 min para provocar la sedimentación del material más grosero.

- Recoger 15 ml de la interfase utilizando una pipeta estéril y depositar en tubos de centrífuga estériles de 15 ml en los que se dejó actuar el CPC durante 18-24 h, provocando igualmente el enriquecimiento del inóculo mediante sedimentación.

- Inocular 0,2 ml (4 gotas) del sedimento con pipeta Pasteur estéril en cada tubo (de un total de cuatro). Esta fase de siembra se llevó a cabo en campana de bioseguridad, en dos pasos para contrarrestar la mayor concentración de micobacterias en la parte inferior de la pipeta: en el primero se inoculó una gota en cada uno de los tubos y en el segundo paso se inocularon tres gotas en sentido inverso.

- Cerrar los tubos flameando previamente el tapón y la boca del tubo, sin apretar.

- Incubar los tubos en estufa a 37ºC en una gradilla en posición inclinada durante una semana, tras la que se comprobó su estado.

- Cerrar completamente los tubos e incubar a 37ºC con los tapones apretados.

En cada lote se incorporaban dos tubos sin sembrar para descartar la contaminación en la fase de producción de medios.

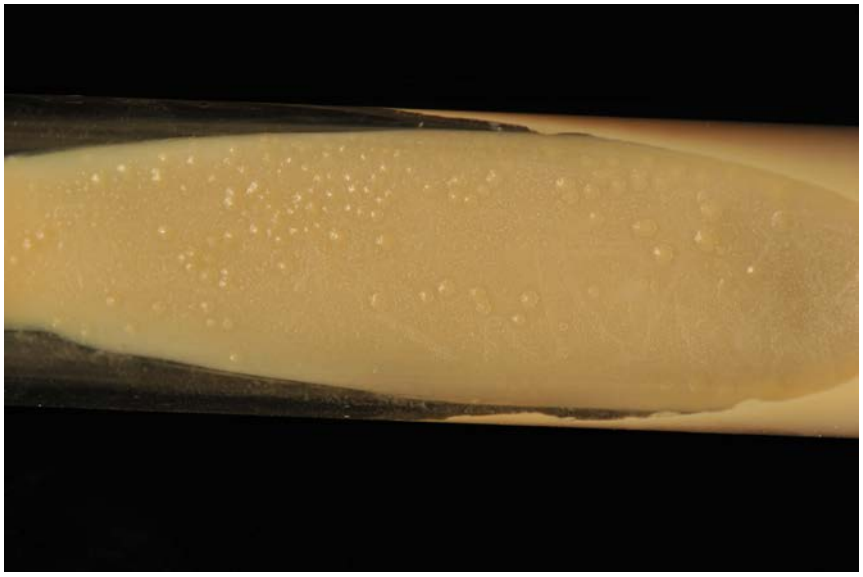
Se realizaron tres revisiones de los cultivos durante el periodo de incubación. Estas eran llevadas a cabo en una lupa estereoscópica Leica MZ 75 (Leica. Wetzlar, Alemania). La primera de ellas a los cuatro meses y la última a los 12 meses de su incubación. El diagnóstico se consideró positivo si se observaban colonias de morfología característica en alguno de los tubos y se comprobaba la presencia de BAAR mediante la técnica de ZN modificada (Noack, 1979), para la que se emplearon los reactivos que se describen en la tabla III.10:

- Tinción con fucsina fenicada Kinyoun durante 10 min.
- Lavar en agua corriente.
- Decoloración con alcohol ácido 15 s.
- Lavar en agua corriente.
- Contratar con verde malaquita 3 min.
- Secar al aire libre.

Tabla III.10. Reactivos empleados en la modificación de Kinyoun de la técnica de Zielh-Neelsen

• **Fucsina fenicada Kinyou** (Química Clínica Aplicada S.A., España)
• **Alcohol-Ácido** - Etanol absoluto (Panreac, España): 485 ml - Ácido clorhídrico 37% (Panreac, España): 15ml
• **Verde malaquita** - Verde malaquita (Merck, EE. UU.): 0,8 g - Agua purificada de clase 2: 100 ml

Figura III.9. Aislamiento positivo de *Map*.



Colonias de morfología compatible con una cepa bovina, cultivadas en medio Herrold

III.1.4.1.4.2. PCR de heces

Las muestras de heces fueron congeladas a -20ºC hasta el momento de su procesado según el método descrito por Garrido *et al*., (2000b):

III.1.4.1.4.2.1. Extracción de las micobacterias

Para la concentración de las micobacterias fecales, se siguieron los siguientes pasos:

- Pesar 1g de heces y añadir 20 ml de SDS Laurel Sulfate Sodium SALT (Sigma-Aldrich, EE. UU.) al 5% en una bolsa de Stomacher.
- Homogeneizar la muestra en un digestor Stomacher 80 (Laboratorios Blender, Seward Medical Limited, Londres, Reino Unido) durante 1 min.
- Dejar la bolsa de Stomacher en posición vertical durante 20 min a temperatura ambiente para lograr la precipitación del material más grosero.
- Recoger 10 ml de la fase acuosa superior y transferirla a un tubo de polipropileno.
- Centrifugar a 7500g durante 10 min a 4ºC.
- Desechar el sobrenadante y realizar dos lavados con las mismas condiciones anteriores con PBS.
- En el último lavado resuspender en 2 ml de PBS y se transferir a un vial de 2 ml.
- Centrifugar a 9600g durante 5 min.
- Decantar el sobrenadante dejando el pellet en un volumen final de 200µl.

III.1.4.1.4.2.2. Lisis y extracción de ADN micobacteriano

El protocolo para conseguir la lisis de la micobacteria y extraer el ADN micobacteriano se expone a continuación. Los reactivos empleados se detallan en la tabla III.11.

- Añadir al vial con la extracción micobacteriana 500 µl de TE-Triton X100 y homogeneizar.

- Exponer a tres ciclos de congelación-hervido, para romper la pared micobacteriana. Estos consistían en 5 min a -196ºC en nitrógeno líquido seguidos de 5 minutos a 100ºC en baño termostático (Selecta, España).

- Añadir 450 µl de reactivo GE y 250 µl de acetato de amonio 7,5 M pH 6,3. Mezclar por inversión y dejar 15 min en hielo.

- Añadir 500 µl de cloroformo:octanol (24:1, v/v) y mezclar por inversión.

- Centrifugar a 9600g durante 5 min y transferir la fase acuosa a un nuevo tubo con 500 µl de cloroformo:octanol, previamente preparado en hielo.

- Centrifugar de nuevo con las mismas condiciones.

- Recoger la fase acuosa y transferir a un nuevo vial para precipitar el ADN. Para ello, se añade a este vial igual volumen de isopropanol (Panreac, España) que de fase acuosa recogida. Dejar precipitando toda la noche a -20ºC.

- Centrifugar a 9600g durante 10 min.

- Lavar dos veces con etanol (Panreac, España) al 70% conservado a --20ºC, mediante la adición de 1ml de etanol 70% y centrifugación a 9600g durante 5 min.

- Dejar secar al aire los viales abiertos, boca abajo hasta la completa evaporación del alcohol.

- Resuspender el sedimento de ADN en agua destilada desionizada estéril (Sigma-Aldrich, EE. UU.) y mantener a -20ºC hasta su uso.

Para asegurar el correcto funcionamiento de la técnica se usó como control negativo de extracción una muestra de agua destilada desionizada estéril (Sigma-Aldrich, EE. UU.) a la que se añadieron los mismos reactivos que al resto de muestras, como se ha descrito.

III.1.4.1.4.2.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Como cebadores de la reacción se emplearon oligonucleótidos específicos utilizados previamente por otros autores (Garrido *et al.*, 2000b): RJ1: 5´GTTCGGGGCCGTCGCTTAGG3´ y PT91: 5´CCCACGTGACCTCGCCTCCA3´, que amplifican un segmento de 389 pares de bases de la secuencia de inserción IS*900*.

Tabla III.11. Reactivos empleados en la extracción de ADN.

• **Reactivo GE** - Guanidina isotiocianato (Invitrogen; EE.UU): 59,08 g - EDTA (78Mm) (Panreac, España): 2,92 g - Agua destilada estéril: 100 ml
• **TE-Triton X100** - Tris 0,2 M (10mM): 5 ml - EDTA 0,1M (mM): 1 ml - Triton X100: 1 ml (Merck, Alemania): - Agua destilada estéril: 93 ml
• **Stock EDTA 0,1 M** - EDTA: 3,722 g - Agua destilada estéril: 100 ml
• **Stock TRIS 0,2 M pH 8** - Tris base (Merck, Alemania) : 2,42 g - Agua destilada:8,5 ml - Ajustar el pH a 8 y completar hasta 100 ml
• **Acetato de amonio 7,5 M** - Acetato de amonio: 57,81 g - Agua destilada: 100 ml

Se realizó la premezcla con los reactivos que se describen en la tabla III.12. en una dependencia dedicada a este fin, separada físicamente de la zona donde se añadía el ADN a cada vial. Ambas dependencias eran sometidas a irradiación con rayos ultravioleta, al menos durante unos 30 min previamente a su utilización. Cada muestra se sometía a la reacción por duplicado. También se utilizaba un control positivo de ADN extraído de una cepa de *Map* aislada en laboratorio y un control negativo de reacción, al que se le añadía igual cantidad de agua destilada desionizada en lugar de ADN. Esta reacción tenía lugar en el termociclador PTC-100™ (MJ Research, Watertown, MA, EE. UU.) con el programa siguiente: un ciclo a 96ºC durante 2 min, 40 ciclos a 95ºC durante 30 s, a 58ºC durante 30 s y a 72ºC durante 1 min y finalmente un ciclo a 72ºC durante 10 min.

Tabla III.12. Reactivos empleados en la reacción de PCR

Reactivo	Volumen
H_2O	17,85 µl
Buffer 10 X (Invitrogen, EE.UU)	2,5 µl
Cl_2Mg (50 mM) (Invitrogen, EE.UU)	0,75 µl
Cebador 1 (Invitrogen, EE.UU)	0,5 µl
Cebador 2 (Invitrogen, EE.UU)	0,5 µl
dNTPs (25 mM) (Invitrogen, EE.UU)	0,2 µl
Taq DNA polimerasa (Invitrogen, EE.UU)	0,2 µl
ADN muestra	2,5 µl
Total	**25** µl

III.1.4.1.4.2.4. Visualización de los resultados

Tras la finalización de la reacción, los viales con el producto amplificado se extraían del termociclador y eran guardados a 4ºC hasta su carga en el gel de agarosa (Seakem® LE Agarose. Cambrex; EE. UU.) al 2% en TBE 0,5 X. Los reactivos usados en esta etapa están descritos en la tabla III.13. Al menos en uno de los pocillos de los dos extremos del gel se cargaban 0,2 µg de marcador de peso molecular de 100 pares de bases (Biotools, Madrid, España). En el resto se cargaban 12,5 µl de las muestras amplificadas a las que se añadían 2,5 µl del tampón de carga.

Dependiendo del tamaño del gel, la cubeta de electroforesis se sometía a unas constantes de voltaje diferentes. Si el gel era pequeño (de hasta 10 pocillos) se sometía a 80V durante 90 min, y si se trataba de un gel de mayor tamaño se aplicaban 100V con el mismo tiempo. Una vez finalizado el corrido electroforético, el gel se teñía en agitación en una cámara en oscuridad que contenía agua y unas gotas de bromuro de etidio (Merck, Alemania), durante 30 min.

Para la visualización de los resultados el gel se introducía en un transiluminador de luz ultravioleta, que se encontraba conectado a un sistema informático de tratamiento

de imágenes (BioCaptMw, Microsoft, Redmond, EE. UU.), las cuales se imprimieron en una videoimpresora.

Para la interpretación de los resultados, se consideraba que una muestra era positiva cuando se obtenía una banda correspondiente a un fragmento de 389 pares de bases de la secuencia de inserción IS*900* en al menos uno de las dos muestras amplificadas y, además, todos los controles presentaban el resultado esperado.

Tabla III.13. Reactivos empleados para la visualización de ADN amplificado.

• **Tampón TBE 20 X** - Tris básico (1M) (Merck, Alemania): 121 g - Ácido bórico (1M) (Calbiochem, Alemania): 61,7 g - EDTA (20mM) (Panreac, España): 7 g - Agua destilada: 1000 ml
• **Tampón TBE 0,5X** - TBE 20 X: 25 ml - Agua destilada: 975 ml
• **Tampón de carga** - Bromophenol Blue (Sigma Chemical Co., EE. UU.): 0, 25 g - Sacarosa (Panreac, España): 40 g - Agua destilada: 100 ml

III.1.4.1.5. Estudio bacteriológico en suero: PCR de suero

Las muestras de suero utilizadas en la PCR fueron las mismas que las empleadas para valorar la respuesta inmune humoral (apartado III.1.4.1.2.1).

III. 1.4.1.5.1. Lisis y extracción de ADN micobacteriano

Se parte de 200 µl de suero que previamente se ha descongelado a temperatura ambiente y se sigue el protocolo utilizado con las muestras de heces (apartado III.1.4.1.3.1.2.2).

III.1.4.1.5.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Como cebadores de la reacción se emplearon tanto los descritos para la PCR de heces (apartado III.1.4.1.3.2.3), como otros oligonucleótidos específicos de la secuencia IS*900* de 217 pares de bases utilizados por Collins *et al.* (1993): C1: 5´GATCGGAACGTCGGCTGGTCAGG3´ y C2: 5´GATCGCCTTGCTCATCGCTGCCG3´, en el cual las muestras se sometieron al siguiente programa: 1 ciclo a 96ºC durante 3 min, 38 ciclos a 96ºC durante 1 min, 65ºC durante 1 min y 72ºC durante 2 min, y finalmente un ciclo a 72ºC durante 8 min.

Para la interpretación de los resultados con los segundos cebadores, se consideraba que una muestra era positiva cuando se obtenía una banda correspondiente a un fragmento de 217 pares de bases de la secuencia de inserción IS*900* en al menos uno de las dos muestras amplificadas y, además, cuando en todos los controles se obtenía el resultado esperado.

III.1.4.2. Estudios "*post-mortem*"

III.1.4.2.1. Estudios anatomopatológicos

III.1.4.2.1.1.Necropsia, estudio macroscópico y toma de muestras

A los 180 dpv se llevó a cabo el sacrificio de cinco animales, tres de ellos del grupo VI y dos del grupo VNI, y a los 330 dpv del resto (Tabla III.3). En todos los casos, el sacrificio se produjo mediante desangrado tras la inyección intravenosa del producto eutanásico T-61® (Intervet Schering-Plough Animal Health, España) tras la sedación previa con Rompun® (Bayer, Kiel, Alemania) ambos a la dosis recomendada por el fabricante.

A todos los animales, se les practicó la necropsia completa y ordenada, fijándose en cualquier alteración macroscópica y prestando atención especial a aquellas asociadas

al intestino y nódulos linfáticos relacionados. El animal 7461 (grupo VI) que murió a causa de una úlcera abomasal, fue excluido del estudio lesional debido al elevado grado de autolisis que presentaban las muestras de tejido.

Se realizó una toma de muestras sistemática para su posterior estudio histopatológico en la que se recogían diferentes muestras de intestino: duodeno, yeyuno (una muestra de 5 cm de cada tramo: proximal, medio y distal con placa de Peyer y sin ésta), íleon (tres muestras de 5 cm tomadas a 20, 40 y 60 cm de la válvula ileocecal), válvula ileocecal, ciego, colon y recto. Asimismo, se tomaron muestras de los diferentes nódulos linfáticos relacionados: yeyunal caudal (tres muestras de la parte más caudal), yeyunales (tres muestras) ileales (tres muestras) e ileocecales (tres muestras). Igualmente, se recogieron muestras de los diferentes órganos de la canal y músculo esquelético.

III.1.4.2.1.2. Procesamiento histológico

Los tejidos fueron fijados en formol tamponado al 10% durante 24-48 h. De cada muestra se tallaron tres piezas que se incluyeron en un procesador de tejidos automático Myr modelo STP 120 ® (Microm Laborgerate, S.L., Barcelona, España) de ciclo continuo de 18 h, en el que las muestras fueron deshidratadas en alcohol de gradación creciente, tratadas con xilol y finalmente incluidas en parafina de punto de fusión de 56 ºC (Vogel Histo-Comp®). El montaje definitivo de los bloques se realizó en una unidad formadora de bloques Myr AP 280-2® (Microm Laborgerate, S.L., Barcelona, España).

Tras la inclusión, se obtuvieron varias secciones seriadas de 4µm de espesor con un microtomo Finesse Shadon® (Cheshire, Reino Unido) utilizando cuchillas desechables Feather R35® que fueron recogidas en portaobjetos. Tras su secado, se emplearon las técnicas de tinción de HE, cuyos reactivos se reflejan en la tabla III.14., y de ZN para la detección de BAAR, cuyos reactivos se detallan en la tabla III.15.

Para llevar a cabo la tinción de HE se procedió a:

- Desparafinar e hidratar mediante dos pases de 10 min cada uno en xilol, seguidos de pases de 5 min en los alcoholes de 100º, 100º, 96º y 60º.
- Lavar con agua corriente durante 10 min.
- Teñir de 3 a 5 min con Hematoxilina de Harris.
- Lavar en agua corriente durante 5 min.
- Teñir con eosina durante 30 s.
- Lavar, deshidratar y montar en DPX (VWR International Ltd, Reino Unido).

Para llevar a cabo la técnica de ZN se procedió a:

- Desparafinar e hidratar mediante dos pases de 10 min cada uno en xilol, seguidos de pases de 5 min en los alcoholes de 100º, 100º, 96º y 60º.
- Lavar con agua corriente durante 10 min.
- Tinción con carbol-fucsina (previamente precalentada) durante 50 min en estufa a 37ºC.
- Lavar en agua corriente 5 min.
- Decolorar con la solución alcohol-ácido o solución ácido sulfúrico hasta que la preparación quede rosa pálido.
- Lavar en agua corriente 5 min.
- Teñir con la solución de trabajo de azul de metileno durante 15 s.
- Lavar, deshidratar en alcohol de 95º, alcohol absoluto, xilol y montar en DPX (VWR International Ltd, Reino Unido).

Tabla III.14. Reactivos empleados en la técnica de tinción de Hematoxilina-Eosina

- **Hematoxilina de Harris**

- Hematoxilina (Merck, Alemania): 1 g
- Alcohol 100º (Dávila-Villalobos S.A., España): 10 ml
- Sulfato aluminico amónico (Panreac, España): 20 g
- Agua destilada: 200 ml

Disolver la hematoxilina en alcohol y el alumbre en agua caliente
Mezclar y hervir con cuidado
Añadir el óxido de mercurio y retirar del fuego enfriándolo rápidamente

- **Eosina**

- Eosina (Merck, Alemania): 1 g
- Agua destilada: 100 ml
- Ácido acético glacial (Merck, Alemania): 2 ó 3 gotas

Tabla III. 15. Reactivos empleados en la técnica de tinción de Z-N

- **Solución de Carbolfucsina** (Sigma Diagnostics, EE. UU.)

- **Solución alcohol-ácido**

- Alcohol de 70º (Dávila-Villalobos, España): 200 ml
- Ácido clorhídrico: 2 ml

- **Azul de Metileno**
  - **Solución madre**

    - Azul de metileno (Panreac, España): 1,4 g
    - Alcohol de 96º (Dávila-Villalobos S.A., España): 100 ml

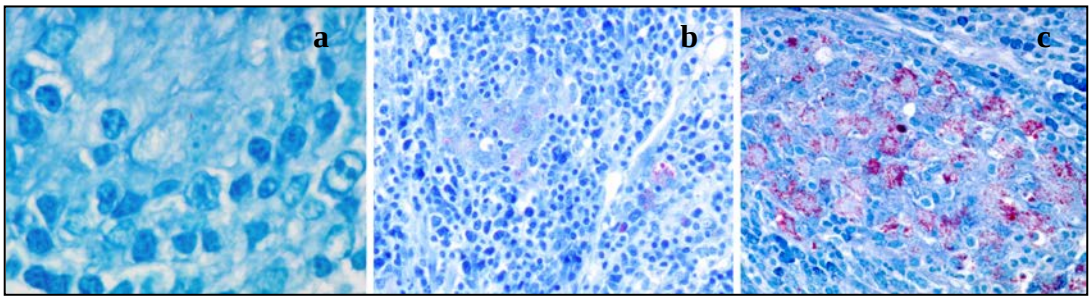
  - **Solución de trabajo**

    - Solución madre: 10 ml
    - Agua destilada: 90 ml

En cada una de las secciones de tejido examinadas se valoró la intensidad de tinción mediante ZN en toda la muestra, siempre por el mismo observador. Según el número de BAAR, se clasificaron en cuatro categorías (Fig. III.10):

- 0= ausencia de BAAR
- += uno o muy pocos BAAR
- ++= cantidad moderada de BAAR
- +++= cantidad abundante de BAAR.

Figura III.10. Clasificación de las secciones en función de la intensidad de tinción con la técnica de ZN para la detección de BAAR: "+", una o muy pocos BAAR (a), 400x; "++", cantidad moderada de BAAR, (b) 200x; "+++", abundantes BAAR (c), 200x.



III.1.4.2.1.3. Clasificación de lesiones

Las lesiones observadas fueron clasificadas de acuerdo a su morfología, localización y extensión, tomando como referencia las descripciones realizadas por Pérez *et al.* (1996) y González *et al* (2005) de las lesiones asociadas a la infección por *Map*. Estos autores reconocen tres grandes grupos lesionales, cuyas principales características se describen a continuación:

Formas focales: granulomas pequeños y bien delimitados formados por 10-30 macrófagos y alguna célula gigante. Estas lesiones se localizan exclusivamente en el tejido linfoide, tanto en las placas de Peyer como en nódulos linfáticos, y con pocas o ninguna micobacteria. En algunos casos, se puede encontrar algún linfocito entre los macrófagos del granuloma pero no se aprecia necrosis.

Formas Multifocales: además de las lesiones granulomatosas del tejido linfoide, que suelen ser más numerosas que en las formas focales, en este tipo se observan pequeños granulomas en la lamina propia de la mucosa intestinal, formadas por un pequeño número de macrófagos o, en ocasiones, células gigantes aisladas. En este caso las lesiones provocan un cierto engrosamiento de la mucosa intestinal, pero sin modificar significativamente la arquitectura de la misma. La presencia de micobacterias es moderada y como en el caso de las formas focales, se asocian a fases subclínicas.

Formas difusas: aparece un infiltrado granulomatoso grave en la mucosa intestinal, provocando su engrosamiento y alterando la arquitectura histológica normal.

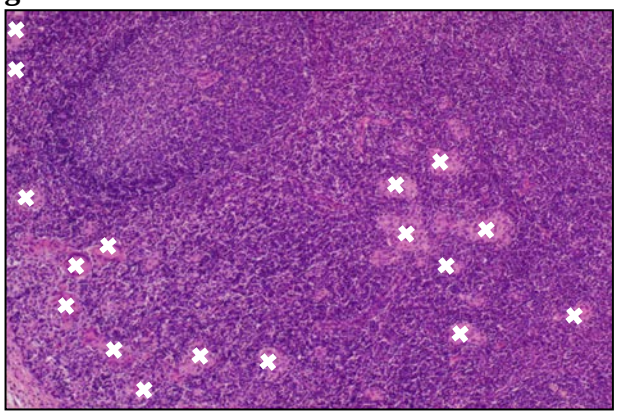
La lámina propia aparece ocupada por un infiltrado granulomatoso que provoca la atrofia y fusión de las vellosidades así como la dilatación de las glándulas intestinales. Además, en estas formas es frecuente la extensión de la lesión a otras capas, tales como la submucosa y la serosa donde además se pueden observar linfangitis y linfangiectasias. Igualmente, los nódulos linfáticos relacionados con el intestino tienden a presentar lesiones graves.

En esta forma se reconocen tres subtipos diferentes de acuerdo con las células predominantes en el infiltrado y la cantidad de BAAR: El *multibacilar*, en el que predominan los macrófagos con grandes cantidades de micobacterias; el *linfocítico* en el que la célula principal son los linfocitos con escasas o ninguna micobacteria; las formas *intermedias* con características de los dos subtipos. Estas formas normalmente se asocian a la presencia de signos clínicos de paratuberculosis.

III.1.4.2.1.4. Recuento de granulomas y valoración del área lesional

Las lesiones se cuantificaron mediante el recuento de los granulomas presentes en cada una de las localizaciones estudiadas (Figura III.11). Éste se realizaba en tres secciones diferentes de cada muestra y el resultado era expresado como la media del número de granulomas en cada localización. En el caso de las muestras de intestino con tejido linfoide (placas de Peyer ileales y yeyunales) el número de granulomas en el tejido linfoide y en la lámina propia se contaba por separado.

Figura III.11. Recuento de lesiones granulomatosas en nódulos linfáticos.



En aquellos casos en que la gravedad y extensión de la lesión impedía la individualización de los granulomas, se realizó una aproximación por la cual se adjudicó un valor de 200 (más elevado que el encontrado en cualquier otro animal con menor grado de lesión) en el nódulo linfático, de 125 en la lesión extensa presente en el tejido linfoide intestinal, y 75 en la mucosa, haciendo referencia a que se trataba de la lesión más extensa encontrada.

En los nódulos linfáticos además se valoró la relación entre el área ocupada por la lesión y el área total del nódulo linfático. Para realizar esta valoración se utilizó un programa analizador de imágenes (analySIS® 3.0, Soft Imaging System, GmbH, Alemania), asociado a un microscopio Nikon Eclipse E600 con una cámara Sony CCD-IRIS incorporada. Los portas con las secciones de nódulos linfáticos teñidas con HE se enfocaban a 20x con el microscopio y se visualizaban en la pantalla del ordenador y mediante el programa de análisis de imágenes se medía el área ocupada por los granulomas. Como el tamaño del nódulo linfático excedía la capacidad de la cámara para poder ser captado, la sección de tejido se dividía en varias porciones (entre 2 y 12), que se fotografiaban mediante una lupa estereoscópica con cámara incorporada (Fig III.12). Posteriormente, en el analizador se llevaba a cabo la medición del área sobre dichas imágenes (Figura III.13) en píxeles.

Figura III. 12. Fotografías de las cuatro divisiones de un nódulo linfático correspondiente a este estudio

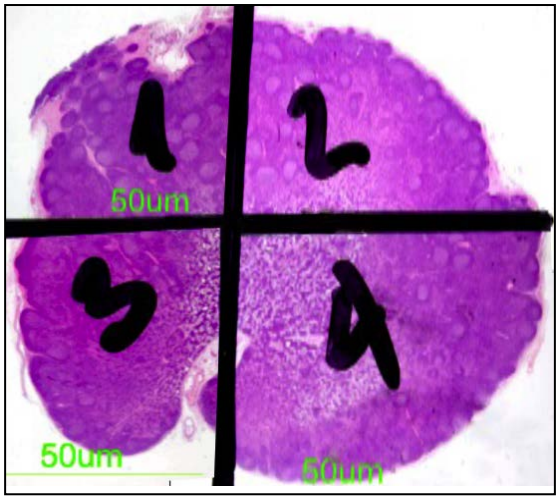
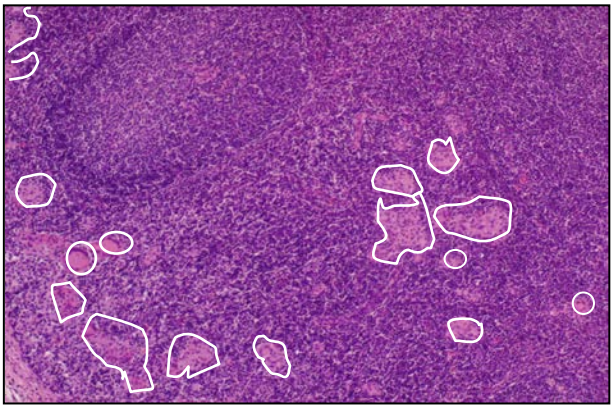


Figura III.13. Medida del área de las lesiones granulomatosas



Las líneas blancas rodean a cada lesión demarcando el área de las mismas

III.1.4.2.1.5. Detección inmunohistoquímica de *Map*

Además de la técnica de ZN, algunas secciones tisulares seleccionadas se inmunotiñeron con un anticuerpo policlonal frente *Map* (Dako, Glostrup, Dinamarca) hecho en conejo, siguiendo el protocolo descrito anteriormente (Pérez *et al.*, 1996; González *et al.*, 2005).

Para llevar a cabo esta técnica, se seleccionaron diferentes secciones de los diferentes tipos de lesión, una vez que estas habían sido clasificadas. Se realizaron cortes seriados de 4 µm, a continuación de los realizados para la HE y ZN en portas tratados con poly-L-Lysina (Sigma-Aldrich, Steinhem, Alemania). Se empleó la técnica del complejo Avidina-Biotina Peroxidasa (ABC-P), usando el kit ABC-Vectastain® Estándar PK 4000 (Laboratorios Vector Burlingame, California, EE. UU.) junto a los reactivos descritos en la tabla III.16.

El protocolo utilizado fue el siguiente:

- Desparafinar e hidratar mediante dos pases de 15 min cada uno en xilol, seguidos de pases de 5 min en los alcoholes de 100º, 100º, 96º y 60º.

- Lavado con agua corriente durante 10 min.

- Inactivar la peroxidasa endógena, utilizando agua oxigenada al 0,3% en metanol, durante 30 min en la oscuridad.

- Realizar dos baños de 5-10 min cada uno en TBS (Tabla III.15).

- Desenmascarar antígenos mediante la inmersión en la solución de tripsina al 0,1%, durante 45 min a 37ºC.

- Realizar dos baños de 5-10 min cada uno en TBS.

- Bloquear las reacciones inespecíficas mediante el empleo de suero de cabra a una dilución 1:10 en TBS durante 30 min.

- Incubar las preparaciones en cámara húmeda durante 12-14 h, a 4ºC, con el anticuerpo primario diluido 1:4000 en TBS, al que previamente se ha añadido 0,1% de albúmina sérica bovina (Sigma® ,España).

- Realizar dos baños de 5-10 min cada uno en TBS.

- Incubar las secciones en cámara húmeda con el antisuero secundario frente a IgG de conejo, biotinilado (Laboratorios Vector, Burlingame, California, EE. UU.) durante 30 min, a una dilución de 1:200 en TBS.

- Realizar baños de 5-10 min cada uno en TBS.

- Incubar las secciones con el complejo Avidina-Biotina Peroxidasa durante 45 min (para prepararlo se mezclan 10 ml de TBS con 100 µl de la solución A, y tras agitación otros 100 µl de la solución B, contenidos ambos en el kit de Vectastain® (Laboratorios Vector, Burlingame California, EE. UU.). Esta solución debe reposar durante 30 min, por lo que se ha de preparar con la suficiente antelación.

- Realizar dos baños de TBS de 5 a 10 min cada uno.

- Revelar la peroxidasa con la diminobenzidina durante 1-4 min.

- Lavar en agua corriente durante 5 min.

- Contrastar con hematoxilina de Harris durante 20-30 s.

- Lavar, deshidratar y montar en DPX (VWR International Ltd, Inglaterra).

Tabla III.16. Reactivos utilizados en la técnica inmunohistoquímica para identificar *Map*

• **TRIS 1M** - TRIS básico: 125 g (Merck, Alemania) - Ácido clorhídrico (ClH): 65 ml - Agua destilada: 800 ml
• **Tampón TBS** o **Solución madre (10 X)** - TRIS 1M: 250 ml - Cloruro Sódico: 80 g - Agua destilada: 750 ml o **Solución de trabajo (1 X)** - Solución madre diluida 1:10 - Ajustar pH entre 7,4 y 7,6
• **Solución de Tripsina al 0,1%** - Tripsina: 0,1 g - Cloruro cálcico: 0,1 g - TBS 1X: 100 ml - Ajustar a pH 7,6 - Preparar 30 min antes de su utilización y mantener a 37ºC
• **Complejo Avidina-Biotina Peroxidasa** (Vectastain® ABC Kit, Vector Labotatories Inc, EE. UU.) - TBS 1 X: 10 ml - Solución A del kit: 100 µl - Solución B del kit: 100 µl
• **Solución de Revelado Diaminobencidina (DAB)** (Peroxidase substrate kit DAB SK-4100®, Vector laboratories Inc., EE. UU.) - Agua destilada: 10 ml - Buffer del kit: 200 µl - DAB del kit: 400 µl - H202 del kit: 200 µl Al añadir cada reactivo se debe agitar el vial con un agitador mecánico

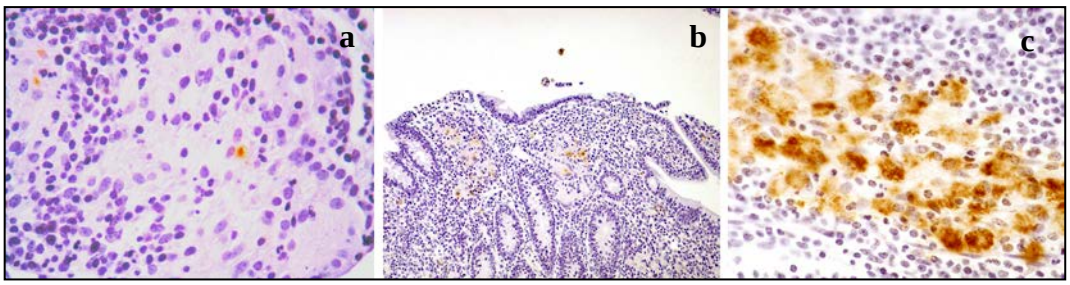
La especificidad de la técnica se controló mediante:

- Omisión del anticuerpo primario y reemplazo de éste por TBS con albúmina sérica bovina.
- Omisión del anticuerpo secundario y reemplazo de éste por TBS.
- Omisión del complejo Avidina-Biotina- Peroxidasa y reemplazo de éste por TBS.
- Omisión de la diaminobenzidina.

Además, en la inmunotinción frente a *Map*, se usó como control positivo una muestra de íleon de una vaca en la que se habían observado BAAR y mediante PCR se había determinado la presencia de *Map*.

Al igual que para la tinción de ZN, la intensidad de inmunotinción en las secciones estudiadas permitió su clasificación en cuatro categorías (Fig. III.14), desde 0 (ausencia de inmunotinción) a +++ (tinción abundante).

Figura III.14. Clasificación de la intensidad de inmunotinción en secciones de tejido teñidas con la técnica inmunohistoquímica para la detección de antígenos de *Map:* "+", inmunotinción escasa (a), 200x; "++", inmunotinción moderada (b), 100x; "+++", inmunotinción intensa (c), 200x.



III.1.4.2.2. Detección de *Map* mediante cultivo de tejidos

Este estudio se llevó a cabo en muestras de placa de Peyer yeyunal distal, íleon distal, válvula ileocecal y nódulos linfáticos yeyunal caudal e ileal, adyacentes a las tomadas para el estudio histológico, que se guardaban en congelación a -20ºC hasta el momento de su utilización.

Los medios de cultivo y el protocolo seguido fueron semejantes a los descritos para las muestras fecales (apartado III.1.4.1.3.1). En el caso de las muestras de tejido, se utilizaron 2 g de cada uno (2g del raspado de la mucosa intestinal para las muestras de placa de Peyer yeyunal distal, íleon distal y válvula ileocecal así como 2 g de nódulo linfático).

III.1.4.2.3. Detección de *Map* mediante PCR de tejidos

La reacción en cadena de la polimerasa se llevó a cabo tanto en tejido fresco, como en tejido incluido en parafina.

III.1.4.2.3.1. PCR de tejidos frescos

Tras la necropsia, se tomaron muestras de placas de Peyer (distal, media y proximal), íleon distal, válvula ileocecal y de los nódulos linfáticos yeyunal caudal, e ileal. Para la extracción y purificación de la micobacteria se empleó el método descrito por Challans *et al.* (1994), con ligeras modificaciones:

III.1.4.2.3.1.1. Extracción de la micobacteria

En el caso de intestino:

- Abrir por su unión al mesenterio y raspar mucosa en una placa de Petri estéril con una cuchilla de bisturí,

En los nódulos linfáticos:

- Trocear lo más posible con tijeras
- Pesar 1 g en ambos casos, en campana de flujo laminar.
- Añadir 5 ml de agua destilada estéril y transferir a una bolsa de Stomacher.
- Homogeneizar en el digestor Stomacher 80 (Laboratorios Blender, Seward Medical Limited, Londres, Reino Unido).
- Transferir el líquido a un tubo de polipropileno de 10 ml y añadir 5 ml de Na0H (Panreac, España) al 0,5% (peso/volumen).

- Incubar en baño maría a 56ºC durante 30 min.

- Transportar el tubo a la campana de nuevo y añadir 1 ml de xilol (VWR Internacional Eurolab S.L. Barcelona, España) y mezclar por agitación intensivamente durante 3-4 min.

- Dejar reposar los tubos al menos durante 30 min para permitir separar la fase acuosa de la orgánica, donde se situarían las micobacterias.

- Transcurrido el tiempo, recoger con micropipeta la fase orgánica, de aproximadamente 1 ml y de color blanquecino y transferirla a un vial de 1,5 ml.

III.1.4.2.3.1.2. Purificación de las micobacterias

El protocolo utilizado para purificar las micobacterias fue el siguiente:

- Centrifugar el vial a 11600g durante 10 min, tras lo cual aparecen tres capas.

- Retirar las dos capas superiores con micropipeta, dejando el sedimento.

- Resuspender el sedimento en 500 µl de NaOH 0,2 M con el agitador mecánico el tiempo necesario hasta el homogeneizado completo.

-Centrifugar con las mismas condiciones durante 5 min, tras lo que vuelven a aparecer tres fases.

- Desechar el sobrenadante y repetir los pasos anteriores

- Resuspender finalmente en 200 µl de NaOH 0,2 M.

- Conservar en refrigeración a 4ºC.

III.1.4.2.3.1.3. Lisis y extracción del ADN micobacteriano

Para la lisis y extracción del ADN micobacteriano, se siguió el mismo protocolo que el descrito para las muestras fecales (apartado III.1.4.1.3.2.2).

III.1.4.2.3.1.4. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Se llevó a cabo siguiendo el mismo método descrito para muestras fecales usando como cebadores otros oligonucleótidos específicos de la secuencia IS*900* de 217

pares de bases utilizados por Collins *et al.* (1993) y el protocolo descrito en el apartado III.1.4.1.4.2.

III.1.4.2.3.2. PCR de tejidos incluidos en parafina

Las mismas muestras de intestino y nódulos linfáticos asociados que se tomaron en la necropsia de los terneros para el estudio histopatológico, fueron las empleadas para su estudio mediante PCR según la técnica seguida por Miller *et al*., 1999.

III.1.4.2.3.2.1. Lisis y extracción del ADN micobacteriano

De los tejidos incluidos en parafina se cortaban, en condiciones de esterilidad, dos secciones de 6 µm que se colocaban en un vial de 1,5 ml estéril tras lo que se procedía a:

-Centrifugar los viales a 4000g durante 5 min para compactar la parafina.

- Añadir 200 µl de Tween 20 (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania) al 0,5% y exponer a tres ciclos de congelación-hervido, iguales a los descritos en la lisis y extracción de ADN micobacteriano de muestras fecales.

- Centrifugar las muestras a 3000g durante 20 min. Tras la centrifugación se obtenían tres capas: en la inferior el sedimento, en la intermedia una fase acuosa y en la superior un anillo de parafina.

- Recoger la fase acuosa perforando el anillo de parafina delicadamente y transferir el mismo a un vial.

- Conservar en refrigeración hasta su amplificación.

III.1.4.2.3.2.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

El protocolo, cebadores y programa seguidos en el caso de las muestras de tejido incluido en parafina fueron idénticos a los descritos para las muestras de tejido fresco.

III.1.4.2.4. Valoración de la producción de IFN-γ por linfocitos tisulares.

Esta prueba se llevó a cabo mediante la incubación de dos tipos de muestras: linfocitos extraídos y purificados a partir de órganos linfoides, y la incubación directa de fragmentos de órganos, según las condiciones descritas a continuación.

III.1.4.2.4.1. Extracción y purificación de linfocitos de los órganos

En la necropsia de los 12 terneros sacrificados a los 330 dpv, se tomaban muestras de nódulo linfático ileal, placa de Peyer ileal, placa de Peyer yeyunal y nódulo linfático preescapular en medio de trabajo a base de RPMI-1640, suplementado con penicilina-estreptomicina y suero fetal bovino (tabla III.17) e inmediatamente se procedía a realizar los siguientes pasos:

- Limpiar los órganos lo mejor posible, retirando los posibles restos de grasa y reservando un pedazo de cada órgano de aproximadamente 0,5 cm^2.

- Triturar los nódulos linfáticos con tijeras y raspar la mucosa con una hoja de bisturí (Paramount Surgiment Ltd., India) en el caso de las placas de Peyer, en una placa de Petri de 9 cm de diámetro (Deltalab, España), hasta obtener un macerado fino.

- Añadir 5 ml del medio de trabajo a la placa de Petri, e introducir la mezcla de cada órgano en una bolsa de plástico para Stomacher.

- Homogenerizar con el Stomacher durante 2 minutos y medio a máxima velocidad.

- Transferir el homogeneizado obtenido a un tubo cónico de 50 ml (Eurotubo®, Deltalab, España) haciéndolo pasar en la boca del mismo por lana de vídrio (Merck, EE. UU.) para filtrar los restos de tejido y mucosa.

- Completar hasta 50 ml con el medio de trabajo.

- Centrifugar a 2200 rpm durante 10 min a temperatura ambiente.

- Retirar el sobrenadante y añadir 7 ml del medio de trabajo y resuspender con una pipeta Pasteur (Eurotubo®, Deltalab, España).

- Transferir la mezcla a un tubo cónico de 15 ml (Eurotubo®, Deltalab, España) cuidadosamente (dejando resbalar por la pared del mismo), sobre 7 ml de Lymphoprep® (Nicomed-Pharma AS, Noruega), que se añadían previamente.

- Centrifugar a 4100 rpm durante 30 min a 4ºC.

- Extraer el halo de linfocitos que queda entre el Lymphoprep® y el medio de cultivo con una pipeta Pasteur y trasferir a un tubo cónico de 15 ml.

- Rellenar el tubo hasta un total de 15 ml con el medio de trabajo.

- Centrifugar 5 min a 2100 rpm a temperatura ambiente.

- Tirar el sobrenadante y añadir 10 ml del medio de trabajo.

- Resuspender y tomar 2 ml de la suspensión de linfocitos.

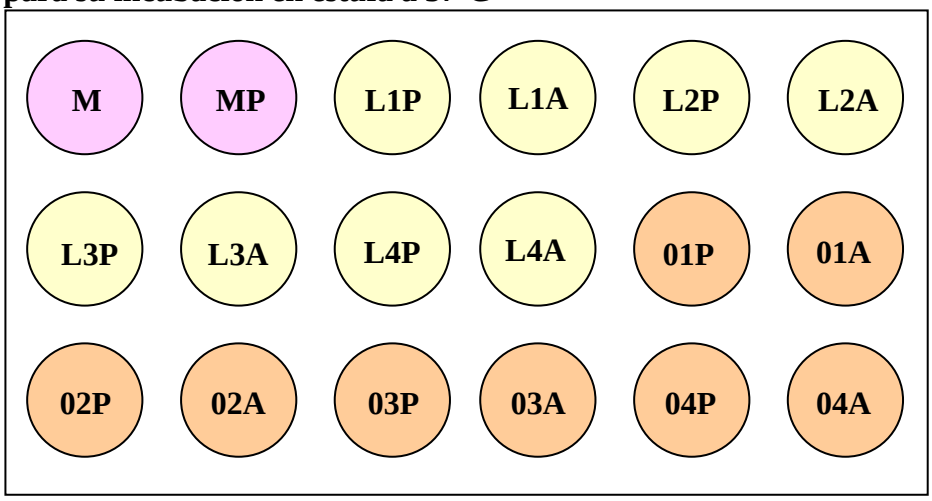
Tabla III.17. Reactivos empleados para la elaboración del medio de trabajo

• **RPMI-1640 con glutamina-L** (Gibco, Invitrogen Corporation , EE. UU.): 600 ml
• **Penicilina (10.000UI)/Estreptomicina (10 mg)** (Seback-FontLab, Alemania): 600 µl
• **Suero fetal bovino inactivado (56ºC-30 minutos)** (Seback-FontLab, Alemania): 12 ml

III.1.4.2.4.2. Incubación de linfocitos y órganos

Los linfocitos y los pedazos de órganos reservados se incubaban en una placa de cultivo celular (Nunc™, Dinamarca) según la figura III.15, durante 24 horas a 37ºC en una estufa con 5% de CO_2, con medio de cultivo, tras lo que se tomaba éste en viales de 1,5 ml que eran centrifugados a 13.000 rpm durante 10 min. Se recogía el sobrenadante y se guardaba en viales de 1,5 ml a -20ºC hasta su utilización para medir la secreción de IFN-γ.

Figura III.15. Esquema de la disposición de linfocitos y órganos para su incubación en estufa a 37ºC



M: 0,5 ml de medio de trabajo; L: 1 ml de linfocitos suspendidos en medio de cultivo; O; porción de órgano de 0,5cm^2; 1-4: órganos, donde 1 es nódulo linfático ileal, 2 es placa de Peyer ileal, 3 es placa de Peyer yeyunal y 4 es nódulo linfático preescapular; P: 100 µl de PBS del Kit Bovigam^{TM} Bovine (Prionics Ag, Suiza). A: 30µg de PPA aviar (CZ Veterinaria, España) diluida en 60 µl de PBS.

III.1.4.2.4.3. Valoración de la producción de IFN-γ

La producción de IFN-γ por los linfocitos se cuantificó mediante un ELISA de captura utilizando el kit comercial "BOVIGAM™ Bovine γ Interferon Test Kit" (Prionics AG, Suiza) que utiliza un anticuerpo monoclonal frente a dicha citoquina bovina.

La realización de este test se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante tal y como se ha descrito en el apartado III.1.5.1.2.2.2.

III.2. MATERIAL ÓPTICO, FOTOGRÁFICO E INFORMÁTICO

Para el estudio de lassecciones histológicas se empleó un microscopio Leitz Diaplan® con óptica PL Fluotar con cabezal múltiple de discusión, alternando entre los distintos objetivos 4X, 10X, 25X, 40X y 63X según el caso.

La cuantificación de micobacterias para la preparación del inóculo (apartado III.1.2.2.1.) se realizó en un microscopio Leitz Laborlux 11 con objetivo de 100X y aceite de inmersión.

Las microfotografías fueron obtenidas en un microscopio Olympus Provis Ax70 (Tokio, Japón) con una cámara digital Nikon Digital Camera DMX 1200

Para la realización de fotografías macroscópicas se empleó una cámara Nikon D-100.

Los programas informáticos empleados para la realización de este estudio fueron el MS Word, el MS Excel como hoja de cálculo y para la obtención de gráficos, así como el MS PowerPoint, todos incluidos en el paquete Microsoft Office XP de Windows XP.

III.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos obtenidos fueron sometidos a pruebas de contrastación de hipótesis mediante análisis de varianza, comparación de medias y frecuencias. Los datos cuantitativos obtenidos mediante de las técnicas de ELISA indirecto, producción de IFN-γ y recuento del número de granulomas fueron sometidos a una transformación logarítmica de base e para ajustar los datos a una distribución normal. Las comparaciones de medias se hicieron mediante la prueba de la t de Student para las

medias ajustadas. Dado que los datos del área lesionada en los nódulos linfáticos se obtuvieron como porcentajes que no siguen una distribución normal, que es la condición para aplicar las pruebas paramétricas de análisis de varianza clásica, estos fueron sometidos a una transformación del tipo arco seno raíz cuadrada de la proporción (Steel y Torrie, 1980). Los datos de tipo frecuencia, como los obtenidos en las pruebas de detección de *Map* o en la IDGA se analizaron mediante la prueba de comparación de frecuencias Chi-cuadrado.

En todos los casos se consideró como límite de significación estadística una probabilidad del 95%. La entrada de datos se realizó mediante una hoja de cálculo Excel en la que se ordenaban y depuraban los datos brutos. Estos se extraían en formato texto y se transferían al procedimiento DATA del paquete estadístico SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC, EE. UU., Versión 9.1). Las pruebas de inferencia estadística se realizaron con los procedimientos GLM (variables dependientes con datos cuantitativos log-normales) y FREQ (variables dependientes con datos cualitativos) de dicho paquete estadístico.

Los modelos que se ensayaron tuvieron en consideración las variables independientes "*tratamiento*" (VI, NVI, VNI, NVNI), "*fecha de sacrificio*" y "*fecha de muestreo*", así como todas sus posibles combinaciones, en el caso del análisis de los datos obtenidos mediante las pruebas de ELISA y del test de IFN-γ. Además, para el análisis de la detección de *Map* en tejidos, así como para el recuento de granulomas, y área ocupada por los mismos, también se tuvieron en cuenta las variables "*localización*" y "*presencia de tejido linfoide*". Así mismo, para el estudio estadístico de los resultados de la secreción *in vitro* de IFN-γ también se consideró la variable "linfocitos/tejido"

Por otro lado, se llevó a cabo un análisis del grado de concordancia entre las diferentes pruebas de detección de *Map* realizadas tanto en tejido fresco (cultivo bacteriológico y PCR) como a partir de tejido incluido en parafina (PCR) con las pruebas inmunológicas o los diferentes tipos lesionales. Para ello, se calculó el índice kappa (k) de concordancia entre pruebas mediante el programa informático Win Episcope Ver. 2.0 (http://www.clive.ed.ac.uk/cliveCatalogueItem.asp?id=B6BC9009-C10F-4393-A22D-48F436516AC4),

con un nivel de confianza del 95% (Smith, 1995; Thrusfield *et al*., 2001). Esta variable estadística kappa puede oscilar entre -1 y +1, donde +1 indica concordancia total, -1 equivale a la discordancia total, mientras que 0 indica que la posible concordancia observada es debida exclusivamente al azar. Por convención, los valores comprendidos entre 0 y 0,2 indican una concordancia débil; aquellos entre 0,2 y 0,4 se interpretan como concordancia escasa; entre 0,4 y 0,6 concordancia moderada; entre 0,6 y 0,8 concordancia significativa, y finalmente valores de k entre 0,8 y 1 sugieren una concordancia casi perfecta (Smith, 1995).

IV.RESULTADOS

IV.1.ESTUDIOS "IN VIVO"

En este apartado se van a exponer los resultados obtenidos en el seguimiento clínico y en la valoración de la respuesta inmunitaria periférica. Los resultados obtenidos en la detección de *Map* o su ADN en heces o suero, a pesar de ser estudios llevados a cabo en el animal vivo, se incluyen dentro del capítulo de estudios bacteriológicos (apartado IV2.2).

IV.1.1. Seguimiento clínico

No se apreciaron signos clínicos evidentes durante el periodo de realización del estudio que pudieran estar relacionados bien con reacciones anafilácticas tras la inoculación de la vacuna o con cualquier otro proceso patológico. Únicamente en algún animal se observó que las heces eran más pastosas de lo normal, sin que esta situación durara más de uno o dos días, resolviéndose por sí sola.

Uno de los terneros (7461, grupo VI) murió de forma repentina antes de la finalización del periodo experimental, a los 250 dpv. No había mostrado signos clínicos hasta la hora anterior a la muerte, cuando se observó una ligera apatía. Se le practicó la necropsia y se comprobó que la muerte fue debida al shock endotóxico y septicémico asociado a una peritonitis aguda causada por una úlcera y perforación del abomaso con el consiguiente paso de contenido gástrico a la cavidad abdominal.

Tras el desafío con *Map*, no se observaron signos compatibles con paratuberculosis en ninguno de los animales hasta el momento de su sacrificio.

IV.1.2. Valoración de la temperatura corporal

Se comprobó que la vacunación no inducía incrementos sobre el rango de temperatura considerado normal en terneros (39,0-40,5ºC), excepto en algún caso aislado que presentaba algunas décimas por encima de este valor, sin que esos

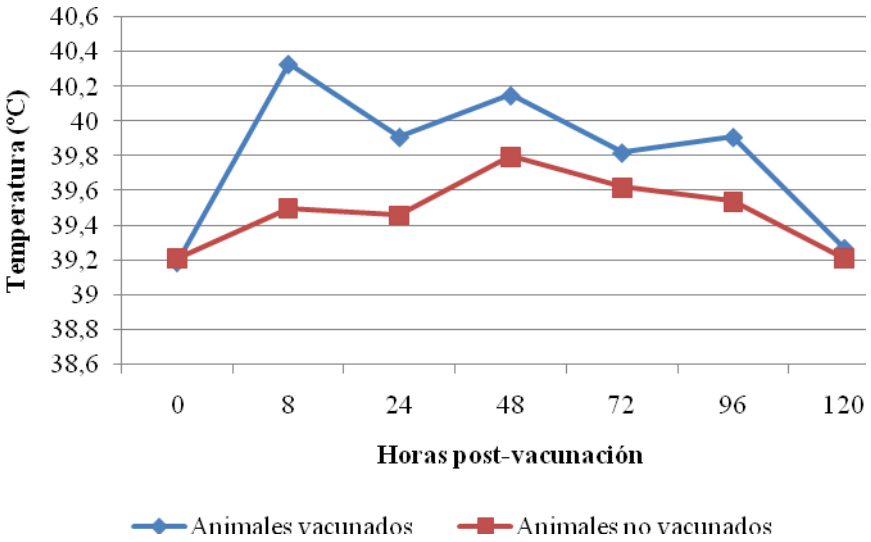
incrementos fueran estadísticamente significativos (Tabla IV.1 y Gráfica IV.1). Las diferencias de temperatura media entre el grupo vacunado y no vacunado (Gráfica IV.1) no fueron significativas en ningún momento.

Tabla IV.1. Valoración de la temperatura corporal

Animal	0 hpv	8 hpv	24 hpv	48 hpv.	72 hpv	96 hpv	120 hpv
Animales vacunados							
3301	39,00	40,30	39,00	39,10	39,10	39,90	39,30
3303	39,20	41,00	40,90	40,40	40,20	40,20	38,80
5931	39,20	40,80	39,90	39,80	39,40	39,40	39,00
5953	39,80	40,30	39,70	40,40	39,90	40,20	39,80
5954	38,90	39,10	39,30	40,50	39,50	39,20	39,20
7461	39,30	41,00	40,10	41,20	40,60	39,10	38,90
7930	38,90	40,80	40,30	40,90	39,50	39,50	39,50
9106	39,50	40,20	40,50	40,20	40,30	39,40	39,50
9108	39,20	40,40	39,80	39,50	39,80	39,90	39,40
9109	38,90	39,40	39,60	39,50	40,10	39,90	39,30
Media	**39,19**	**40,33**	**39,91**	**40,15**	**39,82**	**39,91**	**39,27**
Animales no vacunados							
3300	39,20	39,20	39,90	40,30	40,00	39,60	39,10
3302	39,00	38,90	38,80	39,10	39,40	39,40	38,90
5932	39,20	38,90	38,80	39,80	39,60	39,60	39,20
5933	39,30	40,60	40,30	39,80	39,10	39,60	39,40
5956	39,30	38,90	38,90	40,10	39,20	39,00	38,80
7460	39,00	39,80	39,20	40,20	41,40	40,20	39,50
7931	39,60	40,00	40,00	40,90	39,40	39,60	39,20
9107	39,00	39,80	39,40	39,00	39,30	39,50	39,20
Media	**39,21**	**39,50**	**39,46**	**39,80**	**39,62**	**39,54**	**39,21**

Valores expresados en ºC de las mediciones de la temperatura a las 0, 8, 24, 48, 72, 96 y 120 horas post vacunación (hpv).

Gráfica IV.1. Evolución de la temperatura en las primeras 120 horas post-vacunación



IV.1.3.Valoración del nódulo vacunal

Todos los animales vacunados mostraron un nódulo subcutáneo en el lugar de inoculación de la vacuna que no afectó al estado general del animal. La gráfica IV.2 muestra la evolución del tamaño del nódulo vacunal, expresado como la media del grupo, del máximo valor en cm alcanzado en cualquiera de las tres dimensiones medidas. El nódulo vacunal fue apreciable ya en la inspección realizada a los 15 días de haber inoculado el producto vacunal, con diferencias significativas ($p<0,05$) respecto al día del inicio del experimento que se mantuvieron hasta el final. El valor máximo (5,5-6,5 cm) se alcanzó entre los días 150 y 240 post-vacunación (Tabla IV.2 y Gráfica IV.2) y posteriormente fue disminuyendo. No se observaron diferencias significativas entre ambos grupos de animales vacunados (VI, VNI) en los diferentes momentos post-vacunación sin que, por lo tanto, la infección oral por *Map* influyera sobre el tamaño del nódulo.

Tabla IV.2. Valoración del tamaño del nódulo vacunal (continúa)

Animal	0*	15*	30*	45*	60*	90*	105*	120*
Animales vacunados e infectados								
3301	0	4	5	6	6	6	6	5
3303	0	3	3	4	5	5	5	6
5931	0	3	3	3	3	3	4	4
5953	0	3	3	6	5	5	5	5
7461	0	3	3	5	6	6	6	6
7930	0	3	3	3	4	4	4	4
9108	0	4	4	3	3	3	3	3
9109	0	3	3	3	4	4	4	3
Media	**0**	**3,25**	**3,38**	**4,13**	**4,50**	**4,50**	**4,63**	**4,50**
Animales vacunados no infectados								
5954	0	3	4	4	4	4	5	6
9106	0	3	3	3	3	3	3	5
Media	**0**	**3**	**3,50**	**3,50**	**3,50**	**3,50**	**4**	**5,50**

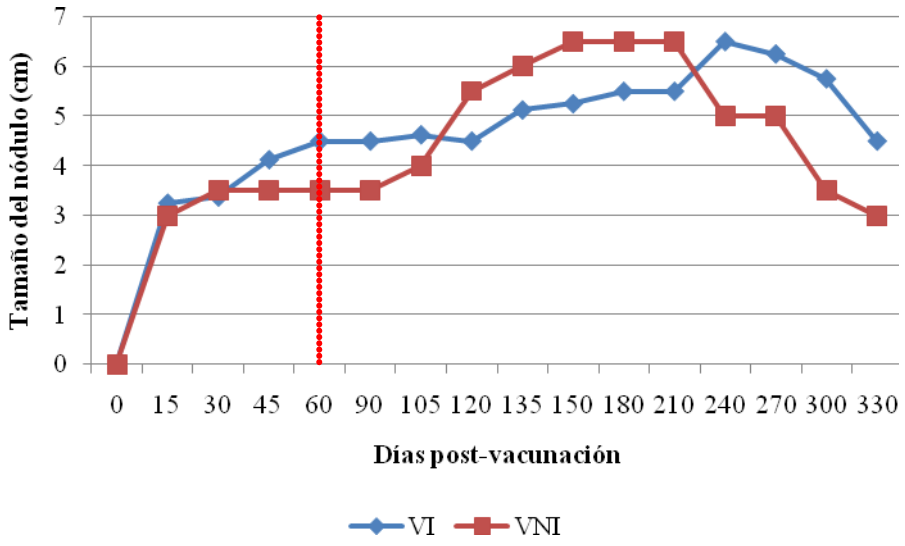
Valores expresados en cm de la mayor dimensión del nódulo vacunal en los diferentes muestreos
*: días post-vacunación.

Tabla IV.2. Valoración del tamaño del nódulo vacunal (continuación)

Animal	135*	150*	180*	210*	240*	270*	300*	330*
Animales vacunados e infectados								
3301	7	7	7	sd	12	12	8	8
3303	7	5	6					
5931	4	4	4	6	sd	4	3	2
5953	5	6	6					
7461	6	7	8	sd	6			
7930	4	4	5	sd	3	4	4	4
9108	4	4	3					
9109	4	5	5	5	5	5	8	4
Media	**5,13**	**5,25**	**5,50**	**5,50**	**6,50**	**6,25**	**5,75**	**4,50**
Animales vacunados no infectados								
5954	6	7	7	8	6	6	7	6
9106	6	6	6	5	4	4	0	0
Media	**6**	**6,50**	**6,50**	**6,50**	**5**	**5**	**3,50**	**3**

Valores expresados en cm de la mayor dimensión del nódulo vacunal en los diferentes muestreos.
*: días post-vacunación. sd.: sin dato.

Gráfica IV.2: Evolución del tamaño del nódulo vacunal en los animales vacunados.



El tamaño del nódulo vacunal fue medido al tiempo indicado post-vacunación (dpv), en el que se tuvo en cuenta el máximo valor alcanzado en cm en cualquiera de las tres dimensiones. •••••• : Momento de la infección

En cuanto al aspecto macro y microscópico del nódulo, no se observaron diferencias entre animales. En todos los casos se trataba de nódulos duros, fríos, bien delimitados y sin adherencias, con una superficie lisa. La forma que presentaban a la palpación era oval, esférica o semi-esférica. En ninguno de los diez animales vacunados se observó ulceración ni ninguna otra alteración en la zona del nódulo. En la necropsia, tras la escisión y sección de los nódulos, se observaba que presentaban un aspecto fibroso homogéneo con focos de necrosis en número variable (entre 2-10), de distinto tamaño y color blanco-amarillento (Figura IV.1).

Figura IV.1. Estudio macroscópico del nódulo vacunal.. Nódulo vacunal de forma oval de aspecto fibroso, con varios focos de necrosis caseosa bien delimitados y distribuidos de forma irregular por la superficie de corte

La valoración histológica de los nódulos vacunales reveló que estaban formados principalmente por varios focos de necrosis caseosa que llegaban a confluir, rodeados de una intensa reacción inflamatoria de tipo granulomatoso (Figura. IV.2). En ellos, se observaban abundantes neutrófilos, muchos de ellos degenerados, asociados a la necrosis. En la mayoría de ocasiones se observaban focos de calcificación distrófica en la zona necrótica. También era frecuente encontrar, en el centro de los granulomas, restos del producto vacunal. Tanto los focos de necrosis como los restos de la vacuna aparecían rodeados por una reacción granulomatosa intensa, formada por macrófagos y células gigantes con abundantes linfocitos, todo ello delimitado por una intensa reacción fibrosa (Figura. IV.3). Cuando aparecían restos del producto vacunal, éste se observaba como gotas oleosas conteniendo abundantes BAAR (Figura. IV.4). La imagen histológica de los nódulos vacunales de los terneros sacrificados a los 180 o 330 dpv era similar, diferenciándose únicamente en que la capa fibrosa que demarcaba los granulomas era más evidente en los nódulos de los animales eutanasiados a los 330 dpv.

Figura IV.2. **Estudio histológico del nódulo vacunal.**
Focos de necrosis caseosa, rodeados de una intensa reacción inflamatoria de tipo granulomatoso, demarcados por una cápsula fibrosa. H-E. 40x.

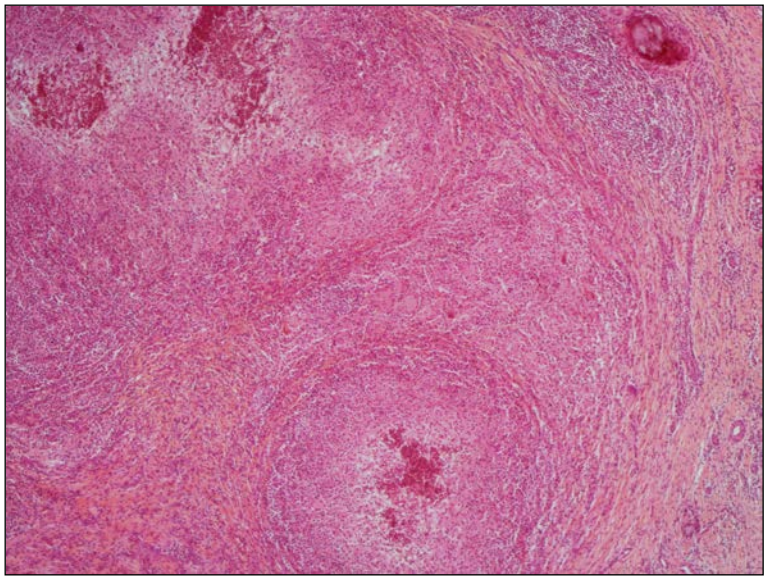


Figura IV.3. **Estudio histológico del nódulo vacunal**.
Zona de necrosis conteniendo abundantes neutrófilos (parte izquierda de la figura) y áreas de calcificación distrófica (flechas), rodeadas de un infiltrado inflamatorio granulomatoso, con células gigantes. HE. 100x.

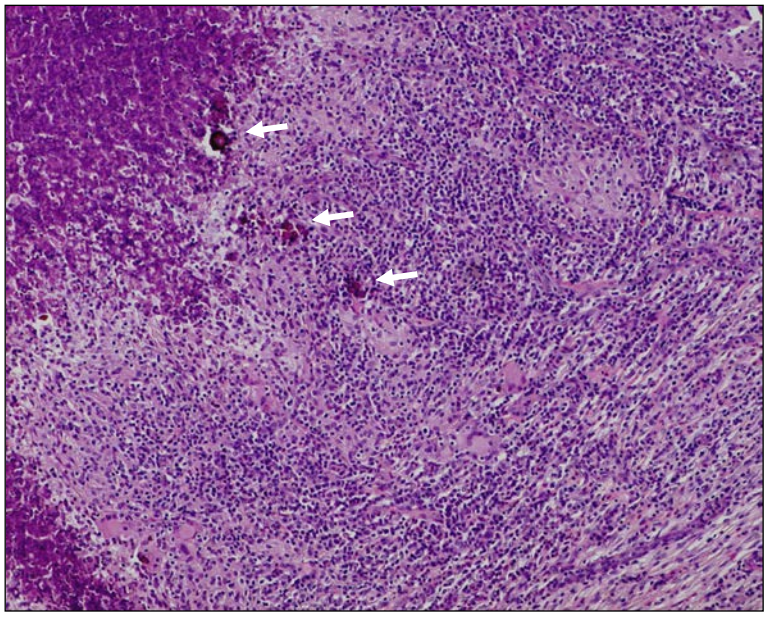
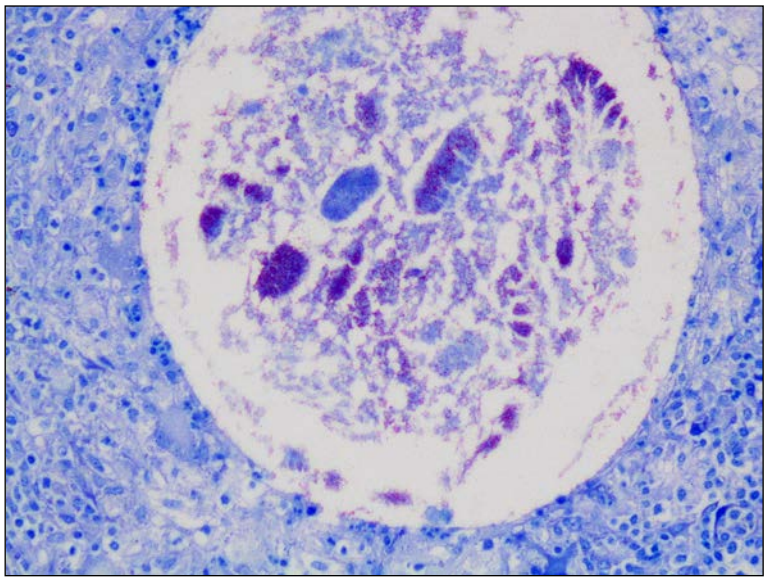


Figura IV.4. **Estudio histológico del nódulo vacunal**.
Restos del producto vacunal, en el centro de la imagen, que aparece como gotas oleosas conteniendo abundatnes BAAR, rodeados de una reacción inflamatoria granulomatosa. Ziehl-Neelsen. 200x.



IV.1.4. Estudio de la respuesta inmunitaria periférica

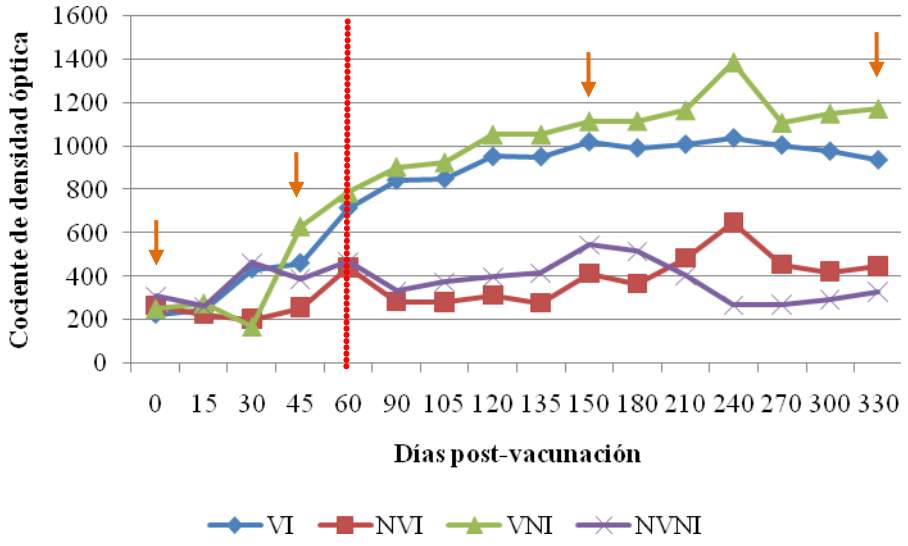
IV.1.4.1. Respuesta inmunitaria humoral

IV.1.4.1.1. ELISA indirecto

IV.1.4.1.1.1. ELISA indirecto frente a paratuberculosis

En la tabla IX.1 (Anexo) se detallan los resultados individuales para el ELISA indirecto frente a paratuberculosis obtenidos en los diferentes momentos del experimento. Dichos resultados se representan como el valor medio en cada grupo y muestreo en la gráfica IV.3. Igualmente, en la Gráfica IV. 6 se muestran los resultados de la relación de la respuesta inmunitaria valorada mediante las técnicas de ELISA e IDGA, en los diferentes grupos a lo largo de toda la infección experimental.

Gráfica IV.3: Evolución de la producción de anticuerpos a lo largo del experimento medidos mediante el test ELISA indirecto frente a paratuberculosis.



La tasa de anticuerpos se expresa como la media aritmética del índice de DO (densidad óptica) de cada animal (cociente de densidad óptica) en los distintos grupos experimentales. VI: vacunado e infectado, NVI: no vacunado e infectado; VNI: vacunado y no infectado; NVNI: no vacunado y no infectado). ••••• : Momento de la infección. Las flechas naranjas indican el momento en el que se realizó la prueba de la intradermorreacción (IDR).

Se observó que los grupos de animales **vacunados** mostraban una tasa de anticuerpos séricos superior a la de los no vacunados (Gráfica IV.3, Tabla IX.1 de Anexos). Además, en ambos lotes de animales vacunados (VI, VNI), a partir de los 90 dpv, se obtuvieron valores por encima del índice que se considera positivo para el diagnóstico de esta enfermedad (ELISA ≥ 800). Tanto los terneros del grupo **VI** como del **VNI**, produjeron una cantidad significativamente mayor de anticuerpos que los grupos no vacunados a partir de los 60 dpv ($p<0,05$), incrementándose las diferencias ($p<0,001$) a partir del día 90 post-vacunación y hasta el final del estudio. Entre ambos grupos de animales vacunados (VI, VNI) no se observaron diferencias significativas en la producción de anticuerpos en ningún momento del estudio.

En cuanto a la evolución de la producción de anticuerpos a lo largo del tiempo, se observó que fue a los 240 dpv cuando se alcanzaron los valores más elevados en ambos grupos (Gráfica IV.3; Tabla IV.3). Se observaron diferencias significativas entre la producción de anticuerpos a los 240 dpv con la de los muestreos realizados desde el inicio del estudio hasta los 45 dpv ($p<0,001$) o hasta los 135 dpv ($p<0,05$). Posteriormente, las diferencias no fueron significativas entre muestreos hasta el final del experimento.

El grupo de terneros **no vacunados** e infectados (**NVI**) presentó valores de anticuerpos significativamente más altos ($p<0,05$) que los controles no infectados (**NVNI**) a los 210 dpv, permaneciendo más elevados hasta el final del experimento, pero sin llegar a alcanzar en ningún momento valores considerados como positivos en el diagnóstico serológico habitual de paratuberculosis en la infección natural, como se muestra en la gráfica IV.3 y en la tabla IX.1 del anexo, si bien el ternero 5956 mostró un resultado positivo en el muestreo de los 240 dpv (Tabla IX.1).

Respecto a los momentos de realización de la prueba de IDR, tras su ejecución no se observaron modificaciones significativas (incrementos o disminuciones) en la producción de anticuerpos frente a paratuberculosis a lo largo del experimento.

Tabla IV.3. Producción de anticuerpos en los diferentes momentos post-vacunación.

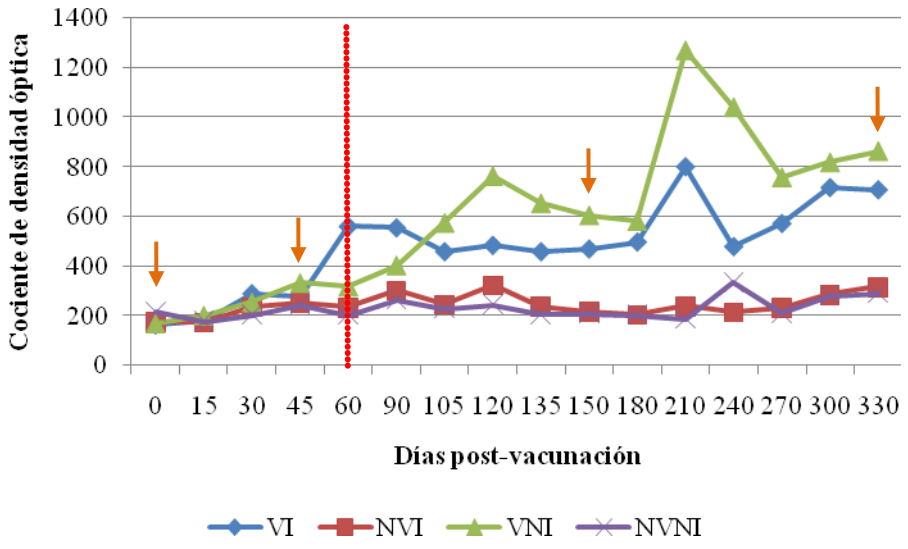
	Prueba	
Días post-vacunación	**ELISA PTB**	**ELISA TB**
0	263,68	180,96
15	255,22	183,03
30	317,48	245,58
45	435,17	276,79
60	604,06	328,75
90	591,49	381,60
105	608,93	377,31
120	679,81	453,98
135	675,43	388,75
150	774,47	375,19
180	749,47	371,99
210	766,71	623,59
240	835,99	517,40
270	710,13	443,44
300	711,75	525,63
330	722,38	544,56

Valores medios del índice de DO (densidad óptica) de todos los animales en los diferentes muestreos. ELISA PTB: prueba ELISA frente a paratuberculosis. ELISA TB: prueba ELISA frente a tuberculosis. El resultado se obtuvo al dividir el valor medio de la DO de cada suero problema entre el valor medio de los controles positivos de cada placa de ELISA

IV.1.4.1.1.2. ELISA indirecto frente a tuberculosis

En la tabla IX.2 (Anexo) se detallan los resultados individuales para el ELISA indirecto frente a tuberculosis obtenidos en los diferentes momentos del experimento. Dichos resultados se representan como el valor medio de cada grupo a lo largo del tiempo en la gráfica IV.4.

Gráfica IV.4: Evolución de la producción de anticuerpos a lo largo del experimento medidos mediante el test ELISA indirecto frente a tuberculosis.



La tasa de anticuerpos se expresa como la media aritmética del índice de DO (densidad óptica) de cada animal (cociente de densidad óptica) en los distintos grupos experimentales. VI: vacunado e infectado; NVI: no vacunado e infectado; VNI: vacunado y no infectado; NVNI: no vacunado y no infectado). ••••• : Momento de la infección. Las flechas naranjas indican el momento en el que se realizó la prueba de la intradermorreacción (IDR).

Como se observa en la gráfica IV.4, los animales de los grupos **vacunados** mostraron niveles mayores de anticuerpos frente a *M. bovis* que los no vacunados. Concretamente, los terneros del grupo **VI** produjeron significativamente mayor cantidad de anticuerpos que los grupos no vacunados a partir de los 60 dpv ($p<0,001$), manteniéndose la diferencia hasta el final del estudio. El grupo **VNI**, formado por dos animales, empezó a mostrar diferencias significativas ($p<0,001$) con los animales no vacunados a los 120 dpv, que se mantuvieron hasta el final del experimento.

Entre ambos grupos vacunados (VI, VNI), también se apreciaron diferencias significativas en la produción de anticuerpos medidos mediante ELISA frente a tuberculosis. El grupo VI produjo mayor cantidad de anticuerpos a los 60 dpv ($p<0,05$) que el grupo VNI. Sin embargo, fueron los animales de este último grupo los que mostraron niveles más elevados a los 120 ($p<0,05$), 210 y 240 ($p<0,001$) dpv.

En cuanto a la evolución a lo largo del experimento de la producción de anticuerpos frente a *M. bovis*, los valores más elevados se obtuvieron a los 210 dpv en

los terneros de los grupos vacunados (Gráfica IV.4). Las diferencias fueron muy significativas ($p<0,001$) entre la producción de anticuerpos a los 210 dpv con la de los muestreos realizados desde el inicio del estudio hasta este momento. A partir de entonces se produjo un descenso hasta el final del estudio.

Entre los animales **no vacunados** (NVI, NVNI), en ningún momento se observaron diferencias significativas en la producción de anticuerpos medidos con esta técnica.

Respecto a los momentos de realización de la prueba de IDR y tras su ejecución no se encontraron modificaciones significativas (incrementos o disminuciones) en la producción de anticuerpos frente a tuberculosis a lo largo del experimento.

Como se puede apreciar en la tabla IV.3, y aunque debe de tenerse en cuenta que se trata de técnicas diferentes, los niveles del índice de densidad óptica fueron siempre inferiores en el ELISA frente a tuberculosis que a paratuberculosis. De forma individual, en escasas ocasiones el índice del ELISA-tuberculosis fue superior en algunos terneros (Tabla IX.2 de anexo).

IV.1.4.1.2. IDGA

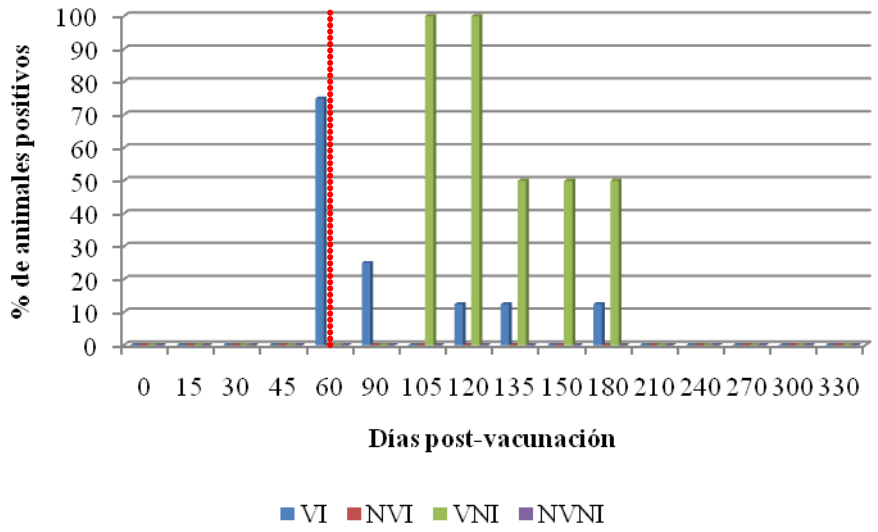
Los resultados obtenidos con esta prueba se muestran en la tabla IV.4 y se representan en la gráfica IV.5. Sólo se observaron reacciones positivas en los animales **vacunados**, tanto infectados como no infectados, que se detectaron únicamente entre los 60 y 180 dpv. La positividad fue inconstante incluso para el mismo animal, variando los resultados de positivo a negativo a lo largo de los muestreos. Es de destacar que en el grupo **VI** seis de los ocho animales fueron ya positivos a los 60 dpv, aunque no se mantuvo después dicho resultado. En el grupo **VNI**, los resultados positivos aparecieron más tardíamente, a los 105 dpv, destacando el ternero 5954 que fue constantemente positivo entre los días 105 y 180 dpv. En cualquier caso, no se apreciaron diferencias significativas entre los dos grupos de terneros vacunados. Todos los terneros **no vacunados**, tanto del grupo **NVI**, como **NVNI** fueron negativos en todos los muestreos.

Tabla IV.4. Resultados del test de inmunodifusión en del de agar en los muestreos con algún animal positivo

	Días post-vacunación						
Animal	60	90	105	120	135	150	180
Animales vacunados e infectados (VI)							
3301	P	P	N	N	N	N	N
3303	P	N	N	N	N	N	N
5931	N	N	N	N	N	N	N
5953	N	N	N	N	N	N	P
7461	P	P	N	P	N	N	N
7930	P	N	N	N	N	N	N
9108	P	N	N	N	N	N	N
9109	P	N	N	N	P	N	N
Animales no vacunados e infectados (NVI)							
3300	N	N	N	N	N	N	N
3302	N	N	N	N	N	N	N
5933	N	N	N	N	N	N	N
5956	N	N	N	N	N	N	N
7460	N	N	N	N	N	N	N
9107	N	N	N	N	N	N	N
Animales vacunados y no infectados (VNI)							
5954	N	N	P	P	P	P	P
9106	N	N	P	P	N	N	N
Animales no vacunados y no infectados (NVNI)							
5932	N	N	N	N	N	N	N
7931	N	N	N	N	N	N	N

(P: Positivo. N: negativo.) .

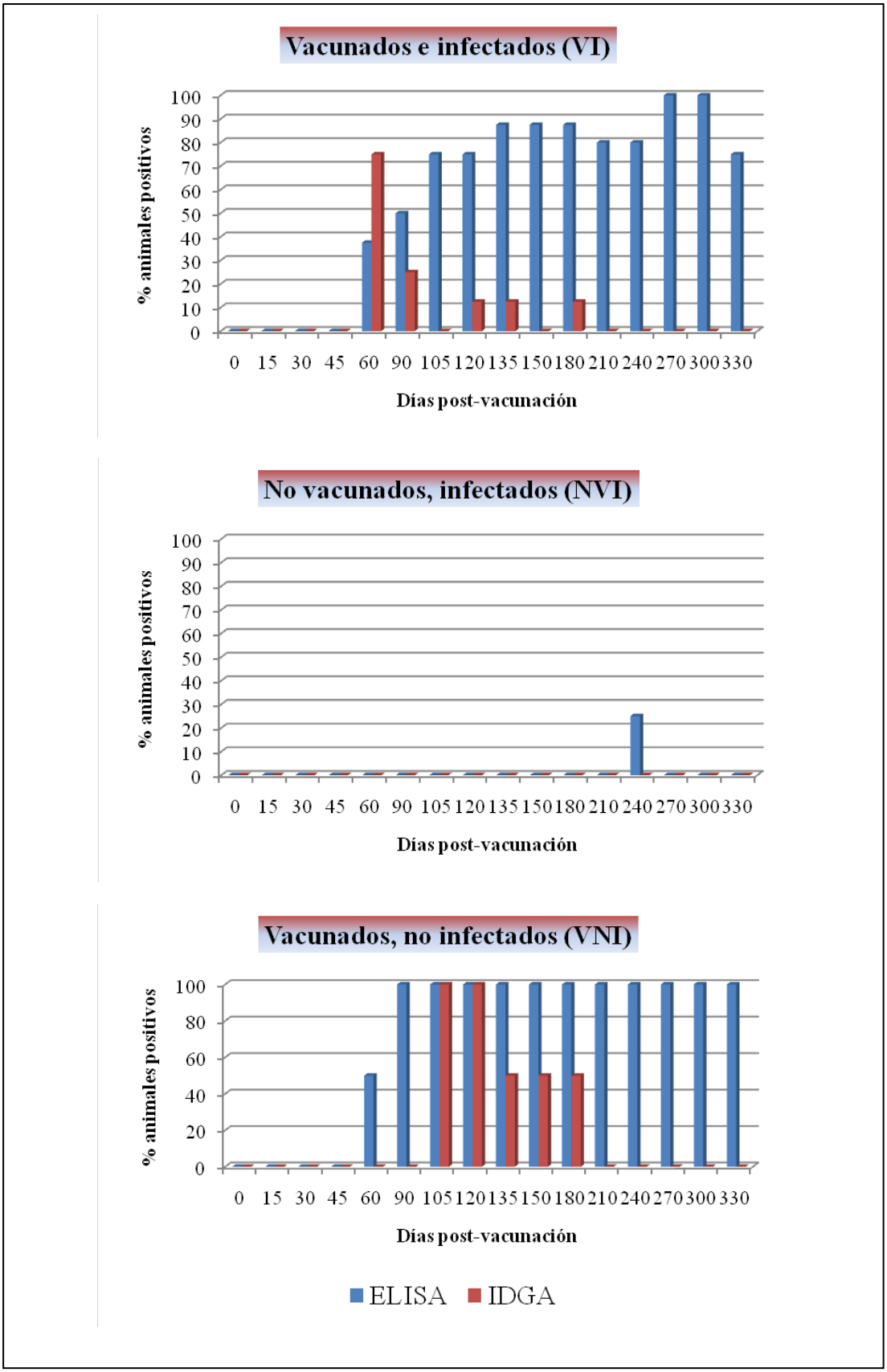
Gráfica IV.5. Porcentaje de animales positivos a la presencia de anticuerpos detectados mediante Inmunodifusión en gel de agar (IDGA).



VI: vacunado e infectado; NVI: no vacunado e infectado; VNI: vacunado y no infectado; NVNI: no vacunado y no infectado. ••••: Momento de la infección.

En la gráfica IV.6 se muestra la comparación entre el porcentaje de terneros positivos a ELISA frente a paratuberculosis y a IDGA. Se observa que el número de animales positivos medidos mediante la IDGA fue mucho menor ($p<0,001$) que en el caso del ELISA, considerando los valores de DO superiores a 800 como positivos. En el grupo NVNI no hubo animales positivos a ninguna de las dos técnicas.

Gráfica IV. 6 Comparación entre los porcentajes de animales positivos a la presencia de anticuerpos frente a *Map* detectados mediante ELISA e IDGA, en los diferentes grupos con algún animal positivo.



IV.1.4.2. Respuesta inmune celular

IV.1.4.2.1. Intradermorreacción (IDR) comparada

En la tabla IV.5 y en la gráfica IV.7 se muestran los resultados del test de IDR comparada tras la inoculación de PPD bovina y aviar a los 0, 45, 150 y 330 dpv.. Al inicio del estudio (0 dpv), ningún animal presentó incremento alguno tras la inoculación de ambas tuberculinas.

A los 45 dpv, todos los animales **vacunados**, tanto del grupo infectado (VI) como del grupo no infectado (VNI) resultaron positivos a la inoculación cutánea de PPD aviar, mostrando incrementos que oscilaban desde 6 mm, en el animal con menor incremento, hasta 23 mm, en el animal dónde este fue mayor (Tabla IV.5). Dichos incrementos fueron significativamente superiores a los de los grupos no vacunados ($p<0,001$). En cuanto a la reacción frente a la PPD bovina, también se obtuvieron resultados positivos aunque no en todos los terneros vacunados, siendo además, en estos casos, la respuesta significativamente menor ($p<0,05$) que la obtenida para la PPD aviar (Gráfica IV.7 y tabla IV.5). Los terneros del grupo VNI mostraron incrementos superiores ($p<0,001$) del grosor cutáneo que los del grupo VI tras la inoculación de la PPD bovina.

En las dos siguientes lecturas (150 y 330 dpv) se observó una disminución progresiva en el incremento de grosor cutáneo en los terneros vacunados inoculados con PPD aviar, si bien el valor medio fue siempre positivo y superior al obtenido con la PPD bovina. A los 150 dpv, un ternero del grupo VI (7461) mostró un resultado negativo a la prueba de IDR frente a la PPD aviar, con 1 mm de incremento de grosor, mientras que en el resto oscilaba entre 2 mm y 24 mm. A pesar de ello, el conjunto de animales del lote **VI** seguían mostrando diferencias significativas con los animales no vacunados ($p<0,001$) en la respuesta a la inoculación con ambas tuberculinas. A los 330 dpv, el incremento del grosor cutáneo tras la inoculación de PPD aviar arrojó valores que se se situaban entre los 3 mm y 13 mm en todos los animales vacunados sometidos a la prueba (Tabla IV.5). En el caso de la PPD bovina, al igual que en los casos anteriores, el incremento de grosor cutáneo fue siempre inferior al obtenido con la PPD aviar.

Tabla IV.5: Resultados de la IDR comparada a los 0, 45, 150 y 330 dpv, después de las 72 horas de inocular la PPD aviar (Aviar) o bovina (Bovina), expresados en mm.

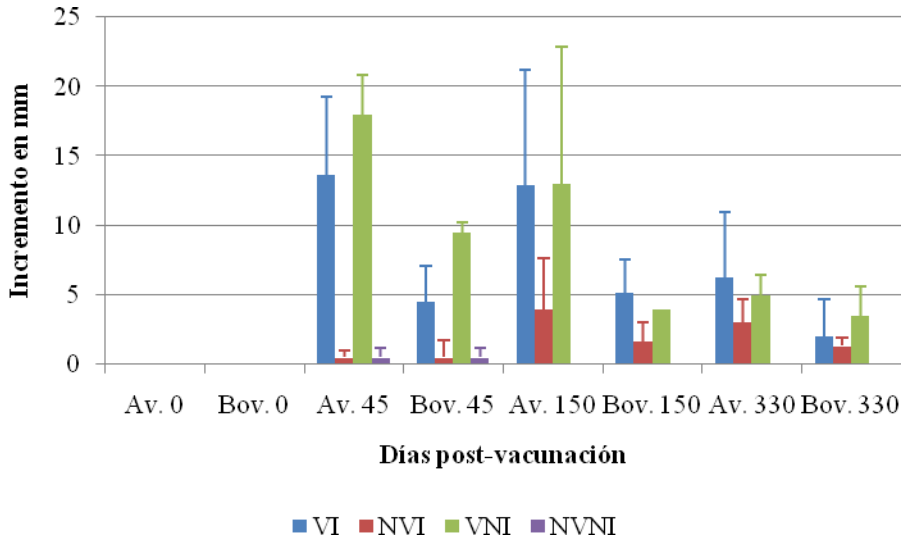
Animal	Días post-vacunación							
	0		45		150		330	
	Aviar	Bovina	Aviar	Bovina	Aviar	Bovina	Aviar	Bovina
Vacunados e infectados (incremento en mm)								
3301	0	0	23	10	23	7	6	6
3303	0	0	14	5	24	8	-	-
5931	0	0	8	3	8	5	3	0
5953	0	0	17	5	19	4	-	-
7461	0	0	18	4	1	0	-	-
7930	0	0	10	3	6	5	13	1
9108	0	0	6	1	11	6	-	-
9109	0	0	13	5	11	6	3	1
Media	**0**	**0**	**13,63**	**4,50**	**12,88**	**5,13**	**6,25**	**2**
No vacunados e infectados (incremento en mm)								
3300	0	0	1	0	3	2	1	1
3302	0	0	0	0	2	1	sd	sd
5933	0	0	0	0	5	2	-	-
5956	0	0	1	0	1	0	4	2
7460	0	0	1	0	11	4	-	-
9107	0	0	0	3	2	1	4	1
Media	**0**	**0**	**0,50**	**0,50**	**4**	**1,67**	**3**	**1,34**
Vacunados y no infectados (incremento en mm)								
5954	0	0	16	9	20	4	6	5
9106	0	0	20	10	6	4	4	2
Media	**0**	**0**	**18**	**9,50**	**13**	**4**	**5**	**3,50**
No vacunados y no infectados (incremento en mm)								
5932	0	0	0	0	0	0	0	0
7931	0	0	1	1	0	0	0	0
Media	**0**	**0**	**0,50**	**0,50**	**0**	**0**	**0**	**0**

sd:sin datos

En cuanto a los animales **no vacunados** (NVI y NVNI), la respuesta a ambas tuberculinas fue negativa a los 45 dpv, cuando aún no se había procedido al desafío, obteniéndose únicamente incrementos de 1 mm en 4 animales, tanto infectados (**NVI**)

como controles (**NVNI**) (Tabla IV.5); no obstante, un animal de grupo NVI (9107) mostró 3 mm de incremento a la inoculación de la tuberculina bovina. Sin embargo, a los 150 dpv (90 dpi) el incremento de grosor cutáneo medio obtenido tras la inoculación de la PPD aviar en el grupo **NVI** ofreció valores considerados como positivos (4 mm), oscilando entre 1 y 11 mm, y siempre significativamente mayores ($p<0,05$) que los obtenidos frente a la PPD bovina. A los 330 dpv (270 dpi), de nuevo se obtuvieron incrementos mayores para la tuberculina aviar que para la bovina, sin que se observaran diferencias con el muestreo anterior. En el grupo **NVNI** no se observaron incrementos para las dos tuberculinas en ninguno de los dos animales (Tabla IV.5).

Gráfica IV.7. Incremento del grosor cutáneo detectado en el test de intradermorreacción (IDR) comparada realizado a los 0, 45, 150 y 330 días post-vacunación.



Av: Incremento del grosor cutáneo tras la inoculación de PPD aviar. Bov: Incremento del grosor cutáneo tras la inoculación de PPD bovina. VI: vacunado e infectado; NVI: no vacunado e infectado; VNI: vacunado, no infectado; NVNI: no vacunado, no infectado. (Barras: desviación típica).

IV.1.4.2.2. Valoración de la producción de IFN-γ

Los resultados de la producción de IFN-γ tras la estimulación de la sangre heparinizada con PPD aviar y PPD bovina se muestran detallados individualmente en las tablas IX.3 y IX.4 (Anexo), respectivamente. Estos resultados se muestran como el valor medio de cada grupo y muestreo, en las gráficas IV.8 y IV.9. Igualmente, la liberación media de IFN-γ tras la estimulación de los linfocitos circulantes con PPD

aviar y bovina por parte de los terneros de los cuatro grupos (VI, NVI, VNI, NVNI) así como su desviación estándar se encuentran reflejados en la tabla IV.6.

Respecto a la producción de IFN-γ por las células sanguíneas tras su estimulación con **PPD aviar**, se observa que los animales de los grupos **vacunados** mostraron un incremento significativo en la producción de esta citoquina respecto al grupo **NVNI** a lo largo de todo el experimento. En los terneros del lote **VI** dicho incremento fue significativamente superior a los 45 dpv ($p<0,05$), alcanzando los mayores niveles a los 120 dpv ($p<0,001$), manteniéndose con diferencias significativamente más altas hasta los 240 dpv ($p<0,05$) respecto a los controles no vacunados, momento a partir del cual disminuyen paulativamente hasta el final del experimento. En el grupo de animales **VNI** las primeras diferencias significativas ($p<0,05$) con el grupo NVNI aparecieron a los 60 dpv, y se mantuvieron hasta los 240 dpv, alcanzando su máximo nivel a los 135 dpv.

En ambos grupos vacunados (VI y VNI) los niveles de IFN-γ se mantuvieron elevados hasta el final del experimento, con valores máximos entre los 120 y 180 dpv (Tabla IV.6 y gráfica IV.8), descendiendo a partir de entonces. Entre ambos grupos hubo diferencias significativas ($p<0,001$) en la producción de esta citoquina tan solo a los 135 dpv, siendo mayor en el grupo de terneros no infectados (VNI) (Gráfica IV.8). En relación con el grupo **NVI**, todos los animales vacunados mostraron niveles más elevados de IFN-γ, excepto a los 210 y 300 dpv, en que los NVI produjeron mayor cantidad de esta citoquina, aunque las diferencias no fueron significativas.

Entre ambos grupos de animales **no vacunados** (NVI y NVNI) tan solo se observó una mayor producción ($p<0,05$) de IFN-γ en sangre circulante de los terneros del grupo infectado (NVI) a partir de los 120 dpv (60 dpi), manteniéndose con niveles mayores que los controles hasta el final del experimento.

Tabla IV.6. Resultados de la prueba de liberación de IFN-γ en los terneros de los diferentes grupos experimentales (continúa)

	VI				NVI			
Dpv	**Av**	**d.e.a**	**Bov**	**d.e.b**	**Av**	**d.e.a**	**Bov**	**d.e.b**
0	1,56	0,61	1,54	0,73	1,30	0,13	1,33	0,21
15	2,13	1,09	4,34	2,29	2,03	2,32	2,13	1,90
30	4,68	2,49	3,31	1,87	1,41	0,75	1,68	0,88
45	16,02	7,62	13,54	5,65	2,16	1,07	2,65	1,65
60	25,14	6,80	21,38	9,34	1,66	0,78	3,44	2,21
90	13,49	8,20	11,65	7,55	1,73	0,89	2,14	1,22
105	29,49	20,61	24,60	20,57	2,62	2,61	3,00	2,49
120	42,65	17,44	43,12	17,6	15,54	11,82	29,19	23,61
135	29,28	14,92	26,39	14,45	11,33	19,73	4,87	2,78
150	36,01	15,98	30,25	17,01	14,64	13,18	13,05	9,65
180	34,93	12,55	32,45	21,52	14,72	15,90	16,03	15,05
210	20,59	13,93	13,53	8,12	26,91	25,76	23,24	23,67
240	23,98	13,82	16,26	20,44	12,98	12,37	6,57	7,09
270	3,08	3,13	2,31	1,67	2,55	1,16	2,50	1,16
300	5,12	3,04	3,79	3,15	12,99	8,55	4,19	1,68
330	13,92	9,48	12,02	9,83	13,80	12,61	9,86	12,98

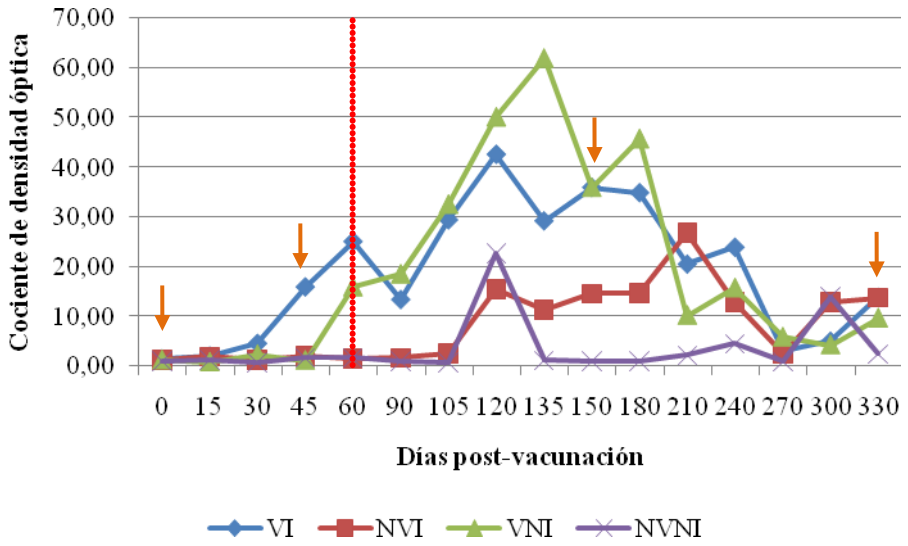
Valores medios de cada grupo experimental (VI: vacunado e infectado; NVI: no vacunado e infectado; VNI: vacunado, no infectado; NVNI: no vacunado, no infectado) en los diferentes días post-vacunación (dpv). Av: nivel de IFN-γ producido tras la estimulación de los linfocitos sanguíneos con PPD aviar, y se obtuvo dividiendo el valor de la absorbancia de cada plasma estimulado con PPD aviar entre la densidad óptica del mismo plasma estimulado con PBS. d.e.a: desviación estándar de los valores Av. Bov: nivel de IFN-γ producido tras la estimulación de los linfocitos sanguíneos con PPD bovina, y se obtuvo dividiendo el valor de la absorbancia de cada plasma estimulado con PPD bovina entre la densidad óptica del mismo plasma estimulado con PBS. d.e.b: desviación estándar de los valores Bov.

Tabla IV.6. Resultados de la prueba de liberación de IFN-γ en los terneros de los diferentes grupos experimentales (continuación)

	VNI				NVNI			
Dpv	**Av**	**d.e.a**	**Bov**	**d.e.b**	**Av**	**d.e.a**	**Bov**	**d.e.b**
0	1,29	0,01	1,22	0,12	1,03	0,11	1,15	0,02
15	0,85	0,13	0,84	0,16	1,23	0,12	1,75	0,52
30	2,38	1,91	1,58	0,38	0,83	0,26	1,24	0,24
45	1,21	0,21	1,35	0,03	1,67	0,52	0,96	0,29
60	15,96	10,19	20,74	14,69	1,65	0,06	3,29	0,14
90	18,54	14,80	13,99	8,37	1,04	0,01	1,49	0,30
105	32,55	0,07	31,14	2,06	0,70	0,57	1,17	0,81
120	50,13	3,54	50,13	3,54	22,68	8,38	32,26	21,93
135	61,94	35,73	58,94	27,53	1,12	0,58	1,38	0,20
150	35,95	21,14	35,01	25,83	1,07	0,18	1,38	0,35
180	45,74	4,30	41,09	10,88	1,06	0,08	1,24	0,11
210	10,25	4,87	10,13	7,96	2,18	1,65	4,42	4,77
240	15,75	4,97	9,28	3,86	4,49	4,65	4,22	4,29
270	5,88	6,59	5,31	5,78	0,87	0,26	1,33	0,48
300	4,32	1,15	2,36	1,23	14,01	18,46	10,89	14,07
330	9,70	3,51	10,18	2,27	2,45	0,33	2,05	0,23

Valores medios de cada grupo experimental (VI: vacunado e infectado; NVI: no vacunado e infectado; VNI: vacunado, no infectado; NVNI: no vacunado, no infectado) en los diferentes días post-vacunación (dpv). Av: nivel de IFN-γ producido tras la estimulación de los linfocitos sanguíneos con PPD aviar, y se obtuvo dividiendo el valor de la absorbancia de cada plasma estimulado con PPD aviar entre la densidad óptica del mismo plasma estimulado con PBS. d.e.a: desviación estándar de los valores Av. Bov: nivel de IFN-γ producido tras la estimulación de los linfocitos sanguíneos con PPD bovina, y se obtuvo dividiendo el valor de la absorbancia de cada plasma estimulado con PPD bovina entre la densidad óptica del mismo plasma estimulado con PBS. d.e.b: desviación estándar de los valores Bov.

Gráfica IV.8. Evolución de la producción de IFN-γ tras la estimulación de sangre periférica con PPD aviar.

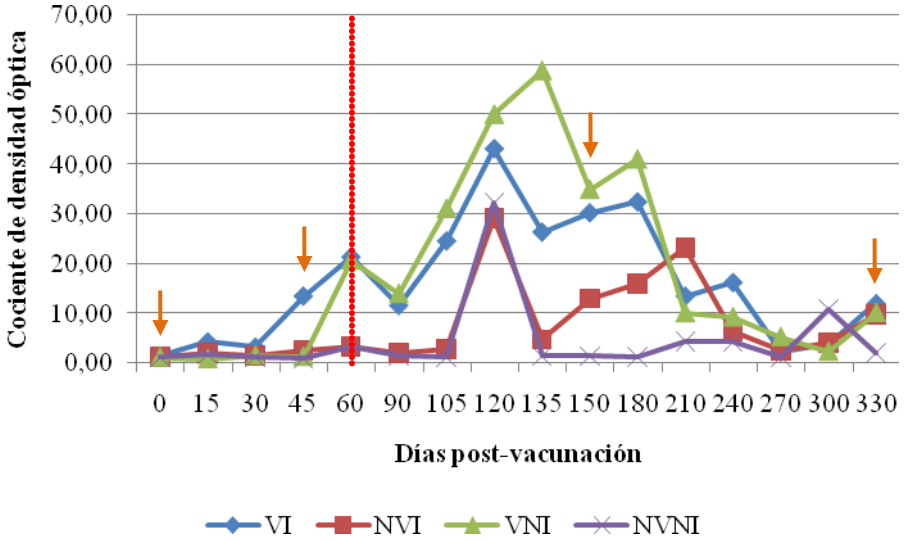


Los valores representados se obtuvieron calculando la media hallada en los diferentes muestreos dentro de cada grupo (VI: vacunado e infectado; NVI: no vacunado e infectado; VNI; vacunado y no infectado; NVNI: no vacunado y no infectado). Los resultados se expresan como un cociente de desnsidad óptica entre el valor de la absorbancia de cada plasma estimulado con PPD aviar y la densidad óptica del mismo plasma estimulado con PBS. ••••••••: Momento de infección. Las flechas naranjas indican el momento en el que se realizó la prueba de la intradermorreacción (IDR).

Si se tiene en cuenta el momento de realización de la IDR, se observa que 15 y 30 días después de realizarse esta prueba a los 45 y 150 dpv respectivamente, hay un incremento significativo ($p>0,05$) en la producción de IFN-γ respecto al muestreo anterior en los animales vacunados.

En la gráfica IV.9 se muestran los resultados obtenidos para la producción de IFN-γ tras la estimulación de la sangre con **PPD bovina**. Se observa que la cinética fue similar a la observada con la PPD aviar, de forma que los animales de los grupos vacunados mostraron un incremento en la producción de esta citoquina, pero los valores del índice de de densidad óptica fueron, en la mayoría de los muestreos, inferiores a los obtenidos para la estimulación de las mismas sangres con la PPD aviar (Tabla IV.6), y cuando los valores fueron mayores estas diferencias no resultaron significativas.

Gráfica IV.9. Evolución de la producción de IFN-γ tras la estimulación de sangre periférica con PPD bovina.



Los valores respresentados se obtuvieron calculando la media hallada en los diferentes muestreos dentro de cada grupo (VI: vacunado e infectado; NVI: no vacunado e infectado; VNI: vacunado, no infectado; NVNI: no vacunado, no infectado). Los resultados se expresan como un cociente de desnsidad óptica entre el valor de la absorbancia de cada plasma estimulado con PPD bovina y la densidad óptica del mismo plasma estimulado con PBS. ••••••••: Momento de infección. Las flechas naranjas indican el momento en el que se realizó la prueba de la intradermorreacción (IDR).

En cuanto a los niveles de IFN-γ mostrados por los diferentes grupos tras la estimulación con PPD bovina, al comparar ambos lotes vacunados con el control **NVNI**, se observó que los terneros del grupo **VI** mostraron niveles significamente más elevados de esta citoquina a partir de los 45 dpv ($p<0,05$), alcanzando el nivel máximo a los 120 dpv ($p<0,001$). A partir de entonces, los niveles de IFN-γ fueron descendiendo hasta los 270 dpv, momento en el cual las diferencias con el grupo control no son significativas. En cuanto a los animales del grupo **VNI**, es a los 60 dpv ($p<0,05$) cuando comienzan a mostrar diferencias significativas respecto al grupo NVNI, alcanzando los niveles más elevados de producción de esta citoquina a los 135 dpv ($p<0,001$), descendiendo hasta los 270 dpv.

En relación con el grupo **NVI**, los niveles de esta citoquina fueron siempre más elevados en el grupo de individuos vacunados a partir de los 45 y 60 dpv para los grupos VI y VNI respectivamente, excepto a los 210, 300 y 330 dpv, que fueron mayores en el grupo NVI, aunque las diferencias no fueron significativas.

Al comparar ambos grupos vacunados, no se observaron diferencias significativas en los niveles de IFN-γ a lo largo del experimento, excepto a los 45 dpv, donde fueron superiores en el grupo VI ($p<0,05$) y a los 135 dpv donde los niveles eran mayores en los terneros del grupo VNI ($p<0,05$).

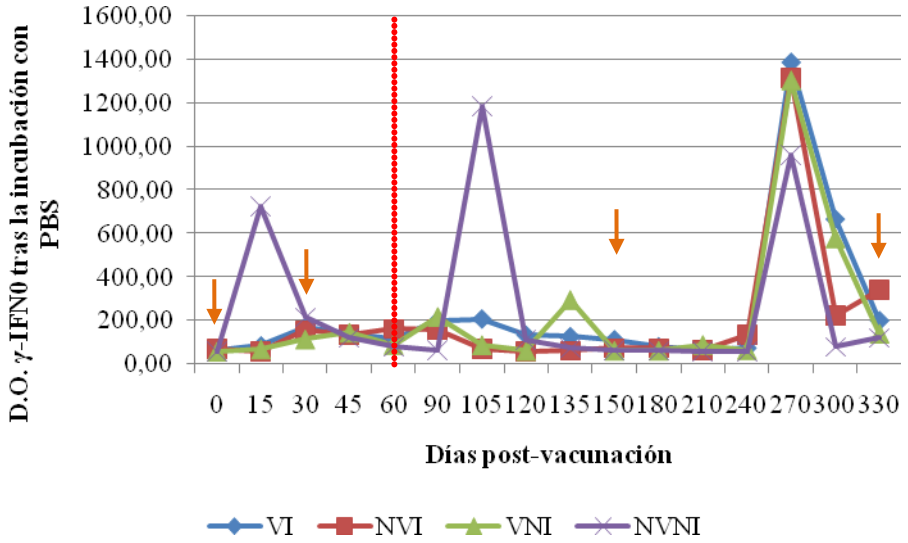
En los terneros del grupo NVI y respecto a los controles del lote NVNI, se observa un incremento en la producción de IFN-γ tras el estímulo con PPD bovina ($p<0,05$) a los 150 dpv (90 dpi), alcanzando el máximo a los 210 dpv (150 dpi) y manteniéndose a niveles más elevados hasta el final del experimento.

Únicamente a los 300 dpv, los terneros del grupo NVNI mostraron niveles de IFN-γ más elevados que los del resto de grupos.

Al igual que sucedió en el caso de la estimulación con PPD aviar, en el primer muestreo llevado a cabo tras las realización de la prueba de IDR a los 45 y 150 dpv (a los 15 y 30 días respectivamente), se observó un incremento significativo de la producción de IFN-γ tras la estimulación con PPD bovina respecto al muestreo previo ($p<0,05$) en los grupos de terneros vacunados.

También se estudió la evolución de la **producción basal bruta de IFN-γ (IFN-γ_0)**, expresada como valor de la absorbancia de los plasmas tras la incubación de las muestras de sangre únicamente con PBS, como reflejo de la respuesta inmune celular inespecífica desarrollado en cada grupo de terneros (Gráfica IV.10). Los valores concretos de cada ternero están recogidos en la tabla IX.5 de los Anexos.

Gráfica IV.10. Evolución de los niveles de IFN-γ basal (IFN-γ_0) lo largo del estudio en cada grupo experimental.



Los valores respresentados se obtuvieron calculando la media hallada en los diferentes muestreos dentro de cada grupo (VI: vacunado e infectado; NVI: no vacunado e infectado; VNI: vacunado, no infectado; NVNI: no vacunado, no infectado). Los resultados se expresan como el valor de la absorbancia de cada plasma incubado con PBS. ••••••••• : Momento de infección. D.O: densida óptica. Las flechas naranjas indican el momento en que se realizó la intradermorreacción (IDR).

Se observan picos de secreción de IFN-γ_0 en el grupo de animales NVNI a los 15, 105 y 270 dpv, muestreo este último en que los niveles de esta citoquina son elevados en todos los grupos. Salvo estas excepciones, se observa como en todos los grupos la producción de la citoquina tras la estimulación con PBS se incrementa ligeramente desde el inicio del estudio hasta llegar a los 105 dpv, y, en términos generales, desciende gradualmente para comenzar a elevarse ligeramente a partir de los 210 dpv hasta el final del estudio.

En cuanto a las diferencias entre grupos, los animales de los grupos **vacunados** (VI, VNI), secretaron, de forma inespecífica, una menor cantidad de IFN-γ que los terneros del grupo control **NVNI**, de manera significativa a los 15 y 105 dpv ($p<0,05$); sin embargo, los animales de ambos grupos vacunados produjeron mayor cantidad de esta citoquina a los 300 dpv ($p<0,001$).

Entre ambos grupos de animales **vacunados** no hubo diferencias significativas en ningún muestreo, lo que parece indicar que la infección, en este caso, no tuvo influencia en la liberación basal de IFN-γ.

Los animales del grupo **NVI**, no mostraron diferencias con los terneros del grupo NVNI, excepto en los dos momentos ya señalados (15 y 105 dpv) cuando los individuos de este último grupo mostraron valores más elevados ($p<<0,001$).

Respecto a la prueba de IDR, no se han observado variaciones en los niveles basales de IFN-γ relacionados con la realización de dicha prueba.

IV.2. Estudios *post-mortem*

IV.2.1.Estudios anatomopatológicos

El sacrificio de los animales fue llevado a cabo en dos momentos de la experiencia, a los 180 dpv (120 dpi), cuando se sacrificaron cinco animales, dos del grupo no vacunado e infectado (NVI) y tres del grupo vacunado infectado (VI), y a los 330 dpv (270 dpi), cuando se sacrificó el resto de terneros, es decir 12, tal y como se muestra en la tabla III.4 del capítulo de material y métodos. Uno de los animales del grupo VI (7461) murió a los 250 dpv, debiendo haberse sacrificado a los 330 dpv, por una úlcera abomasal y debido a elevada autolisis de las muestras se ha excluído del estudio de lesiones.

Tras el sacrificio se realizó la necropsia completa y reglada en todos los animales y se procedió al estudio macroscópico y a la toma de muestras, tal como se ha detallado en el apartado III. 1.4.2.1.1 (Material y métodos).

IV.2.1.1. Lesiones macroscópicas asociadas a paratuberculosis

En el momento del sacrificio, todos los animales presentaban buen estado de carnes. En los terneros eutanasiados a los 180 dpv no se observaron lesiones macroscópicas relacionadas con paratuberculosis en ningún animal, ni tampoco en el animal muerto a los 250 dpv. Sin embargo, en el sacrificio realizado a los 330 dpv, en uno de los animales perteneciente al grupo VI (ternero 5931) se observaron alteraciones visibles. Este animal mostraba linfangiectasias y linfangitis de los vasos linfáticos localizados principalmente en la serosa ileal, que se observaban como cordones blanquecinos de trayecto sinuoso sobre la pared intestinal (Figura IV.5). Además, la pared intestinal se encontraba engrosada en unos 6-8 tramos de íleon y yeyuno, a modo de placas de unos 10-15 cm de longitud, siendo este incremento de grosor más evidente en tramos más distales del intestino delgado. Las zonas afectadas mostraban el aspecto de un tubo rígido y carnoso (Figura IV.5). A la apertura del intestino, en la lámina

propia se observaba la formación de pliegues que al tratar de estirar apenas desaparecían (Figura IV.6). Además, se apreció la tumefacción de los nódulos linfáticos mesentéricos que a la sección presentaban un aspecto edematoso con la zona la medular, de color parduzco, incrementada de tamaño y la presencia de nodulaciones blanquecinas de pequeño tamaño en la cortical. No se observaron focos de necrosis ni en los nódulos linfáticos ni en las zonas de intestino lesionadas.

No se encontró ningún otro tipo de alteraciones macroscópicas asociadas a esta enfermedad.

Figura IV.5. Intestino delgado del animal 5931. Lesiones macroscópicas. Linfangiectasias y linfangitis de los vasos linfáticos de la serosa ileal, donde los vasos linfáticos aparecen como cordones blanquecinos de trayecto sinuoso sobre la pared intestinal. Engrosamiento del intestino que toma el aspecto de un tubo rígido y carnoso.

Figura IV.6. Intestino delgado del animal 5931. Lesiones macroscópicas. Aspecto de la mucosa intestinal, donde se observa la formación de pliegues que al tratar de estirar apenas desaparecían.

IV.2.1.2. Lesiones microscópicas asociadas a la paratuberculosis

En todos los animales estudiados se pudo constatar la presencia de tejido linfoide intestinal, formando las denominadas placas de Peyer, en diferentes tramos intestinales, desde el yeyuno proximal hasta la válvula ileocecal. Este tejido estaba constituido por la agrupación de folículos linfoides de morfología esférica u ovoidea delimitados por una fina cápsula de tejido conjuntivo, localizados en la mucosa y submucosa intestinales. Además, los folículos estaban separados unos de otros por un espacio interfolicular en el que abundaban los linfocitos así como los capilares sanguíneos y linfáticos. Sobre las placas de Peyer aparecía la lámina propia intestinal, conteniendo glándulas que en ocasiones se extendían hasta el tejido linfoide, situándose entre los folículos. Sobre los folículos, según la sección examinada, en vez de glándulas se observaban abundantes linfocitos, formando la zona denominada cúpula, que aparecía recubierta por un epitelio simple cúbico. Los folículos linfoides presentes en la válvula ileocecal y en el yeyuno (placa de Peyer yeyunal) se caracterizaban por presentar mayor densidad de células en las partes periféricas de los mismos. En el íleon, sin embargo, no se apreciaba esa clara diferencia de densidad linfocitaria entre las partes

centrales y periféricas de los folículos, y estos se encontraban separados unos de otros por una capa de tejido fibroso que representaba la zona interfolicular, que incluso en algunos cortes histológicos se había separado físicamente al llevar a cabo el tratamiento de las muestras para su estudio.

IV.2.1.2.1. Estudio y clasificación de las lesiones histológicas

Once de los trece animales infectados (cinco de los ocho del grupo VI y todos los del lote NVI) presentaban lesiones histológicas asociadas a paratuberculosis. En los animales utilizados como contol del experimento, no infectados, no se encontraron lesiones.

Las lesiones observadas fueron clasificadas en diferentes categorías (apartado III. 1.4.2.1.3. del capítulo de material y métodos), siguiendo los criterios establecidos por Pérez *et al* (1996) en ovino, Corpa *et al*., (2000a) en caprino y, principalmente, González *et al*., (2005) en bovino, que son los siguientes:

- Presencia de lesiones granulomatosas características de paratuberculosis.
- Localización de las lesiones en las diferentes estructuras de la pared intestinal y nódulos linfáticos asociados.
- Intensidad y extensión de las lesiones.
- Tipos celulares predominantes en el infiltrado inflamatorio.
- Presencia y cantidad de BAAR.

- **Lesiones observadas en el tejido linfoide intestinal**

En la mayoría de los animales se observaron lesiones clasificadas como de tipo *focal* o *multifocal.* En estos casos, la lesión en el tejido linfoide se caracterizaba por la presencia de pequeños granulomas, bien delimitados, formados por 5-30 macrófagos con citoplasma abundante, pálido y ligeramente espumoso y con núcleo grande y de cromatina poco densa, localizados en esta región (Figura IV.7). En ocasiones podían observarse linfocitos entre los macrófagos que formaban la lesión. Asimismo, podían aparecer células gigantes de tipo Langhans de forma aislada en el tejido linfoide o

formando parte de los granulomas (Figura IV.8). En los animales con lesión *multifocal* el número de estos granulomas solía ser más elevado (Figura IV.9). El infiltrado granulomatoso se localizaba en las áreas interfoliculares de las placas de Peyer. En muy pocas ocasiones se observaban BAAR en el citoplasma de los macrófagos mediante la técnica de ZN, incrementándose el número de lesiones con un resultado positivo cuando se llevó a cabo la tinción inmunohistoquímica frente a antígenos de *Map* (Figura IV.10).

Figura IV.7. Lesión de tipo focal. Placa de Peyer. Tejido linfoide con pequeños granulomas, bien delimitados, formados por 5-30 macrófagos con citoplasma abundante, pálido y ligeramente espumoso y con núcleo grande y de cromatina poco

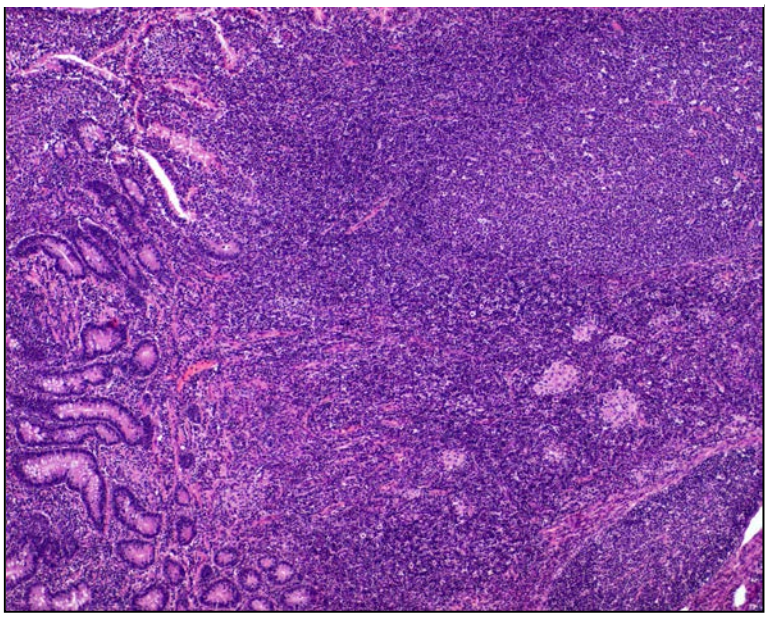


Figura IV.8. Lesión de tipo focal. Placa de Peyer. Tejido linfoide con pequeños granulomas, en los que aparecen células gigantes de tipo Langhans formando parte de los granulomas (flecha). HE. 40x.

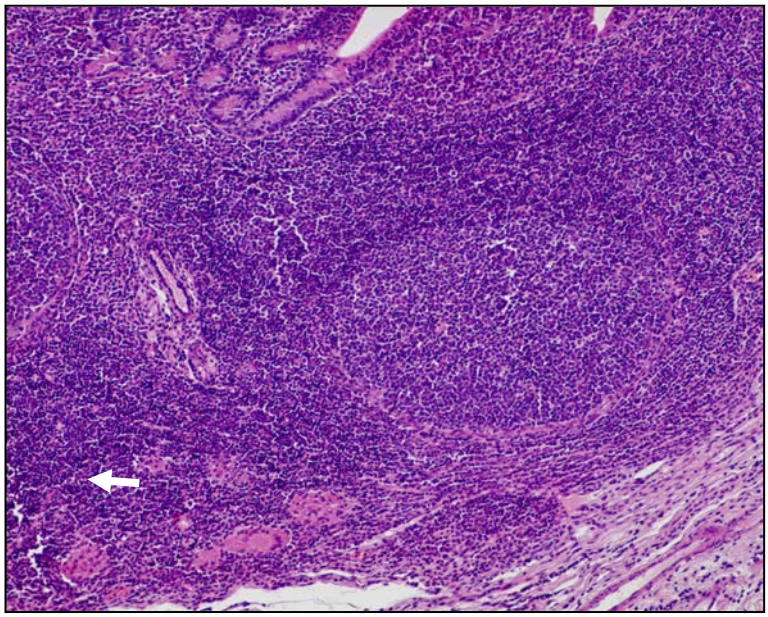


Figura IV.9. Lesión de tipo multifocal. Placa de Peyer. Granulomas bien delimitados, en número mayor que en las lesiones focales, en la zona interfolicular de la placa de Peyer. HE. 40x.

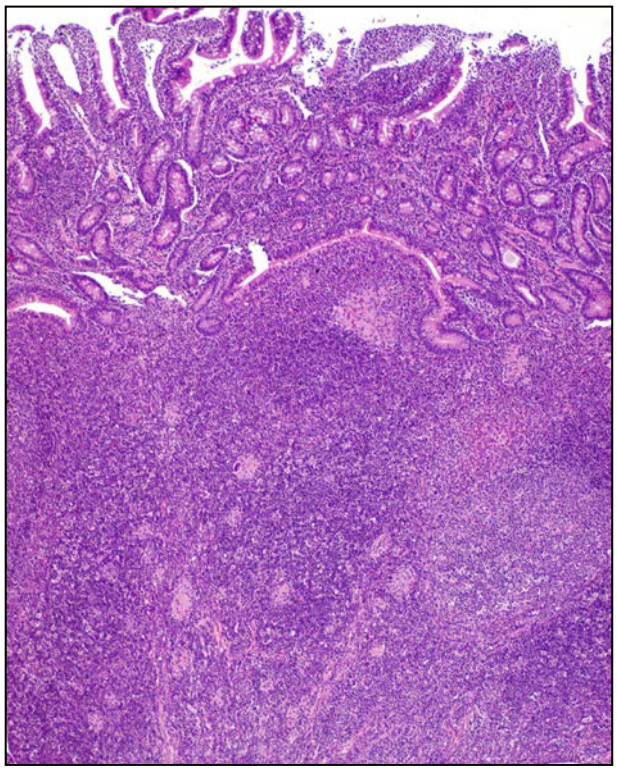
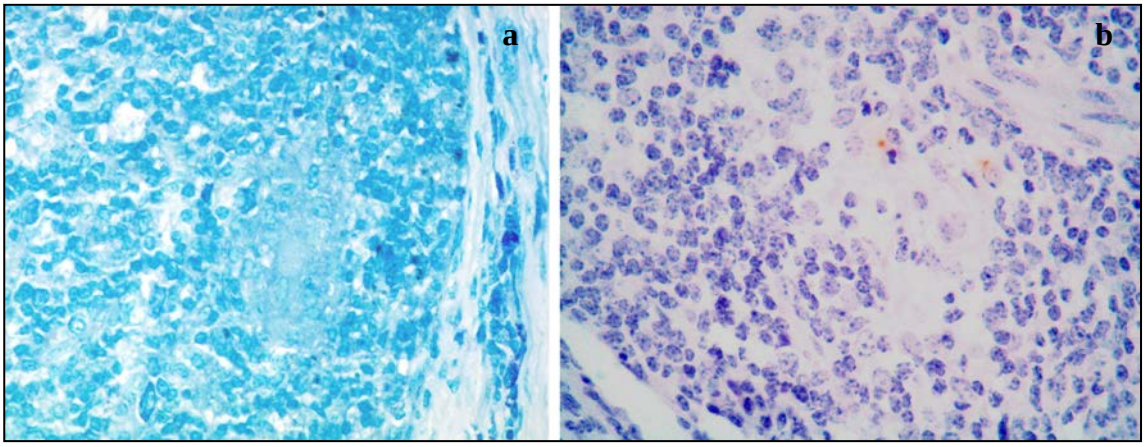


Figura IV.10. Lesión de tipo focal. Placa de Peyer. Ausencia de BAAR, ZN, 200x (a). Escasa inmunotinción frente a antígenos de *Map*, IHQ frente a *Map*, 200x (b).



En otros animales, las lesiones fueron clasificadas como de tipo *difuso.* En estos casos la lesión granulomatosa del tejido linfoide era más extensa que la observada en las de tipo *focal* o *multifocal.* El infiltrado granulomatoso presentaba las mismas características anteriormente descritas, pero los granulomas eran más numerosos y confluían, ocupando amplias áreas del tejido linfoide, especialmente las regiones interfoliculares. En algunos terneros con este tipo de lesión los granulomas llegaban a invadir la cápsula y los folículos linfoides, ocupando la mayoría de la placa de Peyer, y alterando notablemente su arquitectura histológica normal (Figura. IV.11). En estas lesiones se pudieron detectar BAAR en cantidad variable según el animal, mediante la técnica de ZN (Figura. IV.12), siendo la positividad más evidente al realizar la técnica inmunohistoquímica con el anticuerpo frente a *Map* (Tablas IV.7 y 8).

Figura IV.11. Lesión de tipo difuso. Placa de Peyer.
Numerosos granulomas en el tejido linfoide que confluyen ocupando amplias áreas en las regiones interfoliculares con invasión de la cápsula y los folículos linfoides, alterando notablemente la arquitectura histológica normal de la placa de Peyer. HE, 40x.

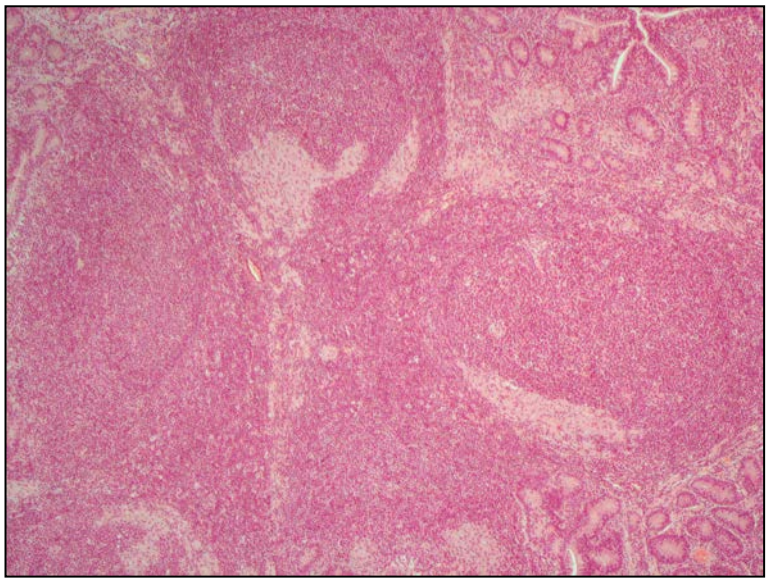
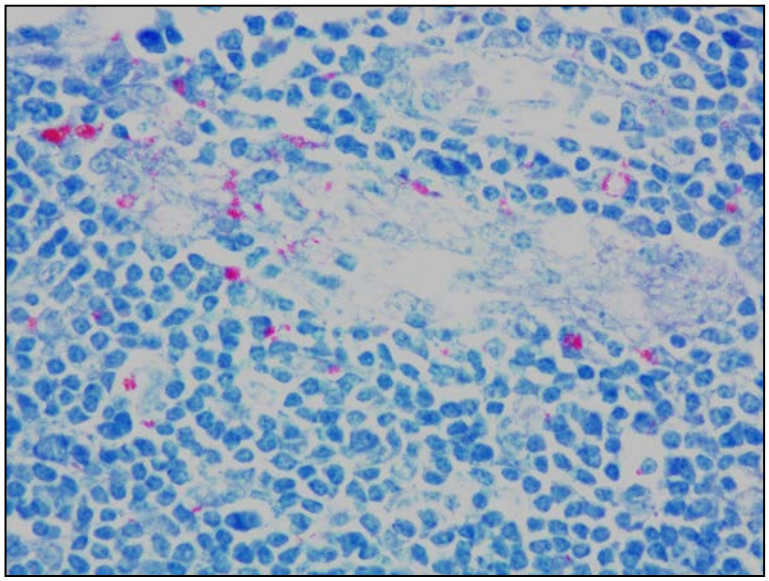


Figura IV. 12. Lesión de tipo difuso. Placa de Peyer.
Cantidad moderada de BAAR (++) en los granulomas. ZN, 200x.



- **Lesiones en la lámina propia intestinal**

Dentro de las categorías de lesión anteriormente referidas, en las de tipo *focal* no se encontraron infiltrados granulomatosos en la lámina propia, estando restringidas únicamente al tejido linfoide. De esta forma, solo en las lesiones *multifocales* o *difusas* se encontraba afectada la lámina propia, tal y como se describe a continuación:

-Lesiones de tipo *multifocal*: En este caso, se observaban pequeños granulomas bien definidos, en número variable, en la lámina propia de la mucosa intestinal, similares a los descritos en el tejido linfoide para este tipo de lesión, sin llegar a alterar la morfología normal de las vellosidades intestinales (Figura. IV.13). En ocasiones, se podían encontrar células gigantes aisladas en lugar de granulomas bien formados. Estas lesiones se localizaban generalmente en la parte apical de las vellosidades y se encontraban rodeadas por un número variable de linfocitos y células plasmáticas (Figura. IV.13). Como se ha señalado, en este tipo de lesión no se modificaba la arquitectura normal del intestino; de hecho, un hallazgo muy común era la presencia de una vellosidad normal adyacente a otra afectada. Estos granulomas se observaron mayoritariamente en la lámina propia intestinal asociada al tejido linfoide (placa de Peyer) pero en algunos casos también se apreciaban en la lámina propia no relacionada con el mismo. Por ello, y según la localización de los granulomas en la lámina propia, se definieron dos subtipos de este tipo de lesión, independientemente del número de vellosidades afectadas o de granulomas encontrados: la denominada *multifocal a*, cuando los granulomas aparecían únicamente en la lámina propia adyacente al tejido linfoide, y la *multifocal b* cuando además también se observaban en zonas de lámina propia no asociada con las placas de Peyer (Figura. IV.14). En este tipo de lesión se podían detectar ocasionalmente BAAR mediante la tinción de ZN (Tablas IV.7 y 8). Los resultados de la inmunotinción frente a *Map* eran similares a los obtenidos con el ZN.

Figura IV.13. Lesión de tipo *multifocal a.* Lámina propia intestinal. Pequeños granulomas bien definidos, localizados tanto en el tejido linfoide como en la lámina propia, entre las glándulas i, sin llegar a alterar la morfología normal de las vellosidades intestinales. Ocasionalmente se aprecia alguna cripta dilatada conteniendo material necrótico. HE, 40x.

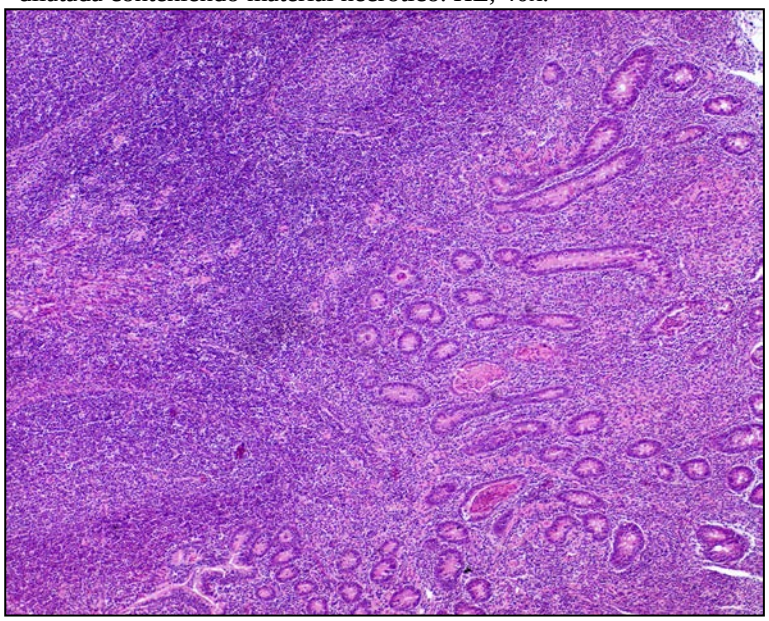
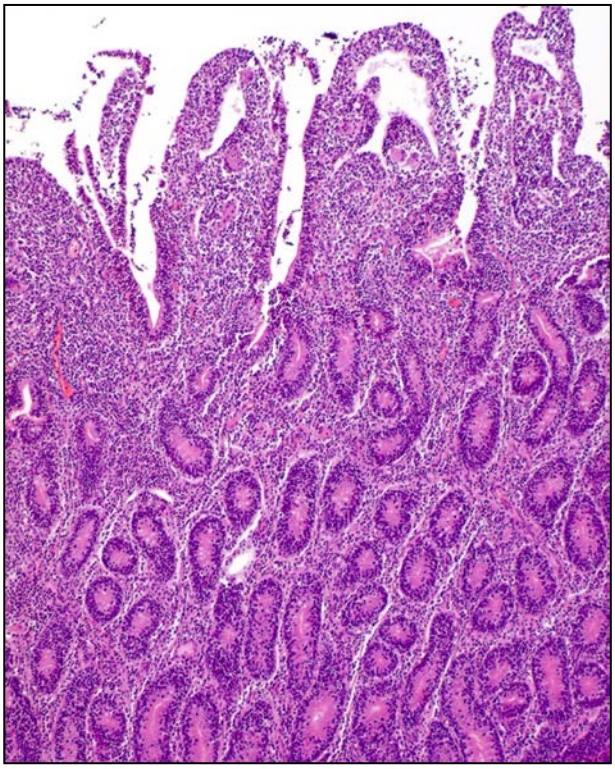


Figura IV.14. Lesión de tipo *multifocal b.* Lámina propia intestinal. Granulomas de pequeño tamaño (flechas) en los ápices de las vellosidades de zona de yeyuno no relacionada con tejido linfoide. Se observa la dilatación de los vasos linfáticos de la vellosidad. HE, 100x.



Lesiones de tipo *difuso*: los animales con este tipo de alteración mostraban una enteritis granulomatosa grave y difusa que se podía observar de forma simultánea en varias secciones del intestino delgado. Estaba caracterizada por un infiltrado inflamatorio formado principalmente por macrófagos y linfocitos que invadían la lámina propia, provocando la separación de las glándulas intestinales y el engrosamiento de las vellosidades (Figura. IV.15). Aunque en algunas localizaciones los granulomas se observaban bien delimitados, en la mayoría de muestras la lesión estaba caracterizada por la presencia de un infiltrado de macrófagos bien diferenciados (células epitelioides), así como por algunos linfocitos, células plasmáticas y células gigantes de Langhans, que invadían la zona basal de las lámina propia de las vellosidades, extendiéndose en los casos más graves hasta las zonas más apicales, provocando el engrosamiento de dichas vellosidades (Figura. IV.16). En esta lesión se observaba una cantidad variable de BAAR, según el tipo de lesión, en el citoplasma de

macrófagos y células gigantes, que se evidenciaban mejor mediante la técnica inmunohistoquímica frente a *Map*. En algunas áreas, se podían observar criptas intestinales dilatadas y llenas de restos de células necróticas (Figura. IV.16) rodeadas del intenso infiltrado granulomatoso. Además, en algunas localizaciones de la submucosa y especialmente de la serosa, se apreciaba una marcada dilatación de los vasos linfáticos, cuya pared aparecía engrosada y desestructurada debido a la presencia de un infiltrado inflamatorio formado principalmente por linfocitos y macrófagos que también se podía encontrar en la región perivascular (Figura. IV.17).

Figura IV.15. Lesión de tipo difuso. Lámina propia intestinal. Inflitrado inflamatorio granulomatoso formado principalmente por macrófagos y linfocitos que invaden toda la lámina propia, provocando la separación de las glándulas intestinales y el engrosamiento de las vellosidades. HE. 40x.

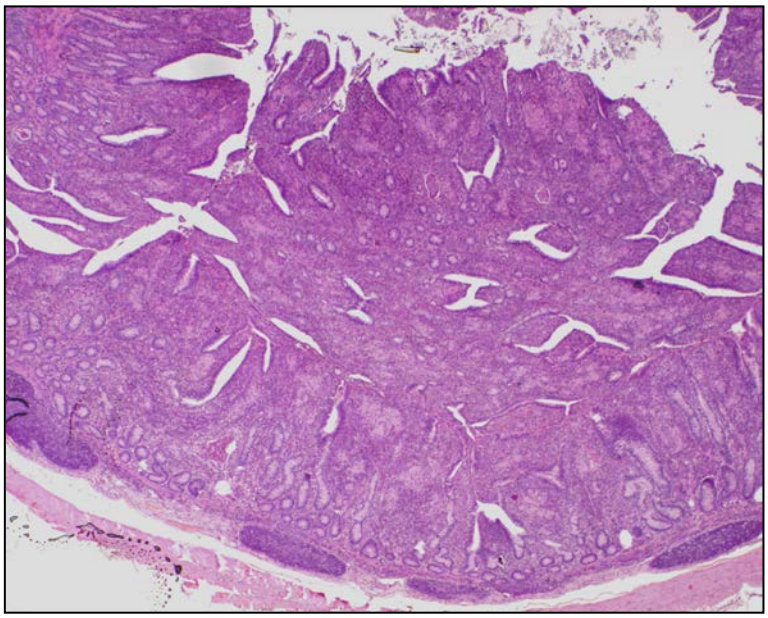


Figura IV.16. Lesión de tipo difuso. Lámina propia intestinal. Infiltrado de macrófagos bien diferenciados (células epitelioides), linfocitos y células gigantes de Langhans, invadiendo la zona basal de las lámina propia de las vellosidades, extendiéndose hasta las zonas más apicales, provocando la fusión de vellosidades y el engrosamiento de toda la zona. Se observan

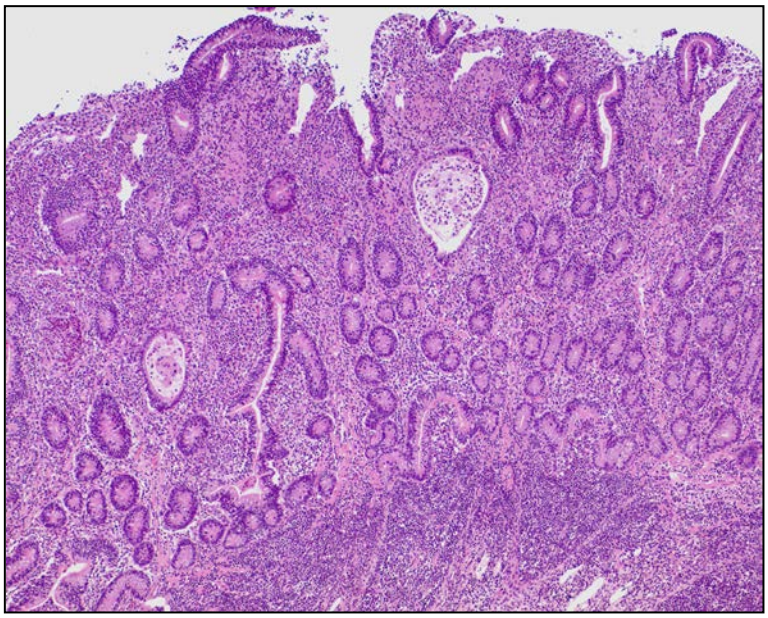
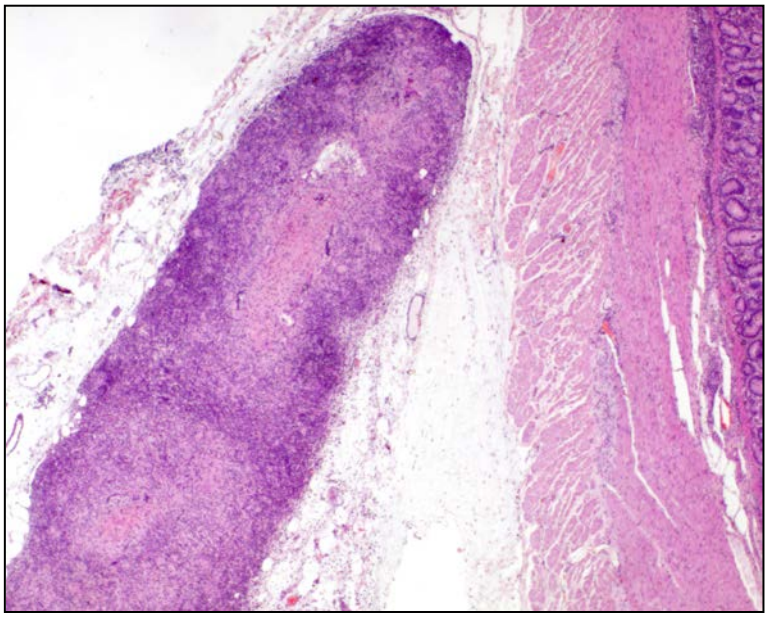


Figura IV.17. Lesión de tipo difuso. Serosa intestinal. Linfangitis grave, caracterizada por la presencia de un intenso infiltrado inflamatorio formado por macrófagos y linfocitos, en el que se aprecian áreas de necrosis, alrededor del



De acuerdo a la clasificación de lesiones antes mencionada (González *et al.*, 2005), los casos de lesión de tipo *difuso* encontrados se encuadrarían dentro del denominado subtipo *intermedio o linfocítico.* En ambos casos, el infiltrado estaba formado por abundantes linfocitos, entre los cuáles, en las denominadas formas *intermedias* se observaban numerosos grupos de macrófagos y células gigantes (Figura. IV.18), con abudantes BAAR evidenciados tanto mediante la tinción de ZN como inmunohistoquímica (Figura. IV.19). Sin embargo, en la lesión de tipo *linfocítico*, predominaban los linfocitos, mientras que los granulomas presentes contenían abundantes células gigantes y eran de escasa entidad, apareciendo entre los linfocitos, sobre todo en los ápices de las vellosidades (Figura. IV.20). La cantidad de BAAR era o nula o muy escasa con todas las técnicas empleadas (Figura. IV.21). En los animales con este tipo de alteración, la enteritis granulomatosa fue observada desde las localizaciones proximales del yeyuno hasta la válvula ileocecal. Aunque existía una ligera variabilidad entre las distintas muestras estudiadas, a cada animal se le adjudicó un tipo de lesión según cuál fuera la imagen predominante en todas las secciones de intestino examinadas.

Figura IV.18. Lesión de tipo difuso *intermedio*. Lámina propia intestinal. Infiltrado formado por abundantes linfocitos, numerosos grupos de macrófagos y células gigantes que provocan el engrosamiento de la lámina propia. HE, 100x.

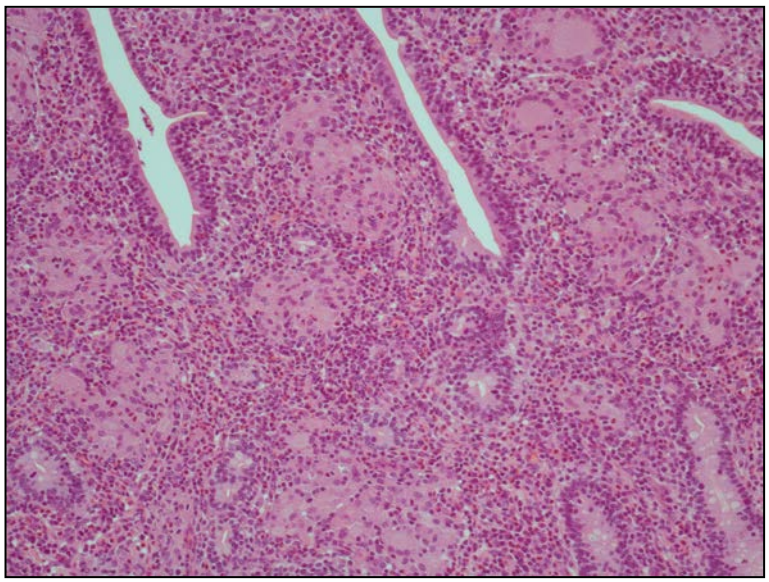


Figura IV.19. Lesión de tipo difuso *intermedio*. Lámina propia intestinal. Abundante cantidad de BAAR evidenciados tanto mediante la tinción de ZN (a) como inmunohistoquímica (b). 200x.

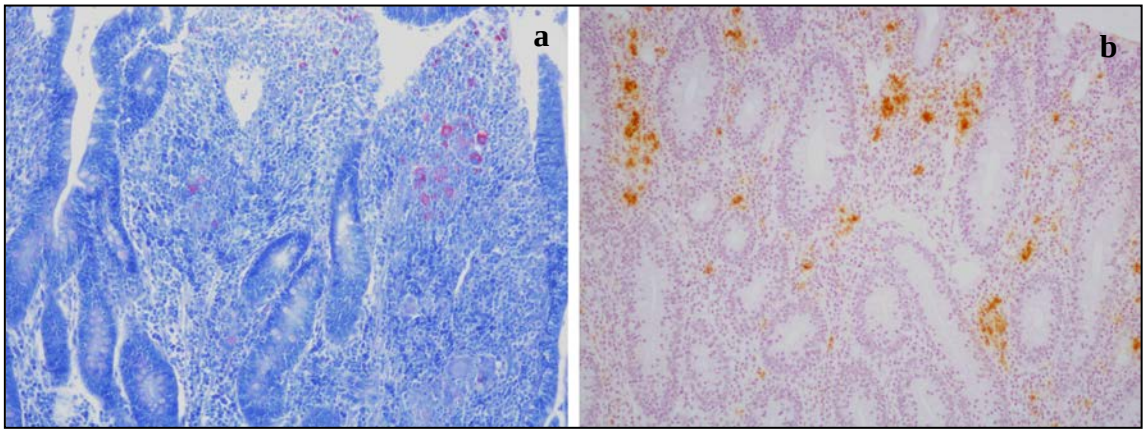


Figura IV.20. **Lesión de tipo difuso *linfocítico*.** Ápice de vellosidad con presencia abundante de linfocitos y granulomas albergando abundantes células gigantes de escasa entidad entre los linfocitos, sobre todo en los ápices de las vellosidades.

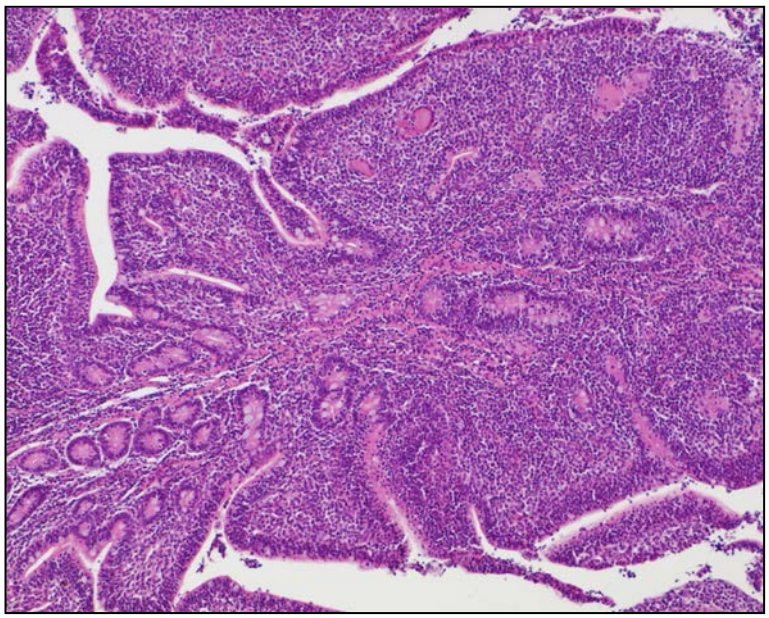
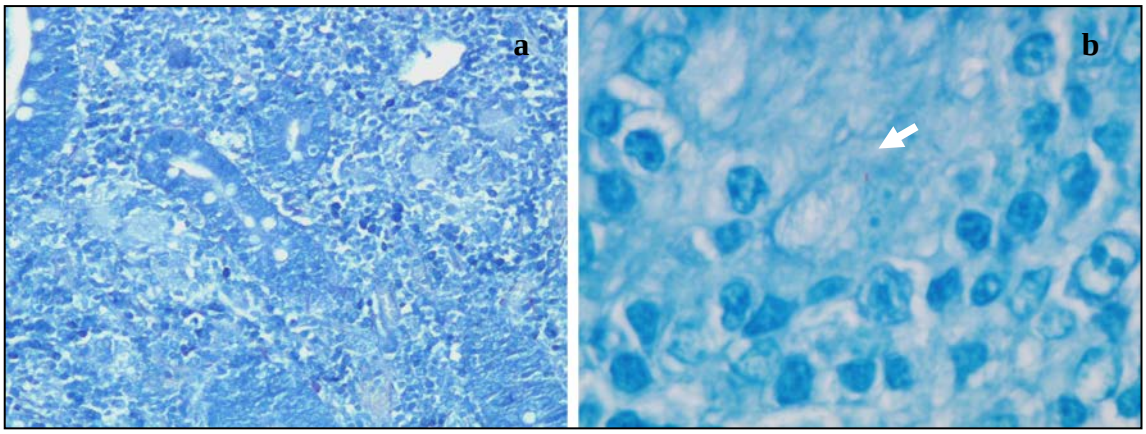


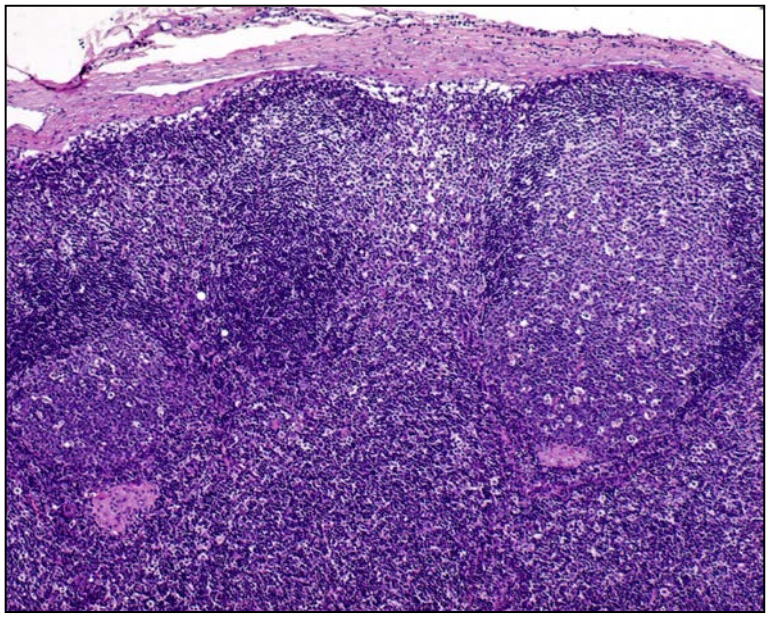
Figura IV.21. **Lesión de tipo difuso *linfocítico*. Lámina propia intestinal.** Ausencia de BAAR (a) o presencia muy escasa (flecha) (b) en los granulomas presentes en la lámina propia. ZN 200 x (a), 400 x (b).



- **Lesiones en los nódulos linfáticos**

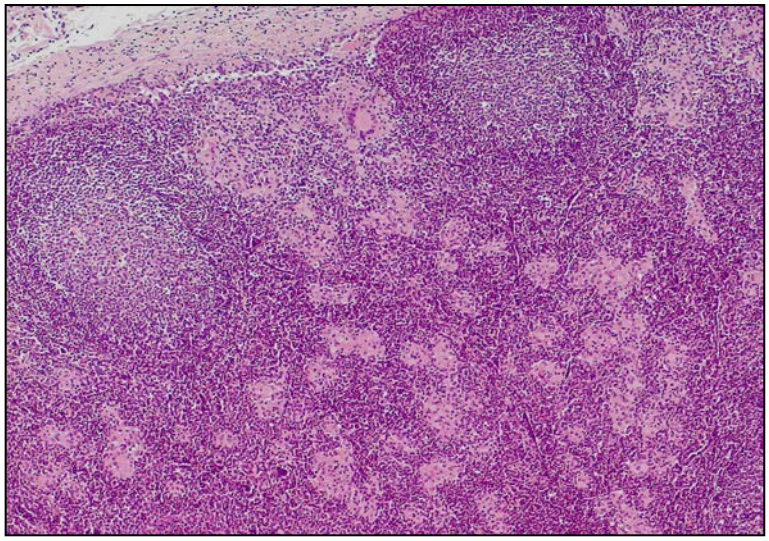
La lesión de los nódulos linfáticos se caracterizaba por una linfadenitis granulomatosa, donde podían encontrarse infiltrados formados por macrófagos y células epitelioides localizados preferentemente en la región paracortical. La gravedad e intensidad de la lesión en estos órganos estaba estrechamente relacionada con el tipo de lesión intestinal. En aquellos animales con lesión de tipo *focal*, localizada exclusivamente en el tejido linfoide intestinal, los nódulos linfáticos no presentaban lesión o bien mostraban pequeños granulomas similares a los descritos en el tejido linfoide intestinal, localizados en la zona cortical, rodeando a los folículos linfodes, en relación con los senos subcapculares o corticales (Figura IV.22) y, en mucha menor medida, en la región paracortical. Ocasionalmente se observaron células gigantes de Langhans, tanto formando parte de los granulomas como aisladas. No se observaron BAAR en ninguno de los nódulos linfáticos con lesión focal mediante la técnica de ZN; sin embargo, alguna de las secciones fue positiva empleando la técnica inmunohistoquímica frente a *Map*.

Figura IV.22. Lesión de tipo focal. Nódulo linfático. Pequeños granulomas bien delimitados localizados en la zona cortical, rodeando a los folículos linfodes, en relación con los senos subcapculares. HE, 100x.



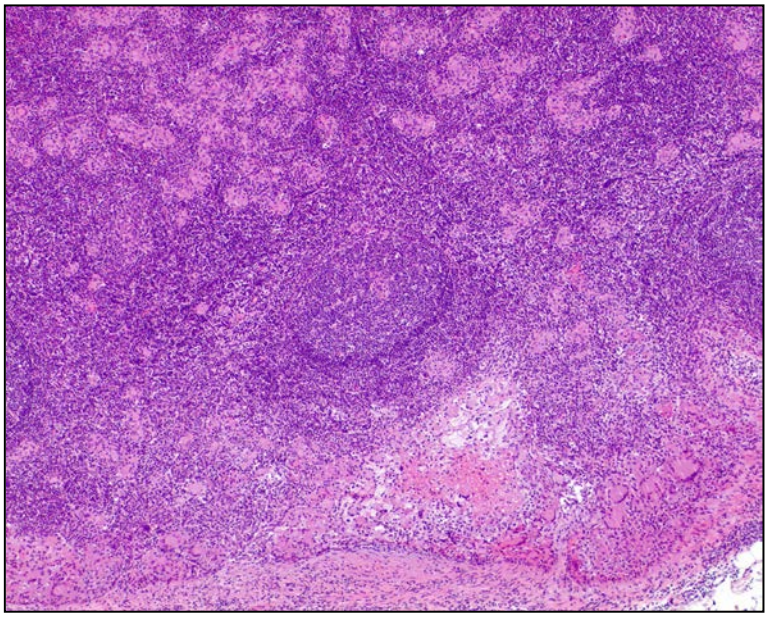
En los animales que presentaban lesiones de tipo *multifocal* en el intestino, los granulomas encontrados en el nódulo linfático eran similares a los descritos, pero normalmente aparecían en mayor número (Figura IV.23). Podían apreciarse BAAR, aunque generalmente en un número muy escaso, evidenciándose más fácilmente al realizar la tinción inmunohistoquímica frente a *Map* en estas secciones.

Figura IV.23. Lesión de tipo multifocal. Nódulo linfático. Granulomas bien definidos, algunos con células gigantes, en número moderado ocupando la zona interfolicular y paracortical del nódulo linfático. HE, 100x.



En los casos con lesión de tipo *difuso* en el intestino, los nódulos linfáticos mostraban una linfadenitis granulomatosa difusa caracterizada por la presencia de un intenso infiltrado granulomatoso, con características similares al encontrado en la mucosa intestinal pero más intenso y localizado no solo en la cortical, donde llegaba a invadir los folículos linfoides, sino que también aparecía en la región paracortical de los nódulos linfáticos, donde los granulomas podían confluir llegando a alterar la arquitectura normal de estos órganos (Figura. IV.24). Además, se observaba un incremento de macrófagos en la medular. En todos los casos se detectaron BAAR mediante la técnica de ZN o antígenos de *Map* mediante métodos inmunohistoquímicos, generalmente en número moderado.

Figura IV.24. Lesión de tipo *multifocal.* Nódulo linfático. Granulomas en número elevado localizados en las zonas cortical, y paracortical. El infiltrado inflamatorio invade los folículos linfoides, alterando la arquitectura histológica normal del nódulo linfático. Se observan zonas de necrosis caseosa y abundantes células gigantes. HE, 40x.



IV.2.1.2.2. Distribución de los animales según el tipo de lesión

Para llevar a cabo la clasificación de los animales en función del tipo de lesión, se otorgó una categoría de las ya mencionadas a cada tramo de intestino o nódulo linfático examinado. Finalmente, cada animal fue clasificado como poseedor de una lesión de tipo *focal*, *multifocal* o *difuso* en función de la lesión más grave encontrada en los diferentes tramos de intestino examinados. Igualmente, para asignar un valor (apartados III.1.4.2.1.2. y III.1.4.2.1.5 del capítulo de material y métodos) a cada animal según la cantidad de BAAR o antígenos de *Map* puestos en evidencia mediante la técnica de ZN o IHQ, se ha tenido en cuenta la mayor intensidad de tinción encontrada en alguna sección de las estudiadas.

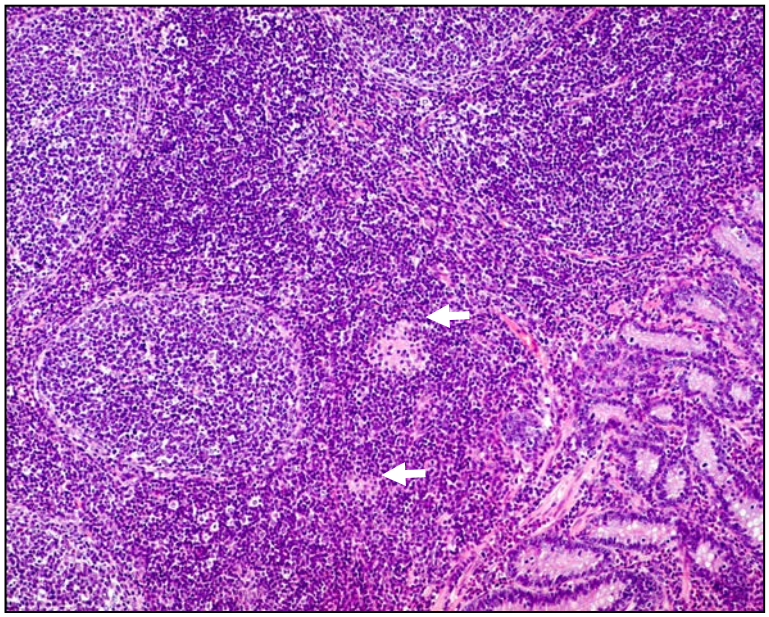
Sacrificio a los 180 días post-vacunación (120 días post infección)

Animales no vacunados e infectados (VI)

De los tres animales del grupo VI, tan solo uno de ellos mostró lesión y fue de tipo *focal* (3303), mientras que los otros dos (5953 y 9108) no presentaron lesión granulomatosa alguna.

Las lesiones en el animal 3303 se localizaron únicamente en el tejido linfoide de la placa de Peyer yeyunal media (PPYM), y consistían en la presencia de dos granulomas bien delimitados (Figura IV.25). En este caso, en el interior de los pocos macrófagos que formaban estos granulomas no se apreció la presencia de BAAR ni antígenos de *Map* en su citoplasma, otorgando por tanto, el valor "0" tanto para la técnica de ZN como la IHQ frente a *Map*. En los nódulos linfáticos de este animal no se apreció lesión granulomatosa alguna. Por tanto, y atendiendo a la lesión intestinal, este animal fue clasificado como *focal* (Tabla IV.7).

Figura IV.25. Animal 3303. Placa de Peyer yeyunal media. Lesión de tipo focal. resencia de dos granulomas de pequeño tamaño y bien delimitados (flechas). HE, 100x.

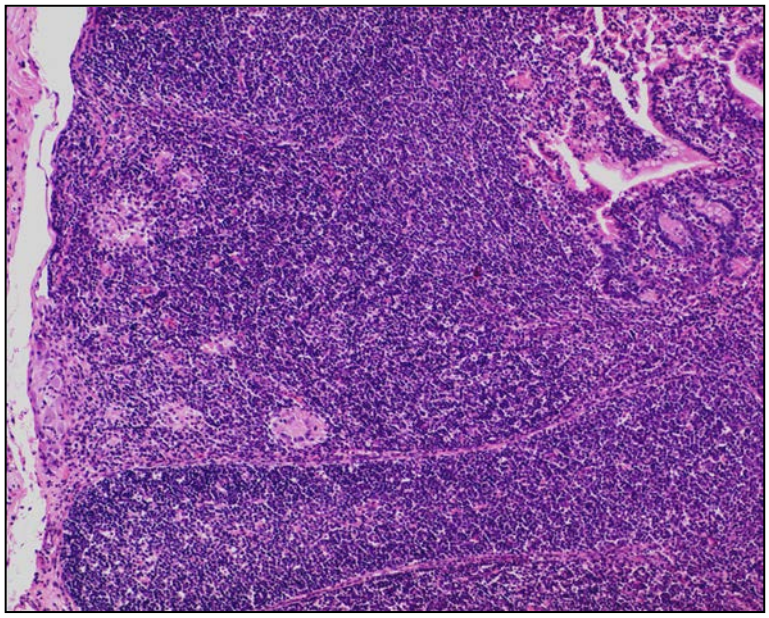


Animales no vacunados e infectados (NVI)

Los dos animales del grupo NVI sacrificados en este momento de la experiencia (5933, 7460) fueron clasificados según el tipo de lesión como se muestra en la tabla IV.7 de forma que uno de ellos (7460) presentaba lesión de tipo *focal* mientras que el otro ternero (5933) mostraba el tipo *multifocal b.*

En el caso del animal con identificación 7460 no se observaron granulomas ni células gigantes en la lámina propia de ninguna de las localizaciones examinadas. No obstante, aparecían granulomas de pequeño tamaño y bien delimitados en el tejido linfoide de la válvula ileocecal (VIC) y de las placas de Peyer yeyunales distal (PPYD) y media (PPYM) (Figura IV.26), generalmente en número reducido como se describe en el apartado IV.2.1.2.3. Asimismo, se observó algún granuloma en los nódulos linfáticos ileal y yeyunal caudal, de características similares a los presentes en el tejido linfoide intestinal. La morfología de estos granulomas no difería de los encontrados en el ternero 3303 del grupo VI. Con la tinción de ZN, tan sólo se observaron BAAR en lesiones granulomatosas de una de las tres secciones del nódulo ileal y en dos secciones del nódulo yeyunal caudal, catalogadas como "+" en ambos casos. Con la tinción IHQ la tinción fue más intensa, de carácter moderado, clasificándose como "++"

Figura IV.26. Animal 7460. Placa de Peyer yeyunal media. Lesión de tipo focal. Granulomas de pequeño tamaño y bien delimitados en el tejido linfoide de la placa de Peyer yeyunal media. HE, 100x.



Respecto al otro animal de este grupo, el ternero 5933, en el tejido linfoide intestinal se observaban granulomas focales, bien delimitados, de similares características a las descritas anteriormente; sin embargo, en este ternero estos granulomas también se extendían a la lámina propia intestinal, sin modificar sustancialmente su arquitectura microscópica (Figura IV.27). Las lesiones en el tejido linfoide aparecían en el íleon distal (ILD), en la PPYM y placa de Peyer yeyunal proximal (PPYP), donde ocupaban el espacio interfolicular así como los folículos linfoides y cúpulas. En la lámina propia, los granulomas, similares a los del tejido linfoide, se observaron en la PPYM y PPYP, tanto asociados al tejido linfoide como en tramos no relacionados con la placa de Peyer. Además, también se encontraron en zonas de yeyuno que no contenían tejido linfoide (Figura IV.28), en los tramos medio (YYM), y proximal (YYP). Por todos estos hallazgos, la lesión de este animal fue clasificada como tipo *multifocal b*. En el intestino no se observó ningún BAAR mediante ZN, si bien empleando la tinción IHQ frente a *Map* se encontró inmunotinción positiva en algunos granulomas de la lámina propia, por lo que el animal se clasificó como "+". Los nódulos linfáticos en los que se pudieron observar lesiones compatibles con la infección por paratuberculosis fueron el ileocecal, ileal (Figura IV.29) y los yeyunales que presentaban escasos granulomas bien delimitados. En algunas de las secciones afectadas de nódulos linfáticos pudieron apreciarse macrófagos con 1 a 6 BAAR, otorgando una valoración de "+" tanto en la tinción de ZN como IHQ.

Figura IV.27. Ternero 5933. Placa de Peyer yeyunal media. Lesión multifocal. Granulomas de pequeño tamaño, bien delimitados y localizados en el tejido linfoide y lámina propia intestinal (flechas). HE, 200x..

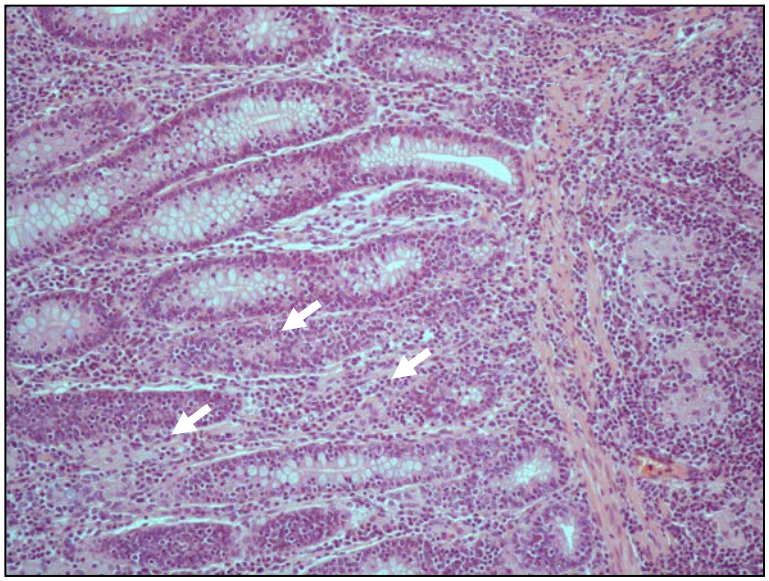


Figura IV.28. Animal 5933. Yeyuno medio. Lesión multifocal b. Granulomas en lámina propia entre las glándulas intestinales, con células gigantes y rodeados de linfocitos. HE, 200x.

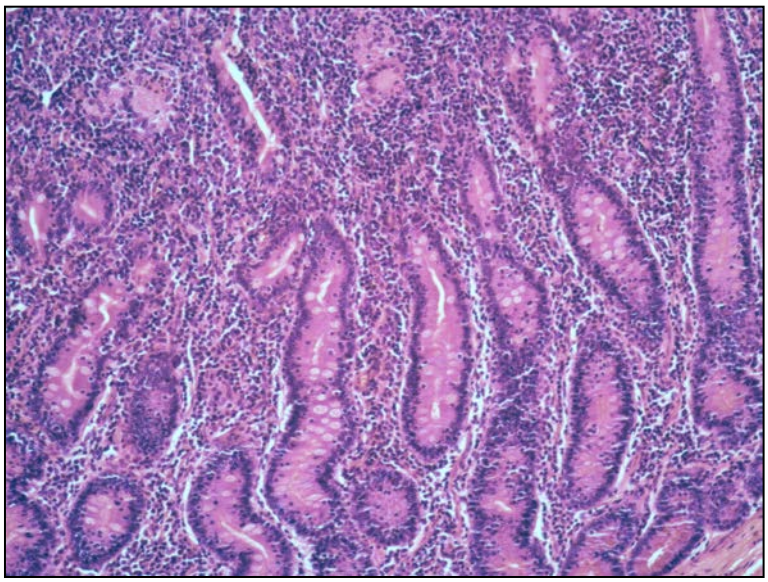


Figura IV.29. Animal 5933. Nódulo linfático ileal. Lesion multifocal. Granuloma bien delimitado y de pequeño tamaño en la zona paracortical. HE, 200x.

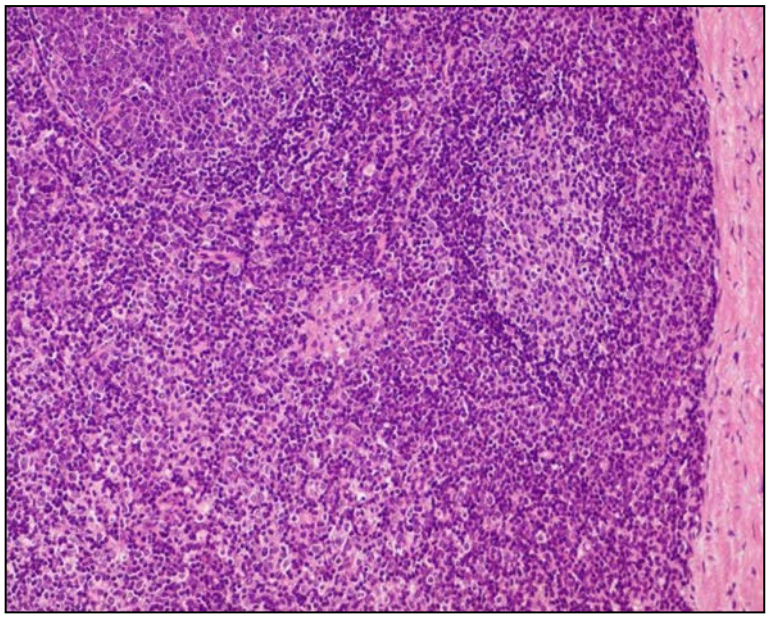


Tabla IV. 7. Clasificación de los animales sacrifiados a los 180 dpv en función del tipo de lesión, y valoración de las pruebas de ZN e IHQ.

		Clasificación	
Identificación	**Tipo de lesión**	**ZN**	**IHQ**
Animales vacunados e infectados			
3303	Focal	0	0
5953	Sin lesión	0	0
9108	Sin lesión	0	0
Animales no vacunados e infectados			
5933	Multifocal b	+	+
7460	Focal	+	++

ZN: Tinción de Ziehl-Neelsen. IHQ: tinción inmunohistoquímica frente a *Map*. 0: ausencia de BAAR. +: escasa tinción; ++: tinción de intensidad moderada.

Sacrificio a los 330 días post-vacunación (270 días post infección)

En el segundo sacrificio fueron eutanasiados el resto de animales pertenecientes al estudio, salvo el 7461 que como ya se ha citado, murió a causa de una úlcera abomasal a los 250 dpv y no se ha tenido en cuenta para el estudio anatomopatológico debido a que el nivel de autolisis de las muestras de intestino impidieron su correcta valoración. La clasificación de las lesiones por animales, así como la valoración en los mismos de las técnicas de ZN e IHQ frente a *Map* se presentan en la tabla IV.8.

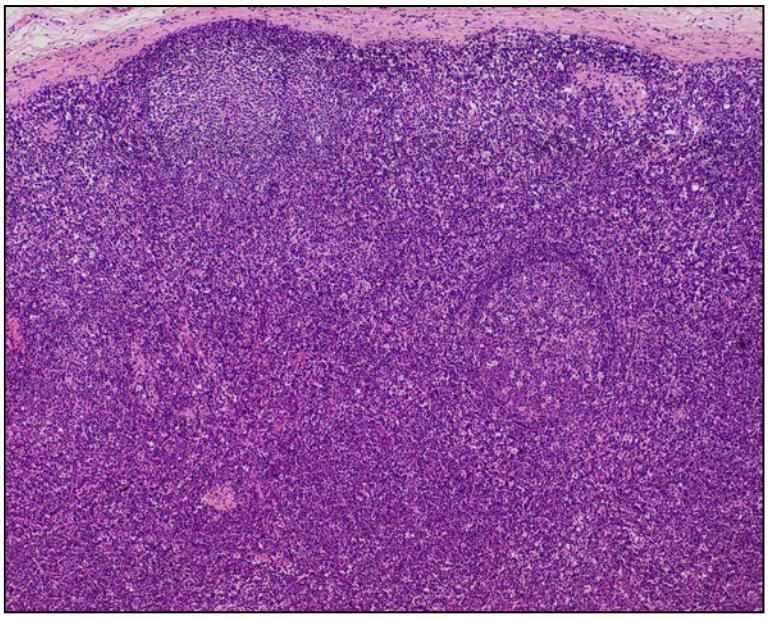
Animales de los grupos control

Los animales de los grupos control, es decir de los grupos que no fueron infectados, tanto vacunados (VNI) como no vacunados (NVNI), no mostraron ninguna lesión compatible con la infección por *Map* en ningún tramo intestinal examinado. Por tanto, todos ellos fueron clasificados como *sin lesión*.

Animales vacunados e infectados

En cuanto al grupo vacunado (VI), cuatro terneros (3301, 5931, 7930 y 9109) fueron sacrificados a los 330 dpv (270 dpi). Tres de ellos (3301, 7930 y 9109), clasificados como de tipo *focal* (tabla IV.8), mostraron lesiones asociadas a paratuberculosis localizadas únicamente en el tejido linfoide intestinal y nódulos linfáticos. Estas consistían en la presencia de granulomas de pequeño tamaño y bien delimitados o en ocasiones únicamente células gigantes aisladas, con características similares a las descritas anteriormente en estas localizaciones. Como se detalla en el capítulo siguiente (IV.2.1.2.3), la intensidad lesional variaba entre los animales. En el caso de los terneros 3301 y 9109 las lesiones eran escasas y se localizaban tan sólo en la PPYD, NLYc o PPYM, NLYc, NLIl respectivamente (Figura IV.30). El animal 7930 presentaba lesiones más numerosas y en mayor número de localizaciones, en concreto en la VIC, ILD, PPYD, PPYM, PPYP, así como en todos los nódulos linfáticos examinados. En cuanto a la detección de BAAR mediante ZN, tan sólo pudo ser posible en una de las células gigantes aislada de ILD en el animal 3301 y en un granuloma de la PPYP del 9109. De igual forma, la técnica IHQ no reveló nuevas localizaciones de inmunotinción positiva, por lo que los animales fueron categorizados como "+" en cuanto a la presencia de BAAR o antígenos de *Map.*

Figura IV.30. Ternero 9109. Nódulo linfático ileal. Lesión focal. Granulomas de pequeño tamaño en la zona cortical y paracortical. HE, 100x.



El último animal de este grupo, el 5931, mostró una enteritis granulomatosa grave que fue clasificada como de tipo *difuso intermedio* (Tabla IV.8). Se caracterizaba por la presencia de un intenso infiltrado inflamatorio de carácter granulomatoso que afectaba a numerosos tramos del intestino (tanto al tejido linfoide como a la lámina propia intestinal) y a los nódulos linfáticos estudiados. Aunque todas las localizaciones examinadas se encontraban afectadas, salvo el YYP y la PPYP, no todas las secciones y localizaciones presentaban la misma intensidad de lesión. Mientras en unas secciones tan solo algunas vellosidades estaban afectadas por un infiltrado formado mayoritariamente por linfocitos, algún macrófago y células gigantes aisladas , siendo la presencia de BAAR escasa, en otras muestras la lesión era difusa, afectando a todas las vellosidades intestinales que aparecían engrosadas debido a la presencia de numerosos linfocitos entre los que se encontraban grupos de macrófagos con alguna célula gigante. El número de BAAR era numeroso en el citoplasma de estos macrófagos y la tinción IHQ intensa, clasificando al animal para ambas tinciones como "+++" (Figura IV.31). Asimismo, en la submucosa y serosa se observó un infiltrado celular similar al de la mucosa, apreciándose una grave linfangitis granulomatosa con presencia de linfocitos y macrófagos así como trombos y émbolos de estas mismas células y células gigantes en su luz (Figura IV.32), con BAAR en el citoplasma de las células macrofágicas. El edema de la submucosa era muy intenso en las secciones donde se apreciaban las linfangitis graves, incrementando varias veces el grosor de la pared intestinal. Por todo ello y según los criterios anteriormente expuestos, la lesión del animal se clasificó como de tipo *difuso intermedio.*

Figura IV.31. Ternero 5931. Vellosidad intestinal. Lesión difusa intermedia. Presencia de numerosos BAAR en el citoplasma macrófagos ("+++"). ZN, 200x.

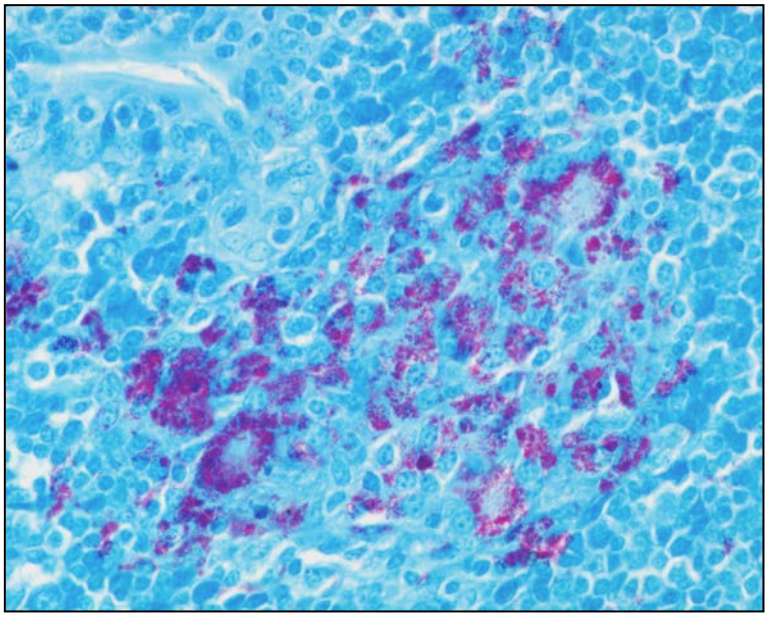
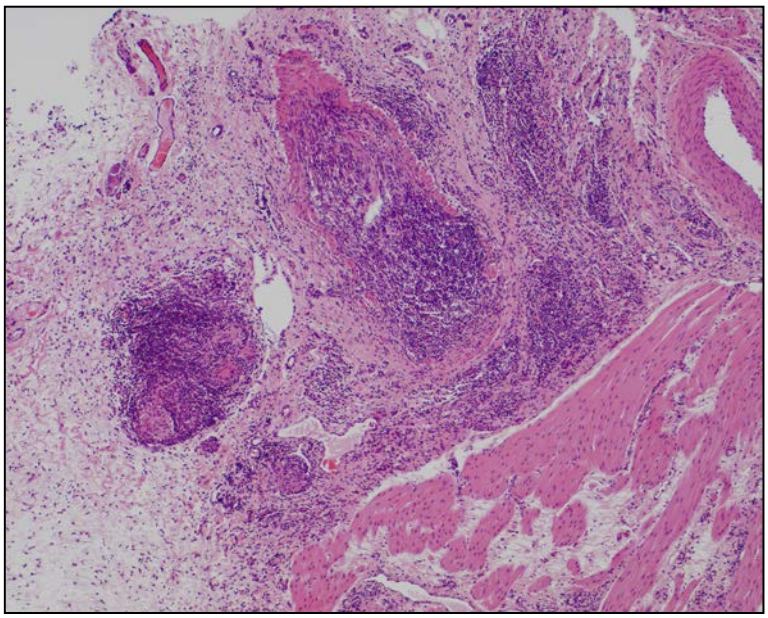


Figura IV.32. Ternero 5931. Serosa. Lesión difusa intermedia. Linfangitis granulomatosa grave, donde se observa un intenso infiltrado inflamatorio formado por abundantes linfocitos, macrófagos y células gigantes alrededor de los vasos linfáticos. HE, 40x.



Animales no vacunados e infectados

De los animales infectados que no fueron inmunizados (NVI), tres (3300, 3302 y 5956) presentaron lesión de tipo *multifocal b*, con presencia de granulomas en la lámina propia no asociada al tejido linfoide (Tabla IV.8 y 11), mientras que el ternero restante (9107), presentó una lesión de tipo difuso *linfocítico* (Tabla IV.8).

Con respecto a los animales con lesión *multifocal b*, es de destacar que en el ternero 3300 no se observaron granulomas en el tejido linfoide, presentando como única lesión escasos y pequeños granulomas en la lámina propia del YYM (Figura IV.33); además, y en mayor medida se observaron granulomas en todos los nódulos linfáticos examinados (Tabla IV.11).

El ternero 3302 persentaba lesiones en la lámina propia y tejido linfoide en todos los tramos de íleon y yeyuno examinados (Figura IV.34), además de en el tejido linfoide de la VIC y PPYM y en los nódulos linfáticos ileal, yeyunal caudal y yeyunales. En el ternero 5956, se observaron lesiones en la lámina propia del ILD, YYD, YYM y en la PPYP; además, en este animal se apreciaron lesiones granulomatosas en el tejido linfoide de la VIC, de todos los tramos del íleon así como en todos los nódulos lináticos (Tabla IV.11).

En cuanto a la presencia de micobacterias en las lesiones intestinales, tan solo el animal 3302 mostró BAAR en el citoplasma de los macrófagos que formaban los granulomas y las células gigantes de la lámina propia (Figura IV.35). La cantidad de BAAR oscilaba entre 1 y 20 en la misma sección, y el animal fue catalogado como “+” para esta técnica. Mediante la tinción inmunohistoquímica, se detectaba mejor la positividad, observándose inmunotinción en otras localizaciones, por lo que se clasificó como “++”. Los otros dos terneros fueron negativos.

Con respecto a los nódulos linfáticos, los granulomas, como se ha descrito anteriormente, se localizaban principalmente en la zona cortical relacionados con los senos corticales y subcapsulares y en la zona perifolicular. En estas localizaciones se observaron escasos BAAR; en el caso de los nódulos linfáticos ileocecales del animal 3300 se apreció un bacilo en una de sus secciones, y en los nódulos linfáticos ileales y yeyunales caudales del animal 3302 se observaron de 3 a 20 BAAR; en ambos casos se valoró como “+” a esta técnica. En el animal 5956, aunque es el que presentaba mayor

lesión en los nódulos linfáticos, no se observaron BAAR mediante la técnica de ZN en ninguno de ellos. La inmunotinción frente a *Map* fue débil ("+") en el caso del animal 3300, moderada ("++") en el 3302y nula ("0") en el 5956.

Figura IV.33. Ternero 3300. Lámina propia. Lesión multifocal b. Células gigantes, rodeadas de abundantes linfocitos, en el ápice de las vellosidades intestinales. HE, 100x.

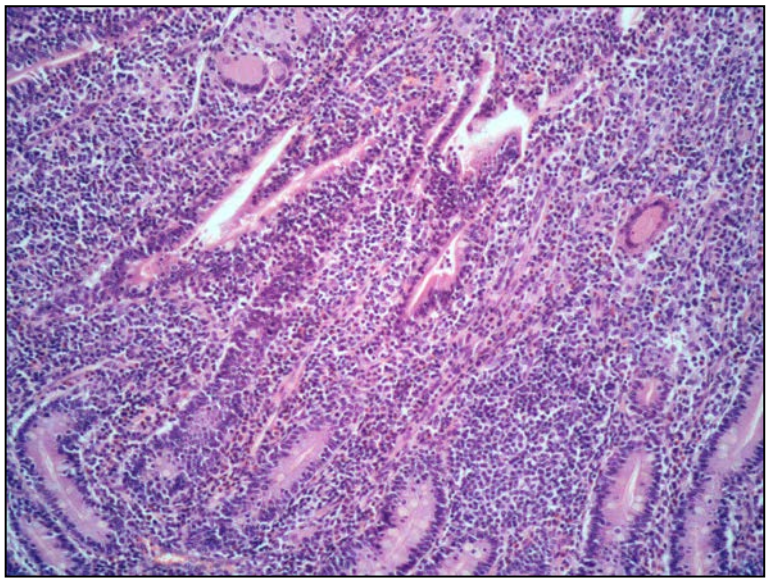


Figura IV 34. Ternero 3302. Lámina propia. Lesión multifocal b. Engrosamiento focal de las vellosidades intestinales, debido a un incremento del número de linfocitos, con presencia de células gigantes, en una zona de yeyuno sin tejido linfoide. HE, 100x.

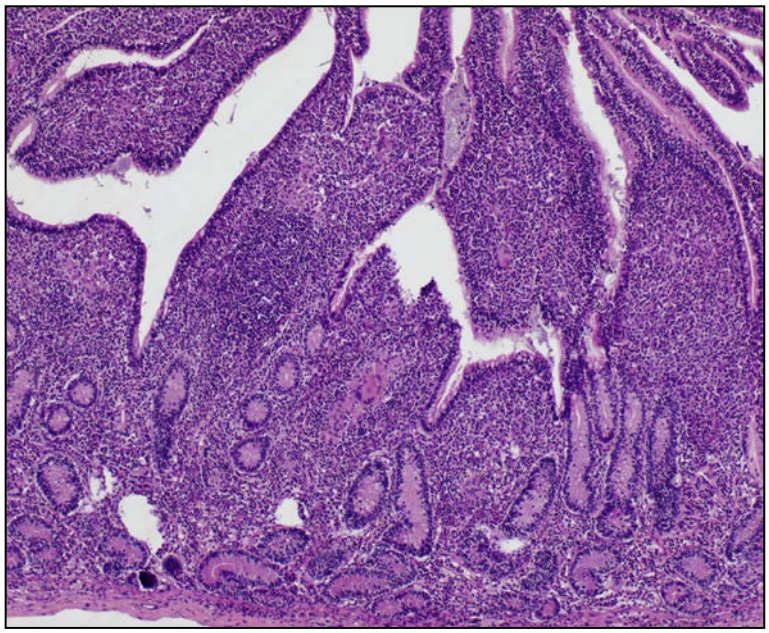
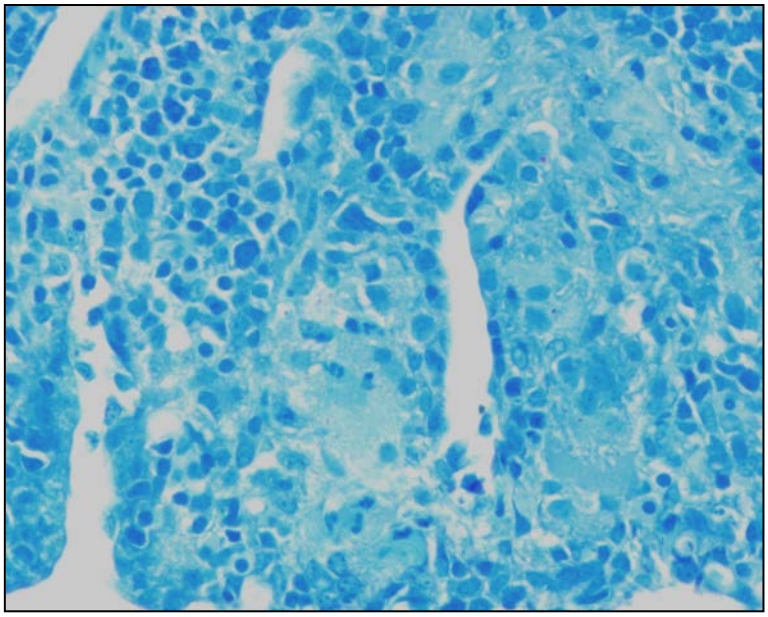


Figura IV 35. Ternero 3302. Lámina propia. Lesión multifocal b. Granulomas con escasos BAAR (+), en la lámina propia del yeyuno. ZN, 200x.



El otro animal de este grupo (9107) mostró una lesión de tipo *difuso linfocítico*. Todas las secciones, sin excepción, tanto aquellas de intestino como las de nódulos linfáticos mostraron lesiones compatibles con la infección por *Map*, caracterizadas por infiltrado celular intenso localizado en la lámina propia que afectaba a la mayoría de las vellosidades de cada sección, provocando su engrosamiento y formado principalmente por linfocitos y células gigantes aisladas o en grupos, junto con un escaso número de células epitelioides, localizadas (Figura IV.36) en el ápice de las vellosidades. También se observaron lesiones granulomatosas en todas las localizaciones con tejido linfoide La serosa apenas se encontraba afectada, observándose linfangitis leves formadas por linfocitos y algún macrófago, de localización focal, y esporádicamente émbolos de estas células en la luz de los vasos mencionados, sin detectarse BAAR. En la mayoría de las secciones tan solo se pudieron observar BAAR en muy bajo número, apareciendo de forma esporádica, en las células gigantes. Por ello, el animal se clasificó como "+", tanto mediante la técnica de ZN como inmunohistoquímica (Figura IV.37).

Los nódulos linfáticos mostraron una gran cantidad de granulomas localizados tanto en la región cortical como en la paracortical, que aunque eran muy numerosos se encontraban bien diferenciados y con características similares a los ya descritos (Figura IV.38). La presencia de BAAR en ellos era variable, pero en general aparecían en baja cantidad (Figura IV.39).

Figura IV 36. Ternero 9107. Lámina propia. Lesión de tipo *difuso linfocítico*. Infiltrado celular intenso en la lámina propia que afectaba a la mayoría de las vellosidades de cada sección, provocando su engrosamiento y formado principalmente por linfocitos y células gigantes aisladas o en grupos, junto con un escaso número de células epitelioides en el ápice de las vellosidades. HE, 100x.

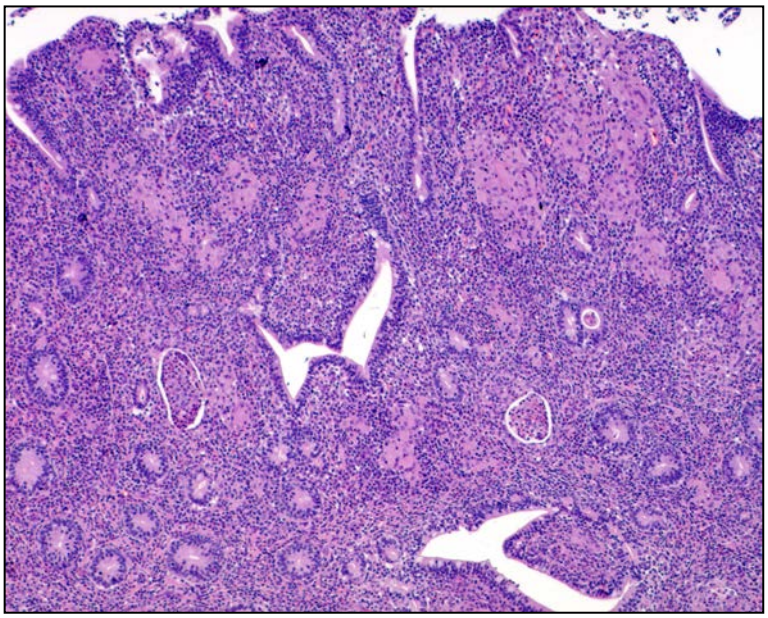


Figura IV 37. Ternero 9107. Lámina propia. Presencia de BAAR en número muy bajo (+) en las células gigantes que forman el granuloma. ZN, 400x.

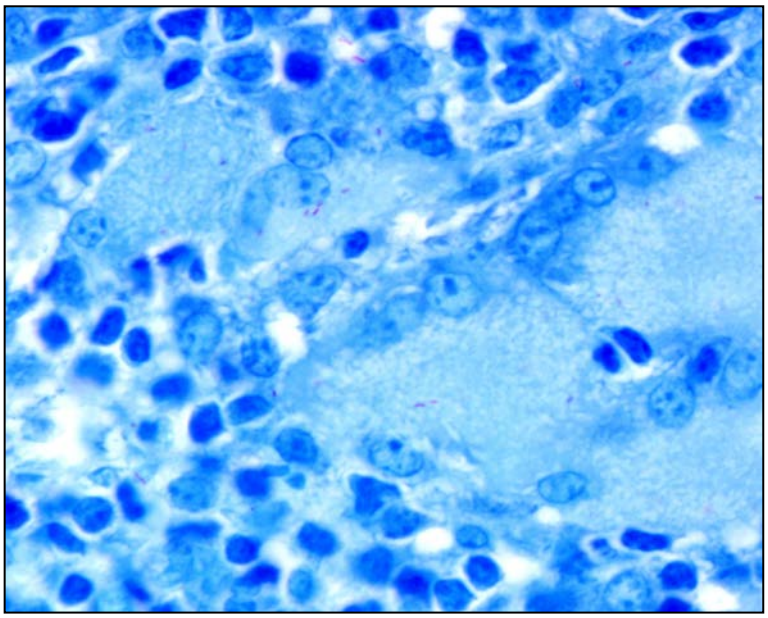


Figura IV 38. Ternero 9107. Nódulo linfático. Lesión de tipo *difuso linfocítico*. Varios granulomas bien diferenciados y células gigantes, localizados tanto en la región cortical como en la paracortical. HE, 100x.

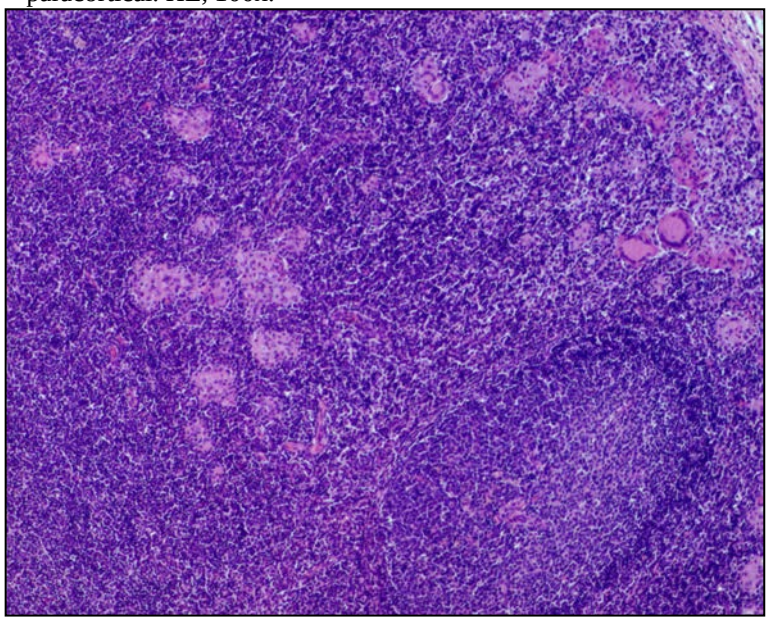


Figura IV 39. Ternero 9107. Nódulo linfático. Lesión de tipo *difuso linfocítico*. Presencia de BAAR en baja cantidad en el citoplasma de los macrófagos que forman un granuloma. HE, 400x.

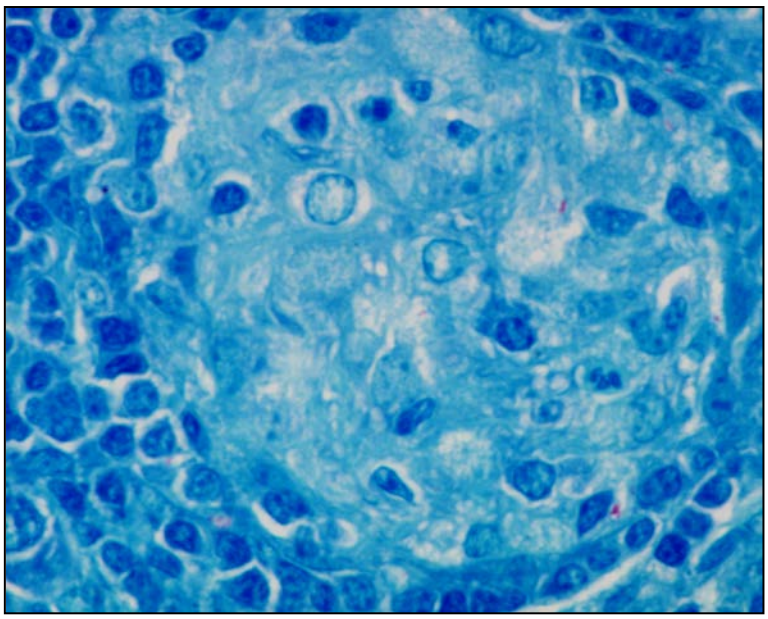


Tabla IV.8. Clasificación de los animales sacrifiados a los 330 dpv en función del tipo de lesión, y valoración de las pruebas de ZN e IHQ

		Clasificación	
Identificación	**Tipo de lesión**	**ZN**	**IHQ**
Animales vacunados e infectados			
3301	Focal	+	+
5931	Difusa intermedia	+++	+++
7930	Focal	0	0
9109	Focal	+	+
Animales no vacunados e infectados			
3300	Multifocal b	+	+
3302	Multifocal b	+	++
5956	Multifocal b	0	0
9107	Difusa linfocítica	+	+

ZN: Tinción de Ziehl-Neelsen. IHQ: tinción inmunohistoquímica frente a *Map.* 0: ausencia de BAAR. +: escasa tinción; ++: tinción de intensidad moderada.

Al tener en cuenta los sacrificios, se aprecia que en todos los grupos infectados la gravedad de las lesiones aumenta con el tiempo, incrementándose el número de animales con lesiones y siendo éstas más extensas a los 330 dpv (Tablas IV.7 y 8). Al comparar los dos grupos de animales infectados, se observa que la categorización de las lesiones en los no vacunados (NVI) es más grave que en los vacunados (VI) en los dos momentos del sacrificio, ya que a los 180 dpv hay dos terneros sin lesiones en el gurpo VI, mientras que todos las tenían en el grupo NVI, y a los 330 dpv, a pesar de que un ternero del grupo VI mostró una lesión *difusa*, en el resto de animales la lesión fue *focal* o no se encontró, mientras que todos los terneros del grupo NVI presentaban lesiones de carácter más grave (*multifocales b* y *difusas*).

IV.2.1.2.3. Recuento del número de granulomas

Para valorar la gravedad y extensión de las lesiones, además de clasificarlas, se procedió al recuento de los granulomas presentes en las tres secciones de cada localización estudiada, tal y como se ha explicado en el capítulo de material y métodos.

En las tablas IV.9 a 14, y en las gráficas IV.11 a 18, se expresan los resultados de dicho recuento por cada localización examinada (como la media de las tres muestras valoradas), animal y momento del sacrificio.

Como se ha indicado, en ambos grupos control (VNI y NVNI) no se observaron lesiones, por lo que se analizarán y compararán los datos de los otros dos grupos, donde sí se encontraron lesiones.

Sacrificio a los 180 días post-vacunación (120 días post infección)

Como se observa en la tabla IV.9, en el grupo **VI** únicamente el ternero 3303 presentaba 2 granulomas, localizados únicamente en el tejido linfoide de la PPYM. Sin embargo, los dos animales del grupo **NVI** sacrificados en esta fecha presentaban lesiones granulomatosas en mayor número que en el grupo anterior (tablas IV.9 y IV.10), observándose en zonas de lámina propia desprovistas de tejido linfoide.

En la gráfica IV.11 y tabla IV.10 se muestra el número medio de granulomas por animal en los terneros sacrificados a los 180 dpv. Se puede apreciar que la cantidad de granulomas era significativamente mayor ($p<0,001$) en los terneros del grupo **NVI** (46,6 $\pm$ 16,96) que en los del grupo **VI** (0,67 $\pm$ 1,15).

Tabla IV.9. Número medio de granulomas por sección en los diferentes tejidos intestinales y nódulos linfáticos examinados de los animales sacrificados a los 180 dpv (continúa).

	Recuento de granulomas en tejidos										
	VIC		Íleon						Yeyuno sin placa de Peyer		
			Tejido linfoide			Lámina Propia					
Identificación	**T.L**	**L.P**	**D**	**M**	**P**	**D**	**M**	**P**	**D**	**M**	**P**
Animales vacunados e infectados a los 60 dpv											
3303	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5953	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9108	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Media	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**
Animales no vacunados e infectados a los 60 dpv											
5933	**0**	**0**	**1,33**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0,33**	**1,33**
7460	**4**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**
Media	**2**	**0**	**0,67**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0,17**	**0,67**

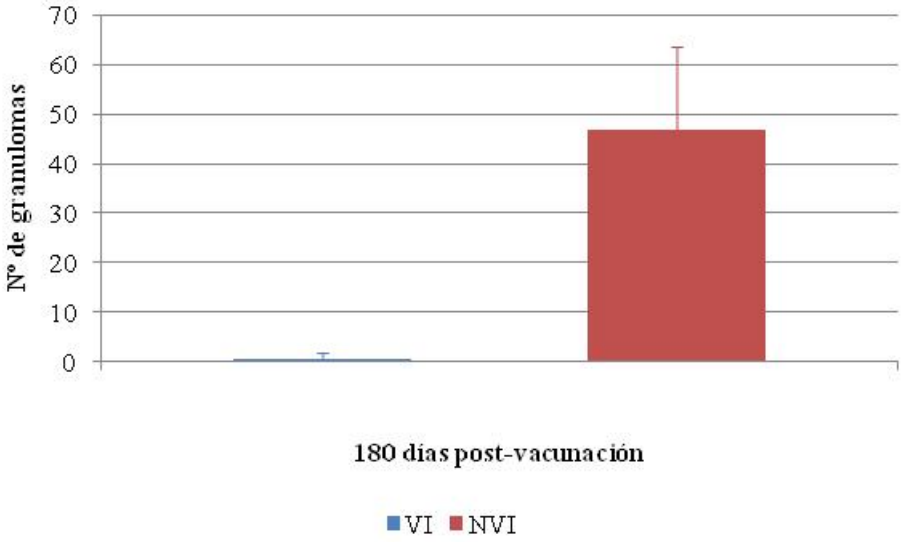
VIC: Válvula ileocecal; T.L.: tejido linfoide; LP: lámina propia; D: distal; M: medio; P:proximal; Ic: ileocecal; I: ileal; Yc: yeyunal caudal; Yy: yeyunales

Tabla IV.9. Número medio de granulomas por sección en los diferentes tejidos intestinales y nódulos linfáticos examinados de los animales sacrificados a los 180 dpv (continuación).

	Recuento de granulomas en tejidos									
	Placa de Peyer yeyunales						Nódulos linfáticos			
	Tejido linfoide			Lámina propia						
Identificación	**D**	**M**	**P**	**D**	**M**	**P**	**Ic**	**I**	**Yc**	**Yy**
Animales vacunados e infectados a los 60 dpv										
3303	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0
5953	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9108	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Media	**0**	**0,67**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**
Animales no vacunados e infectados a los 60 dpv										
5933	0	18,33	9,67	0	14,33	6,67	4,33	1,33	0	1
7460	14	14	0	0	0	0	0	0,67	2	0
Media	**7**	**16,17**	**4,84**	**0**	**7,17**	**3,34**	**2,17**	**1**	**1**	**0,5**

VIC: Válvula ileocecal; T.L.: tejido linfoide; L.P: lámina propia; D: distal; M: medio; P: proximal; Ic: ileocecal; I: ileal; Yc: yeyunal caudal; Yy: yeyunales

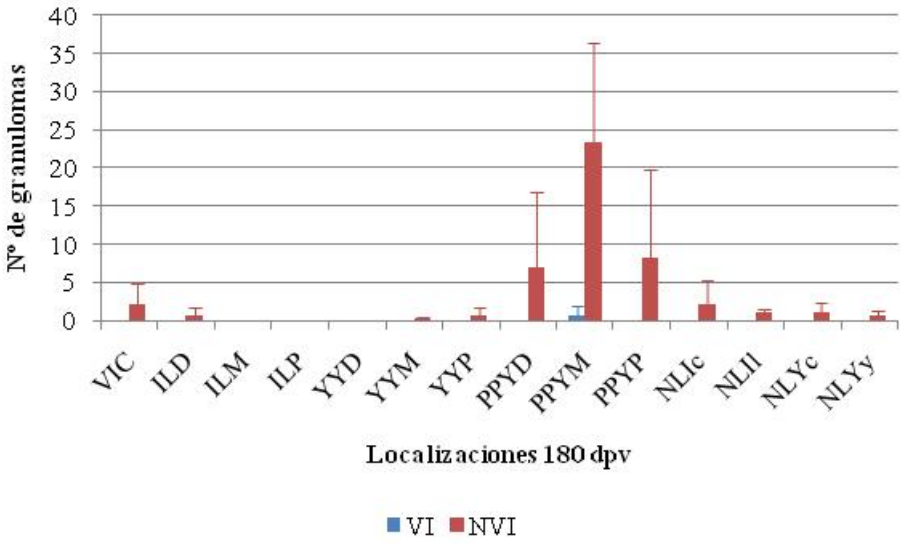
Gráfica IV.11. Número total de granulomas por animal en el sacrificio a los 180 días post vacunación.



VI: vacunado e infectado; NVI: no vacunado e infectado. (Barras de error: desviación estándar).

En la gráfica IV.12 se muestra la distribución media del número de granulomas por animal en función de las distintas localizaciones examinadas, incluyendo todos los granulomas independientemente de su presencia en el tejido linfoide o en la lámina propia. Se observa que la localización donde aparecen las lesiones con más frecuencia es la PPYM (p<0,001), que en los terneros del grupo VI es la única muestra donde se encontraron granulomas (0,67) y en los animales del grupo NVI fue donde aparecieron más frecuentemente (23,33). En este último grupo también destaca el resto de placas de Peyer yeyunales y la válvula ileocecal, frente a las muestras de íleon, donde únicamente se encontraron granulomas en el ILD. Respecto a los nódulos linfáticos, el número de lesiones fue inferior al de cualquiera de las PPY, no encontrándose diferencias significativas entre ellos. Cuando se comparan los dos grupos, hay un mayor número de granulomas (p<0,001) en los terneros del grupo NVI frente a los del grupo VI en todas las localizaciones.

Gráfica IV.12. Número medio de granulomas por localización y animal en los terneros sacrificados a los 180 días post-vacunación.



VIC: válvula ileocecal; ILD:íleon distal; ILM: íleon medio; ILP: íleon proximal; YYD: yeyuno distal; YYM: yeyuno medio; YYP: yeyuno proximal; PPYD: placa de Peyer yeyuna distal; PPYM: placa de Peyer yeyuna media; PPYP: placa de Peyer yeyual proximal; NL: nódulo linfático; Ic: ileocecal; Il: ileal; Yc: yeyunal caudal; Yy: yeyunales.

En la tabla IV.10 y gráfica IV.13 se muestra la distribución de los granulomas según su presencia en zonas de tejido linfoide, lámina propia asociada o no al tejido linfoide intestinal y nódulos linfáticos, independientemente de la localización. Se observa que el número mayor de granulomas aparece, en ambos grupos, en el tejido

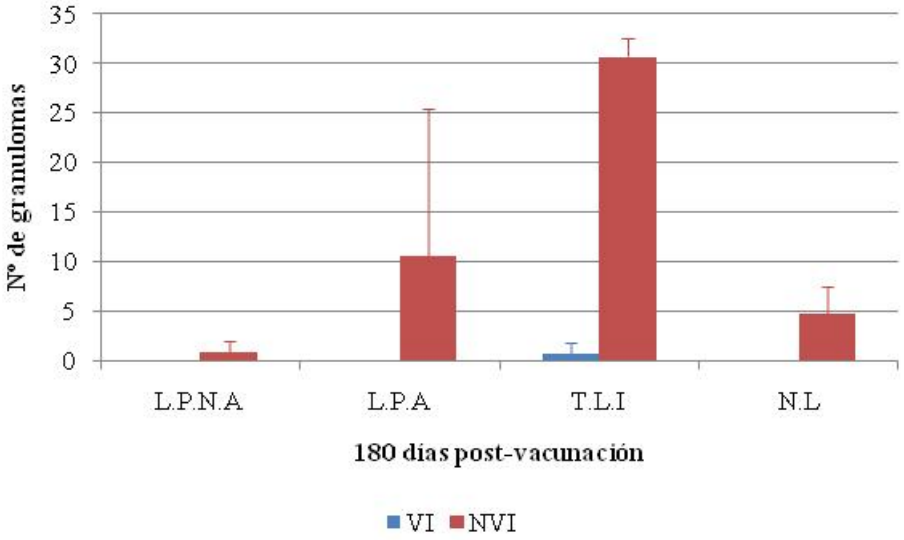
linfoide intestinal (p<0,001), seguido de la lámina propia asociada al mismo y los nódulos linfáticos. El menor número se encontró en las zonas de lámina propia intestinal sin tejido linfoide. En todas las localizaciones apareció un mayor número de granulomas en los terneros del grupo NVI (p<0,001) respecto al VI.

Tabla IV.10. Número total y medio de los granulomas encontrados en la lámina propia asociada y no asociada al tejido linfoide intestinal, tejido linfoide intestinal y nódulos linfáticos en los animales animales sacrificados a los 180 días post-vacunación.

Identificación	LP no asociada a T.L	LP asociada a T.L	Tejido linfoide intestinal	Nódulos linfáticos	Total
Animales vacunados e infectados					
3303	0	0	2	0	2
5953	0	0	0	0	0
9108	0	0	0	0	0
Media	**0**	**0**	**0,67**	**0**	**0,67**
Animales no vacunados e infectados					
5933	1,66	21	29,33	6,66	58,65
7460	0	0	32	2,67	34,67
Media	**0,83**	**10,5**	**30,67**	**4,67**	**46,66**

L.P: lámina propia; T.L: tejido linfoide.

Gráfica IV.13. Valor medio del número de los granulomas en la lámina propia asociada y no asociada a tejido linfoide intestinal, tejido linfoide intestinal y nódulos linfáticos en los animales animales sacrificados a los 180 días post-vacunación.



LP.N.A: lámina propia no asociada a tejido linfoide; LP.A: lámina propia asociada a tejido linfoide; T.L.I: tejido linfoide intestinal; N.L: nódulo linfático. (Barras de error: desviación estándar).

Sacrificio a los 330 días post-vacunación (270 días post infección)

El recuento de lesiones halladas en los terneros de los grupos VI y NVI sacrificados a los 330 dpv según la zona de tejido examinada, se muestra en la tabla IV.11. En la tabla IV.12 además figura el número total de granulomas que mostraba cada animal, que se muestra también en la gráfica IV.14.

En todos los terneros del grupo **VI** se pudieron encontrar granulomas, con diferencias en su número entre los animales. Los valores totales por animal fueron bajos, oscilando entre 2 y 52 granulomas, excepto para el ternero 5931 que mostraba una lesión *difusa*, donde se llegaron a contabilizar 1287 granulomas. Excepto en este último caso, en el que se observaban granulomas en todas las localizaciones estudiadas, en el resto estaban restringidos al tejido linfoide del yeyuno, válvula ileocecal y nódulos linfáticos.

En cuanto al grupo **NVI**, el número de granulomas encontrados por animal (sumando los que aparecían en cada localización, calculando para cada una la media de todas las muestres examinadas) fue mayor, oscilando entre 10,33 en el ternero 3300 y

los 1794,33 del animal 9107, que presentaba una lesión *difusa*. En los animales de este grupo (Tabla IV.11) los granulomas aparecían, además de en tejido linfoide, en la lámina propia asociada o no al mismo. Como ya se ha señalado antes, es de destacar que el ternero 3300 presentaba granulomas en muestras de yeyuno sin placa de Peyer y en nódulos linfáticos, pero no en áreas de tejido linfoide intestinal.

Tabla IV.11. Número medio de granulomas por sección en los diferentes tejidos intestinales y nódulos linfáticos examinados de los animales sacrificados a los 330 dpv (continúa).

	Recuento de granulomas en tejidos										
	VIC		Íleon						Yeyuno sin placa de Peyer		
			Tejido linfoide			Lámina propia					
Identificación	**T.L**	**L.P**	**D**	**M**	**P**	**D**	**M**	**P**	**D**	**M**	**P**
Animales vacunados e infectados a los 60 dpv											
3301	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5931	48	12	125	125	125	75	75	75	17	12	0
7930	12,67	0	0	0	5	0	0	0	0	0	0
9109	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Media	**15,17**	**3**	**31,25**	**31,25**	**32,5**	**18,75**	**18,75**	**18,75**	**4,25**	**3**	**0**
Media sin 5931	**4,22**	**0**	**0**	**0**	**1,67**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**
Animales no vacunados e infectados a los 60 dpv											
3300	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,67	0
3302	4	0	24,67	24,33	84	22,67	13,33	46	7,67	64	1
5956	2	0	18	6	5,67	7	0	0	0,67	0,33	0
9107	17,67	32,33	125	125	125	75	75	75	18	58	14
Media	**5,92**	**8,08**	**41,92**	**38,83**	**53,67**	**26,17**	**22,08**	**30,25**	**6,58**	**30,75**	**3,75**

VIC: Válvula ileocecal; T.L: tejido linfoide; LP: lámina propia; D: distal; M: medio; P:proximal; Ic: ileocecal; I: ileal; Yc: yeyunal caudal; Yy: yeyunales.

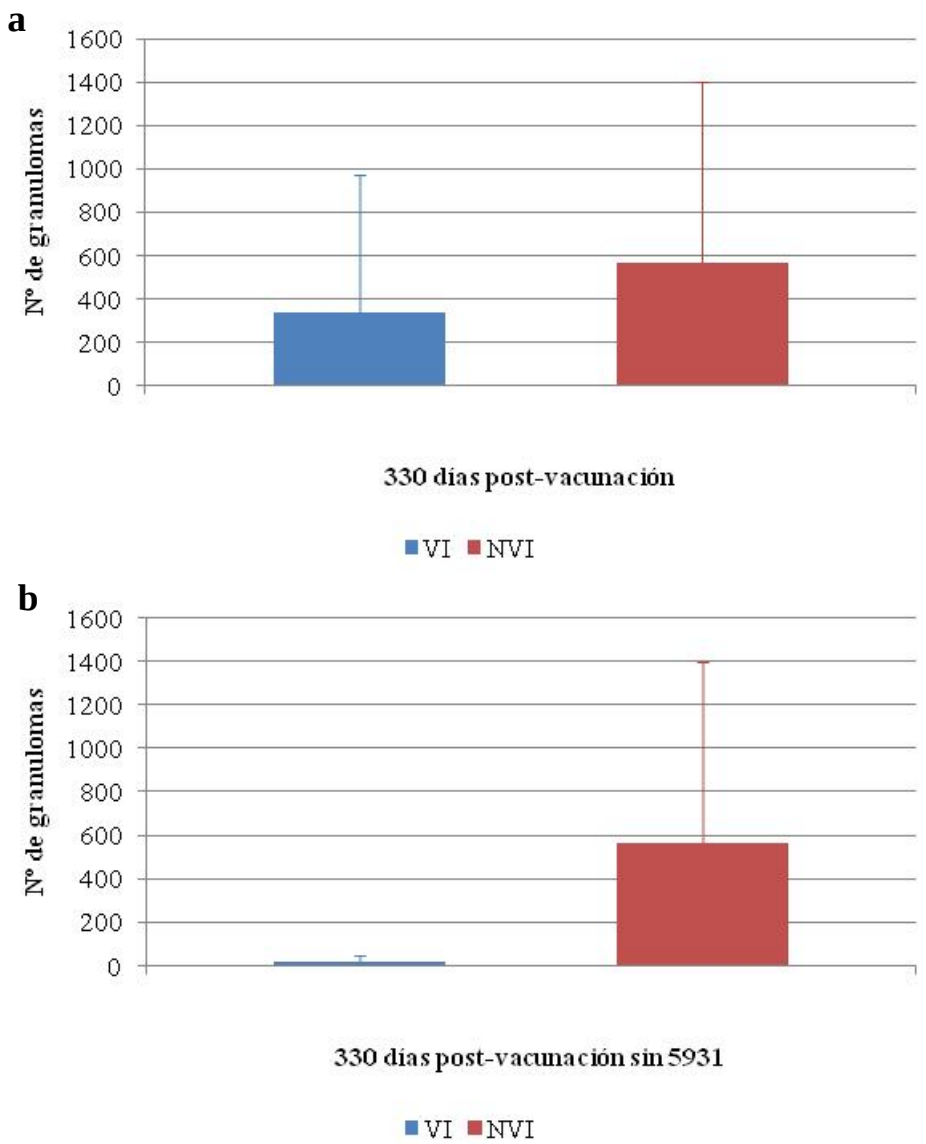
Tabla IV.11. Número medio de granulomas por sección en los diferentes tejidos intestinales y nódulos linfáticos examinados de los animales sacrificados a los 330 dpv (continuación).

	Recuento de granulomas en tejidos									
	Placa de Peyer yeyunal						Nódulos linfáticos			
	Tejido linfoide			Lámina propia						
Identificación	**D**	**M**	**P**	**D**	**M**	**P**	**Ic**	**I**	**Yc**	**Yy**
Animales vacunados e infectados a los 60 dpv										
3301	1,67	0	0	0	0	0	0	-	0,33	0
5931	125	125	0	75	75	0	46	43	109	-
7930	1,67	12,33	0,67	0	0	0	1,33	2,33	10,67	5,33
9109	0	1,67	0	0	0	0	0	4,67	1	0
Media	**32,09**	**34,75**	**0,17**	**18,75**	**18,75**	**0**	**11,84**	**16,67**	**30,25**	**1,78**
Media sin 5931	**1,11**	**4,67**	**0,22**	**0**	**0**	**0**	**0,44**	**3,5**	**4**	**1,78**
Animales no vacunados e infectados a los 60 dpv										
3300	0	0	0	0	0	0	5,33	0,33	2,33	1,67
3302	14	20,67	0	18,33	11,67	0	0	2,33	4,33	3,33
5956	0	0	0	0	0	1	21	20,67	1	6
9107	125	125	16	75	75	10	200	200	175	53,33
Media	**34,75**	**36,42**	**4**	**23,33**	**21,67**	**2,75**	**56,58**	**55,83**	**45,67**	**16,08**

VIC: Válvula ileocecal; T.l.: tejido linfoide; LP: lámina propia; D: distal; M: medio; P:proximal; Ic: ileocecal; I: ileal; Yc: yeyunal caudal; Yy: yeyunales.

Al comparar los resultados del recuento en ambos grupos a los 330 dpv, se puede observar una diferencia estadísticamente significativa ($p<0,001$) entre el número de granulomas del grupo NVI (565,08 $\pm$ 833,59) y del VI (337,09 $\pm$ 633,67). Esta diferencia sería aún más evidente si se eliminaran los datos del ternero 5931 (20,45 frente a 565,08).

Gráfica IV.14. Número total de granulomas por animal en el sacrificio a los 330 días post vacunación, considerando todos los terneros del estudio (a) o eliminando el animal 5931 (b).



VI: vacunado e infectado; NVI: no vacunado e infectado. (Barras de error: desviación estándar).

En la gráfica IV.15 se muestra la distribución de los granulomas en cada una de las localizaciones examinadas en el intestino y en los nódulos linfáticos, tanto incluyendo (Gráfica IV.15a) como eliminando (Gráfica IV.15b) al ternero 5931 del gurpo VI. Se observa que en los terneros del grupo NVI aparecen granulomas en todas las muestras examinadas, mientras que en el grupo VI no se observan en el YYP. Si no

se tiene en cuenta al ternero 5931, se verían libres de lesión todas las secciones de yeyuno así como las de ILD e ILM.

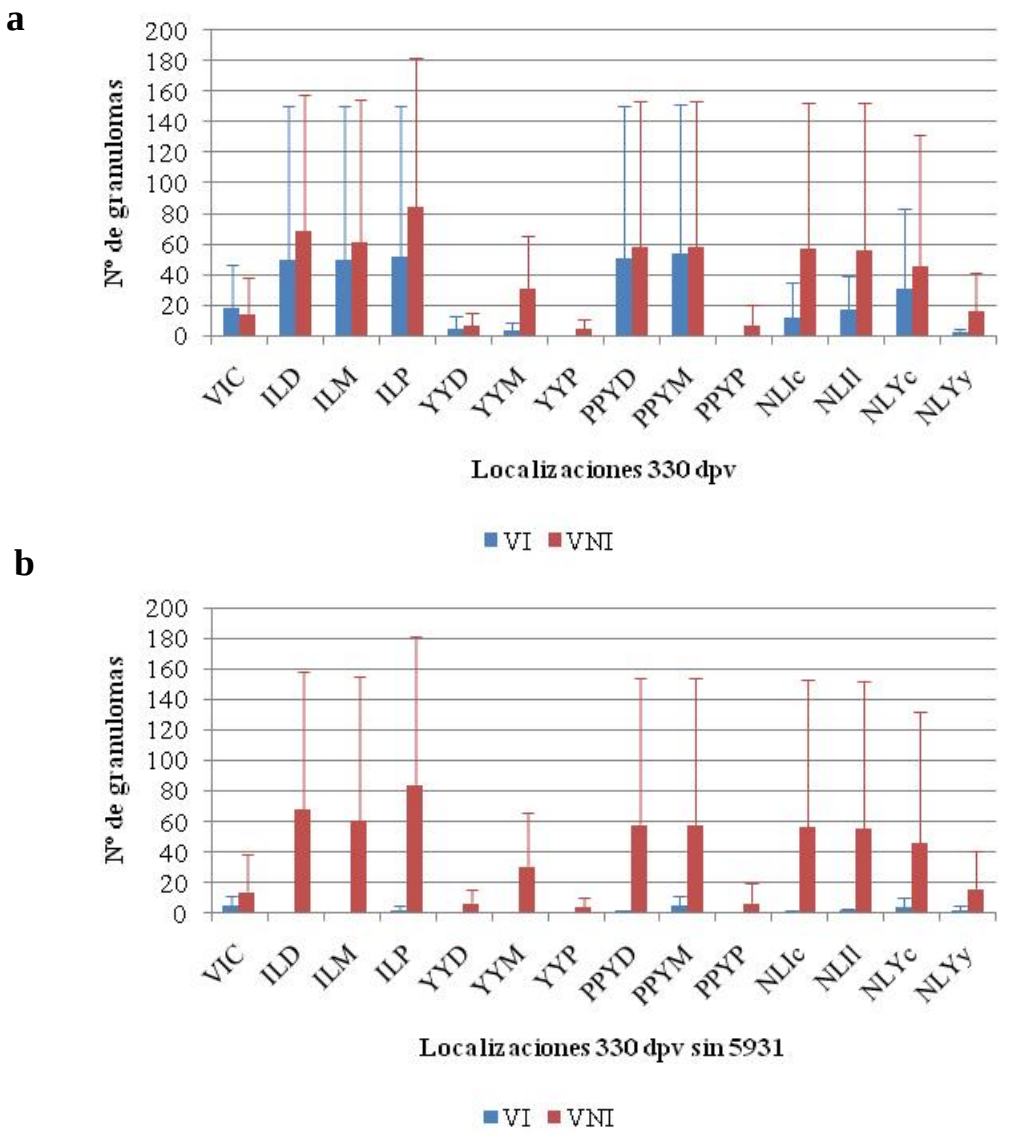
Se puede apreciar que en los animales sacrificados a los 330 dpv, tanto en el grupo VI como NVI, las localizaciones intestinales más afectadas son las muestras de íleon y las placas de Peyer yeyunales (proximales y medias), sin observarse diferencias significativas entre dichas localizaciones excepto para el ILP, que presenta un número mayor de granulomas ($p<0,05$) que las placas de Peyer yeyunales. La válvula ileocecal presenta un número menor de granulomas que el resto de zonas.

En cuanto a los nódulos linfáticos, no se observan diferencias significativas entre estas localizaciones y el íleon o PPYP, PPYM, excepto para el NL yeyunal, que presenta una cantidad menor ($p<0,05$) de granulomas.

Es de destacar la cantidad significativamente más elevada ($p<0,05$) de granulomas encontrada en las muestras de yeyuno sin placa de Peyer, especialmente en YYM, en los animales no vacunados frente a los vacunados, diferencia mucho más manifiesta si se eliminan los datos del ternero 5931. En cualquier caso, el número de granulomas en esta localización es siempre inferior ($p<0,05$) al encontrado en áreas de intestino con tejido linfoide (VIC, íleon o placas de Peyer yeyunales).

Respecto a la comparación entre ambos grupos, se observa que el número de granulomas es siempre superior en los terneros del grupo NVI ($p<0,05$), si bien las diferencias no son significativas en las muestras de PPYM y PPYD, y son más marcadas en los nódulos linfáticos ($p<0,001$), especialmente el ileal. Si se prescinde del ternero 5931, las diferencias son muy significativas ($p<0,001$) en todas las localizaciones.

Gráfica IV.15. Número medio de granulomas por localización y animal en los terneros sacrificados a los 330 días post-vacunación, incluyendo a todos los animales (a) o eliminando los datos del ternero 5931 (b).



VIC: válvula ileocecal; ILD:íleon distal; ILM: íleon medio; ILP: íleon proximal; YYD: yeyuno distal; YYM: yeyuno medio; YYP: yeyuno proximal; PPYD: placa de Peyer yeyunal distal; PPYM: placa de Peyer yeyunal media; PPYP: placa de Peyer yeyunal proximal; NL: nódulo linfático; Ic: ileocecal; Il: ileal; Yc: yeyunal caudal; Yy: yeyunales. (Barras de error: desviación estándar).

Al valorar la localización de las lesiones en los diferentes compartimentos tisulares del intestino (tejido linfoide y lámina propia), se observa que el número de granulomas es significativamente mayor ($p<0,05$) en todas las localizaciones en los animales no vacunados que en los vacunados, como se refleja en la tabla IV.12; y en la gráfica IV.16a, b. Las mayores diferencias se encuentran en la lámina propia no asociada a la placa de Peyer, en la que el grupo NVI, supera más de 5,5 veces al grupo VI, seguido de los nódulos linfáticos (más de 3 veces superior) y lámina propia asociada a tejido linfoide y tejido linfoide intestinal (1,39 y 1,21 veces mayor respectivamente).

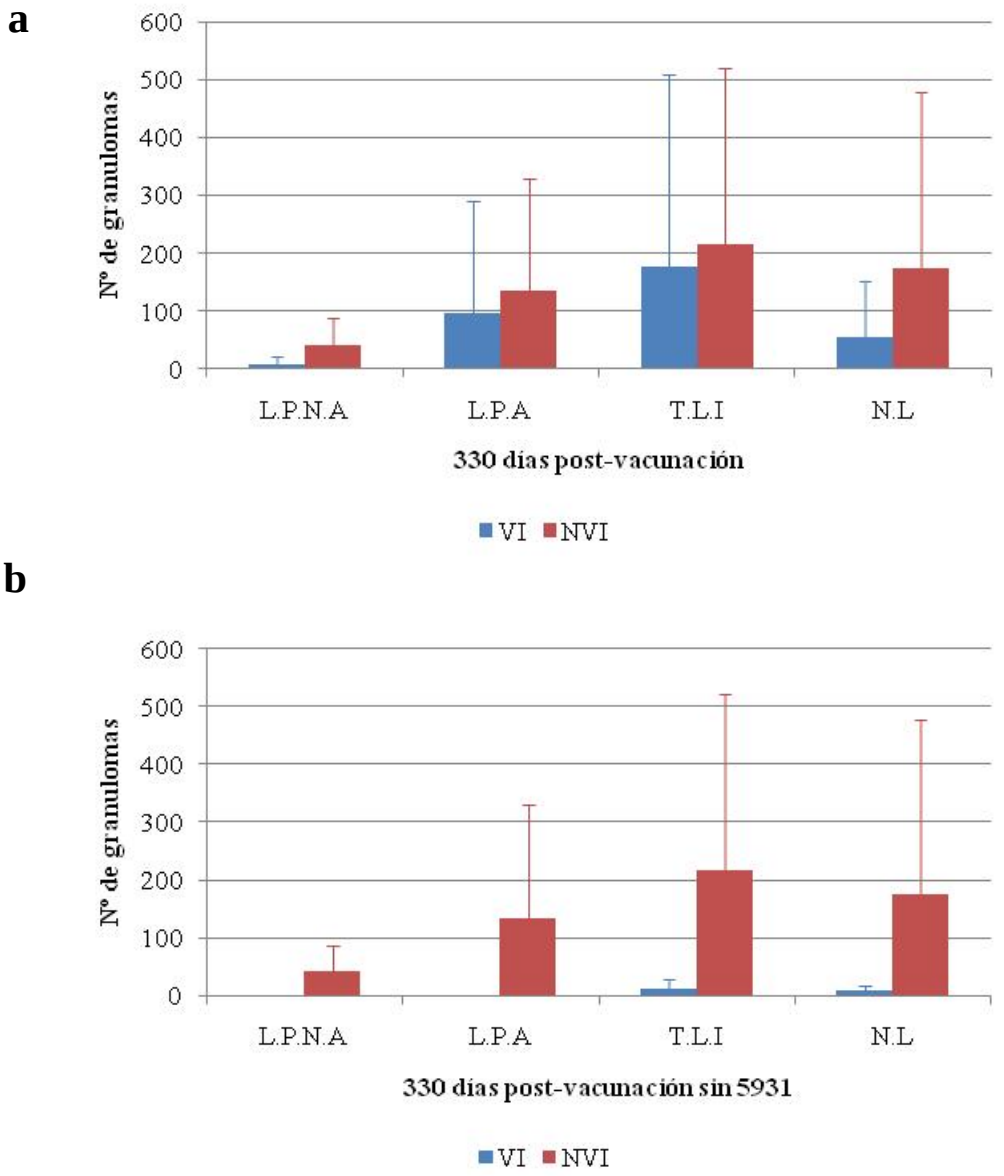
Si no se tuviera en cuenta al animal 5931 del grupo VI, estas diferencias serían más acusadas, de forma que no existiría lesión en la lámina propia (asociada o no al tejido linfoide) y las diferencias entre las otras localizaciones se ampliarían más, superando en más de 18 veces el número de granulomas en el tejido intestinal y en más de 20 en nódulos linfáticos.

Tabla IV.12. Número total y medio de los granulomas encontrados en la lámina propia asociada y no asociada a tejido linfoide intestinal, tejido linfoide intestinal y nódulos linfáticos en los animales animales sacrificados a los 330 días post-vacunación (continúa).

Identificación	L.P no asociada a TL	L.P asociada a T.L	Tejido linfoide intestinal	Nódulos linfáticos	Total
Animales vacunados e infectados					
3301	0	0	1,67	0,33	2
5931	29	387	673	198	1287
7930	0	0	32,34	19,66	52
9109	0	0	1,67	5,67	7,34
Media	**7,25**	**96,75**	**177,17**	**55,92**	**337,09**
Media (sin 5931)	**0**	**0**	**11,89**	**8,55**	**20,45**
Animales no vacunados e infectados					
3300	0,67	0	0	9,66	10,33
3302	72,67	112	171,7	9,99	366,36
5956	1	8	31,67	48,67	89,37
9107	90	417,33	658,67	628,33	1794,33
Media	**41,09**	**134,33**	**215,51**	**174,16**	**565,08**

L.P: lámina propia; T.L.: tejido linfoide.

Gráfica IV.16. Valor medio de los granulomas por sección en lámina propia asociada y no asociada a tejido linfoide intestinal, tejido linfoide intestinal y nódulos linfáticos en los animales animales sacrificados a los 330 días post-vacunación.



L.P.A: lámina propia asociada a tejido linfoide; L.P.N.A: lámina propia no asociada a tejido linfoide; T.L.I: tejido linfoide intestinal; N.L: nódulo linfático. (Barras de error: desviación estándar).

Resultados comparativos entre los sacrificios a los 180 y 330 dpv.

Los resultados comparativos de ambos grupos en los dos sacrificios se encuentran resumidos en la tabla IV.13 y representados en la gráfica IV.17. Se observa un incremento significativo ($p<0,001$) en el número de granulomas observado a los 180 dpv y a los 330 dpv, tanto en el grupo NVI (46,66 frente a 565,08) como VI (0,67 frente a 337,09). Si se prescindiera de los datos del animal 5931 esta diferencia, aunque existe (0,67 frente a 20,45) es menor ($p<0,05$) en el lote VI.

Se observa que en los animales vacunados el incremento que se produce en el número de granulomas entre los 180 y los 330 dpv es menor, en general, que en el grupo no vacunado (aunque en ambos, este incremento es significativo -$p<0,001$-), destacando la no ausenciade lesiones en la lámina propia en el primer sacrificio, y la aparición de muchas menos que en el grupo no vacunado en el segundo sacrificio, y debiéndose todas ellas al animal 5931, con lesión difusa. También, hay diferencias significativas ($p<0,001$) en el número de granulomas en el tejido linfoide intestinal y lámina propia asociada entre los dos grupos, tanto a los 180 como a los 330 dpv, siendo siempre mayor en el grupo NVI.

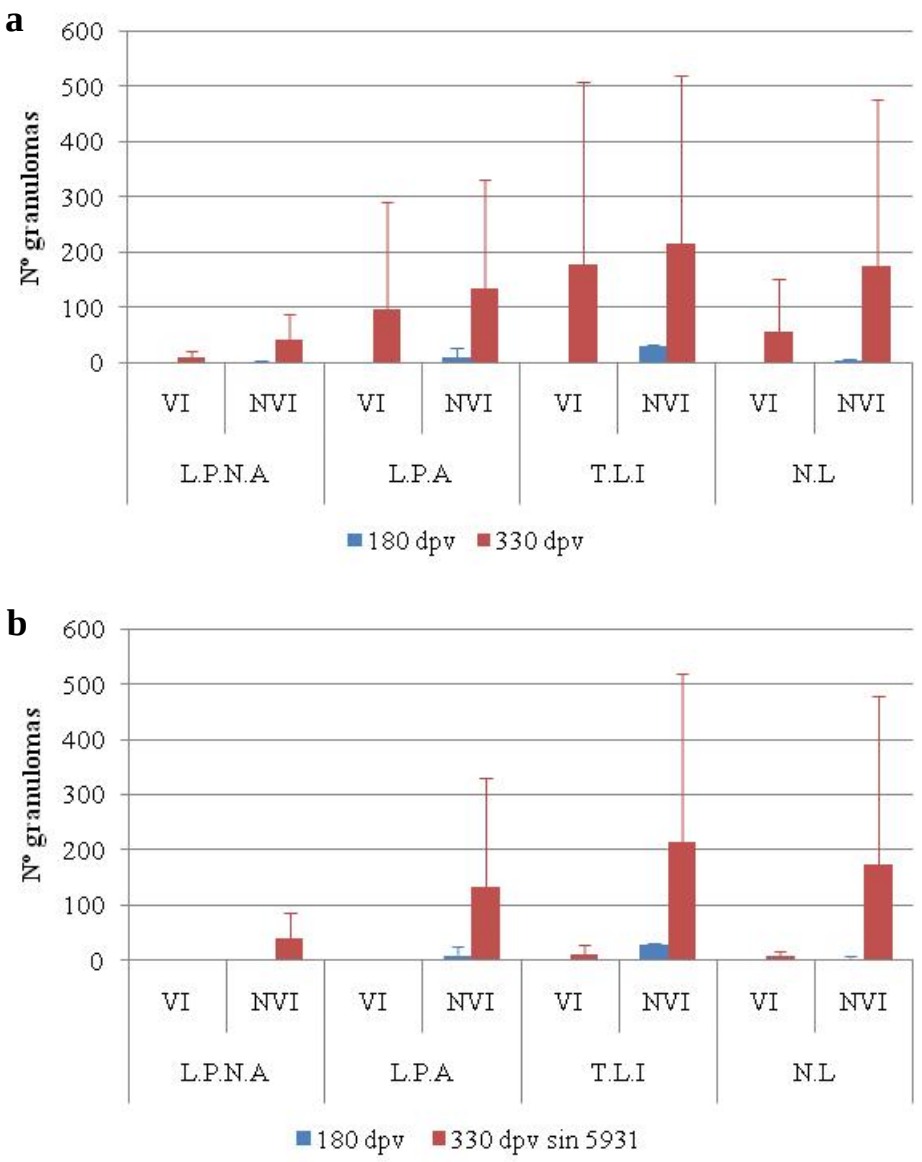
Respecto a la evolución del número de granulomas a lo largo del experimento en las distintas localizaciones (Tabla IV.13 y gráfica IV.17a,b), se observa que en los terneros del grupo NVI, a los 180 dpv ya aparecen granulomas en todas las localizaciones, incrementándose su número significativamente ($p<0,001$) en los animales sacrificados a los 330 dpv. Es de destacar que el incremento de la lesión en los nódulos linfáticos se produce en relación con el aumento de la lesión en el intestino. En el grupo VI, a los 180 dpv no se observan granulomas en ninguna muestra de lámina propia. A los 330 dpv, todas las lesiones en esta localización se deben al ternero 5931. En el resto de localizaciones se produce también un incremento significativo ($p<0,05$), pero de menor entidad que el observado en el grupo NVI.

Tabla IV.13. Número medio de granulomas por sección en lámina propia no asociada y asociada al tejido linfoide, en tejido linfoide intestinal y en nódulos linfáticos en los dos sacrificios.

	LP no asociada a T.L	LP asociada a T.L	Tejido linfoide intestinal	Nódulos linfáticos	Total
Animales vacunados e infectados					
180 dpv	**0**	**0**	**0,67**	**0,67**	**0,67**
330 dpv	**7,25**	**96,75**	**117,17**	**55,92**	**337,09**
330 dpv (sin 5931)	**0**	**0**	**17,71**	**9,98**	**27,45**
Animales no vacunados e infectados					
180 dpv	**0,83**	**10,50**	**30,67**	**4,67**	**46,66**
330 dpv	**41,09**	**134,33**	**215,51**	**174,16**	**565,09**

L.P.: lámina propia; T.L.: tejido linfoide.

Gráfica IV.17. Valor medio del número de granulomas según su distribución en la lámina propia no asociada y relacionada con el tejido linfoide, en el tejido linfoide intestinal y nódulos linfáticos en ambos sacrificios, considerando todos los animales en el grupo VI (a) o eliminando los datos del 5931 (b).



L.P.N.A: Lámina propia no asociada a tejido linfoide; L.P.A: lámina propia asociada a tejido linfoide; T.L.I.: tejido linfoide intestinal; N.L.: nódulo linfático. (Barras de error: desviación estándar).

Resultados globales

Al comparar ambos grupos, sin tener en cuenta los momentos de sacrificio (Tabla IV.14 y gráfica IV.18), en los animales del grupo NVI el total de granulomas es significativamente superior ($p<0,001$), más del doble, que en el grupo VI. Si se analizan estos datos por compartimentos, se mantienen estas diferencias ($p<0,05$) en las cuatro regiones estudiadas. Al igual que se ha observado previamente, si se eliminan los datos correspondientes al ternero 5931, estas diferencias son mucho más acusadas en todas las localizaciones, especialmente en las zonas de lámina propia.

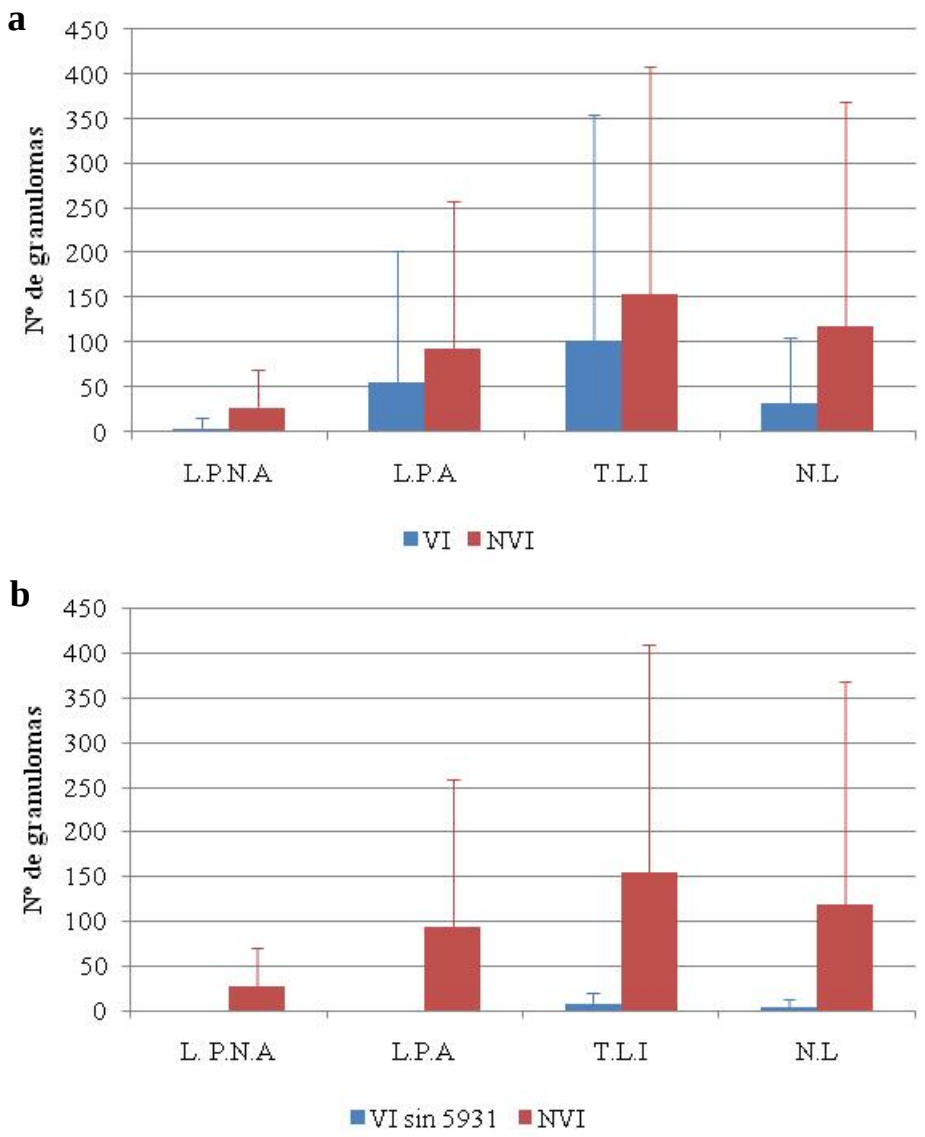
Tabla IV.14. Número medio de granulomas por sección en lámina propia no asociada y asociada al tejido linfoide, en tejido linfoide intestinal y en nódulos linfáticos los grupos vacunado e infectado y no vacunado e infectado.

	LP no asociada a T.L	LP asociada a T.L	Tejido linfoide intestinal	Nódulos linfáticos	Total
VI	**4,14**	**55,29**	**101,53**	**31,95**	**192,91**
VI sin 5931	**0**	**0**	**6,28**	**4,28**	**10,56**
NVI	**27,67**	**93,06**	**153,90**	**117,66**	**392,28**

L.P: Lámina propia; T.L.: tejido linfoide; VI: vacunado e infectado; NVI: no vacunado e infectado

Al comparar las localizaciones estudiadas entre ambos grupos se observa que en los terneros del grupo NVI el número de granulomas aparece en mayor cantidad en el tejido linfoide, seguido de los nódulos linfáticos y lámina propia asociada al tejido linfoide, sin diferencias significativas entre estas localizaciones, y en menor número en zonas de lámina propia sin tejido linfoide. Sin embargo, en el grupo VI el número de granulomas es mayor en el tejido linfoide seguido de la lámina propia asociada al mismo, con diferencias significativas respecto a los nódulos linfáticos y a la lámina propia sin relación con tejido linfoide.

Gráfica IV.18. Valor medio de los granulomas por sección en lámina propia asociada y no asociada al tejido linfoide intestinal, tejido linfoide intestinal y nódulos linfáticos en los dos grupos infectados, considerando (a) o excluyendo (b) los datos del ternero 5931.



L.P.N.A: lámina propia no asociada a tejido linfoide; L.P.A: lámina propia asociada a tejido linfoide; T.L.I.: tejido linfoide intestinal; N.L.: nódulo linfático. (Barras de error: desviación estándar).

IV.2.1.2.4.Área ocupada por las lesiones granulomatosas en los nódulos linfáticos

Con el objetivo de valorar la extensión de las lesiones, tal y como se ha explicado en el capítulo III.1.4.2.1.4 de material y métodos, en cada una de las tres secciones de cada nódulo linfático examinado (ileocecal, ileal, yeyunal caudal y yeyunal), se valoró el área ocupada por la lesión granulomatosa asociada a la infección por *Map*, que se expresó en relación con el área total del nódulo linfático, como el porcentaje de superficie lesionada en cada muestra.

Al igual que en el recuento de ganulomas, no se encontraron lesiones en los nódulos linfáticos de los grupos control (VNI, NVNI), por lo que se analizarán y compararán los datos de los otros dos lotes.

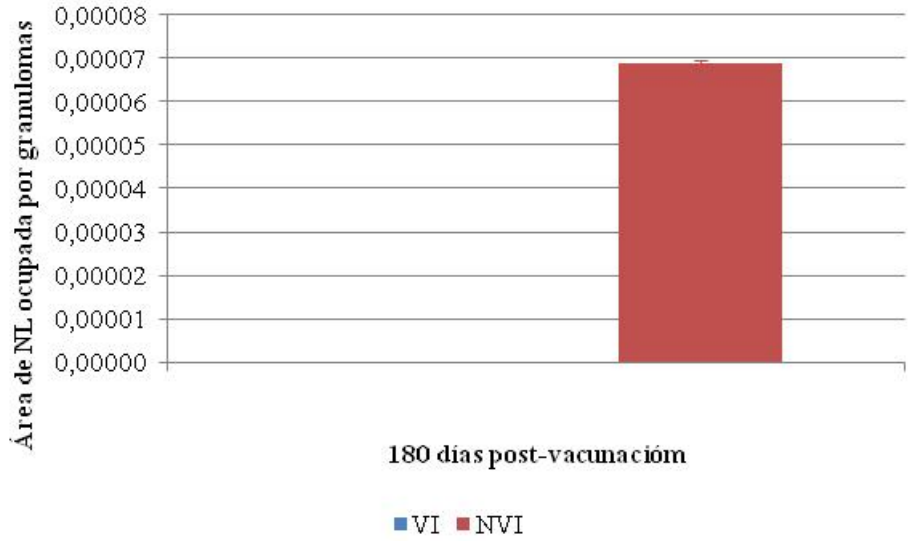
Sacrificio a los 180 días post-vacunación (120 días post infección)

En la tabla IV.15 y en la gráfica IV.19 se muestra el área ocupada por las lesiones en los nódulos linfáticos de los animales sacrificados a los 180 dpv. En este momento ninguno de los tres animales del grupo **VI** presentaba lesión en los nódulos linfáticos. Sin embargo, en los dos animales de este sacrificio que no fueron inmunizados (grupo **NVI**), se observaron lesiones paratuberculosas. Cuando se tiene en cuenta el total de superficie lesionada, las diferencias entre grupos fueron significativas ($p<0,001$).

Tabla IV.15. Área ocupada por los granulomas en los nódulos linfáticos, por animal y sección en los terneros sacrificados a los 180 dpv

Identificación	Nódulo linfático Ileocecal	Nódulo linfático Ileal	Nódulo linfático Yeyunal caudal	Nódulos linfáticos Yeyunales	Total
Animales vacunados e infectados					
3303	0,0000%	0,0000%	0,0000%	0,0000%	0,0000%
5953	0,0000%	0,0000%	0,0000%	0,0000%	0,0000%
9108	0,0000%	0,0000%	0,0000%	0,0000%	0,0000%
Media	**0,0000%**	**0,0000%**	**0,0000%**	**0,0000%**	**0,0000%**
Animales no vacunados e infectados					
5933	0,0032%	0,0151%	0,0000%	0,0090%	0,0068%
7460	0,0000%	0,0040%	0,0236%	0,0000%	0,0069%
Media	**0,0016%**	**0,0096%**	**0,0118%**	**0,0045%**	**0,0069%**

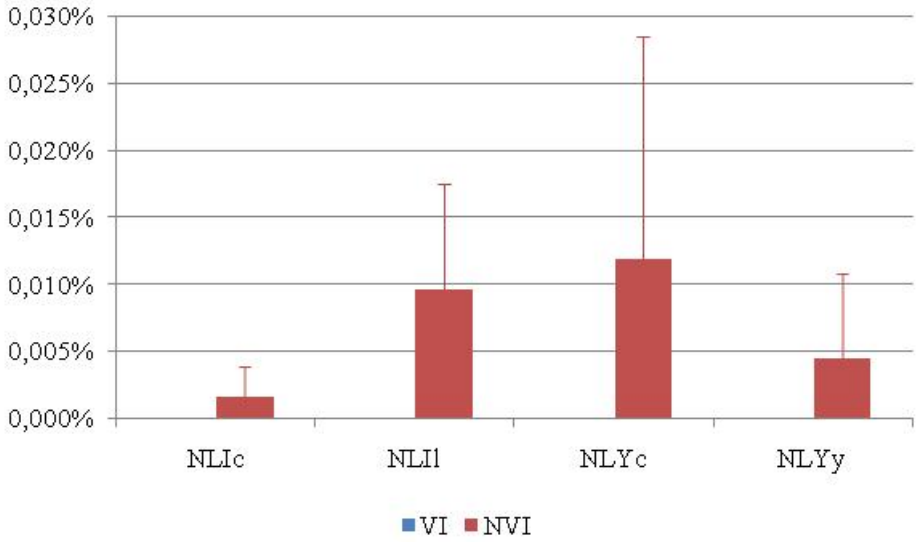
Gráfica IV.19. Área lesionada por sección y animal en el sacrificio de los 180 dpv.



VI: vacunado e infectado; NVI: no vacunado e infectado. (Barras de error: desviación estándar).

Los nódulos linfáticos con la lesión más extensa resultaron ser los yeyunales caudales, ocupando la lesión 1,23 veces más que en los ileales; 2,62 veces más que en los yeyunales y 7,38 veces más que en los ileocecales (Gráfica IV 20).

Gráfica IV.20. Área lesionada por animal en cada uno de los nódulos linfáticos examinados en los terneros sacrificados a los 180 dpv.



NLIc: nódulo linfático ileocecal; NLIl: nódulo linfático ileal; NLYc: nódulo linfático yeyunal caudal; NLYy: nódulos linfáticos yeyunales. (Barras de error: desviación estándar).

Sacrificio a los 330 días post-vacunación (270 días post infección)

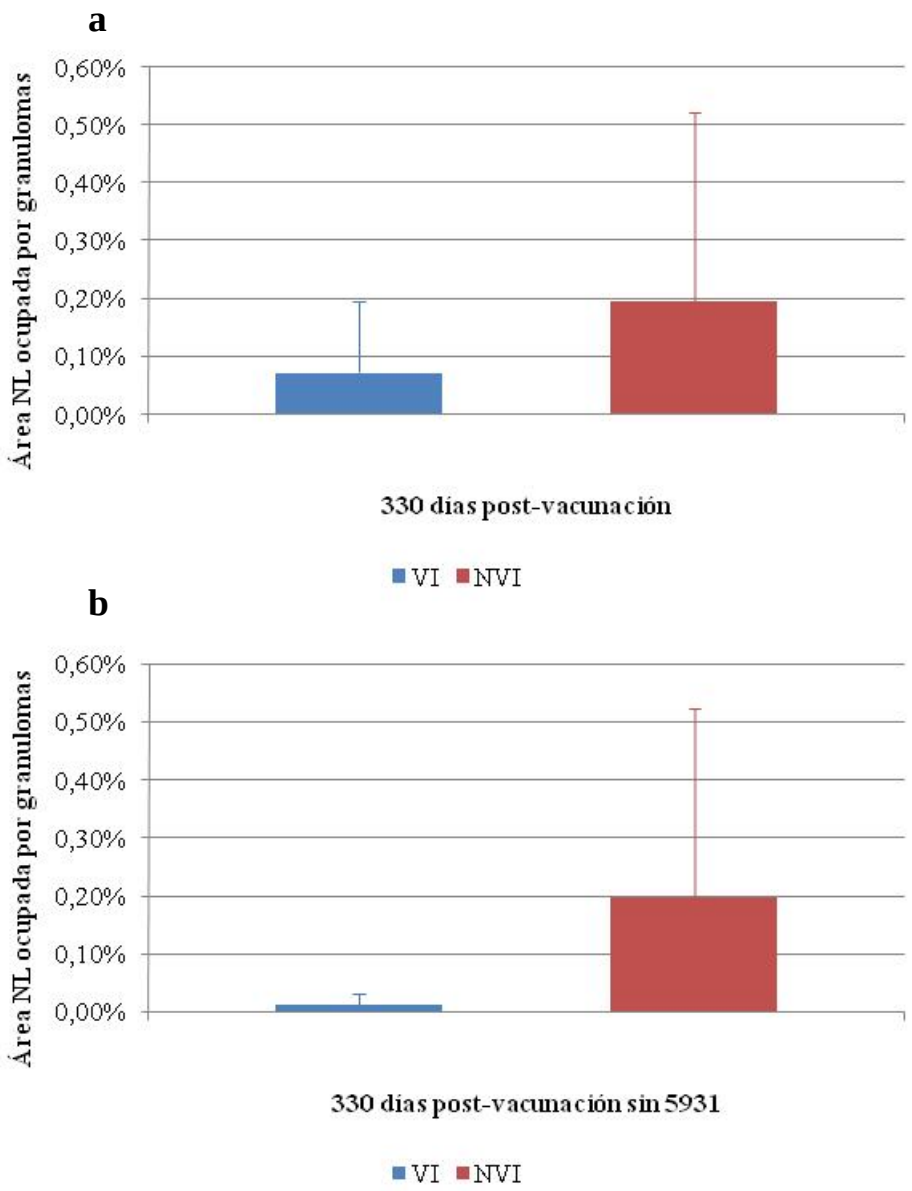
En la tabla IV.16 y en las gráficas IV.21 y 22, se muestra el área ocupada por las lesiones en los nódulos linfáticos de los animales sacrificados a los 330 dpv. Aunque con variaciones en cuanto a su localización, se pudieron encontrar lesiones granulomatosas en algún nódulo infático de todos los animales de los grupos NVI y VI. Al valorar el área total ocupada por la lesión, en el caso de los NVI fue significativamente mayor ($p<0,001$), en concreto 2,66 veces más que la de los VI.

Tabla IV.16. Área ocupada por los granulomas en los nódulos linfáticos, por animal y sección en los terneros sacrificados a los 330 dpv

Identificación	Nódulo linfático Ileocecal	Nódulo linfático Ileal	Nódulo linfático Yeyunal caudal	Nódulos linfáticos Yeyunales	Total
Animales vacunados e infectados					
3301	0,0000%	-	0,0000%	0,0000%	0,0000%
5931	0,1239%	0,3298%	0,3173%	-	0,3235%
7930	0,0036%	0,0341%	0,0405%	0,0531%	0,0328%
9109	0,0000%	0,0087%	0,0039%	0,0000%	0,0032%
Media	**0,0319%**	**0,1503%**	**0,0904%**	**0,0177%**	**0,0732%**
Media (sin 5931)	**0,0012%**	**0,0214%**	**0,0148%**	**0,0177%**	**0,0120%**
Animales no vacunados e infectados					
3300	0,0096%	0,0106%	0,0102%	0,0194%	0,0124%
3302	0,0000%	0,1140%	0,0137%	0,0122%	0,0350%
5956	0,0366%	0,1268%	0,0052%	0,0178%	0,0466%
9107	0,0066%	2,1056%	0,4528%	0,1785%	06859%
Media	**0,0132%**	**0,5892%**	**0,1205%**	**0,0570%**	**0,1950%**

Si no se tuviera en cuenta al animal 5931, las diferencias entre ambos son aún más marcadas. En concreto, el área total ocupada por la lesión en los nódulos linfáticos de los NVI sería 16,25 veces mayor que en los VI (Tabla IV.16 y gráfica IV.21).

Gráfica IV.21. Área lesionada por sección y animal en el sacrificio de los 330 dpv teniendo en cuenta a todos los animales del grupo VI (a) o eliminando los datos del ternero 5931 (b).

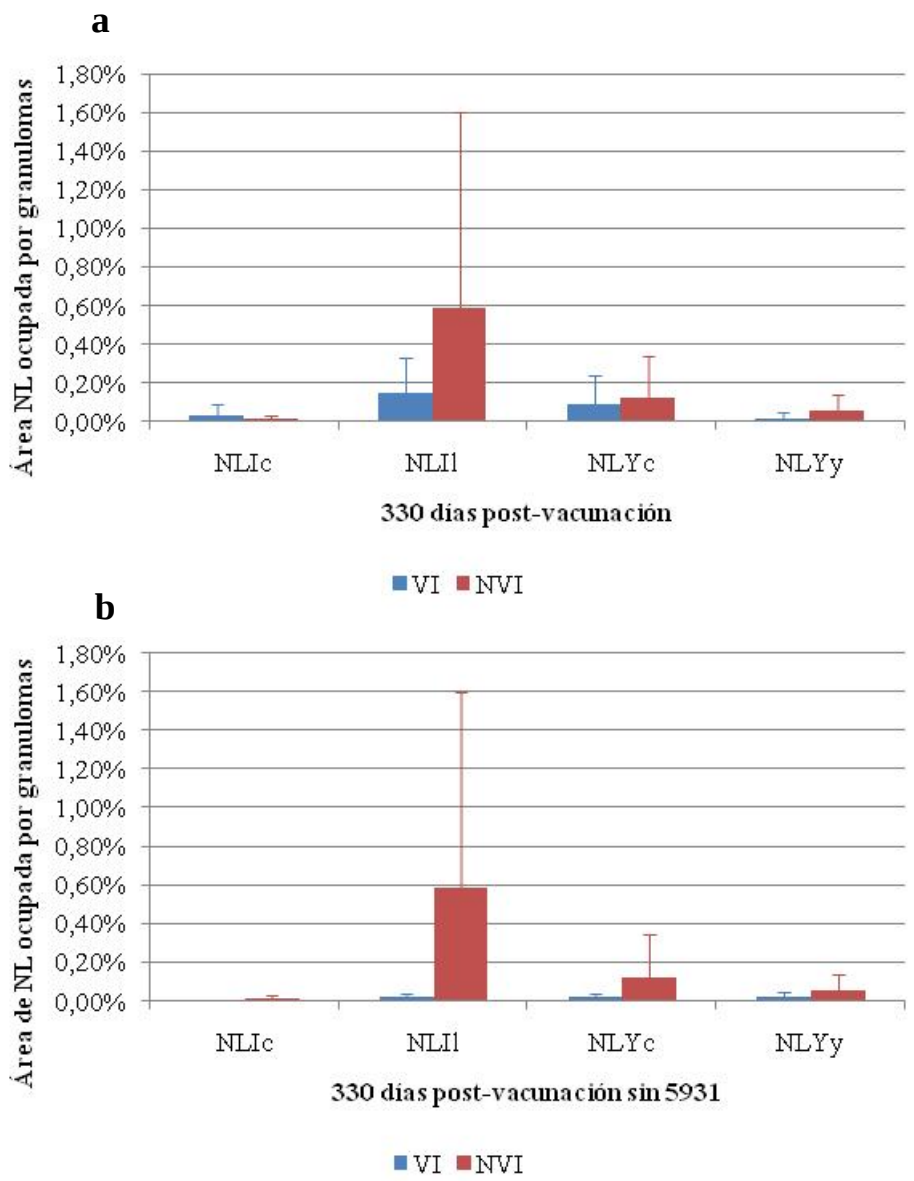


VI: vacunado e infectado; NVI: no vacunado e infectado. (Barras de error: desviación estándar).

En cuanto a la comparación de la extensión de las lesiones en los diferentes nódulos linfáticos, los granulomas ocupan un mayor área en los animales del grupo NVI ($p<0,05$) que en los VI (Tabla IV.16 y gráfica IV.22), excepto en el nódulo linfático

ileocecal, donde no se observan diferencias. La mayor extensión de lesión se observa en el nódulo linfático ileal en los terneros de ambos grupos.

Gráfica IV.22. Área lesionada por animal en cada uno de los nódulos linfáticos examinados en los terneros sacrificados a los 330 dpv con los datos de todos los terneros del grupo VI (a) o eliminando los del animal 5931 (b)



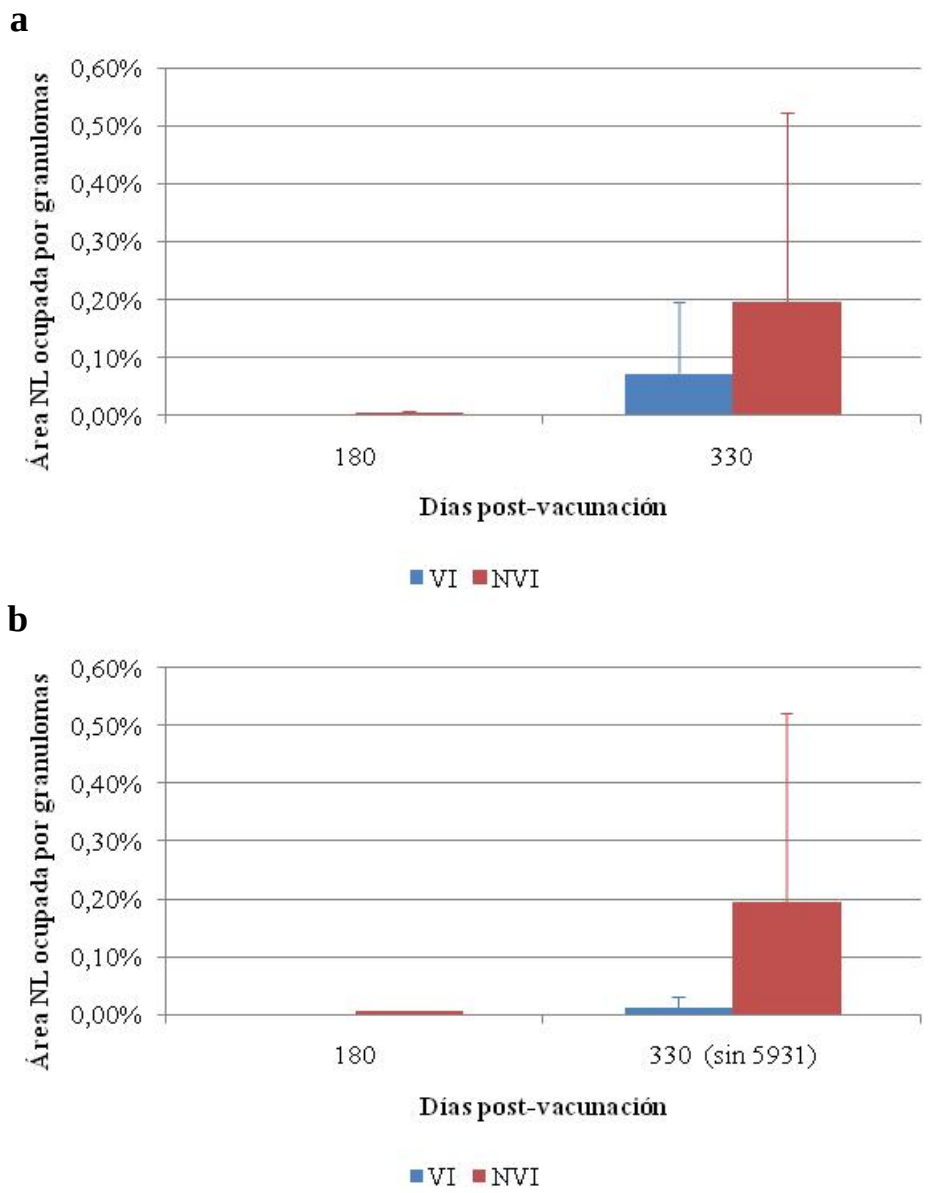
NLIc: nódulo linfático ileocecal; NLIl: nódulo linfático ileal; NLYc: nódulo linfático yeyunal caudal; NLYy: nódulos linfáticos yeyunales. (Barras de error: desviación estándar).

Resultados comparativos entre los sacrificios a los 180 y 330 dpv

Al comparar los dos momentos de sacrificio (Tablas IV.15 y 16 y gráfica IV.23), la extensión ocupada por la lesión granulomatosa se incrementa significativamente ($p<0,001$) en los terneros del segundo sacrificio respecto al primero. Al comparar la evolución de cada grupo, en los terneros del lote VI en el sacrificio realizado a los 180 dpv no se encontraron lesiones en ningún nódulo linfático mientras que a los 330 dpv el-área afectada ocupaba el 0,0732%; en los animales del grupo NVI dicho incremento fue más notable, incrementándose el porcentaje de lesión en 28,26 veces.

Si no se tiene en cuenta al animal 5931, las diferencias entre el grupo vacunado y no vacunado son más manifiestas.

Gráfica IV.23. Área lesionada por animal y sacrificio incluyendo los datos de todos los animales del grupo VI (a) o eliminando los del ternero 5931 (b).

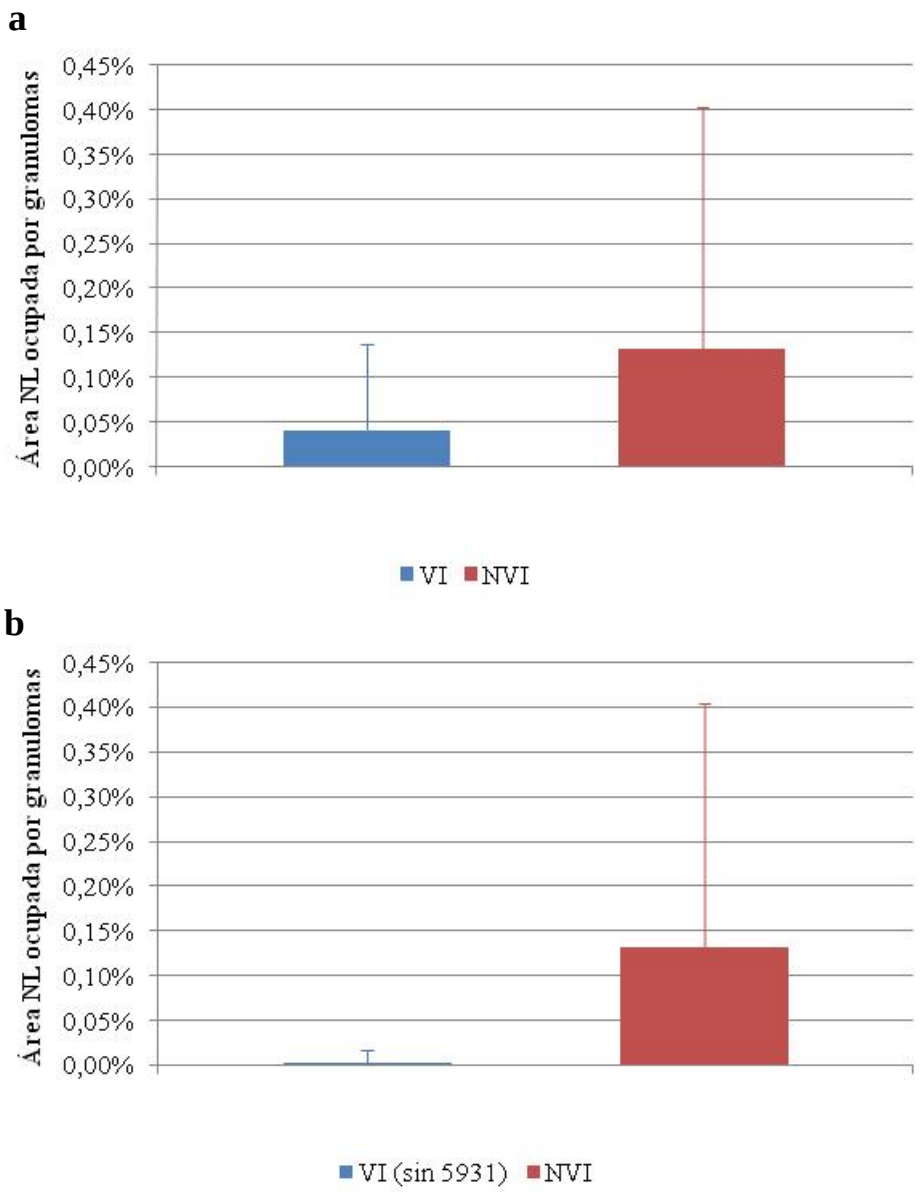


VI: vacunado e infectado; NVI: no vacunado e infectado. (Barras de error: desviación estándar).

Resultados globales

En cuanto a la comparación de la extensión de la lesión en los nódulos linfáticos entre animales vacunados (grupo VI) y no vacunados (grupo NVI) en el conjunto del estudio, independientemente del momento de sacrificio, se observó que era significativamente mayor ($p<0,05$) en los terneros del grupo NVI que en los del VI, diferencia que sería más amplia ($p<0,001$) si se excluyen los datos del animal 5931 (Gráfica IV.24).

Gráfica IV.24. Área lesionada por sección y animal en los dos grupos infectados, considerando los datos de todos los animales del grupo VI (a) o excluyendo los del ternero 5931 (b).



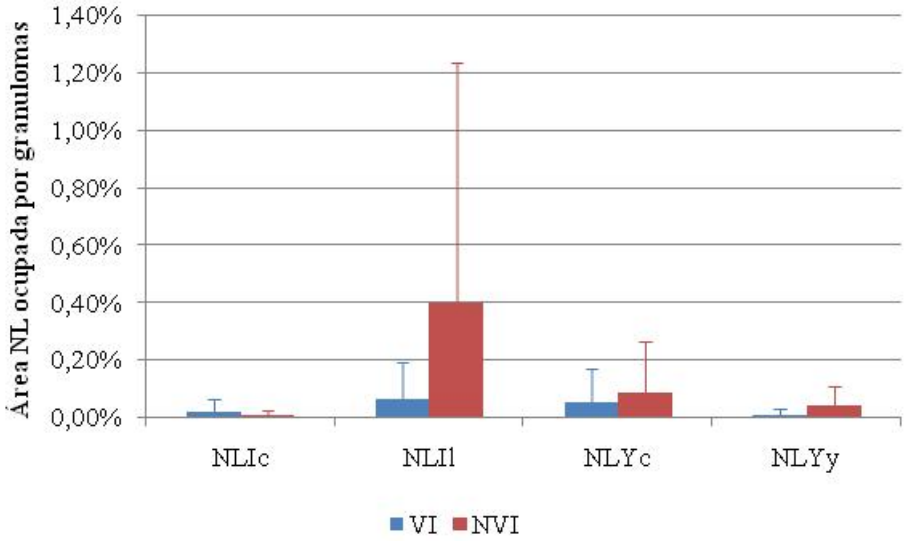
NL: nódulo linfático; VI: vacunado e infectado; NVI: no vacunado e infectado. (Barras de error: desviación estándar).

Al estudiar la distribución de la extensión de las lesiones según la localización, se observa que el nódulo linfático ileal es el más afectado en ambos grupos, con diferencias significativas ($p<0,05$) respecto a los otros nódulos examinados (Gráfica IV.25). Así, las lesiones granulomatosas en los animales vacunados presentan una extensión en este nódulo linfático casi 7 veces mayor que la de los nódulos linfáticos yeyunales, 4,42 veces mayor que la de los nódulos linfáticos ileocecales y 1,20 veces mayor que el yeyunal caudal. No obstante, al no tener en cuenta al animal 5931 (Gráfica IV.25), los nódulos linfáticos más afectados serían los yeyuyales, aunque sin diferencias significativas respecto a los ileales (0,0003% más extensión de lesión).

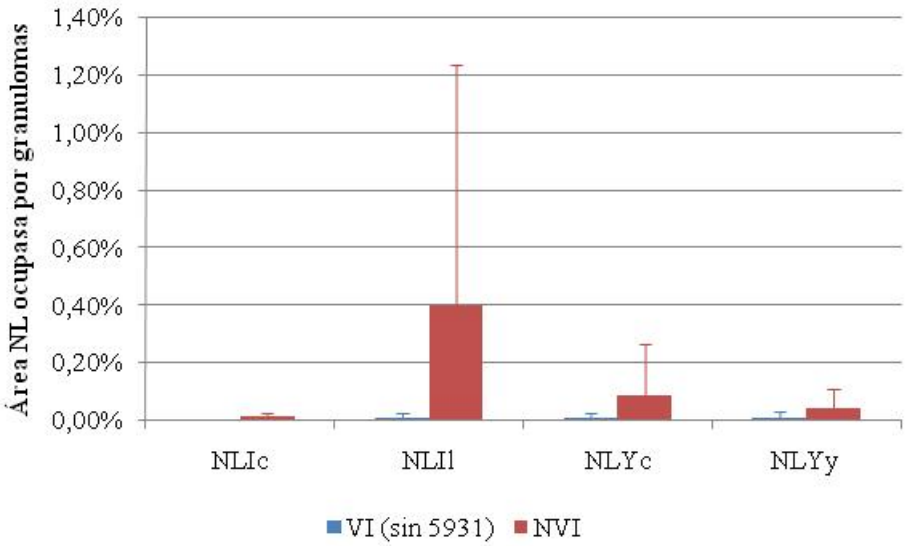
En el caso de los animales no vacunados, estas diferencias son aún más evidentes, ya que la extensión de la lesión en el nódulo linfático ileal supera en 45,28 a la del nódulo ileocecal, más de 10 veces a los nódulos yeyunales y 4,7 veces al nódulo yeyunal caudal (Gráfica IV.25). Al comparar ambos grupos de animales infectados, las diferencias significativoas solo aparecen cuando se consideran los datos del nódulo linfático ileal ($p<0,05$).

Gráfica IV.25. Área lesionada por animal en cada uno de los nódulos linfáticos examinados en los dos grupos infectados, tomando en cuenta los datos de todos los terneros del grupo VI (a) o excluyendo al animal 5931 (b).

a



b



NL: nódulo linfático; NLIc: nódulo linfático ileocecal; NLIl: nódulo linfático ileal; NLYc: nódulo linfático yeyunal caudal; NLYy: nódulos linfáticos yeyunales. VI: vacunado e infectado; NVI: no vacunado e infectado. (Barras de error: desviación estándar).

IV.2.1.3. Lesiones microscópicas no asociadas a paratuberculosis

Sacrificio a los 180 días post-vacunación (120 días post infección)

No se observaron alteraciones significativas asociadas a ningún otro proceso.

Sacrificio a los 330 días post-vacunación (270 días post infección)

En el grupo de animales vacunados e infectados posteriormente, se encontraron focos inflamatorios linfocitarios miliares en el parénquima hepático de un ternero (3301), o un foco miliar o submiliar de degeneración grasa en este órgano en otro animal (5931). Asimismo, en el animal que murió debido a una úlcera abomasal a los 250 dpv (7461) se observó peritonitis, perihepatitis y periesplenitis fibrinopurulentas. Además se observaron esporádicamente, algunas formas parasitarias, compatibles con *Eimeria spp*. en las células epiteliales del intestino delgado en los terneros 3301 y 5956, este último del grupo NVI. Este ternero y uno del grupo NVNI (7931), presentaron una leve neumonía intersticial caracterizada por el aumento de tamaño de los tabiques alveolares, en lo que se observaban células mononucleares y eosinófilos.

IV.2.2. Estudios bacteriológicos

IV.2.2.1. Cultivo de material fecal

De las muestras de material fecal recogidas en los momentos citados en el capítulo correspondiente de la sección de material y métodos, y cultivadas en los medios de Herrold y Löwestein-Jensen no se obtuvo ningún aislamiento positivo en ninguna de las lecturas de los tubos realizadas.

IV.2.2.2. Cultivo de tejidos

Como ya se ha señalado en el capítulo III.1.4.1.4.1 (material y métodos), el aislamiento bacteriológico se llevó a cabo en todos los terneros de este estudio en muestras de tejido de de válvula ileocecal (VIC), ileón distal (ILD) y placa de Peyer yeyunal distal (PPYD), así como en los nódulos linfáticos ileal (NLIl), y yeyunal caudal (NLYc), adyacentes a las tomadas para el estudio histológico.

Se obtuvieron aislamientos positivos en muestras de cuatro animales del grupo no vacunado e infectado (**NVI**) y dos del grupo vacunado e infectado (**VI**). En los animales no infectados no se obtuvieron aislamientos de *Map.* En la tabla IV.17 se detallan los animales y muestras que resultaron positivos, y el medio en que se consiguió el aislamiento.

El mayor número de cultivos positivos se obtuvo empleando el medio de Herrold suplementado con micobactina J, oscilando el número de colonias visibles entre 1 y más de 50. En el medio de Löwestein-Jensen, aunque el número de muestras positivas fue menor, también se obtuvo, en un caso en el que no se detectó aislamiento en el medio de Herrold, un elevado número de colonias (30). El tejido en el que se logró un mayor número de aislamientos fue el ILD, donde se consiguió en cuatro de los seis animales con algún tejido positivo, mientras que la PPYD fue el órgano con menor número de resultados positivos, únicamente en un animal. Las localizaciones con un

aislamiento positivo de *Map* supusieron el 12,5% de las muestras examinadas en el grupo VI, mientras que en grupo NVI se consiguió aislar la micobacteria en el 16,67%, sin que estas diferencias fueran significativas.

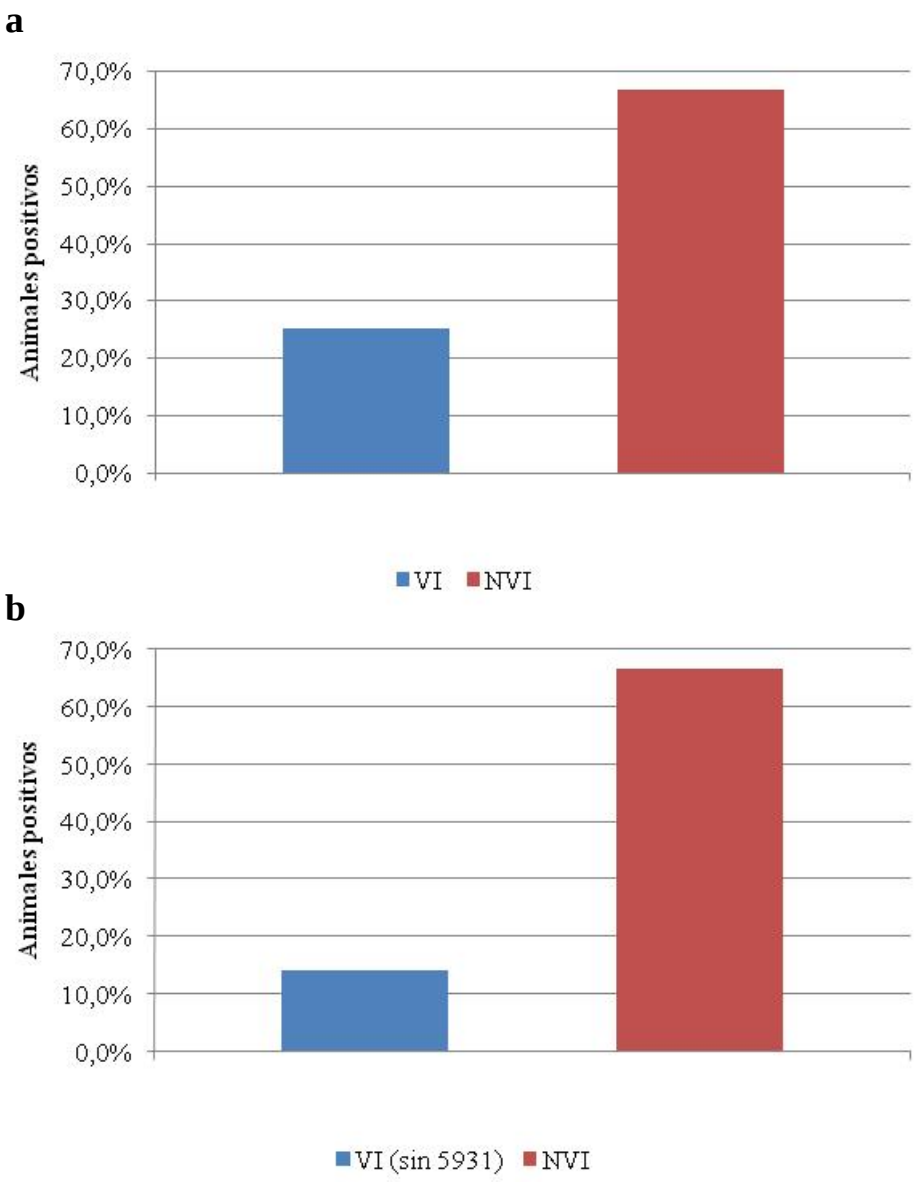
Tabla IV.17. Aislamientos de *Map* a partir de las muestras de tejido cultivadas en medios Herrold y Löwestein-Jensen.

Identificación	Tejido positivo	Número de colonias	Medio de cultivo
Animales vacunados e infectados			
5931	PPYD	2	HEYM+MJ
	NLYc	4	HEYM+MJ
9109	VIC	> 50	HEYM y LJ+MJ
	ILD	1	HEYM+MJ
	NLYc	1	HEYM+MJ
Animales no vacunados e infectados			
3300	ILD	1	HEYM+MJ
3302	ILD	1	HEYM+MJ
7460	NLIl	1	HEYM+MJ
9107	VIC	15	HEYM+MJ
	ILD	3	HEYM+MJ
	NLIl	30	LJ+MJ

PPY: Placa de peyer yeyunal; NLYc: nódulo linfático yeyunal caudal; IL: Íleon; VIC: válvula ileocecal; NLIl: nódulo linfático ileal. HEYM: medio Herrold; MJ: micobactina; LJ: medio Löwenstein-Jensen.

Al comparar los resultados de los grupos VI y NVI (Gráfica IV.26a) se observa que solo en dos animales (5931 y 9109) de ocho (25%) del grupo **VI** se obtuvo un aislamiento positivo en algún tejido, mientras que en el grupo **NVI** fueron cuatro de seis (66,67%), siendo estas diferencias estadísticamente significativas ($p<0,05$). En el caso del grupo VI, los dos terneros habían sido sacrificados a los 330 dpv, mientras que en el grupo NVI, uno de ellos lo fue a los 180 y el resto a los 330 dpv. En ambos grupos (Tablas IV.7 y 8), se trataba de animales con lesiones de tipo *focal* (7460, 9109), *multifocal* (3300, 3302) y *difuso* (5931, 9107).

Gráfica IV.26. Porcentaje total de animales con aislamiento positivo de *Map* en tejidos, incluyendo (a) o sin considerar (b) al ternero 5931.



VI: vacunados e infectados; NVI: no vacunados e infectados.

Al no considerar al animal 5931 -el animal con lesión *difusa* del grupo VI-, las diferencias entre ambos grupos se ampliarían, ya que tan solo en un animal de este lote (14,29%) se pudo aislar *Map*, frente al 66,67% de terneros con aislamiento positivo en el grupo NVI (Gráfica IV.26b). El número de localizaciones positivas, descendería, a su vez, del 12,5 al 7,5% en el grupo VI, en comparación con el 16,67% localizaciones del grupo NVI.

Respecto al número de colonias aisladas, se observa que entre los animales del grupo VI, en el ternero 5931 se llegan a aislar 6 colonias, y aproximadamente 52 en el animal 9109, mientras que en el grupo NVI, en tres de los animales se aísla una colonia, y en el restante 48, sin que existan diferencias significativas entre el número de colonias identificadas en ambos grupos.

IV.2.2.3. Reacción en cadena de la polimerasa en muestras fecales

La reacción de cadena de la polimerasa (PCR) realizada sobre las muestras fecales no arrojó ningún valor positivo en los muestreos realizados a lo largo de todo el experimento, en ningún animal.

IV.2.2.4 Reacción en cadena de la polimerasa en muestras de tejidos

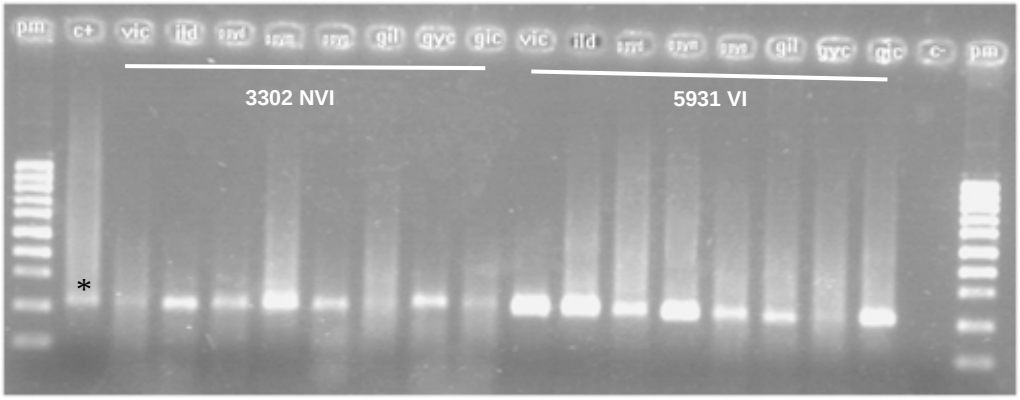
IV.2.2.4.1. Tejidos frescos

La PCR se llevó a cabo en todos los terneros de este estudio en muestras de tejido de válvula ileocecal (VIC), íleon distal (ILD) y placas de Peyer yeyunal distal (PPYD), media (PPYM) y proximal (PPYP), así como en los nódulos linfáticos ileal (NLIl), y yeyunal caudal (NLYc), adyacentes a las tomadas para el cultivo bacteriológico. Los resultados obtenidos en la PCR de tejidos frescos de los animales infectados se muestran en la tabla IV.18. Los tejidos procedentes de animales no infectados fueron negativos a esta técnica.

Se pudo detectar la secuencia IS*900* específica de *Map* (Figura IV.40), en terneros de ambos grupos infectados. En el grupo VI, fueron positivos 7 de los 8 terneros (87,5%), siendo negativo un animal sacrificado a los 330 dpv. En el grupo NVI, se obtuvieron resultados positivos en 5 de los 6 terneros (83,34%) que formaban el grupo, siendo el negativo sacrificado a los 180 dpv. Estas diferencias no fueron estadísticamente significativas.

En cuanto a la distribución de tejidos en los que se pudo identificar una reacción positiva a esta técnica, fue variable según el animal (Tabla IV.18), desde únicamente una muestra como en el ternero 7930 (grupo VI) hasta en todos los tejidos examinados, como ocurrió en dos animales del grupo vacunado (el 5931 y el 3303) y en un animal del grupo no vacunado (3302). El número de muestras positivas en los terneros del lote NVI es del 64,29% de las examinadas, mientras que en el grupo VI es del 61,11%. Estas diferencias no fueron estadísticamente significativas.

Figura IV. 40. Fotografía de los resultados de la PCR frente a *Map* en muestras de tejido congelado del animal 3302 del grupo no vacunado infectado (NVI) y del 5931 del grupo vacunado e infectado (VI), en un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio.



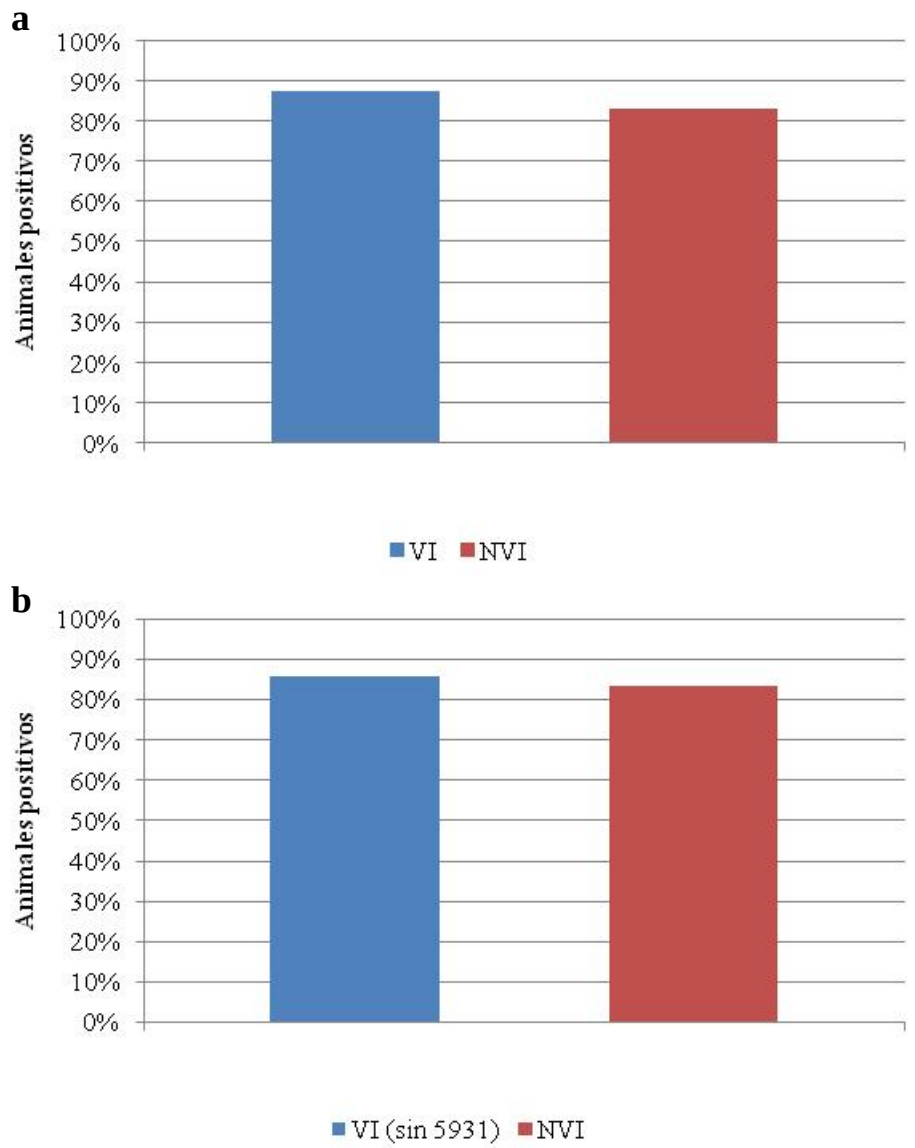
Carriles 1 y20: marcadores de peso molecular; 2: control positivo; 3-10: muestras de intestino y nódulos linfáticos del animal 3302; 11-18: muestras de intestino y nódulos linfáticos del animal 5931; 19: control negativo.*: banda positiva correspondiente a 217 pares de bases.

Tabla IV.18. Resultados de la PCR frente a *Map* en muestras de tejidos frescos de los animales infectados a los 60 dpv, según el momento de sacrificio.

Animal	VIC	ILD	PPYD	PPYM	PPYP	NIl	NLYc
Animales vacunados e infectados							
Sacrificados a los 180 dpv							
3303	**P**	**s.m**	**N**	**N**	**N**	**N**	**N**
5953	**P**	**P**	**P**	**P**	**P**	**P**	**P**
9108	**P**	**P**	**P**	**P**	**P**	**P**	**P**
Sacrificados a los 330 dpv							
3301	**N**	**N**	**N**	**N**	**N**	**N**	**N**
5931	**P**	**P**	**P**	**P**	**P**	**P**	**P**
7461	**s.m**	**P**	**N**	**N**	**P**	**N**	**P**
7930	**N**	**N**	**N**	**N**	**N**	**N**	**P**
9109	**P**	**P**	**P**	**P**	**P**	**P**	**P**
Animales no vacunados e infectados							
Sacrificados a los 180 dpv							
5933	**N**	**N**	**N**	**N**	**N**	**N**	**N**
7460	**P**	**P**	**P**	**P**	**P**	**P**	**P**
Sacrificados a los 330 dpv							
3300	**P**	**N**	**N**	**N**	**N**	**P**	**P**
3302	**P**	**P**	**P**	**P**	**P**	**P**	**P**
5956	**P**	**N**	**N**	**N**	**P**	**P**	**P**
9107	**P**	**P**	**P**	**P**	**N**	**P**	**P**

VIC: válvula ileocecal; ILD: íleon distal; PPYD: placa de Peyer distal; PPYM: placa de Peyer media; PPYP: placa de Peyer proximal; NLIl: nódulo linfático ileal; NLYc: nódulo linfático yeyunal caudal; N: negativo; P: positivo; s.m: sin muestra; dpv: días post-vacunación.

Gráfica IV.27. Porcentaje de animales con reacción positiva a la PCR frente a *Map* en tejidos frescos de terneros infectados a los 60 dpv, considerando (a) o excluyendo (b) los datos del animal 5931.



VI: vacunados e infectados; NVI: no vacunados e infectados.

Si no se tuviera en cuenta, para esta prueba, al animal 5931 del grupo VI, el porcentaje de animales positivos a la prueba descendería del 87,5% al 85,71%, frente al 83,34% de animales positivos en el grupo NVI. No obstante, el número de localizaciones positivas, al no tener en consideración al ternero 5931 sería de 55,31% frente al 64,29% de localizaciones positivas en los NVI. En cualquier caso, las diferencias no son significativas en ninguno de los casos.

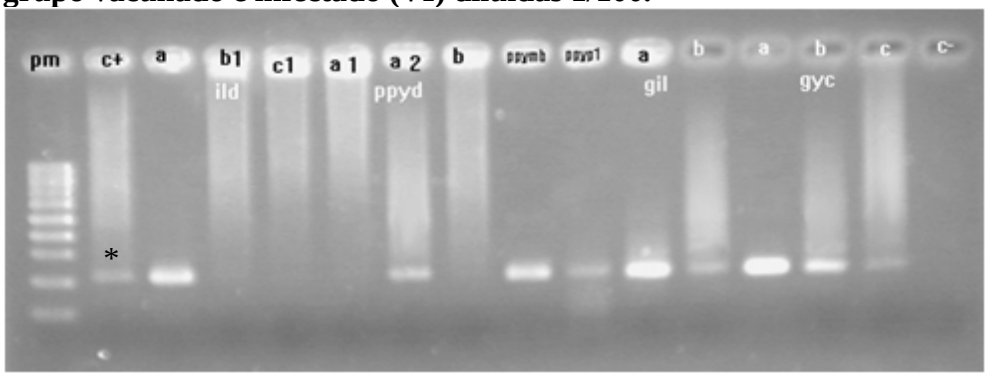
Al tener en cuenta a todos los animales, se observa como la muestra en la que se encontró una mayor positividad fue el NLYc con el 78,57% de los animales positivos, seguido de la VIC con el 76,92%, sin diferencias entre ambas. La muestra con menor positividad fue la PPYD, a pesar de que en esta localización se detectó *Map* en la mitad (50%) de los terneros.

IV.2.2.4.2. Tejidos incluidos en parafina

La técnica de PCR también se llevó a cabo en todos los terneros de este estudio en los mismos tejidos incluidos en parafina empleados para el estudio histológico, en las tres tramos de válvula ileocecal (VIC), íleon distal (ILD), placas de Peyer yeyunal distal (PPYD), media (PPYM) y proximal (PPYP), así como en tres secciones de los nódulos linfáticos ileal (NLIl), y yeyunal caudal (NLYc).

Los resultados obtenidos en las muestras de los animales infectados (grupos VI y NVI) se presentan en la tabla IV.19 y en la gráfica IV.28. En el caso de varias muestras del animal 5931 (Figura IV. 41) fue necesario diluir la concentración final del ADN por negativizar el resultado de la PCR, por su exceso de concentración.

Figura IV. 41. Fotografía del resultado de la técnica de PCR frente a *Map* en muestras de tejido incluido en parafina del animal 5931 del grupo vacunado e infectado (VI) diluidas 1/100.



Carril 1: marcador de peso molecular; 2: control positivo; 3-15: muestras de intestino y nódulos linfáticos del animal 5931 diluidas 1/100.*: banda positiva correspondiente a 217 pares de bases.

Tabla IV.19. Resultados de la técnica de PCR frente a *Map* en muestras de tejido incluido en parafina de los terneros infectados a los 60 dpv según el momento de sacrificio

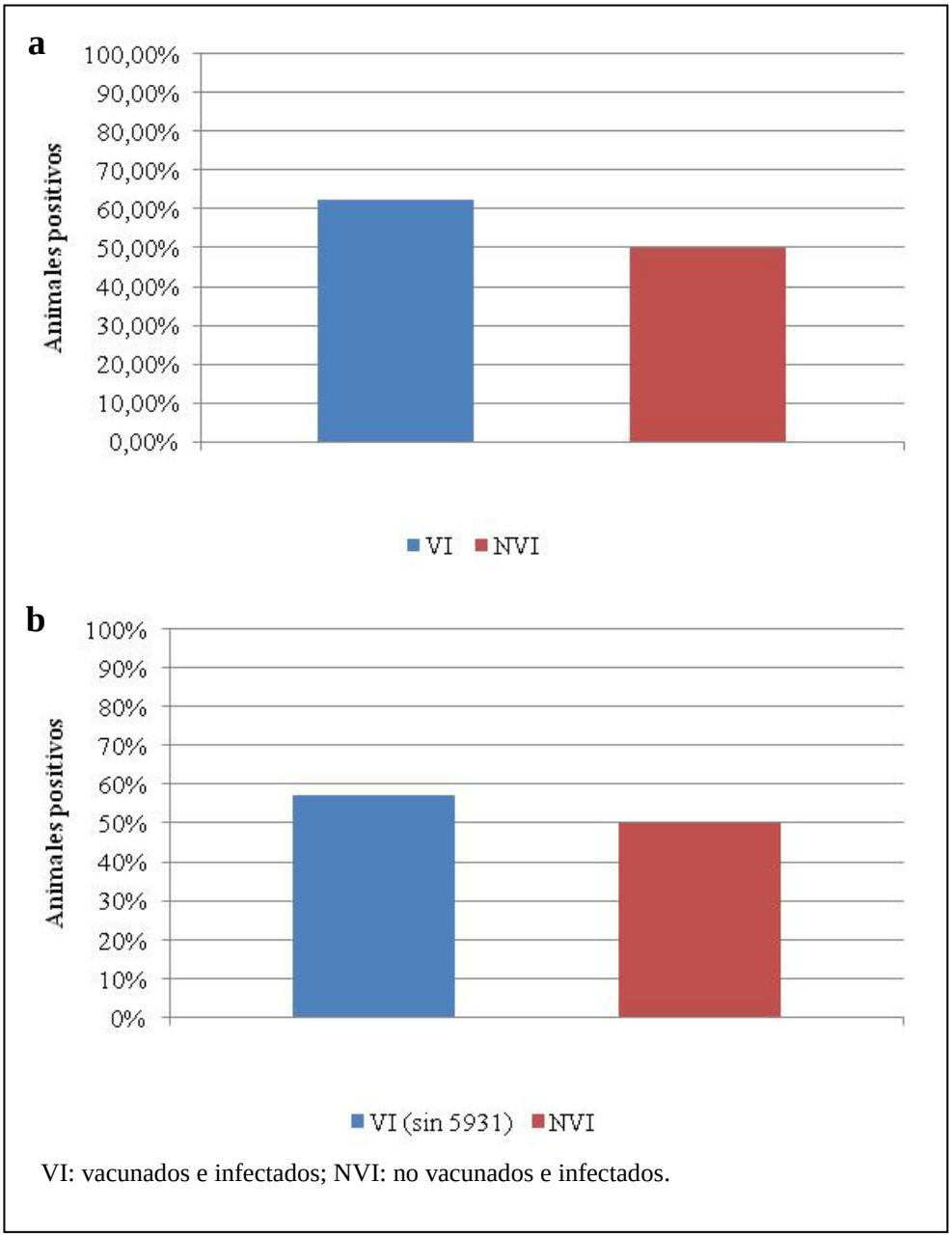
Animal	VIC	ILD	PPYD	PPYM	PPYP	NIl	NLYc
Animales vacunados e infectados							
Sacrificados a los 180 dpv							
3303	**N**	**N**	**N**	**N**	**N**	**N**	**N**
5953	**N**	**N**	**N**	**N**	**N**	**N**	**N**
9108	**N**	**P(2)**	**N**	**N**	**N**	**N**	**N**
Sacrificados a los 330 dpv							
3301	**N**	**P(2)**	**N**	**N**	**N**	**s.m**	**N**
5931	**P(3)**	**P(3)**	**P(3)**	**P(3)**	**P(3)**	**P(3)**	**P(3)**
7461	**N**	**N**	**N**	**N**	**N**	**N**	**N**
7930	**N**	**P(1)**	**N**	**N**	**N**	**N**	**N**
9109	**P(2)**	**P(2)**	**N**	**N**	**N**	**N**	**N**
Animales no vacunados e infectados							
Sacrificados a los 180 dpv							
5933	**N**	**N**	**N**	**P(1)**	**N**	**N**	**N**
7460	**N**	**N**	**N**	**N**	**N**	**N**	**N**
Sacrificados a los 330 dpv							
3300	**N**	**N**	**N**	**N**	**N**	**N**	**N**
3302	**N**	**P(1)**	**P(1)**	**N**	**N**	**P**	**P**
5956	**N**	**N**	**N**	**N**	**N**	**N**	**N**
9107	**N**	**P(3)**	**N**	**N**	**N**	**P(3)**	**P(3)**

VIC: válvula ileocecal; ILD: íleon distal; PPYD: placa de Peyer distal; PPYM: placa de Peyer media; PPYP: placa de Peyer proximal; NLIl: nódulo linfático ileal; NLYc: nódulo linfático yeyunal caudal; N: negativo; P: positivo; s.m: sin muestra; dpv: días post-vacunación. Entre paréntesis se muestra el número de secciones positivas.

Cinco de los ocho (62,5%) animales del grupo VI ofrecieron resultado positivo a la PCR en alguna muestra mientras que en el grupo NVI se detectó reacción positiva en tres de seis (50%) animales (Gráfica IV.28), sin que dicha diferencia fuera estadísticamente significativa. El número de muestras positivas en cada animal variaba

desde una hasta la totalidad, observándose este hecho en un ternero con lesión difusa (5931).

Gráfica IV.28. Porcentaje de animales infectados a los 60 días post-vacunación positivos a la PCR en tejido incluido en parafina, considerando (a) o excluyendo (b) los resultados de las muestras del ternero 5931.



VI: vacunados e infectados; NVI: no vacunados e infectados.

Si no se tuviera en cuenta en el estudio al ternero 5931, el número de animales positivos descendería del 62,5 al 57,14% en el grupo VI, frente al 50% del grupo NVI.

El porcentaje de localizaciones positivas descendería del 12,37% al 5,15% en los animales del lote VI, siendo del 6,19% en los del grupo NVI, mientras que si se tiene en cuenta la totalidad de secciones en las que se ha llevado a cabo esta prueba (3 por localización) se aprecia que el porcentaje de positividad en los VI disminuiría del 10,31 al 3,10% sin el 5931, frente al 4,12% en los terneros del grupo NVI, sin que estas diferencias sean estadísticamente significativas.

Al tener en cuenta a todos los animales, se observa que la muestra en la que se encontraron más resultados positivos ($p<0,05$) fue el ILD, con el 50% de los animales y el 33,4% de las secciones estudiadas positivas. La muestra con menor positividad fue la de PPYP, apareciendo ésta tan sólo en el 7,14 % de los terneros y el 7,14% de las secciones estudiadas.

IV.2.2.5. Reacción en cadena de la polimerasa en suero

La PCR en suero se llevó a cabo cada 15 días desde el momento de la infección hasta el día 150 dpv (90 post-infección) y mensualmente hasta el final del experimento (330 dpv -270 dpi-). Las muestras fueron procesadas con los cebadoresRJ1-PT91 y C1-C2 descritos en el material y métodos (Apartado III.1.4.1.5). Los resultados con los cebadoresRJ1-PT91 se muestran en la tabla IV.20 y en la gráfica IV.29 y con los cebadoresC1-C2 en la tabla IV.21 y gráfica IV.30.

En los animales no infectados, no se pudo evidenciar la presencia de ADN micobacteriano en suero. En los animales infectados se obtuvieron reacciones positivas de forma esporádica, en mayor número de ocasiones en los animales no vacunados (36,76%) que en los animales vacunados (33,72%), en distintos momentos post-infección (Tablas IV.20 y 21).

Con los cebadoresRJ1-PT91, ocho animales, cuatro del grupo vacunado y cuatro del no vacunado mostraron positividad en algún muestreo del experimento. De ellos, cuatro lo hicieron en al menos dos ocasiones (dos en cada grupo), mostrando cuatro o más veces positividad dos animales (uno de cada grupo) (Tabla IV. 20). Es destacable que en el animal con mayor número de muestras de suero positivas (7461), aunque no

se le pudo hacer el estudio histológico, fue negativo a la PCR de secciones histológicas y cultivo, así como escasamente positivo a la PCR de tejido fresco. Los otros animales (7460 y 3302) con mayor número de muestras de suero positivas a la PCR presentaban lesiones de tipo *focal* o *multifocal*, no observándose positividad en esta técnica en los animales con lesiones de tipo *difuso* (5931 y 9107). Como se puede observar en la gráfica IV.29, no se observaron diferencias en el porcentaje de animales positivos entre los grupos VI y NVI, excepto a los 240 dpi, donde fue significativamente mayor ($p<0,001$) en el grupo NVI.

Al realizar la PCR con los cebadores C1-C2, se consigue detectar la secuencia IS900 en cinco animales más (los cuatro restantes del grupo vacunado y uno más del grupo no vacunado). Además, en los animales en los que la técnica fue positiva lo fue, generalmente, en un mayor número de muestreos que con los cebadoresRJ1-PT91, coincidiendo, en la mayoría de casos, los muestreos positivos con ambos cebadores. En este caso, los animales con lesión de tipo *difuso* (5931 y 9107) presentaban positividad. Asimismo, animales sin lesión y con lesiones de tipo *focal* y *multifocal* eran positivos con esta técnica en algún momento post-infección. Además, como ocurría con los cebadores RJ1-PT91, con los C1-C2 el animal con mayor número de muestras positivas fue el 7461. El único animal, aparte de los no infectados, en el que no se detectó la secuencia IS*900* con estos cebadores fue el 5933, animal que presentaba lesión de tipo *focal*. Como se observa en la gráfica IV.30, no se observaron diferencias significativas entre los grupos VI y NVI, excepto a los 60, 75 y 270 dpi, donde el número de terneros positivos fue mayor entre los del grupo NVI, y a los 150 y 180 dpi, donde lo fue en el lote VI ($p<0,05$).

Tabla IV.20. Resultados de la técnica de PCR frente a *Map* en muestras de suero utilizando los cebadores RJ1-PT91 en diferentes días post-infección (dpi) (continúa).

Animal	0*	15*	30*	45*	60*	75*	90*
Animales vacunados							
3301	N	N	N	N	N	N	N
3303†	N	N	N	N	N	N	N
5931	N	N	N	N	N	N	N
5953†	N	N	N	N	N	N	N
7461	N	N	P	N	P	P	N
7930	N	N	N	N	N	N	N
9108†	N	N	N	N	N	P	N
9109	N	N	N	P	P	N	N
Positivos	**0**	**0**	**1**	**1**	**2**	**2**	**0**
Animales no vacunados							
3300	N	N	N	N	N	N	N
3302	N	N	N	N	N	N	N
5933†	N	N	N	N	N	N	N
5956	N	N	N	N	N	N	N
7460†	N	N	N	P	P	P	P
9107	N	N	N	N	N	N	N
Positivos	**0**	**0**	**0**	**1**	**1**	**1**	**1**

*: días post-infección; N: negativo; P: positivo. †: animal sacrificado a los 120 dpi.

Tabla IV.20. Resultados de la técnica de PCR frente a *Map* en muestras de suero utilizando los cebadores RJ1-PT91 en diferentes días post-infección (dpi) (continuación).

Animal	120*	150*	180*	210*	240*	270*
Animales vacunados e infectados						
3301	N	N	N	N	P	N
3303†	N					
5931	N	N	N	N	N	N
5953†	N					
7461	N	P	P	†		
7930	N	N	N	N	N	N
9108†	N					
9109	N	N	N	N	N	N
positivos	**0**	**1**	**1**	**0**	**1**	**0**
Animales no vacunados e infectados						
3300	N	N	N	N	P	N
3302	N	N	P	P	P	N
5933†	N					
5956	N	N	N	N	P	N
7460†	N					
9107	N	N	N	N	N	N
positivos	**0**	**0**	**1**	**1**	**3**	**0**

*: días post-infección; N: negativo; P: positivo. †: animal sacrificado a los 120 dpi.

Tabla IV.21. Resultados de la técnica de PCR frente a *Map* en muestras de suero utilizando los cebadoresC1-C2 en diferentes días post-infección (dpi) (continúa).

Animal	0*	15*	30*	45*	60*	75*	90*
Animales vacunados							
3301	N	N	P	N	N	N	N
3303†	N	P	N	N	N	N	N
5931	N	P	N	N	N	N	P
5953†	N	N	P	N	N	N	N
7461	N	P	P	P	P	P	P
7930	N	N	N	N	N	P	N
9108†	N	N	N	N	N	P	N
9109	N	N	P	N	N	P	N
Positivos	**0**	**3**	**4**	**1**	**1**	**4**	**2**
Animales no vacunados							
3300	N	P	P	P	N	P	N
3302	N	N	N	N	N	P	P
5933†	N	N	N	N	N	N	N
5956	N	P	N	N	P	P	N
7460†	N	N	P	N	P	P	N
9107	N	N	N	N	P	N	N
Positivos	**0**	**2**	**2**	**1**	**3**	**4**	**1**

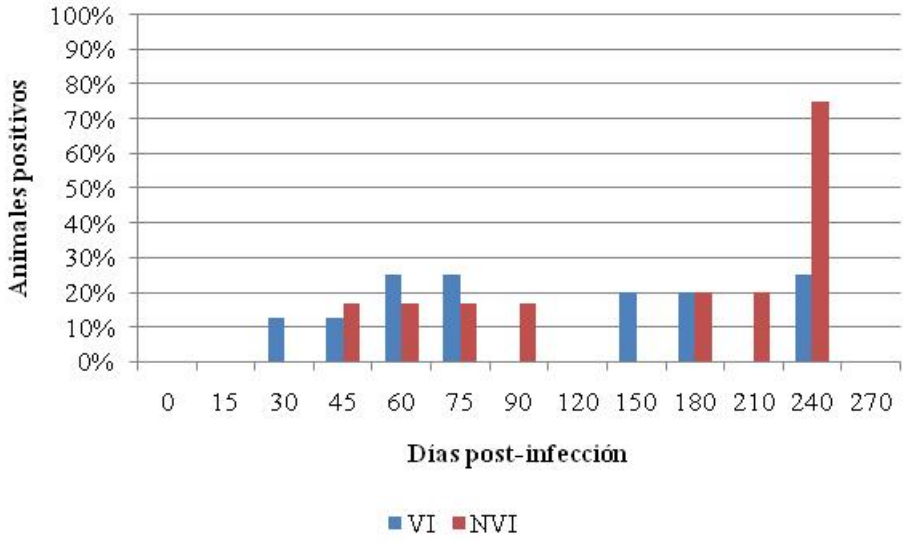
*: días post-infección; N: negativo; P: positivo. †: animal sacrificado a los 120 dpi.

Tabla IV.21. Resultados de la técnica de PCR frente a *Map* en muestras de suero utilizando los cebadoresC1-C2 en diferentes días post-infección (dpi) (continuación).

Animal	120*	150*	180*	210*	240*	270*
Animales vacunados e infectados						
3301	N	N	N	N	P	N
3303†	N					
5931	P	N	N	N	P	N
5953†	N					
7461	N	N	N			
7930	P	P	P	N	P	N
9108†	N					
9109	N	P	N	P	P	N
Positivos	**2**	**2**	**1**	**1**	**4**	**0**
Animales no vacunados e infectados						
3300	N	N	N	P	N	N
3302	N	N	N	N	P	P
5933†	N					
5956	P	N	N	N	P	N
7460†	N					
9107	N	N	N	N	P	P
Positivos	**1**	**0**	**0**	**1**	**3**	**2**

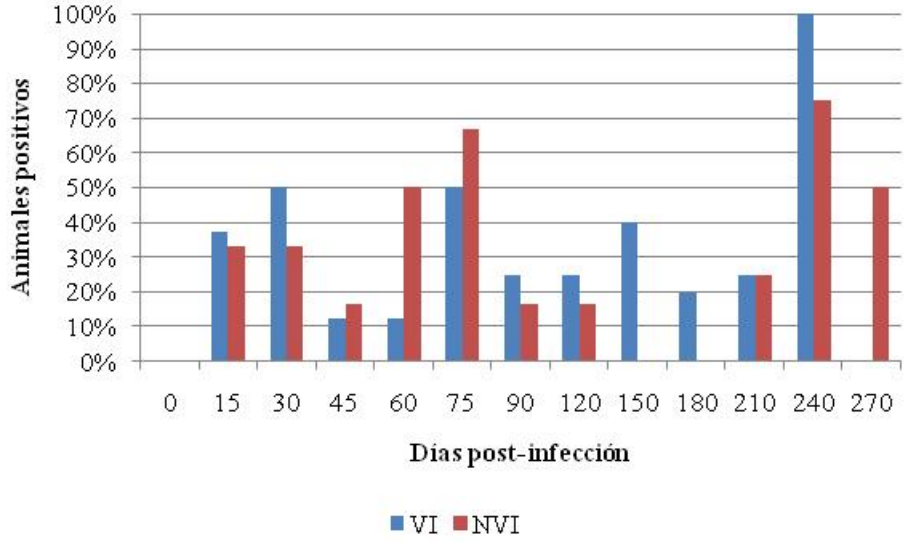
*: días post-infección; N: negativo; P: positivo. †: animal sacrificado a los 120 dpi.

Gráfica IV.29. Porcentaje de animales positivos a la PCR frente a *Map* en muestras de suero utilizando los cebadores RJ1-PT91 de los infectados.



VI: animales vacunados e infectados. NVI: Animales no vacunados e infectados

Gráfica IV.30. Porcentaje de animales positivos a la PCR frente a *Map* en muestras de suero utilizando los cebadores C1-C2 de los infectados.



VI: animales vacunados e infectados. NVI: animales no vacunados e infectados

IV.3. RESULTADOS GLOBALES

IV.3.1. Relación entre los tipos de lesión y los resultados de las distintas pruebas diagnósticas

En la tabla IV.22 se muestran los resultados de la valoración lesional y los resultados del aislamiento bacteriológico y las pruebas de PCR en tejido fresco e incluido en parafina de todos los animales del estudio. Además, en la tabla IV.23 se presentan los resultados globales donde se relaciona el tipo de lesión con el resultado de estas pruebas etiológicas.

Tabla IV.22. Tipo de lesión y resultados obtenidos en cultivo, PCR de tejido fresco e incluído en parafina en diferentes tramos intestinales de los animales infectados.

Animal	VIC*	ILD*	PPYD*	PPYM*	PPYP*	NIL*	NYC*
Animales vacunados e infectados							
3301‡	SL/-/-/+	SL/-/-/+	F/-/-/-	SL/sr/-/-	SL/sr/-/-	s.m/-/-/-	F/-/-/-
3303†	SL/-/+/-	SL/-/sm/-	SL/-/-/-	F/sr/-/-	SL/sr/-/-	SL/sr/-/-	SL/-/-/-
5931‡	MF/-/+/+	DIF/-/+/+	DIF/+/+/+	DIF/sr/+/+	SL/sr/+/+	MF/-/+/+	DIF/+/+/+
5953†	SL/-/+/-	SL/-/+/-	SL/-/+/-	SL/sr/+/-	SL/sr/+/-	SL/-/+/-	SL/-/+/-
7930‡	F/-/-/-	SL/-/-/+	F/-/-/-	F/sr/-/-	F/sr/-/-	F/-/-/-	F/-/+/-
9108†	SL/-/+/-	SL/-/+/+	SL/-/+/-	SL/sr/+/-	SL/sr/+/-	SL/-/+/-	SL/-/+/-
9109‡	SL/+/+/+	SL/+/+/+	SL/-/+/-	F/sr/+/-	SL/sr/+/-	F/-/+/-	F/+/+/-
Animales no vacunados e infectados							
3300‡	SL/+/-/-	SL/+/+/-	SL/-/-/-	SL/sr/-/-	SL/sr/-/-	F/-/+/-	F/-/+/-
3302‡	F/-/+/-	MF/+/+/+	MF/-/+/+	MF/sr/+/-	SL/sr/+/-	F/-/+/-	F/-/+/-
5933†	SL/-/-/-	F/-/-/-	SL/-/-/-	MF/sr/-/+	MF/sr/-/-	F/-/-/-	SL/-/-/-
5956‡	F/-/+/-	MF/-/-/-	SL/-/-/-	SL/sr/-/-	MF/sr/+/-	MF/-/+/-	F/-/+/-
7460†	F/-/+/-	SL/-/+/-	F/-/+/-	F/sr/+/-	SL/sr/+/-	F/+/+/-	F/-/+/-
9107‡	MF/+/+/-	DIF/+/+/+	DIF/-/+/-	DIF/sr/+/-	MF/sr/-/-	DIF/+/+/+	DIF/-/+/+

*Tipo de lesión/resultado en el cultivo/resultado en la PCR en tejido fresco/resultado en la PCR en tejido incluído en parafina; VIC: Válvula ileocecal; ILD: Íleon distal; ILM: Íleon medio; ILP: Íleon proximal; PPYD: Placa de Peyer yeyunal distal; PPYM: Placa de Peyer yeyunal media; PPYP: Placa de Peyer yeyunal proximal; NIL: Nódulo linfático ileal; NYC: Nódulo linfático yeyunal caudal; †: sacrificado a los 180 días post-vacunación; ‡: sacrificado a los 330 días post-vacunación; sm: sin muestra; sr: sin reultado por no procesar el tejido con esta técnica; -: negativo; +: positivo; SL: sin lesión;F: focal; MF: multifocal; DIF: difusa.

En la tabla IV.23 se muestra el tipo lesional en que ha sido clasificado cada animal infectado, así como el resultado encontrado en las diferentes pruebas diagnósticas en el momento del sacrificio.

Tabla IV.23 Tipos de lesión y resultado de las diferentes pruebas diagnósticas en el momento del sacrificio de los animales infectados.

		Pruebas diagnósticas en el momento del sacrificio						
Animales	**Lesión**	**ELISA**	**IDR**	**IFN-γ**	**Cultivo**	**PCR tf**	**PCR tp**	**PCR s**
Vacunados e infectados								
Sacrificados a los 180 dpv								
3303	F	Pos	Pos	Pos	Neg	Pos	Neg	Neg
5953	SL	Pos	Pos	Pos	Neg	Neg	Pos	Neg
9108	SL	Neg	Pos	Pos	Neg	Pos	Pos	Neg
3301	F	Pos	Pos	Pos	Neg	Pos	Neg	Neg
Sacrificados a los 330dpv								
5931	Dint	Pos	Pos	Pos	Neg	Pos	Pos	Neg
7461*	-	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Neg
7930	F	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos
9109	F	Neg	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Neg
No vacunados e infectados								
Sacrificados a los 180dpv								
5933	MFb	Neg	Pos	Pos	Pos	Pos	Neg	Neg
7460	F	Neg	Pos	Pos	Neg	Pos	Neg	Neg
Sacrificados a los 330 dpv								
3300	MFb	Neg	Neg	Pos	Neg	Neg	Pos	Neg
3302	MFb	Neg	Neg	Pos	Pos	Pos	Neg	Neg
5956	MFb	Neg	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos
9107	Dlin	Neg	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos

*Muerte a los 250 dpv a causa de una úlcera abomasal; ELISA: ELISA frente a paratuberculosis; IDR: intradermorreacción tras la inoculación con PPD aviar; IFN-γ: prueba de liberación de IFN-γ tras la estimulación con PPD aviar. PCR tf: PCR de tejido fresco; PCR tp: PCR de tejido incluído en parafina; PCR s: PCR de suero. F: Focal; Dint: difusa intermedia; SL: sin lesión; MFb: multifocal b; Dlin: difusa linfocítica. Pos: positivo; Neg: negativo.

Para los resultados de la PCR de suero se ha tenido en cuenta el resultado obtenido con ambos pares de primers utilizados, de forma que el animal se considera positivo si lo es a cualquiera de los dos.

Las siguientes tablas (Tablas IV.24-27) muestran el resumen de los resultados mostrados en las tablas anteriores, en el total de los animales infectados, desglosados por grupos.

Tabla IV.24. Resultado de las diferentes pruebas diagnósticas en el momento del sacrificio de los animales vacunados e infectados, según el tipo de lesión en que han sido clasificados.

Vacunados e infectados	Tipo lesional			
	Sin lesión	Focal	Multifocal b	Difusa
Cultivo: (+/total) Positivos (%)	0/2 (0)	1/4 (25)	-	1/1 (100)
PCR Fresco: (+/total) Positivos (%)	2/2 (100)	3/4 (75)	-	1/1 (100)
PCR Parafina: (+/total) Positivos (%)	1/2 (50)	3/4 (75)	-	1/1 (100)
PCR Suero: (+/total) Positivos (%)	0/2 (0)	0/4 (0)	-	0/1 (0)

Tabla IV.25. Resultado de las diferentes pruebas diagnósticas en el momento del sacrificio de los animales no vacunados e infectados, según el tipo de lesión en que han sido clasificados.

No vacunados e infectados	Tipo lesional			
	Sin lesión	Focal	Multifocal b	Difusa
Cultivo: (+/total) Positivos (%)	-	1/1 (100)	2/4 (50)	1/1 (100)
PCR Fresco: (+/total) Positivos (%)	-	1/1 (100)	3/4 (75)	1/1 (100)
PCR Parafina: (+/total) Positivos (%)	-	0/1 (0)	2/4 (50)	1/1 (100)
PCR Suero: (+/total) Positivos (%)	-	0/1 (0)	1/4 (25)	1/1 (100)

Tabla IV.26. Resultado de las diferentes pruebas diagnósticas en el momento del sacrificio del total de animales infectados, según el tipo de lesión en que han sido clasificados.

Infectados	Tipo lesional			
	Sin lesión	Focal	Multifocal b	Difusa
Cultivo: (+/total) **Positivos (%)**	0/2 (0)	2/5 (40)	2/4 (50)	2/2 (100)
PCR Fresco: (+/total) **Positivos (%)**	2/2 (100)	4/5 (80)	3/4 (75)	2/2 (100)
PCR Parafina: (+/total) **Positivos (%)**	1/2 (50)	3/5 (60)	2/4 (50)	2/2 (100)
PCR Suero: (+/total) **Positivos (%)**	0/2 (0)	0/5 (0)	1/4 (25)	1/2 (50)

Tabla IV.27. Resultado de las pruebas inmunológicas en el momento del sacrificio de los animales no vacunados e infectados, según el tipo de lesión en que han sido clasificados.

No vacunados e infectados	Tipo lesional			
	Sin lesión	Focal	Multifocal b	Difusa linfocítica
ELISA: (+/total) **Positivos (%)**	-	0/1 (0)	0/4 (0)	0/1 (0)
IDR: (+/total) **Positivos (%)**	-	1/1 (100)	2/3* (66,67)	1/1 (100)
IFN-γ: (+/total) **Positivos (%)**	-	1/1 (100)	4/4 (100)	1/1 (100)

ELISA: ELISA frente a paratuberculosis; IDR: intradermorreacción tras la inoculación con PPD aviar; IFN-γ: prueba de liberación de IFN-γ tras la estimulación con PPD aviar. *: no se tiene dato de uno de los animales con lesión multifocal b

Como se puede observar, los dos terneros *sin lesión*, que pertenecen al grupo vacunado, presentan resultados negativos al cultivo y a la PCR en suero mientras que los dos fueron positivos a la PCR en tejido fresco y uno a la PCR de tejidos incluidos en parafina. Únicamente en dos de los terneros con lesión *focal* se consiguió un aislamiento positivo mediante cultivo, mientras que este porcentaje fue superior cuando se empleó la técnica de PCR en tejido fresco (80% de los terneros) o en parafina (60%). Todos los animales fueron negativos a la PCR en suero. En las pruebas inmunológicas, valoradas en un solo animal con este tipo de lesión, los resultados fueron positivos a las

pruebas para la valoración de la respuesta celular, pero negativos a la producción de anticuerpos. Los animales con lesión *multifocal b* pertenecían todos al grupo no vacunado y dos de los cuatro con esta forma lesional (50%) fueron positivos al cultivo y a la PCR en muestras de tejido incluidas en parafina, llegando al 75% con la PCR de tejido fresco. Sólo un animal fue positivo a la PCR de suero. Los cuatro animales fueron negativos al test ELISA, mientras que todos fueron positivos al test de liberación del IFN-γ, y uno de ellos negativo a la IDR. El ternero vacunado con lesión *difusa intermedia*, resultó positivo a todas las pruebas excepto a la PCR de suero, mientras que el ternero no vacunado con lesión *difusa linfocítica* fue negativo tan solo al test ELISA.

En la siguiente tabla (Tabla IV.28) se muestra la relación entre el tipo de lesión y el resultado para el cultivo, PCR en tejido fresco y PCR en tejido incluido en parafina del conjunto de muestras de intestino o nódulos linfáticos analizadas por cada una de las técnicas, que se detallan en la tabla IV.22.

Tabla IV.28. Resultados globales donde se relaciona el tipo de lesión con el resultado de las pruebas de diagnóstico etiológico en el conjunto de muestras de intestino y nódulos linfáticos analizadas en los terneros infectados.

Tipo de Lesión	Nº de muestras (%)	Cultivo (+/total) positivos (%)	PCR Fresco (+/total) positivos (%)	PCR parafina (+/total) positivos (%)
Sin lesión	43 (47,48)	4/28 (13,79)	24/42 (57,14)	7/43 (16,28)
Focal	26 (28,89)	2/21 (9,52)	16/26 (6,15)	0/26 (0)
Multifocal a	12 (13,33)	2/7 (2,86)	8/12 (6,66)	5/12 (41,66)
Difusa Intermedia	4 (4,44)	2/3 (66,67)	4/4 (100,00)	4/4 (100,00)
Difusa linfocítica	5 (5,56)	2/4 (50,00)	5/5 (100,00)	3/5 (60,00)

El mayor porcentaje de muestras con aislamiento positivo mediante cultivo se obtiene en aquellas que presentan una lesión de tipo *difuso intermedia*, seguidas de las secciones con lesión *difusa linfocítica*, mostrando menos porcentaje de aislamientos las muestras con lesión *focal* o *multifocal b*. Todas las muestras de tejido con lesión *difusa*, tanto *intermedia* como *linfocítica*, fueron positivas a la PCR de tejido fresco, siendo, como para la prueba anterior, los tramos clasificados como *focales* y *multifocales b* los menos positivos. Con la PCR de tejidos incluidos en parafina se detectaron como

positivos todos los tramos con lesión *difusa intermedia*, así como el 60% de aquellos de tipo *difuso linfocítico* y en ninguna sección con lesión de tipo *focal* (Tabla IV.28).

En la siguiente figura (Figura IV.42) se muestra el análisis del grado de concordancia, por tipo de lesión, presentada entre las pruebas diagnósticas llevadas a cabo en los tramos que se presentan en la tabla IV.22.

Figura IV.42. Análisis del grado de concordancia, por tipo de lesión, presentada entre las pruebas diagnósticas llevadas a cabo en los tramos presentados en la tabla IV.22.

Sin lesión		CULTIVO		κ
		Pos	Neg	
PCR Fresco	Pos	3	13	**0,083**
	Neg	1	10	
PCR Parafina	Pos	2	4	**0,276**
	Neg	2	20	

Focal		CULTIVO		κ
		Pos	Neg	
PCR Fresco	Pos	0	0	**0**
	Neg	2	19	
PCR Parafina	Pos	0	0	**0**
	Neg	2	19	

Multifocal a		CULTIVO		κ
		Pos	Neg	
PCR Fresco	Pos	1	3	**-0,077**
	Neg	1	2	
PCR Parafina	Pos	1	3	**-0,077**
	Neg	1	2	

Difusa intermedia		CULTIVO		κ
		Pos	Neg	
PCR Fresco	Pos	2	1	**0**
	Neg	0	0	
PCR Parafina	Pos	2	1	**0**
	Neg	0	0	

Difusa linfocítica		CULTIVO		κ
		Pos	Neg	
PCR Fresco	Pos	2	2	**0**
	Neg	0	0	
PCR Parafina	Pos	2	1	**0**
	Neg	0	1	

Sin Lesión		PCR Fresco		κ
		Pos	Neg	
PCR Parafina	Pos	4	3	**0**
	Neg	20	15	

Focal		PCR Fresco		K
		Pos	Neg	
PCR Parafina	Pos	0	0	**0**
	Neg	16	10	

Multifocal a		PCR Fresco		K
		Pos	Neg	
PCR Parafina	Pos	4	1	**0,211**
	Neg	4	3	

Difusa intermedia		PCR Fresco		K
		Pos	Neg	
PCR Parafina	Pos	4	0	**-**
	Neg	0	0	

Difusa linfocítica		PCR Fresco		K
		Pos	Neg	
PCR Parafina	Pos	3	0	**0**
	Neg	2	0	

Pos: positivo; Neg: negativo; κ: índice estadístivo Kappa.

Se observa cómo, en las secciones *sin lesión*, el cultivo presenta una concordancia débil con la PCR de tejido fresco, y escasa con la PCR de tejido incluido en parafina. Igualmente, en estos tramos la concordancia entre la PCR de tejido fresco y la PCR de tejido incluido en parafina sería debida al azar En los tramos con lesión *focal*, la concordancia que presenta el cultivo con la PCR de tejido fresco o con la de tejido incluido en parafina es debida exclusivamente al azar, al igual que ocurre con ambas PCR. En las secciones con lesión *multifocal* el cultivo muestra una débil discordancia con ambas PCR y entre estas pruebas la concordancia es escasa. En las secciones de lesión *difusa intermedia* el cultivo presentó concordancia exclusivamente debida al azar con ambas PCR; entre estas no pudo hallarse la concordancia, al presentar los cuatro tramos con este tipo de lesión iguales resultados para la PCR en tejido fresco y embebido en parafina (positivo). En los tramos con lesión *difusa linfocítica*, la concordancia del cultivo con la PCR de tejido fresco fue debida al azar, mientras que presentaba concordancia moderada con la PCR de tejido incluido en parafina. Entre las PCR la concordancia fue debida al azar (Figura IV.XX).

IV.3.2. Relación entre las diferentes pruebas diagnósticas

En la siguiente figura (Figura IV.43) se muestra el análisis de concordancia de las diferentes pruebas diagnósticas realizadas en el momento del sacrificio, incluida la histopatología. Para la histopatología se considera un resultado positivo el hallazgo de cualquier tipo de lesión. Para el resto de pruebas, se consideraba positivo o negativo en función de los parámetros expresados en el material y métodos. Las pruebas inmunológicas indicadas se refieren a su diagnóstico frente a paratuberculosis. Al igual que ocurría en el apartado anterior, para la PCR en suero, se considera positivo un resultado si lo ha sido a la técnica con cualquiera de los dos pares de cebadores utilizados.

Las concordancias lesión con pruebas inmunológicas, al no haber animales sin lesión (dentro de los vacunados, que es sobre los que se reflejan las pruebas inmunológicas), no se pueden calcular.

Figura IV.43. Análisis del grado de concordancia entre las pruebas diagnósticas y la valoración histopatológica en los terneros infectados (continúa).

Infectados		Cultivo		κ
		Pos	Neg	
Lesión	Pos	6	5	0,270
	Neg	0	2	
PCR Fresco	Pos	6	6	0,222
	Neg	0	2	
PCR Parafina	Pos	4	4	0,160
	Neg	2	4	
PCR Suero	Pos	2	1	0,222
	Neg	4	7	
ELISA*	Pos	0	0	0
	Neg	4	2	
IDR*	Pos	3	1	0,545
	Neg	0	1	
IFN-γ*	Pos	4	2	0
	Neg	0	0	

Infectados		PCR Fresco		κ
		Pos	Neg	
Lesión	Pos	9	2	-0,182
	Neg	2	0	
PCR Parafina	Pos	6	2	0,163
	Neg	6	0	
PCR Suero	Pos	3	0	0,087
	Neg	9	2	
ELISA*	Pos	0	0	0
	Neg	5	1	
IDR*	Pos	4	0	1
	Neg	0	1	
IFN-γ*	Pos	5	1	0
	Neg	0	0	

Resultados en los que se toma al cultivo y la PCR de tejido fresco como referencia.*:Tan solo se tiene en cuenta a los seis animales del grupo no vacunado, para anular los resultados positivos a las diferentes pruebas debido al efecto de la vacunación.

Figura IV.43. Análisis del grado de concordancia entre las pruebas diagnósticas y la valoración histopatológica de los terneros infectados (continuación).

Infectados		PCR Parafina		κ
		Pos	Neg	
Lesión	Pos	6	5	0,025
	Neg	1	1	
PCR Suero	Pos	2	1	0,075
	Neg	6	5	
ELISA*	Pos	0	0	0
	Neg	3	3	
IDR*	Pos	2	2	-0,364
	Neg	1	0	
IFN-γ*	Pos	3	3	0
	Neg	0	0	

Infectados		PCR Suero		κ
		Pos	Neg	
Lesión	Pos	2	9	0,064
	Neg	0	2	
ELISA*	Pos	0	0	0
	Neg	2	4	
IDR*	Pos	2	2	0,286
	Neg	0	1	
IFN-γ*	Pos	2	4	0
	Neg	0	0	

Resultados en los que se toma la PCR de tejido incluido en parafina y la de suero como referencia.*:Tan solo se tiene en cuenta a los seis animales del grupo no vacunado, para anular los resultados positivos a las diferentes pruebas debido al efecto de la vacunación.

Tomando como referencia el cultivo, se muestra que esta prueba presenta concordancia moderada con la prueba de la IDR, débil con la PCR en tejido incluido en parafina, escasa concordancia con las lesiones, PCR en tejido fresco y en suero, concordancia moderada con la IDR y concordancia debida exclusivamente al azar con las pruebas de ELISA e IFN-γ.

Al tomar como referencia a la PCR en tejido fresco, la concordancia es débil con la histopatología, PCR en tejido incluido en parafina, PCR en suero, escasa con el cultivo, perfecta con la IDR y debida al azar con el ELISA y el IFN-γ.

Al tomar como referencia la PCR en tejido incluido en parafina, la discordancia es escasa con la IDR, débil con PCR de tejido fresco, con histopatología, lesión, cultivo y PCR de suero, y debida al azar con las pruebas de ELISA e IFN-γ.

Si la referencia es la PCR en suero, la concordancia con la presencia de lesiones, la PCR en tejidos incluidos en parafina y en suero es débil, escasa con cultivo e IDR y debida al azar con el test ELISA y de liberación de IFN-γ.

La concordancia entre las pruebas inmunológicas y las lesiones no han podido ser calculadas debido a que no existen animales que hayan sido infectados y no inmunizados (NVI) y que no presenten lesión.

En la siguiente figura (Figura IV.44) se muestra la concordancia entre las pruebas inmunológicas entre sí en los animales del grupo NVI.

Figura IV. 44. Análisis del grado de concordancia entre las pruebas de diagnóstico inmunológico de los terneros infectados y no vacunados.

No vacunados e infectados		ELISA		κ
		Pos	Neg	
IDR	Pos	0	4	**0**
	Neg	0	1	
IFN-γ	Pos	0	6	**0**
	Neg	0	0	

No vacunados e infectados		IDR		κ
		Pos	Neg	
IFN-γ	Pos	4	1	**0**
	Neg	0	0	

Pos: positivo; Neg: negativo; κ: índice estadístico Kappa.

Se observa que en todos los casos la concordancia existente es debida exclusivamente al azar.

IV.3.3. Producción *in vitro* local de IFN-γ

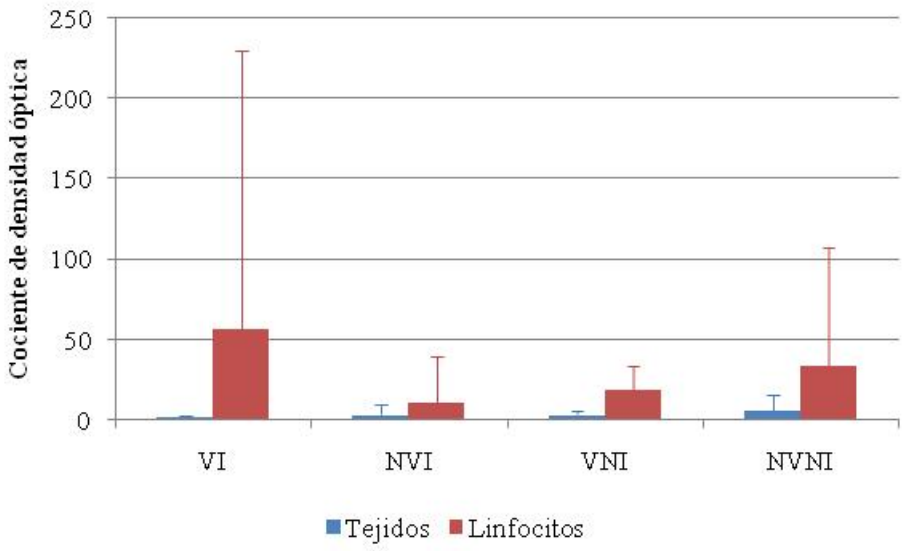
La producción *"in vitro"* de IFN-γ por parte de los linfocitos extraídos, purificados de los tejidos y cultivados fue siempre significativamente mayor ($p<0,05$) que cuando se empleó el tejido completo en todos los grupos experimentales, tal y como se muestra en las tablas IV.29 y en la gráfica IV.31.

Tabla IV.29. Producción total de IFN-γ por parte de los tejidos y linfocitos extraídos de los mismos en los diferentes grupos experimentales, tras la estimulación con PPD aviar e incubación durante 24 horas.

Grupos	Tejido	Linfocitos
VI	2,09	56,64
NVI	3,41	10,81
VNI	3,43	19,04
NVNI	5,51	33,48

Los resultados están expresados como cocientes de densidad óptica. VI: vacunados e infectados; NVI: no vacunados e infectados; VNI: vacunados no infectados; NVNI: no vacunados, no infectados.

Gráfica IV.31. Producción total de IFN-γ por parte de los tejidos y linfocitos extraídos de los mismos en los diferentes grupos experimentales, tras la estimulación con PPD aviar e incubación durante 24 horas.



VI: vacunados e infectados; NVI: no vacunados e infectados; VNI: vacunados no infectados; NVNI: no vacunados, no infectados. (Barras de error: desviación estándar).

Cuando se analizan los valores de IFN-γ en los diferentes grupos, no se han encontrado diferencias significativas entre ellos, tanto en los linfocitos purificados como en los tejidos.

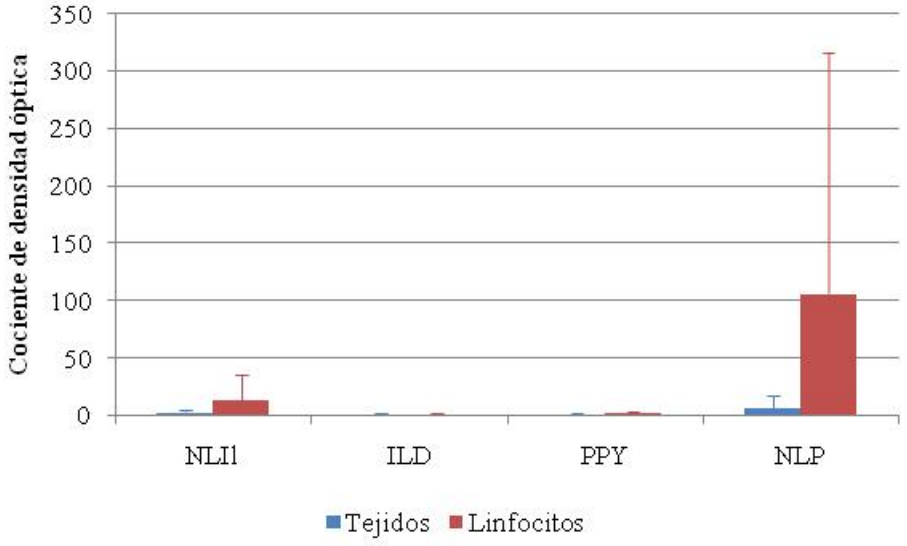
Los resultados de la producción total de IFN-γ por parte de los linfocitos o de los tejidos de cada una de las localizaciones examinadas (NLIl, ILD, PPY, NLP) se muestran en la tabla IV.30 y en la gráfica IV.32. La producción de IFN-γ por parte de los linfocitos de NLIl, PPY y NLP fue mayor en los linfocitos que en los tejidos ($p<0,05$), no así en el ILD, donde la producción de esta citoquina por parte de los tejidos superó a la producida por los linfocitos extraídos de los mismos, si bien la diferencia no fue significativa.

Tabla IV.30. Producción total de IFN-γ por parte de los tejidos y linfocitos extraídos de los mismos en las diferentes localizaciones examinadas, tras la estimulación con PPD aviar e incubación durante 24 horas.

	NLIl	ILD	PPY	NLP
Tejidos	2,85	1,85	1,88	6,70
Linfocitos	13,95	1,56	2,47	106,14

Los resultados están expresados comococientes de densidad óptica. NLIl: nódulo linfático ileal; ILD: íleon distal; PPY: placa de Peyer yeyunal; NLP: nódulo linfático preescapular.

Gráfica IV.32. Producción total de IFN-γ por parte de los tejidos y linfocitos extraídos de los mismos en las diferentes localizaciones examinadas, tras la estimulación con PPD aviar e incubación de 24 horas.



NLIl: nódulo linfático ileal; ILD: íleon distal; PPY: placa de Peyer yeyunal; NLP: nódulo linfático preescapular.(Barras de error: desviación estándar).

Al comparar la producción de IFN-γ entre las diferentes localizaciones, no se observaron diferencias significativas en ninguno de los dos protocolos.

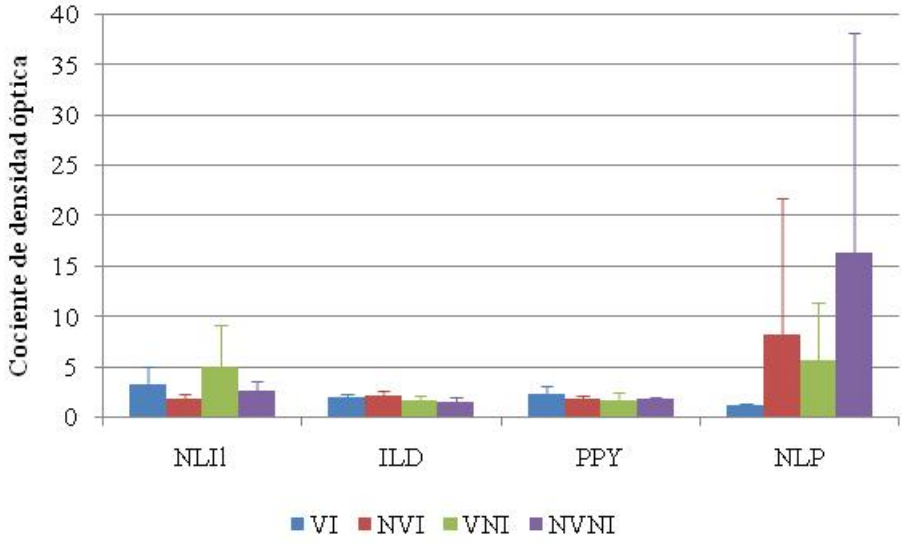
Los resultados de la producción de esta citoquina por parte de los tejidos en las diferentes localizaciones y en los diferentes grupos se muestran en la tabla IV.31 y en la gráfica IV.33. Se observa como los valores más altos de densidad óptica se obtienen en el NLP, en todos los grupos excepto en el VI, donde este valor corresponde al NLIl. Para los grupos VNI y NVNI el NLIl es el segundo tejido en el que se produce más IFN-γ, no así para el grupo NVI, donde sucede en el ILD. Únicamente se observan diferencias significativas entre grupos entre localizaciones concretas, como se muestra más adelante.

Tabla IV.31. Producción de IFN-γ por parte de los tejidos del nódulo linfático ileal (NLIl), íleon distal (ILD), placa de Peyer yeyunal (PPY) y nódulo linfático preescapular (NLP) de los terneros de todos los grupos experimentales, tras la estimulación con PPD aviar e incubación durante 24 horas.

Grupos	Linfocitos de los órganos			
	NLIl	ILD	PPY	NLP
VI	3,20	1,86	2,20	1,12
NVI	1,70	2,15	1,75	8,05
VNI	4,95	1,55	1,65	5,55
NVNI	2,55	1,50	1,70	16,30

Los resultados vienen expresados en cocientes de densidad óptica. VI: vacunados e infectados; NVI: no vacunados e infectados; VNI: vacunados no infectados; NVNI: no vacunados, no infectados.

Gráfica IV.33. Producción de IFN-γ por parte de e los tejidos NLIl, PPI, PPY, NLP de los terneros de todos los grupos experimentales, tras la estimulación con PPD aviar e incubación durante 24 horas.



VI: grupo vacunado e infectado; NVI: grupo no vacunado e infectado; VNI: grupo vacunado y no infectado; NVNI: grupo no vacunado y no infectado.(Barras de error: desviación estándar).

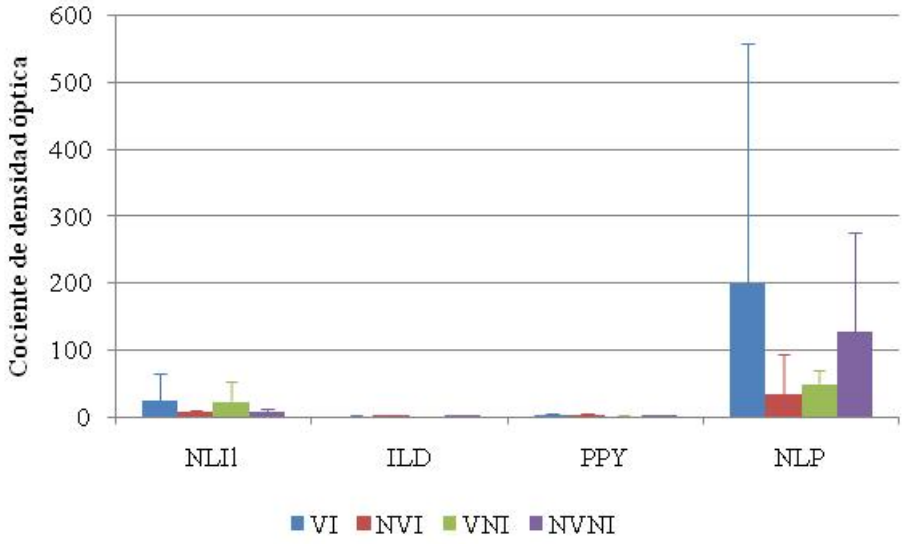
Los resultados de la producción de IFN-γ por parte de los linfocitos extraídos de tejidos en las diferentes localizaciones tras su estimulación con PPD aviar y en los diferentes grupos se muestran en la tabla IV.32 y en la gráfica IV.34. Se observa como los valores más altos de densidad óptica se obtienen, independientemente del tratamiento recibido, como ya ocurría con el cultivo de los fragmentos de tejido, en el NLP seguido del NLIl, con diferencias respecto al resto de localizaciones ($p<0,05$), en todos los grupos, siendo el NLIl es el segundo tejido en el que se produce más IFN-γ, también para todos los grupos. Únicamente se observan diferencias significativas entre grupos entre localizaciones concretas, como se muestra más adelante.

Tabla IV.32. Producción de IFN-γ por parte de los linfocitos extraídos de los tejidos del nódulo linfático ileal (NLIl), íleon distal (ILD), placa de Peyer yeyunal (PPY) y nódulo linfático preescapular (NLP) de los terneros de todos los grupos experimentales, tras la estimulación con PPD aviar e incubación durante 24 horas.

Grupos Animales	Linfocitos de los órganos			
	NLIl	ILD	PPY	NLP
VI	23,94	1,24	2,76	198,63
NVI	5,79	2,19	2,83	32,46
VNI	23,48	1,10	2,00	49,60
NVNI	5,80	1,40	1,63	125,10

Los resultados vienen expresados en cocientes de densidad óptica. VI: vacunados e infectados; NVI: no vacunados e infectados; VNI: vacunados no infectados; NVNI: no vacunados, no infectados.

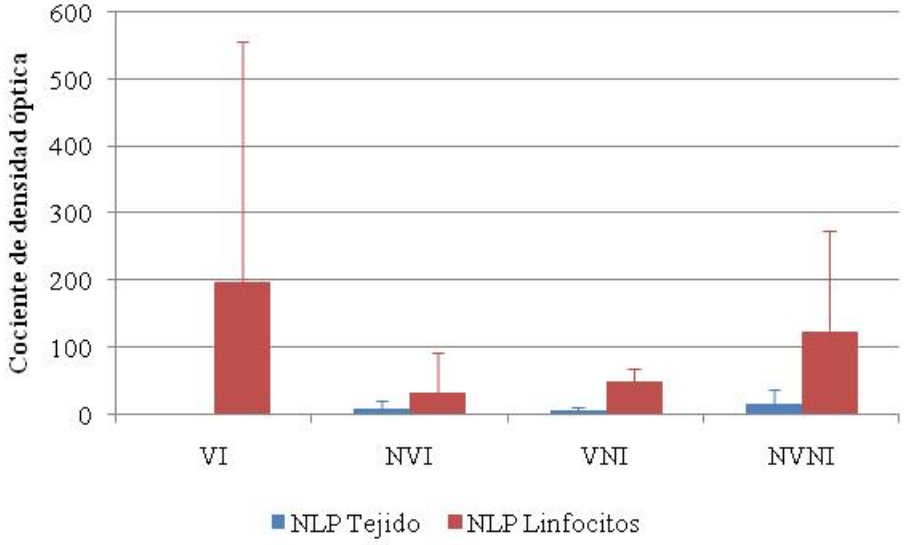
Gráfica IV.34. Producción de IFN-γ por parte de los linfocitos extraídos tras la necropsia de los tejidos NLIl, ILD, PPY y NLP de los terneros de todos los grupos experimentales, tras la estimulación con PPD aviar e incubación durante 24 horas.



VI: vacunados e infectados; NVI: no vacunados e infectados; VNI: vacunados no infectados; NVNI: no vacunados, no infectados.(Barras de error: desviación estándar).

Para una mejor visualización de los resultados, en las siguientes gráficas (Gráficas IV.35-39) se muestra las diferencias en la producción de IFN-γ en las diferentes localizaciones, en los diferentes grupos, entre la cantidad producida por los tejidos y por los linfocitos.

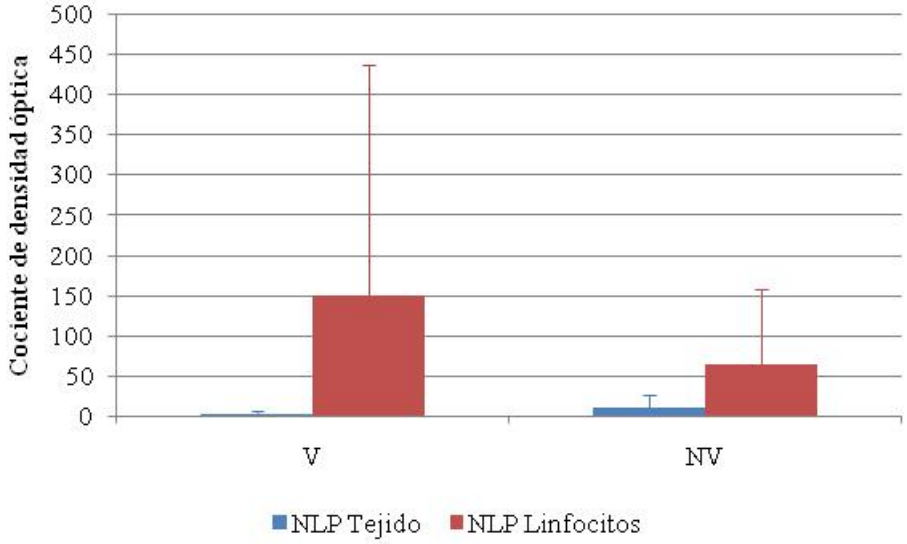
Gráfica IV.35. Producción de IFN-γ por parte de las muestras de tejido y linfocitos extraídos del nódulo linfático preescapular (NLP), tras la estimulación con PPD aviar e incubación durante 24 horas.



VI: grupo vacunado e infectado; NVI: grupo no vacunado e infectado; VNI: grupo vacunado y no infectado; NVNI: grupo no vacunado y no infectado

Se observan diferencias significativas ($p<0,05$) entre los grupos VI y los NVI y VNI en la producción de IFN-γ por parte de los linfocitos del NLP (Gráfica IV.35).

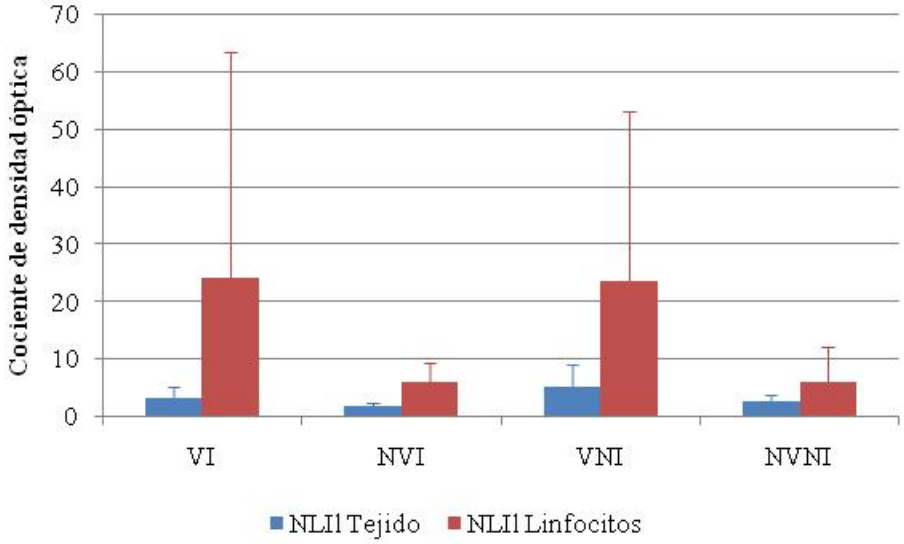
Gráfica IV.36. Producción de IFN-γ por parte de las muestras de tejido y linfocitos extraídos del nódulo linfático preescapular (NLP), tras la estimulación con PPD aviar e incubación durante 24 horas, en terneros vacunados (V) y no vacunados (NV).



Barras de error: desviación estándar.

Dado que la infección no influiría sobre la liberación de IFN-γ en el NLP, se han agrupado los lotes según sean vacunados (V) o no vacunados (NV) y se han observado diferencias significativas en la producción de IFN-γ entre ambos grupos ($p<0,05$) (Gráfica IV. 36).

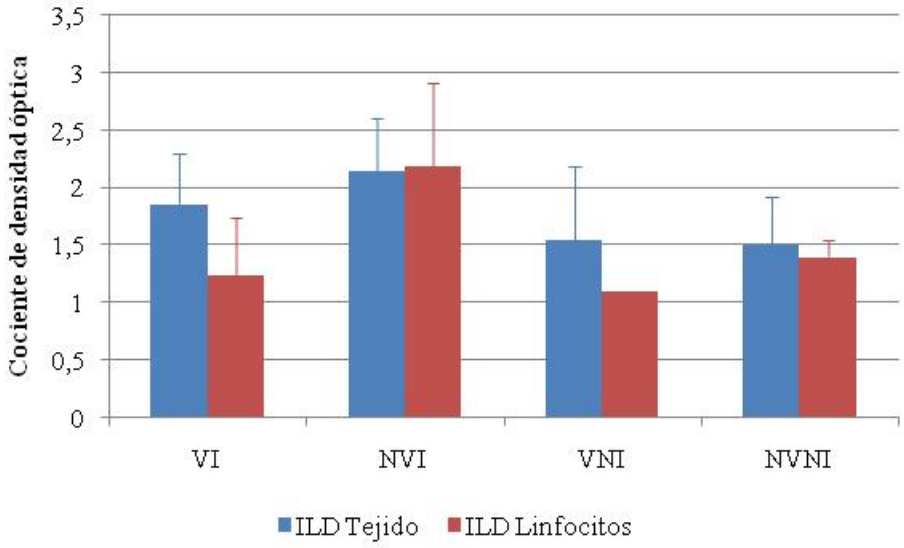
Gráfica IV.37. Producción de IFN-γ por parte de muestras de tejido y linfocitos extraídos del nódulo linfático ileal (NLIl), tras la estimulación con PPD aviar e incubación 24 horas.



VI: grupo vacunado e infectado; NVI: grupo no vacunado e infectado; VNI: grupo vacunado y no infectado; NVNI: grupo no vacunado y no infectado. (Barras de error: desviación estándar)

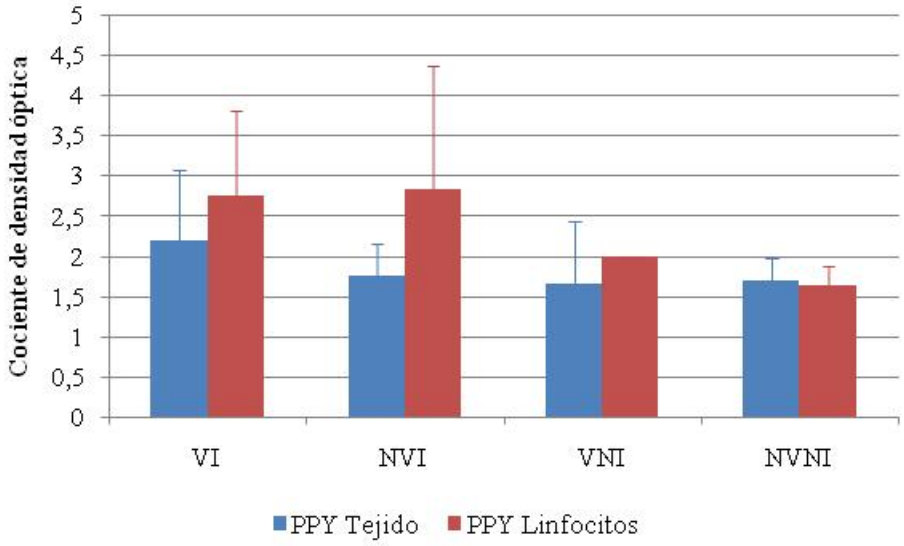
Se observa un incremento de producción de IFN-γ por parte de los linfocitos purificados en las muestras de NLIl de los dos grupos vacunados respecto al resto ($p<0,05$), que no se aprecian en el cultivo de fragmentos tisulares (Gráfica IV.37).

Gráfica IV.38. Producción de IFN-γ por parte de secciones de tejido y linfocitos extraídos del íleon distal (ILD), tras la estimulación con PPD aviar e incubación 24 horas.



VI: grupo vacunado e infectado; NVI: grupo no vacunado e infectado; VNI: grupo vacunado y no infectado; NVNI: grupo no vacunado y no infectado. (Barras de error: desviación estándar)

Gráfica IV.39. Producción de IFN-γ por parte de tejido y linfocitos extraídos de la placa de Peyer yeyunal (PPY), tras la estimulación con PPD aviar e incubación 24 horas.



VI: grupo vacunado e infectado; NVI: grupo no vacunado e infectado; VNI: grupo vacunado y no infectado; NVNI: grupo no vacunado y no infectado. (Barras de error: desviación estándar)

Los terneros del grupo NVI mostraron una mayor producción de esta citoquina que el grupo control NVNI ($p<0,05$), en linfocitos extraídos a partir de muestras de intestino (placa de Peyer yeyunal e ileal), no observándose dichas diferencias en el cultivo de fragmentos de tejido (Gráfica IV.39). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas con los grupos de animales vacunados (Gráfica IV.39).

V.DISCUSIÓN

V.1. DISCUSIÓN

El hecho de que la vacunación se haya demostrado ya, en estudios previos, como un procedimiento exitoso para el control de la paratuberculosis, a pesar de los inconvenientes que presenta, fue el principal motivo que propició el que se realizaran las experiencias que componen esta Tesis Doctoral, cuyo objetivo general fue valorar la eficacia de una nueva vacuna, Silirum®, en el control de la infección por *Map* en un modelo experimental en terneros.

La principal conclusión de este estudio es que esta nueva formulación vacunal ha demostrado su eficacia en cuanto al control de la infección paratuberculosa, provocando una reducción en el número y extensión de las lesiones, así como en la colonización por *Map* de los distintos tejidos. Sin embargo, y como ya se había demostrado con la administración de otros productos vacunales en estudios experimentales en ovino (Brotherston y Gilmour, 1961b; Nisbet *et al*., 1962; Juste *et al*., 1994; Begg y Griffin, 2005; Reyes, 2007; Griffin *et al*., 2009), pero también en bovino (Hagan, 1935; Stuart, 1965b; Larsen *et al.*, 1974; Uzonna *et al*., 2003; Koets *et al*., 2006; Kathaperumal *et al*., 2008; Sweeney *et al*., 2009), caprino (Marly *et al*., 1988; Hines II *et al*., 2007a; Singh *et al*., 2007; Kathaperumal *et al*., 2009; Hines II *et al*., 2014) e incluso en trabajos de campo al vacunar ovinos jóvenes (Eppleston *et al*., 2005; Reddacliff *et al*., 2006), la inoculación de Silirum® en el modelo experimental empleado, no previene la infección. Además, la protección no es completa, habiéndose demostrado que un animal vacunado desarrolló formas lesionales avanzadas y graves de paratuberculosis.

En este trabajo, se ha empleado un método de valoración histopatológica de las lesiones basado en el estudio de su localización, extensión y morfología, así como su cuantificación, para estudiar la eficacia de la vacunación. Las lesiones asociadas a paratuberculosis pudieron apreciarse en once de los catorce animales infectados del estudio. Los tres animales que no presentaron lesión pertenecían al grupo vacunado, por lo que en todos los animales que no fueron inmunizados pudieron encontrarse lesiones asociadas a paratuberculosis, indicando ya una eficacia de la vacunación en la prevención del desarrollo de lesiones. No solo la proporción de animales con afectación

histológica fue mayor en el grupo no vacunado, sino que la gravedad de las lesiones también. Así, de los cinco animales que presentaban lesión en el grupo inmunizado, salvo el animal 5931 que desarrolló una lesión difusa, el resto presentó lesiones de tipo focal. De los terneros del grupo no vacunado, sin embargo, tan sólo uno de los sacrificados a los 180 dpv presentaba lesión focal restringida al tejido linfoide mientras que el resto presentaba afectación de la lámina propia intestinal, con lesiones multifocales en 4 casos y lesión difusa en otro. Además, se ha comprobado que, tanto en el sacrificio realizado a los 180 dpv como en el que se llevó a cabo a los 330 dpv, el número de granulomas contados en los tejidos de los animales vacunados fue mucho menor que el de los no vacunados, incluso incluyendo el ternero 5931, en el que el recuento de granulomas fue muy numeroso. Por otra parte, en el grupo no vacunado los granulomas eran evidentesen un mayor número de localizaciones y estas lesiones se encontraban mucho más extendidas, como ha quedado constatado al valorar el área que ocupaban en los nódulos linfáticos. Estos resultados apoyan también la eficacia de la vacuna, de manera que no sólo se consigue que aparezcan menos animales con lesión, sino que cuando ésta existe, es menos grave ya que, en la mayor parte de los terneros no vacunados, las lesiones progresaron hacia formas más extensdidas. Atendiendo a estos hallazgos se podría contemplar la hipótesis de que, en la mayoría de los animales inmunizados y posteriormente infectados, la vacuna habría inducido una regresión de las lesiones, hasta su desaparición, o al menos su contención en formas focales, evitando su progresión.

El número de trabajos previos sobre valoración de la eficacia de la vacunación mediante el estudio de lesiones es escaso en la especie bovina. En cuanto a estudios experimentales, tan sólo se han encontrado, en la bibliografía consultada, dos trabajos (Hagan, 1935; Larsen *et al.*, 1974) donde se demuestra que en los animales vacunados hay menos lesiones. En el caso de estudios de campo, hay más evidencias tanto en animales vacunados al mes de edad (Kalis *et al*., 1992; Wentink *et al.*, 1994; van Shaik *et al*., 1996) como en los vacunados de diferentes edades (García Pariente *et al*., 2005; Alonso-Hearn *et al*., 2012). En cualquier caso, en ninguno de ellos se ha llevado un estudio detallado del número de lesiones y extensión de las mismas como el que se ha realizado en el presente estudio.

En la especie ovina, sin embargo, si se han realizado estudios más exhaustivos, en los que se hace un recuento de lesiones, apreciándose un número menor de ellas en corderos vacunados e infectados experimentalmente (Juste *et al*., 1994). Esta observación también ha sido comunicada en otros trabajos (Nisbet *et al*., 1962; Gowzdz *et al*., 2000a) si bien en ellos no se lleva a cabo un recuento detallado. En otro trabajo llevado a cabo por nuestro grupo de investigación, en el que además de la vacuna Gudair® se probó una vacuna similar a la de este trabajo en corderos, se comprobó la ausencia absoluta de lesiones en los animales infectados y que habían sido vacunados, otorgando a la vacunación frente a *Map* una protección completa en cuanto al desarrollo de lesiones (Reyes, 2007). No obstante, en esta especie se han probado soluciones vacunales como AquaVax (vacuna viva de la cepa 316F y con adyuvante salino) sin ningún valor protector ya que los animales vacunados presentan el mismo patrón de lesiones que los animales no vacunados (Begg y Griffin, 2005), aunque si encontraban diferencias positivas achacables a la vacunación cuando se realizaba con Neoparasec® (Begg y Griffin, 2005), con Gudair® u otras formulaciones elaboradas con el lípido K (Griffin *et al*., 2009). En esta especie también han sido numerosos los trabajos realizados en condiciones de campo para valorar la eficacia de la vacunación con muy buenos resultados al comparar las lesiones encontradas en los animales vacunados con respecto a los controles (Sigurdsson, 1960; Aduriz, 1993; Sommerville *et al*., 1995; Dimareli-Mali *et al*., 1997; Eppleston *et al*., 2005; Thonney *et al*., 2005; Reddacliff *et al*., 2006; Toribio *et al*., 2007). En ganado caprino, aunque en un menor número de trabajos, también se ha comprobado la efectividad vacunal al medir la diferente presentación de lesiones entre animales vacunados y controles, tanto en infecciones experimentales (Singh *et al*., 2007; Hines II *et al*., 2007a, 2014; Kathaperumal *et al*., 2009) como en animales con infección natural y vacunados a edades diferentes, de 1 mes (Saxegaard y Fodstad, 1985), de 6 meses a un año (Singh *et al*., 2013) o incluso adultos (Corpa *et al*., 2000b). En otras experiencias, también en condiciones de campo, aunque no se ha encontrado una disminución del número de animales con lesión, si se ha observado que los individuos vacunados presentaban lesiones de tipo focal mientras que en los no inmunizados las lesiones eran más extensas y graves (Pérez *et al*., 1995; García Pariente *et al.*, 2004), sugiriendo que la vacunación controla el desarrollo lesional hacia formas focales o evitaría su progresión hacia tipos más graves, lo que apoyaría nuestros resultados.

En nuestro estudio, las lesiones histológicas no solo eran significativamente más numerosas en los animales no vacunados en ambos momentos de sacrificio, como ya se ha descrito, sino que las diferencias en su localización también sugerirían que la vacunación habría modificado su desarrollo. Así, en el sacrificio realizado a los 180 dpv, las lesiones solo aparecieron en uno de los tres animales vacunados, y estaban localizadas en el tejido linfoide, concretamente 2 granulomas en el tejido linfoide de la PPYM, mientras que en los dos terneros sacrificados en el grupo no vacunado las lesiones, además de ser más numerosas, afectaban diferentes localizaciones, destacando la lámina propia intestinal, lo que se ha asociado a una progresión hacia formas más avanzadas de la infección (Stamp y Watt, 1954; Buergelt *et al*.,1978; Nisbet *et al*., 1962; Van Kruingen *et al*., 1986; Pérez *et al*., 1996; Corpa *et al*., 2000a; García-Marín *et al*., 2000; Kurade *et al*., 2004; Valheim *et al*., 2002b; González *et al*., 2005; Delgado *et al*., 2013; Fernández *et al*., 2014a). De igual forma, en el sacrificio llevado a cabo a los 330 dpv, todos los animales vacunados, a excepción del animal con lesión difusa, presentaban lesiones restringidas al tejido linfoide (formas focales). Este tipo de lesión se ha asociado a formas de resistencia o latencia de la infección (Pérez *et al*., 1996; Corpa *et al*., 2000a; González *et al*., 2005; Delgado *et al*., 2013; Fernández *et al*., 2014a), indicando que la vacunación sería capaz de conseguir, en la mayoría de los animales infectados, una limitación del desarrollo lesional, o incluso una regresión, hacia formas de resistencia localizadas exclusivamente en el seno del tejido linfoide. Esta hipótesis se vería apoyada por el hecho de que, si se exceptúa el ternero vacunado con lesión difusa, sólo se ha encontrado lesión en zonas de yeyuno no relacionadas con tejido linfoide en los animales no vacunados; este hallazgo, como ya se ha indicado, se asocia a la progresión de la infección hacia formas más avanzadas.

Al igual que el recuento de granulomas, el estudio de valoración de la extensión de las lesiones llevado a cabo en los nódulos linfáticos también ha mostrado una acción beneficiosa de la vacunación. En el primer sacrificio realizado, ninguno de los tres animales del grupo vacunado presentaba lesiones en los nódulos linfáticos, diferencias que también son evidentes en el segundo sacrificio, en el que los animales no vacunados presentan una extensión de las lesiones 2,66 veces mayor que la de los vacunados;como en el caso anterior, se ampliarían sustancialmente si no se tuviera en cuenta el animal

vacunado con lesión difusa. Estos hallazgos concuerdan con lo observado a nivel intestinal y refuerzan la hipótesis planteada en cuanto a la acción de la vacunación sobre las lesiones.

Cuando se analiza la intensidad lesional en los dos momentos del sacrificio, el número de lesiones detectadas en los animales sacrificados a los 330 dpv fue siempre mayor, además de ser éstas más extensas que las encontradas a los 180 dpv en ambos grupos, si bien el incremento producido de un sacrificio a otro es menos acentuado en el grupo vacunado que en el grupo no vacunado, con lo que se podría atribuir este efecto a la vacuna. Además, en el grupo de terneros no vacunados se encuentran afectadas todas las localizaciones examinadas, mientras que en el grupo vacunado hay localizaciones sin afectación, destacando el menor número de lesiones encontrado en los nódulos linfáticos. Teniendo en cuenta estos hallazgos, y ante lo sugerido en párrafos anteriores sobre que la vacunación podría causar una limitación o incluso regresión de las lesiones, estos resultados comparativos entre los dos momentos de sacrificio apuntan a que la vacunación no sería capaz de paralizar la progresión de las lesiones, a la vista de que en el segundo sacrificio eran mayores y más extensas, pero sí de frenarla y de enlentecer su desarrollo, ya que eran menos numerosas en los vacunados que en los no vacunados. Esto estaría parcialmente de acuerdo con lo encontrado en otros trabajos experimentales en la especie ovina (Juste *et al*., 1994, García-Marín *et al*., 1997; Reyes, 2007) que indican que la vacunación limita la progresión de las lesiones, lo que en nuestro estudio habría ocurrido de forma parcial, ya que han continuado progresando.

En los estudios anteriormente mencionados en la especie ovina (Juste *et al*., 1994; Reyes, 2007) se ha señalado que la vacunación, además, podría provocar una regresión en las lesiones ya inducidas, al encontrar que los granulomas de los animales vacunados, además de reducirse en número, presentan fenómenos de fibrosis asociada a un mayor intento de restringir la lesión. Hallazgos similares en ovejas adultas infectadas experimentalmente (Delgado *et al.*, 2013) o en corderos inoculados con cepas bovinas de *Map* (Verna *et al.*, 2007; Fernández *et al.*, 2014a) también se han asociado a una respuesta más intensa del hospedador en esas circunstancias, capaz de provocar la regresión de las lesiones. Sin embargo, en nuestro estudio los granulomas observados en los animales vacunados presentan una morfología similar a la de los no vacunados y no

se observan esos fenómenos de fibrosis señalada por estos investigadores, lo cual estaría más de acuerdo con la hipótesis formulada anteriormente de que, en este caso, la vacunación habría producido un enlentecimiento en la progresión lesional más que una regresión o limitación clara de las lesiones.

De todo lo anteriormente expuesto se puede concluir que el método de valoración histopatológica propuesto en esta Tesis Doctoral, basado en el estudio de la extensión, localización y cuantificación de las lesiones, ha demostrado su utilidad para evaluar la eficacia de una vacuna en una infección experimental en terneros.

La eficacia de la vacunación también ha sido constatada mediante los resultados obtenidos en los estudios bacteriológicos. En cuanto al cultivo y la PCR de heces, no se pueden comparar los resultados de los animales vacunados y no vacunados en este trabajo ya que no se obtuvieron resultados positivos en ningún caso. Esta falta de detección podría deberse bien a la falta de rendimiento de los métodos empleados, ya que se ha señalado que la congelación de las muestras disminuiría la viabilidad de *Map* (Geijo, 2007), a la inactivación que puede sufrir la bacteria durante los protocolos de descontaminación de las muestras fecales (Redacliff *et al.*, 2003b), o más probablemente en nuestra opinión, a la escasa excreción fecal que se suele asociar a las fases subclínicas de la infección (Merkal, 1984; Thoen y Baum, 1988; Whipple, 1992; Sockett *et al.*, 1992a; Whitlock *et al.*, 1992, 2000; Whittington *et al.*, 2000a), como sería el caso de los terneros de nuestro estudio. En ellos, tampoco se ha podido detectar la presencia de *Map* en heces ni siquiera en los animales con lesiones difusas, si bien la carga bacteriana en los tejidos de ambos no era excesivamente elevada, tratándose de formas intermedias y linfocíticas. Así pues, en ningún caso estos resultados estarían en contradicción con lo encontrado en otros estudios donde se observa una reducción significativa de la carga bacteriana fecal tanto en trabajos experimentales como de campo, en la especie bovina (Larsen *et al.*, 1974; Hurley y Ewing, 1983; Jorgensen, 1983b; Argenté, 1992; Kormendy, 1994; Mohr, 2000; Kalis *et al.*, 2001; Klawonn *et al.*, 2001; Koets *et al.*, 2006; Patton *et al.*, 2006; Juste *et al.*, 2009a; Alonso-Hearn *et al.*, 2012; Knust *et al.*, 2013; Tewari *et al.*, 2014), ovina (Dimarelli-Malli *et al.*, 1997; Eppleston *et al.*, 2005; Reddacliff *et al.*, 2006; Toribio *et al.*, 2007; Griffin *et al.*, 2009; Eppleston *et al.*, 2011; Hüttner *et al*, 2012; Dhand *et al.*, 2013; Windsor *et al.*, 2014) o

caprina (Marly *et al*., 1988; Leslie *et al*., 1988; Dimarelli-Malli *et al*., 1997; Singh *et al*., 2007, 2013).

En cuanto a la eficacia de la vacunación sobre el aislamiento e identificación de *Map* en tejidos, se ha comprobado que los animales vacunados de este estudio presentan una notable reducción del número de colonias al compararlos con los animales no inmunizados. Además, resultaron positivas un mayor número de localizaciones en los animales no vacunados. Estos resultados apoyarían los obtenidos en estudios previos que han demostrado la eficacia de la vacunación mediante la valoración de la reducción de la carga bacteriológica en tejidos (Brotherston *et al*., 1961; Nisbet *et al*., 1962; Hore *et al*., 1971; Larsen *et al*., 1974; Marly *et al*., 1988; Aduriz, 1993; Juste *et al*., 1994; van Schaik *et al*., 1996; Gwozdz *et al*., 2000a; Uzonna *et al*., 2003; Hines II *et al*., 2007a; Kathaperumal *et al*., 2008, 2009; Sweeney *et al*., 2009; Alonso-Hearn *et al*., 2012), aunque hay algunos trabajos en los que, a pesar de reconocer su eficacia en el control de los signos clínicos, no se ha encontrado una acción beneficiosa en la disminución del número de aislamientos a partir de tejido (Hagan, 1935; Wentink *et al*., 1994, Pérez *et al*., 1995; Hines II *et al*., 2007a), si bien en la gran mayoría de estos estudios no se hace una valoración exhaustiva de la reducción de la carga bacteriana en las muestras cultivadas ni del número de localizaciones donde se produce el aislamiento. En aquellos que sí lo hacen se obtuvieron resultados concordantes con los de este trabajo. Uzonna *et al.* (2003) aíslan colonias de *Map* de todos los terneros infectados, tanto vacunados como no vacunados, pero encuentran menos localizaciones afectadas y un menor número de colonias en los vacunados. En el estudio de Hines II *et al*. (2007a) se comprueba cómo uno de los antígenos vacunales probados produce una notable reducción de colonias por gramo de tejido intestinal, descendiendo de 222 colonias en los cabritos vacunados a 97 en los que no recibieron la inmunización, incluso a 83 en el caso de animales vacunados en los que la vacuna lleva alumbre como adyuvante. Igualmente, Katheperumal *et al.* (2008) o Sweeney *et al.* (2009), en un estudio en terneros neonatos, y Kathaperumal *et al.*, (2009) o Hines II *et al.*, (2014) en cabritos, observan una mayor proporción de animales positivos y mayor número de colonias en tejidos de los animales no inmunizados respecto a los que sí lo han sido. Estos buenos resultados también se obtienen en animales adultos, de forma que Alonso-Hearn *et al* (2012), en un estudio realizado en vacas lecheras que se destinan al matadero de forma

prematura, encuentran no solo que el número de animales positivos al cultivo de tejidos es superior en el caso de los no vacunados sino que el porcentaje de animales con elevada carga bacteriana en tejidos es 40% superior en las vacas no vacunadas.

Otro aspecto a tener en cuenta es que el aislamiento se produjo antes en los animales no inmunizados, ya que uno de los cuatro terneros del grupo no vacunado con resultados positivos se había sacrificado 120 días después de la infección, mientras que los dos animales con aislamiento positivo en el grupo VI se sacrificaron a los 270 dpi, lo que no estaría en desacuerdo con el enlentecimiento de la progresión lesional encontrado en los estudios anatomopatológicos. En el estudio experimental de Juste *et al*. (1994) en corderos también se aísla un menor número de colonias en los animales vacunados pero a diferencia de nuestro estudio, el número de aislamientos fue mayor a los 45 dpi que en posteriores sacrificios (120 y 220 dpi). Como ya se ha señalado, en este trabajo además se observó una modificación de las lesiones hacia formas fibrosadas de carácter regresivo, no encontradas en nuestro estudio. Estos hechos diferenciales podrían estar asociados bien al hospedador (distintas especies o razas), al producto vacunal empleado, que aunque contenía la misma cepa de *Map* inactivada de la misma manera, el adyuvante era distinto, o a las condiciones experimentales en las que se desarrollaron los estudios.

Sin embargo, en la identificación de *Map* mediante PCR, las variaciones entre grupos no son tan evidentes ya que, aunque las diferencias no fueron significativas, se ha encontrado un mayor número de resultados positivos en tejidos de animales vacunados, si bien en un menor número de localizaciones que en los no inmunizados, en contraste con los resultados del aislamiento bacteriológico. Además, el número de terneros con resultado positivo fue mayor, en todos los grupos, que empleando el cultivo bacteriológico, tanto en el caso de la PCR llevada a cabo en tejido fresco como en parafina. Debe tenerse en cuenta que la PCR pone de manifiesto la presencia de ácidos nucleídos de *Map,* siendo por lo tanto un signo de infección, sin que ello signifique que las bacterias sean viables como en el cultivo (Garrido *et al*., 2000a).

Los resultados de la PCR sugieren la posibilidad de que los animales vacunados se habrían infectado de forma similar a los no inmunizados pero la vacunación habría

sido capaz de inducir una mayor destrucción de bacilos, llegando a reducirse también el número de localizaciones colonizadas. Por lo tanto estarían de acuerdo con los hallazgos lesionales, donde la vacunación ha mostrado una reducción en la gravedad y extensión de las lesiones e incluso la ausencia de las mismas en algunas secciones y animales, a pesar de resultados positivos de PCR. En este sentido, la demostración de ADN de *Map* en ausencia de lesiones se ha constatado previamente en otras infecciones experimentales en corderos (Delgado *et al.*, 2013; Fernández *et al.*, 2014a).

En numerosos estudios que han valorado la eficacia de la vacunación, especialmente en trabajos de campo en bovino (Doyle, 1956, 1964; Wilesmith, 1982; Hurley y Ewing, 1983; Argenté, 1988; Benedictus, 1988; Kalis *et al*., 1992; Wentink *et al*., 1994; van Shaik *et al*., 1996) y ovino (Aduriz, 1993; Cranwell, 1993; Pérez *et al*., 1995) se ha comprobado que su principal efecto es lograr una reducción de los signos clínicos asociados a paratuberculosis en el rebaño. En nuestro estudio, este hecho no ha podido ser comprobado ya que no se han encontrado manifestaciones clínicas evidentes en ninguno de los animales, incluso en aquellos que mostraron lesiones de carácter difuso. Este hecho no es de extrañar ya que los animales experimentales tenían, en el momento del sacrificio, poco más de un año de edad y los signos clínicos asociados a paratuberculosis suelen observarse entre los 2 y los 5 años de edad, durante la primera o segunda lactación en ganado bovino (Chiodini *et al*., 1984a; Stabel, 1998; Pérez *et al*., 2000; Brown *et al*., 2007; Radostits *et al*., 2007).

A pesar de las limitaciones que el tipo de experimentos desarrollados en esta tesis tiene para valorar parámetros como los signos clínicos, se ha señalado lo oportuno de llevar a cabo una evaluación de la vacunación a corto plazo mediante histopatología y estudios bacteriológicos (Nisbet *et al.*, 1962; Juste *et al*., 1992) más que un estudio a largo plazo en el que se valore el efecto de la vacunación mediante cultivo fecal y seguimiento de signos clínicos.

Como era de esperar teniendo en cuenta estudios previos (Larsen, 1973; Chiodini *et al*., 1984a; Marly *et al*., 1988; Spangeler *et al*., 1991a; Aduriz, 1993; Juste *et al*., 1994; García Marín *et al*., 1999; McDonald *et al*., 1999; Gwozdz *et al*., 2000a;

Corpa *et al*., 2000b; Köhler *et al*., 2001; García Pariente *et al*., 2002; Muskens *et al*., 2002; Valheim *et al*., 2002a; Begg y Griffin, 2005; García Pariente *et al*., 2006; Reddacliff *et al*., 2006; Geijo, 2007; Hines II *et al*., 2007a; Nedrow *et al*., 2007; Reyes, 2007; Gillan *et al*., 2010; Stabel *et al*., 2011b; Pérez del Val *et al*., 2012; Coad *et al*., 2013; Hines II *et al*., 2014; Tewari *et al*., 2014), la vacunación indujo una respuesta humoral periférica significativamente superior en los terneros vacunados que en el grupo control, ya a partir de los 60 dpv. Además, considerando el umbral de positividad de la técnica ELISA indirecto cuando se emplea con fines diagnósticos, a partir de los 90 dpv la mayor parte de los terneros vacunados se considerarían positivos. En otros estudios experimentales en los que se ha llevado a cabo la vacunación frente a paratuberculosis, la respuesta inmunitaria humoral de los animales vacunados con respecto a los no vacunados, en cuanto a su intensidad e inicio, varía mucho en función del diseño del experimento, apareciendo ya a los 28 dpv (Thakur *et al.* 2013), a los 2 meses (Spangler *et al.*, 1991) como en nuestro estudio, a los 98 días tras la inmunización (Koets *et al.*, 2006), a los 4 meses (Stabel *et al.*, 2011b) o incluso se ya observado la ausencia de respuesta durante 72 días (Sweeney *et al.*, 2009) o incluso 18 meses post-vacunación (Geijo, 2007), si bien los productos vacunales empleados no son los mismos en todos los estudios. En estudios de campo en la especie bovina (Tewari *et al*. 2014) se ha encontrado producción de anticuerpos tras la vacunación con Mycopar® durante 7 años en dos granjas, si bien no se detectó respuesta en todos los animales vacunados, de forma que un 29,4% y el 36,2% de los animales de cada granja no produjeron anticuerpos, apuntando a la existencia de variaciones en la respuesta entre individuos, como también se ha podido comprobar en nuestro trabajo. Hay otros estudios en los que se ha citado una persistencia de anticuerpos también muy prolongada en un número notable de animales vacunados (Thomsen *et al*. 2012; Muskens *et al.*, 2002; García Pariente *et al.*¸2005), aunque en otras experiencias a los 2 años de la vacunación ya no se detectan anticuerpos (McDonald *et al*., 1999) o las diferencias dejan de ser significativas con los controles al año y medio de vacunar (Geijo, 2007) o incluso a los 12 meses (Köhler *et al*., 2001), lo cual no sucede en nuestro estudio.

Esta respuesta inmune humoral tan rápida e intensa asociada a la vacunación, se produciría tras el reconocimiento de los antígenos micobacterianos, que se introducen en gran número con la vacuna, y posterior estimulación de los linfocitos T CD4+, poniendo en marcha la respuesta Th2, mediada por la IL-14, y la estimulación de los linfocitos B para la producción de determinados isotipos de IgG, inmunoglobulina que detecta el test ELISA empleado en este estudio (Juste *et al*., 1994; Gwozdz *et al*., 2000b; Stabel, 2000a, 2006; Coussens, 2001, 2004).

Los resultados de este trabajo confirman la interferencia que la vacunación produce en el diagnóstico serológico de la paratuberculosis (Griffin *et al*., 2005; Geijo, 2007; Coad *et al.*, 2013) de forma que la vacunación interferiría con el test ELISA frente a paratuberculosis a partir de los 90 y hasta los 330 dpv al menos. Este resultado es el motivo de que en E.E.U.U. se haya desaconsejado la participación de rebaños vacunados en los programas de certificación, ya que diagnosticaron animales positivos mediante ELISA en rebaños tres años después de haber sido inmunizados (Muskens *et al*., 2002). El empleo de IDGA se ha sugerido como una alternativa para diferenciar animales vacunados de los no vacunados (Nedrow *et al*., 2007) aunque según nuestros resultados, la utilidad de esta técnica no sería tal ya que, si bien la positividad encontrada a IDGA es menor que al ELISA, también se han encontrado terneros con resultados positivos a lo largo del estudio.

Es sabido que la inoculación intradérmica de las PPDs que se emplean en la prueba de IDR influye en la respuesta inmunitaria del animal frente a diferentes micobacterias, pudiendo alterarse tanto la respuesta celular (Harboe *et al*., 1990; Rothel *et al*., 1990; 1992; Buddle *et al*., 1994, 1995, 1999; Monaghan *et al*., 1994; Wood y Rothel, 1994; Whipple *et al*., 2001; Palmer *et al*., 2006; Stabel *et al*., 2007) como la humoral (Harboe *et al.*, 1990; Hanna *et al*., 1992; Monaghan *et al*., 1994; Lightbody *et al*., 1998; Lyashchenko *et al*., 2000, 2004; Thom *et al*., 2004; Palmer *et al*., 2006). Se han observado falsos positivos en el diagnóstico serológico de tuberculosis mediante ELISA, tanto en casos naturales como experimentales en bovino (Olsen *et al*., 2001a; Marassi *et al*., 2005) y también en paratuberculosis (Varges *et al*., 2009), tras haberse practicado la IDR, recomendándose que no se saque sangre a los animales para el diagnóstico de paratuberculosis mediante ELISA en un periodo de al menos 90 días

después de haberse realizado dicha prueba (Varges *et al*., 2009). Sin embargo, en nuestro estudio no se ha encontrado ningún cambio significativo en la producción de anticuerpos tras las pruebas de IDR en ninguno de los grupos experimentales. En el caso de la producción de anticuerpos asociada a la vacunación, al ser ésta tan elevada, es probable que no se aprecie el efecto de la IDR. Sin embargo, en los animales únicamente infectados, tampoco se han encontrado individuos que hubieran seroconvertido de forma transitoria tras la IDR, por lo que parece que, con las PPDs y las técnicas de ELISA indirecto o IDGA empleadas en este estudio, diferentes de los trabajos mencionados, dicha interferencia no se produciría.

En la valoración de la respuesta inmunitaria celular mediante la técnica de IDR, todos los animales vacunados de este estudio muestran una respuesta mayor que los terneros a los que no se ha administrado la vacuna tras la inoculación intradérmica de PPD aviar en los tres momentos post-vacunación en que se ha realizado, a los 45, 150 y 330 dpv. Esta mayor respuesta a la PPD aviar ha sido señalada en otros estudios en los que se vacunan bovinos tanto con Mycopar ® (Stabel *et al*., 2011b) como con Gudair ® (Coad *et al*., 2013; Garrido *et al.*, 2013) y estaría relacionada con el efecto que producen las micobacterias inoculadas con la vacuna al provocar una hipersensibilidad de tipo retardado similar a una infección con gran cantidad de *Map* (Merkal *et al*., 1973). En nuestro caso la respuesta mayor se obtiene a los 45 dpv y después disminuye progresivamente, como también ha sido descrito por otros autores (Coad *et al*., 2013).

En lo que respecta a la acción de la vacunación sobre la respuesta celular medida por la liberación de IFN-γ tras la estimulación de linfocitos circulantes con PPD aviar, los animales vacunados de este estudio mostraron valores superiores de producción de esta citoquina, al compararlos con los no vacunados, de manera que los VI empiezan a mostrar diferencias significativas a los 45 dpv, mientras que los VNI lo hacen a los 60 dpv, pero en cualquier caso las diferencias significativas se mantienen hasta los 240 dpv (Tablas IV.6 y IX.3, gráfica IV. 8). Este efecto de la vacunación sobre la respuesta celular ya había sido señalado en estudios de campo en esta especie (Geijo, 2007). En las infecciones frente a micobacterias, tradicionalmente se ha considerado que la respuesta inmunitaria de tipo celular sería la que tiene un carácter protector (Clarke, 1997; Stabel, 2006), siendo por lo tanto su inducción uno de los indicadores de eficacia

vacunal que se pueden considerar. En este sentido, es precisamente a los 240 dpv cuando los nódulos vacunales alcanzan su mayor tamaño, existiendo cierta correlación entre la intensidad de la respuesta inmune celular y el tamaño del nódulo vacunal, lo que apoyaría lo que ya fue sugerido por Vallée (1924) y Doyle (1964) quienes afirman que la acción de la vacuna es paralela a la duración del nódulo vacunal.

La respuesta celular a la vacunación se ha señalado que aparece ya de forma temprana en bovino (McDonald *et al*., 1999; Muskens *et al*., 2002; Sweeney *et al*., 2009; Stabel *et al*., 2011b), concretamente a la semana o dos semanas post-vacunación en terneros inmunizados, previa a la humoral y con mayor persistencia que ésta, al menos dos años tras el inicio del experimento (Köhler *et al*., 2001) lo que coincidiría, al menos en parte, con lo encontrado en nuestro estudio y reproduciría lo que sucede en la infección natural por *Map*, donde la respuesta inmunitaria de tipo celular es anterior a la humoral (Stabel, 2000a). En ovino, sin embargo parece que la diferencia en la producción de IFN-γ por parte de los animales vacunados con respecto a los controles deja de ser significativa a los 6 meses tanto en animales infectados experimentalmente (Corpa *et al*., 2000b) como en infecciones naturales (Geijo, 2007) aunque también se ha descrito la persistencia de respuesta celular en ovejas vacunadas respecto a los controles durante un año e incluso 54 meses post-vacunación (García Pariente *et al*., 2002). En nuestro caso ha persistido hasta los 8 meses (240 dpv).

La realización de la prueba de la IDR si parece influir en la producción de IFN-γ específico en este trabajo ya que, como muestran los resultados, se observa que 15 y 30 días después de realizarse esta prueba a los 45 y 150 dpv respectivamente, hay un incremento significativo en la producción de IFN-γ respecto al muestreo anterior en los animales vacunados, que desaparece posteriormente. Este hecho ya había sido señalado por otros autores en diferentes micobacteriosis (Harboe *et al*., 1990; Rothel *et al*., 1992; Buddle *et al.*, 1994; 1995; Monaghan *et al*., 1994; Wood y Rothel, 1994; Monaghan *et al*., 1997; Whipple *et al*., 2001; Barbosa *et al*., 2003; Palmer *et al*., 2006; Stabel *et al*., 2007) y debería ser tenido en cuenta cuando se empleen estas pruebas diagnósticas.

A tenor de nuestros resultados no se han observado variaciones en la respuesta inmunitaria asociada a la vacunación en relación con la infección de los terneros, como

ya había sido apuntado previamente (Uzonna *et al*., 2003). Posiblemente la elevada intensidad de la respuesta que ya había sido inducida por la vacunación hace que la que posteriormente pueda ser iniciada por la infección con *Map* quede enmascarada.

En cuanto a la producción inespecífica de IFN-γ (IFN-γ_0) en los animales vacunados, la tendencia a lo largo del estudio fue similar en todos los grupos, sin observarse diferencias significativas entre ellos, excepto a los 15 y 105 dpv, cuando se producen incrementos elevados únicamente en el grupo NVNI. Estos resultados no permiten extraer conclusiones respecto a la influencia de la vacunación sobre la producción basal de esta citoquina. Los incrementos elevados se producen únicamente en el grupo NVNI formado solo por 2 animales, por lo que posiblemente se deban a respuestas individuales de difícil valoración en relación con los parámetros considerados en este estudio. Sin embargo, el estudio llevado a cabo por Geijo (2007) la vacunación en vacas adultas en explotaciones libres y con paratuberculosis produjo una reducción de la respuesta celular inespecífica (Geijo, 2007).

Los niveles basales de IFN-γ se han asociado a la producción inespecífica de esta citoquina por parte de las células NK del sistema inmune innato (Olsen y Storset, 2001; Olsen *et al*., 2005). En nuestro trabajo no hubo diferencias significativas en la producción de IFN-γ_0 entre ambos grupos vacunados lo que hace suponer que la infección no tenga influencia en la liberación inespecífica de IFN-γ en animales vacunados. Sin embargo, Geijo (2007) atribuye la alta producción de IFN-γ_0 a la elevada exposición a *Map*, ya que hay vacas que presentan valores elevados ya antes de la vacunación, fenómeno que se ha asociado con las diferentes formas inmunopatogénicas propuestas para la paratuberculosis (Geijo, 2007) o incluso para la enfermedad de Crohn (Juste *et al*., 2009b), de forma que su producción sería más elevada en aquellos animales con daño tisular. En cualquier caso, nuestros resultados no permiten confirmar ninguna de las hipótesis mencionadas, al no haberse encontrado, mediante la metodología empleada, variaciones en los niveles basales de esta citoquina en relación con la vacunación, infección o extensión lesional. Un resultado similar lo obtiene Delgado (2010) al no encontrar ninguna relación con el grado de lesión tisular en corderos infectados experimentalmente.

La respuesta inmune local fue medida en los nódulos linfáticos preescapular, e ileal, así como en las placas de Peyer ileales y yeyunales, mediante la valoración de la liberación de IFN-γ por parte de estos tejidos y de linfocitos extraídos de los mismos. En general, se observó que en todos los grupos esta liberación siempre fue mayor por parte de los linfocitos extraídos que por los propios tejidos, lo que indica que sería más recomendable emplear las células libres que fragmentos de tejido, aunque Gwozdz y Thompson (2002) señalan que este último procedimiento es igualmente útil. En cuanto a la valoración de la acción de la vacunación sobre la producción de IFN-γ local, si bien no se encontraron diferencias a nivel global, cuando se analizan las distintas localizaciones se observa una mayor producción de IFN- γ en los linfocitos extraídos de los nódulos linfáticos preescapular e ileal en los animales vacunados. Estos resultados sugieren que los linfocitos de ambos nódulos linfáticos jugarían un importante papel en la respuesta inmune inducida por la vacunación frente a paratuberculosis y contribuirían al incremento de la producción de IFN-γ que se produce tras su administración. En el caso del nódulo linfático preescapular parece esperable dicha respuesta ya que es allí donde el antígeno inoculado se dirigiría en primera instancia, y ya ha sido mencionada previamente (Sweeney *et al.*, 2009; Uzonna *et al.*, 2013). En el caso del nódulo linfático ileal, podría estar relacionado con la importancia que tiene esta localización concreta en la presencia de lesiones focales o latentes en bovinos infectados de forma natural (González *et al.*, 2005) y con el menor número de lesiones encontradas en dicho órgano en los terneros vacunados de este estudio.

A pesar de la eficacia de la vacunación para el control de la paratuberculosis, han sido señalados diferentes efectos adversos asociados a ella que hemos tratado de analizar en este estudio. Como se ha expuesto en el capítulo de resultados, no se observó ninguna reacción anafiláctica ni de otro tipo tras la inoculación de la vacuna, como también se observó previamente en un trabajo de nuestro grupo al inmunizar corderos con un producto similar al empleado en este estudio (Reyes, 2007). Tampoco nos consta, en la bibliografía consultada que esto se haya producido en otros trabajos experimentales o de campo.

Recientemente, en un estudio llevado a cabo en cabritos vacunados con diferentes productos inmunizantes frente a paratuberculosis (Hines II *et al.*, 2007a) se han detectado elevaciones significativas de la temperatura corporal entre las 48 y 96 horas post-vacunación. En nuestro estudio, este parámetro se evaluó hasta las 120 sin encontrarse variaciones. En el mismo trabajo antes mencionado (Hines II *et al.*, 2007a) encuentran que dicho incremento de la temperatura variaba según la cepa de *Map* presente en la vacuna o el adyuvante, por lo que dichos resultados no contradicen los nuestros, donde la diferente respuesta podría asociarse a la vacuna empleada y al ser una especie diferente de la caprina.

Uno de los principales efectos señalado como adverso en vacunación es el desarrollo de un nódulo vacunal. En nuestro estudio, en todos los animales vacunados se comprobó la presencia de dicho nódulo en el sitio de inoculación de la vacuna, apreciable a los 15 dpv, como ha sido descrito en otros estudios con la misma formulación vacunal que la nuestra (Hines II *et al*., 2014) o con otras diferentes en caprino (Hines II *et al*., 2007a) y ovino (Reyes, 2007). El tamaño del nódulo fue creciendo hasta alcanzar su mayor tamaño entre los 150 y 240 días, después de lo indicado para ovino (Reyes, 2007), con tamaños medios máximos de entre 5,5 y 6,5 cm y que fueron disminuyendo hasta que al final del estudio, se obtenían valores de 4,5 cm en los animales infectados y de 3 en los no infectados, diferencias que no fueron significativas, por lo que la infección no influiría sobre el tamaño del nódulo vacunal. En ningún momento y en ningún animal se han llegado alcanzar los tamaños de 15 cm descritos por otros autores en bovinos (Stuart, 1962; Benedictus *et al*., 1988), ni tampoco se ha observado la aparición de fístulas como se ha recogido en la especie ovina (Sigurdsson y Tryggvadóttir, 1949; García Marín *et al*., 1999b; Reyes, 2007; Griffin *et al*., 2009) o caprina (Hines II *et al*., 2007a) pero en consonancia con lo encontrado por Hines II *et al* (2014). Ya se ha señalado que el tipo de vacuna y el adyuvante empleados influye mucho en el desarrollo y las características del nódulo vacunal (García Marín *et al*., 1999b; Hines II *et al*., 2007a; Reyes, 2007). En el caso de la especie bovina, en otros estudios de campo llevados a cabo (García Pariente *et al*., 2005; Garrido *et al*., 2013) empleando esta misma vacuna tampoco se han registrado casos de nódulos fistulizados. En trabajos anteriores se ha señalado que los animales que desarrollan un nódulo sin tendencia a la supuración serían considerados como

efectivamente vacunados (Doyle, 1964). Además señalan que habría resistencia a la infección mientras el nódulo persista y contenga bacilos ya que, en su experiencia, ningún animal vacunado con microorganismos en el nódulo presenta síntomas clínicos (Doyle, 1964). En nuestro estudio, el nódulo en los animales permaneció mientras duró este, y presentaba bacilos en su interior, como se pudo comprobar con el estudio histológico; sin embargo, y aunque los animales no presentaron signos clínicos, no se puede decir que su persistencia se relacione con una mayor protección ya que el ternero 5931, con lesiones difusas, aún presentaba un nódulo vacunal visible en el momento del sacrificio, si bien es cierto que era el de menor tamaño de todo el grupo.

La auto-inyección de la persona que realiza la inoculación es un problema a tener en cuenta (Jorgensen, 1983b; Sherman, 1985; Patterson *et al*., 1988; Juste y Sáez de Ocáriz, 1990), ya que puede ocasionar una inflamación granulomatosa prolongada en el lugar del incidente por inoculación del producto vacunal, requiriéndose en este caso la escisión quirúrgica e incluso drenaje del material inoculado para evitar la progresión a necrosis extensas (Windsord *et al*., 2005; Richardson *et al*., 2005). Afortunadamente, en este estudio no se ha presentado ese problema.

Un efecto adverso importante señalado para la vacunación frente a *Map* ha sido su interferencia con el diagnóstico de la tuberculosis mediante técnicas basadas en la detección de la respuesta inmunitaria. En este trabajo se ha observado que, tras la realización del test ELISA frente a tuberculosis en los diferentes momentos post-vacunación, los animales vacunados muestran títulos de anticuerpos frente a *M. bovis* superiores a los de los terneros no vacunados (Gráfica IV.4). En concreto, los terneros del grupo VI mostraron una mayor cantidad de anticuerpos que los no vacunados a partir de los 60 dpv, mientras que los VNI lo hicieron a partir de los 120 dpv, y las diferencias se mantuvieron hasta el final del experimento. Sin embargo, entre ambos grupos vacunados no hay una tendencia, en la que unos muestren más títulos que otros, alternándose la superioridad en los diferentes muestreos y por tanto, no pudiendo atribuir a la infección con *Map* la producción de anticuerpos frente a *M. bovis*.

Entre los animales vacunados y de forma individual, se obtuvo algún resultado superior al test de ELISA frente a tuberculosis con respecto al de paratuberculosis, si bien los resultados globales de los grupos siempre fueron superiores a la prueba frente a paratuberculosis. Por ello, aunque la vacunación interfiera en la respuesta inmunitaria humoral, cabría la posibilidad, en la mayoría de casos, de diferenciar un animal vacunado frente a paratuberculosis y un animal infectado con *M. bovis* al realizar estas dos pruebas. Sin embargo, si se llevara a cabo únicamente la prueba de ELISA indirecto frente a tuberculosis, la mayoría de los terneros vacunados ofrecerían un resultado positivo. En cualquier caso, hay que tener en cuenta que no son técnicas similares, por lo que su uso para realizar el diagnóstico diferencial debe tomarse con reservas. En un estudio similar (Coad *et al.*, 2013) en el que se realiza ELISA frente a paratuberculosis y frente a tuberculosis en animales vacunados frente a paratuberculosis, los autores comprueban que los animales vacunados reaccionan positivamente a ambos tests (Coad *et al*., 2013). Sin embargo debe tenerse en cuenta que las pruebas realizadas son diferentes (Idexx para ELISA frente a tuberculosis y Paracheck® para ELISA frente a paratuberculosis) y con diferentes puntos de corte lo que hace difícil comparar los resultados para ambas pruebas, aunque la representación de los resultados hace ver que la positividad al ELISA frente a paratuberculosis es mayor, como ocurre en nuestro estudio. Se han llevado a cabo estudios en el caso inverso al nuestro, es decir, con animales vacunados frente a tuberculosis y a los que se practica el test para valorar la respuesta humoral frente a paratuberculosis (Paracheck®), comprobando que la prueba no otorga falsos positivos (Coad *et al*., 2013).

Existen numerosos estudios que señalan que la vacunación frente a paratuberculosis interfiere con las campañas de erradicación de la tuberculosis mediante la prueba de IDR (Doyle, 1945; Vallé y Rinjard, 1926; Stuart, 1962; Doyle, 1964; Huitema, 1967; Larsen *et al*., 1978; Chiodini *et al*., 1984a; Merkal, 1984; Sherman, 1985; Wentink *et al*., 1988; Köhler *et al*., 2001), motivo por el cual en países como España esta práctica se encuentra prohibida. Como se ha señalado, este hecho estaría causado por la existencia de antígenos comunes a *Map* y *M. bovis* en la PPD bovina (de la Rua-Domenech *et al*., 2006; Aagaaard *et al.*, 2013). La influencia negativa de la vacunación frente a *Map* en la especificidad de la IDR simple ya había sido precisada antes por Lesslie *et al*., (1975) y posteriormente por Coad *et al*. (2003), si bien en un

estudio en casos naturales en cabras, donde se compara el aislamiento de *M. bovis* o *M. caprae* en explotaciones sacrificadas por presentar tuberculosis, algunas de las cuales habían estado vacunadas, se ha observado una menor sensibilidad de la prueba de IDR comparada frente a la IDR simple en el diagnóstico de tuberculosis en todos los rebaños, sin que existieran diferencias significativas en aquellas explotaciones vacunadas (Bezos *et al.*, 2014).

Para eliminar estas interferencias se ha señalado que los animales pueden ser diferenciados utilizando la IDR comparada (Valleé y Rinjard, 1926; Stuart, 1962; Doyle, 1964; Huitema, 1967; Larsen, 1973; Lesslie *et al*., 1975; Naim *et al*, 1985; Corpa *et al*., 1998; García Marín *et al*., 1999; Nedrow *et al*., 2007; Geijo, 2007; Garrido *et al.*, 2013; Coad *et al*., 2013 A nivel experimental, la IDR comparada se ha demostrado útil para diferenciar cabritos vacunados frente a paratuberculosis y posteriormente infectados con *M. caprae* (Pérez de Val *et al*., 2012), en los que empleando la prueba simple aparecerían falsos positivos. En nuestro estudio, los animales vacunados también muestran incrementos positivos a la PPD bovina, pero los incrementos cutáneos tras la inoculación de esta tuberculina, salvo en un caso puntual, fueron inferiores a los obtenidos al inocular la PPD aviar, y por tanto, la aplicación de la IDR comparada permitiría diferenciar a los animales vacunados frente a paratuberculosis de los infectados de tuberculosis. Esta utilidad también se ha puesto de manifiesto en estudios de campo empleando un gran número de animales (Garrido *et al*., 2013), donde se estima que solamente en un 0,10% y 0,03% de los animales vacunados o no inmunizados podrían darse falsos positivos a tuberculosis empleando esta prueba. En este estudio también encuentran una notable reducción en el número de animales positivos a medida que aumenta el tiempo post-vacunación, al igual que en nuestro trabajo, donde a los 330 dpv la diferencia entre los incrementos producidos tras la inoculación de la PPD aviar y bovina se reducen notablemente. Así y apoyando los resultados de Garrido *et al*. (2013) y Coad *et al.* (2013), si la interferencia con el diagnóstico de tuberculosis medido mediante la IDR comparada es ya baja, si se realiza cuando pasa un tiempo desde que se han vacunado a los animales, prácticamente se anularía.

Algunos autores sugieren que lo que ocurre al vacunar frente a paratuberculosis podría ser extrapolado a vacas infectadas por *Map*, de especial importancia en las granjas en que ambas enfermedades, tuberculosis y paratuberculosis, coexisten (Coad *et al*., 2013). Al igual que la vacunación de *Map*, la infección con esta micobacteria dará lugar al desarrollo de una fuerte respuesta a la PPD aviar en vacas (Barry *et al*., 2011) por lo que en granjas infectadas por *Map* cabría la posibilidad de que los animales infectados por tuberculosis bovina pudieran dar falsos negativos a la IDR comparada como consecuencia de una elevada respuesta a la PPD aviar inducida por la sensibilización a antígenos de *Map*. De la misma forma, en cabras, se ha demostrado que la coinfección de *Map* y tuberculosis puede reducir la sensibilidad al test de IDR e IFN-γ para detectar tuberculosis (Álvarez *et al*., 2008; Bezos *et al*., 2012). En nuestro estudio, aunque de carácter limitado en el tiempo, la gran mayoría de los terneros infectados por *Map* hubiera ofrecido un resultado negativo a la IDR simple con tuberculina bovina, al ser las reacciones menores de 4 mm. En cualquier caso, todos estos resultados sugieren que no convendría vacunar frente a paratuberculosis si la explotación no está previamente saneada de tuberculosis. Así pues, la IDR comparada se considera una herramienta útil en la cual la interferencia causada por la vacunación frente a *Map* no es diferente que la provocada por la infección natural en las granjas no vacunadas (Santema *et al*., 2009; Chartier *et al*. 2012; Bezos *et al*., 2014) y al aplicarla se reducen los diagnósticos erróneos como se ha citado anteriormente (Garrido *et al*., 2013).

En este estudio, la producción de IFN-γ tras la estimulación de la sangre con PPD bovina presenta una cinética similar a la observada con la PPD aviar, de forma que los animales de los grupos vacunados mostraron un incremento en la producción de esta citoquina, pero los valores del índice de densidad óptica fueron, en la mayoría de los muestreos, inferiores a los obtenidos para la estimulación de las mismas sangres con la PPD aviar (Tabla IV.6), y cuando los valores fueron mayores estas diferencias no resultaron significativas. Resultados similares son los que obtienen Muskens *et al*. (2002) al hacer el seguimiento durante más de 10 años de terneros vacunados frente a paratuberculosis y en el estudio de campo realizado por Geijo (2007), con duración de 18 meses. En algunos estudios se ha indicado que la presencia de la infección por *Map* o la vacunación en algunos animales podría ocasionar la aparición de falsos positivos en

la prueba de liberación del INF-γ simple para el diagnóstico de tuberculosis (Köhler *et al*., 2001; Walravens *et al*., 2002; Dunn *et al*., 2005; Coad *et al*., 2013), hecho que en nuestro trabajo sólo ocurre de forma puntual, eliminándose la interferencia cuando se realiza de forma comparada. Los pocos casos donde la respuesta fue mayor a la PPD bovina podrían estar relacionados con la edad de los terneros, ya que se ha señalado en varios estudios la existencia de reacciones inespecíficas en la producción de IFN-γ en terneros jóvenes (Olsen *et al*., 2005; Coad *et al.*, 2013). Hay otros autores que asocian la positividad al test de liberación de IFN-γ en animales vacunados con que éstos presenten elevados los niveles de IFN-γ inespecífico (en respuesta al PBS) o INF-γ_0, (Dunn *et al.*¸ 2005; Geijo, 2007). En nuestro estudio, sin embargo, esta citoquina no es más elevada en los animales vacunados respecto a los controles.

Aunque la realización del test de liberación de IFN-γ con ambas PPDs (bovina y aviar) sería suficiente, en la mayoría de los casos, según nuestros resultados para diferenciar animales infectados con *M.bovis* de los vacunados frente a paratuberculosis, se ha propuesto la utilización de los test DIVA con el empleo de antígenos específicos como ESAT-6 y CFP-10 para diferenciar la tuberculosis tanto de animales infectados con *Map* (Hope *et al*., 2005; Aagaard *et al*., 2010) como de vacunados frente paratuberculosis con Gudair® (Coad *et al*., 2013) o Mycopar® (Stabel *et al*., 2011b) en bovino o con Silirum® en caprino (Pérez del Val *et al*., 2012). Como la especificidad de los antígenos DIVA no se ve comprometida por la sensibilización a antígenos de *Map*, se recomiendan sobre todo en explotaciones con prevalencia de tuberculosis baja o media (Aagaard *et al*., 2010).

En este experimento la vacunación no ha proporcionado una protección completa ya que un ternero vacunado desarrolló lesiones graves, visibles tanto macroscópicamente como a nivel histológico, que contenían una cantidad apreciable deBAAR y que se han relacionado con formas avanzadas de la infección por *Map* (Pérez *et al*., 2000; González *et al*., 2005; Brown *et al*., 2007). Que la vacunación frente a paratuberculosis no confiere una protección total es un hecho ya conocido. A nivel experimental se ha demostrado repetidas veces que la vacunación, tanto con vacunas vivas o inactivadas empleando cepas similares, no previene la infección (Brotherston *et*

al., 1961b; Nisbet *et al*., 1962; Juste *et al*., 1994; Begg y Griffin, 2005; Reyes, 2007; Griffin *et al*., 2009). Además, algunos de estos estudios (Begg y Griffin, 2005) reflejan la aparición de corderos vacunados e infectados experimentalmente que desarrollan signos clínicos graves, aunque los autores no encuentran lesiones en la mayor parte de ellos. Este hecho puede ser debido a que en dicho estudio, el número de muestras de tejido que examinan histológicamente es muy limitado. Algo similar podría haber pasado con el ternero 5931 si no se hubiera realizado un muestreo exhaustivo, ya que a pesar de tener lesiones difusas, no todas las zonas muestreadas estaban afectadas. Otro estudio experimental de este mismo grupo en ganado ovino refleja la aparición de lesiones multibacilares en animales vacunados con Gudair® y con nuevas formulaciones lipídicas (Griffin *et al*., 2009) y en algunas ocasiones en mayor porcentaje que en los controles. En caprino, también se han probado formulaciones vacunales con Gudair® (Singh *et al.*, 2007), con células defectivas de pared y alumbre como adyuvante (Hines II *et al*., 2007a) o elaboradas con diferentes cepas de *Map* (Hines II *et al*., 2014) en las que se han observado lesiones graves, similares a las de los animales no vacunados. Además, es posible que existan otros estudios donde se hayan producido fallos vacunales en los que la falta de precisión al describir las lesiones de los animales s (Begg y Griffin, 2005; Kathaperumal *et al*., 2009) hace difícil la comparación con nuestros resultados. En estudios de campo donde se ha vacunado a todos los animales de una explotación, independientemente de su edad, se han encontrado animales con lesiones graves incluso a los tres años post-vacunación (Pérez *et al.*, 1995; Corpa *et al.*, 2000; García Pariente *et al.*, 2004; Reddacliff *et al*., 2006), si bien en estos estudios se desconocía si esos animales, en el momento de la vacunación, habían desarrollado ya formas avanzadas de la infección. En ninguno de estos trabajos los autores plantean hipótesis o explicación alguna que pudiera justificar el por qué en algunos animales la vacunación no los protege de la evolución de la infección por *Map.*

En algunas enfermedades en las que se han producido fallos vacunales éstos se han relacionado con un cambio en la secuencia del genoma del agente causal como es el caso de la circovirois porcina en EEUU (Xiao *et al*., 2012). En nuestro caso, el desconocimiento de la cepa con la que se ha infectado el animal vacunado con lesiones difusas es un hándicap para poder discutir este aspecto. La infección se llevó a cabo con un homogeneizado procedente del intestino de tres vacas afectadas de paratuberculosis,

por lo que es posible que existieran diferentes cepas de *Map* en el inóculo, con lo cual este animal pudiera haberse infectado con una cepa de mayor virulencia que el resto de forma que la inmunización no hubiera sido capaz de detener la progresión de la infección, como en el resto de animales. En este sentido, hay evidencias previas que refieren diferente patogenicidad dentro de las cepas de *Map* (Verna *et al*., 2007; Begg y Whittington, 2008; Fernández *et al*., 2014a).

Un fallo en la respuesta inmunitaria del ternero 5931 debido a factores individuales podría ser otra razón para que la vacuna en este animal no produjera el efecto protector esperado. En la vacunación frente a otras enfermedades, como en el caso de la influenza humana, se han reconocido fallos en algunos pacientes asociados al desencadenamiento de una menor respuesta inmunitaria de tipo humoral en esos individuos concretos, que habrían desarrollado signos clínicos y excreción de virus en heces (Ng *et al*., 2014). En el caso de nuestra experiencia, si bien el ternero había desencadenado una potente respuesta humoral, en el momento del sacrificio la producción de IFN-γ en la sangre estimulada era muy baja (índice=3,65), siendo únicamente inferior la mostrada por los terneros del grupo NVNI, sugiriendo que este animal habría desarrollado una respuesta celular baja, facilitando la progresión de la infección. Como ya se ha señalado, la respuesta protectora frente a las infecciones por micobacterias es la de tipo celular (Clarke, 1997; Stabel, 2006). Se ha descrito la existencia de defectos parciales en la expresión de genes receptores de IFN-γ (IFNGR) que podrían limitar en diferente medida la capacidad de los animales para controlar la infección paratuberculosa. En algunos casos, una causa por la que se puede producir el bloqueo de estos genes sería la propia infección micobacteriana como se ha visto en ratones infectados por *M.avium* (Hussain *et al*., 1999; Álvarez *et al*., 2003). También se han señalado diferencias en la producción de IFN-γ según la cepa infectiva, o lo que es lo mismo, la cepa determinaría la respuesta inmune celular (Verna *et al*., 2007), también sugerido por otros autores con cepas bovinas (Kluge *et al*., 1968), de ciervo (Begara-McGorum *et al*., 1997, 1998) y de origen ovino (Gwozdz y Thompson, 2002; Reddacliff y Whittington, 2003), lo cual como se ha señalado anteriormente también podría haber ocurrido en nuestro estudio; sin embargo, el que la vacuna sí haya sido capaz de inducir una respuesta muy intensa en el resto de animales, hace que el hecho

de una interferencia entre la cepa infectante y la vacunal en la producción de IFN-γ parezca poco probable.

Una posibilidad a tener también en cuenta es el hecho de que este ternero presentara una susceptibilidad especialmente elevada a padecer paratuberculosis. En este sentido, se conoce la existencia de una base genética que podría condicionar las variaciones individuales en cuanto a la susceptibilidad o resistencia a la infección con *Map.* Se ha realizado un estudio en ciervos de la descendencia de animales susceptibles y resistentes a paratuberculosis en el que se ha observado la significativa heredabilidad de la susceptibilidad/resistencia a padecer la enfermedad de forma que los animales resistentes presentan mayores niveles de IFN-γ, títulos bajos de anticuerpos y menos *Map* en tejidos (Mackintosh *et al*., 2011), situación inversa a la que ha ocurrido en el ternero 5931, que podría haber mostrado una especial susceptibilidad a la infección. Aunque en dicho trabajo no determinan qué gen puede ser el responsable de dicha resistencia, hay numerosos trabajos en los que se relaciona la susceptibilidad a padecer paratuberculosis con el polimorfismo de nucleótidos de algún gen (SNP). En concreto, en la especie bovina, hay autores que han sugerido la asociación de la infección con la aparición de un SNP en el gen de reconocimiento de antígenos de lecucocitos bovino (BoLA) DRB3 (Rastislav y Mangesh, 2012), en el gen de la proteína 1 de reconocimiento de peptidoglicano bovino (Pant *et al*., 2011), en el gen CARD15 (Ruiz-Larrañaga *et al*., 2010a) o en el gen SP110 (Ruiz-Larrañaga *et al*., 2010b). De la misma forma, los polimorfismos SNP c.1067C>G y c. 1157-91A>T del gen SLC11A1 (Solute carrier family 11 member), que además están implicados en la inmunidad innata, parecen estar implicados en esta susceptibilidad de vacas a padecer paratuberculosis (Ruiz-Larrañaga *et al*., 2010c). Cambios en este último gen también se han asociado a paratuberculosis en cabras (Taka *et al*., 2013). En el ternero de nuestro estudio no se han llevado a cabo estudios de caracterización genética, por lo que la hipótesis de que se tratara de un animal particularmente sensible que fuera incapaz de desarrollar una respuesta protectora frente a *Map* (tanto inoculado vivo por vía oral como inactivado por vía subcutánea en la vacuna) no sólo no puede ser descartada, sino que parecería bastante plausible.

En este trabajo los terneros se han inoculado con una cantidad muy elevada de micobacterias ($6,7x10^{10}$) lo cual podría haber sido la causa de que en algunos animales hubiera tenido lugar una infección intensa en diversas partes del intestino que hubiera provocado una evolución más rápida hacia formas lesionales difusas y graves que la vacunación no hubiera podido controlar. Aunque es cierto que otros terneros recibieron la misma dosis y la evolución no ha sido similar, no debe descartarse la posibilidad de que, al realizarse la inoculación en varias tomas y ante la tendencia de *Map* a formar grumos, el ternero 5931 hubiera recibido una dosis mayor. La existencia de una relación directa entre la dosis administrada y la gravedad de las lesiones inducidas se ha puesto de manifiesto en repetidas ocasiones (Reddacliff y Whittington, 2003; McGregor *et al.*, 2012; Delgado *et al.*, 2013).

La existencia de variaciones individuales en la respuesta a la infección por *Map* manifestadas en el desarrollo de diferentes lesiones en cuanto a su morfología y gravedad, es un hecho bien conocido en esta enfermedad tanto en casos naturales como experimentales (Pérez *et al*., 1996; Corpa *et al*., 2000a; González *et al*., 2005; Reyes, 2007; Delgado *et al.*, 2013), sin que esté aclarada suficientemente la razón. Dicha variabilidad ha podido ser comprobada en este trabajo en el grupo de terneros NVI, habiendo un animal (9107) que ha llegado a desarrollar lesiones difusas y graves. Algo similar podría haber sucedido en el grupo de terneros VI, de forma que el animal 5931 habría desarrollado, ya desde el inicio, formas lesionales más graves, por alguna o varias de las razones expuestas, que la vacunación no habría podido frenar.

Tampoco se puede descartar totalmente un fallo en la aplicación de la vacuna en este animal. Sin embargo, el hecho de que desarrollara un nódulo vacunal evidente así como una respuesta de tipo humoral, no apoyarían esta posibilidad. Además, en este animal no se observaron lesiones en órganos linfoides que pudieran sugerir la existencia de algún proceso inmunosupresor, incluyendo la infección por el virus de la diarrea vírica bovina, siendo negativa la prueba serológica practicada.

Uno de los objetivos de esta Tesis Doctoral, motivado por la escasez de estudios experimentales en bovinos, ha sido estudiar la patogenia de la paratuberculosis en esta especie, especialmente en lo que se refiere al desarrollo de lesiones, en el modelo de

infección experimental llevado a cabo en este trabajo. Dicho estudio no estaba enfocado directamente a estudiar la entrada de *Map* en el organismo, pero la ausencia de lesiones granulomatosas en tonsilas y su presencia en tejido linfoide intestinal indicaría que, de acuerdo con otros estudios (Momotani *et al*., 1988; Liebler *et al*., 1988a, 1988b; García Marín *et al*., 1992a; Sigurdardotir *et al*., 2001), la entrada de *Map* se produciría por el tejido linfoide intestinal más que por las tonsilas y nódulos linfáticos retrofaríngeos, sugerida por otros autores (Payne y Rankin, 1961a; Lugton, 1999). De todas formas, que estas localizaciones se hubieran colonizado por *Map* no puede descartarse completamente ya que se ha sugerido que el paso de la bacteria por estos sitios sería transitorio, no desarrollándose lesiones (García Marín *et al*., 2000), a diferencia de las placas de Peyer y nódulos linfáticos mesentéricos que es donde aparecenen las fases iniciales de las infecciones experimentales en ovino y caprino (Brotherson *et al.*, 1961a; Nisbet *et al*., 1962; Chiodini *et al*., 1984a; Van Kruiningen *et al.*, 1986; García Marín *et al*., 1992a; Juste *et al*., 1994; Pérez *et al*., 1994b; Lugton, 1999; Sigurdardottir *et al.*, 1999; Valheim *et al*., 2002b; Verna *et al*., 2007; Reyes, 2007; Delgado *et al*., 2013; Fernández *et al*., 2014a), apoyando lo que se observa en este ensayo en el cual siempre se han encontrado lesiones en el tejido linfoide, especialmente en las placas de Peyer yeyunales, y cuando han aparecido en zonas desprovistas del mismo, las zonas de tejido linfoide presentaban lesión de carácter más grave. Únicamente en un ternero no vacunado del estudio (3300) se encontró como única localización intestinal lesionada una muestra de yeyuno medio donde se observaron células gigantes aisladas en la lámina propia. A la vista de que este hallazgo sólo se ha producido en este animal, que también presentaba lesiones en los nódulos linfáticos (Tabla IV.11), parece probable que la entrada de la bacteria y las primeras lesiones también se hubieran producido a nivel del tejido linfoide del yeyuno, desde donde se habrían extendido hacia zonas de yeyuno sin placas de Peyer, al igual que ha ocurrido en el resto de terneros. El no haber detectado lesiones granulomatosas en dichas placas de Peyer es probable que se haya debido a una deficiencia en el muestreo, en el cual no debe pasarse por alto que se examinan secciones de pocas micras de espesor, de forma que no se haya elegido la zona de tejido linfoide afectada. No obstante, no se puede descartar que las lesiones en zonas de yeyuno sin tejido linfoide hayan sido la consecuencia de la entrada de *Map* por los enterocitos, como ya se había señalado (García Marín *et al.*, 1992a; Sigurdardottir *et al*., 2001). El hecho de que, a excepción de este ternero, las lesiones en zonas de yeyuno

sin tejido linfoide siempre estuvieran acompañadas de lesiones en el tejido linfoide, que han aparecido antes que en la lámina propia, hace que esta posibilidad, de ser cierta, tendría una importancia residual.

Los resultados más destacables de este trabajo ponen de manifiesto que el modelo experimental utilizado para infectar terneros con *Map* ha sido capaz de inducir lesiones granulomatosas en terneros de 5 meses de edad al administrar un inóculo con $6{,}7x10^{10}$ bacterias por vía oral procedente de un raspado de intestino de casos clínicos, siguiendo la técnica de Ratnamohan y Spencer (1986), cuya eficacia ya había demostrado nuestro grupo de trabajo en anteriores infecciones experimentales en la especie ovina (Reyes, 2007; Verna *et al*., 2007; Delgado *et al*., 2012, 2013). A pesar de que se ha recomendado el uso de cepas de *Map* cultivadas en laboratorio, como la cepa de referencia K-10 (Hines II *et al*., 2007b), por ser cepas más estandarizadas y con sabidas características del inóculo, se decidió el uso de esta técnica por varias razones: los pases en cultivo disminuyen la virulencia de las cepas (Radosevich *et al*., 2007); los inóculos procedentes de raspados de mucosa intestinal presentan mayor patogenicidad (Chávez, 1993; Strewart *et al*., 2004, 2006, 2007; Begg *et al*., 2005, 2009; Stabel *et al*., 2009) con los que la infección se establece más fácil y rápidamente (Stewart *et al*., 2004; Begg y Whittington, 2008) y se trata de inóculos más representativos de las bacterias con las que los animales se infectan en condiciones naturales, a pesar de que con ellos puedan ingerir otros microorganismos intestinales.

En los últimos años nuestro grupo de investigación ha propuesto un modelo de desarrollo lesional basado en la valoración detallada de la aparición de lesiones granulomatosas en el tejido linfoide intestinal y su progresión hacia distintas zonas del intestino y nódulos linfáticos regionales a partir del estudio de casos naturales en varias especies de rumiantes (Pérez *et al*., 1996; Corpa *et al*., 2000a; González *et al*., 2005) que ya ha sido validado en infecciones experimentales en la especie ovina (Reyes, 2007; Delgado *et al*., 2013; Fernández *et al*., 2014a). En él se propone que las diferentes formas patológicas encontradas en animales adultos, posiblemente infectados cuando eran jóvenes, representan diferentes estadios de la infección, donde el estado inmunológico del animal juega un papel muy importante (Pérez *et al*., 1996; Corpa *et al*., 2000a; González *et al*., 2005). Con el presente estudio, ha podido confirmarse que

dicho modelo de patogenia también sería válido para la especie bovina y se correspondería con las formas descritas en casos naturales en vacas (González *et al.*, 2005). En nuestro estudio, todos los terneros sacrificados a los 120 dpi tenían lesiones sólo en el tejido linfoide, excepto uno donde también se observaban en la lámina propia; en el segundo sacrificio el número de granulomas aumentó significativamente y ya se encontraron lesiones en zonas de mucosa carentes de tejido linfoide e incluso en algunos animales aparecieron formas difusas. Estos resultados indican que las primeras lesiones (focales) aparecerían en el tejido linfoide intestinal (placas de Peyer), como consecuencia de la entrada de *Map* por estas localizaciones, como ya se había señalado en otros trabajos experimentales (Nisbet *et al*., 1962; Juste *et al*., 1994; Kluge *et al*., 1968; Pérez *et al*., 1996; Sigurdardóttir *et al*., 1999, 2001; Valheim *et al*., 2002b; Kurade *et al*., 2004; Verna *et al*., 2007; Delgado *et al*., 2012, 2013; Fernández *et al*., 2014a) y a partir de aquí aumentarían en número y se extenderían en primer lugar hacia zonas de la lámina propia asociada al tejido linfoide (multifocal a) y posteriormente a zonas de mucosa carentes de él (multifocal b y difusas), tal y como se había verificado en la especie ovina y sugerido en el modelo establecido a partir de casos naturales (Pérez *et al.*, 1996; Corpa *et al.*, 2000a; González *et al.*, 2005).

Además, el haber encontrado lesiones focales en terneros sacrificados a los 270 dpi y en un mayor número en los animales vacunados, confirmaría el papel que el tejido linfoide juega en la persistencia o latencia de las lesiones focales asociadas a la infección por *Map* que se había puesto de manifiesto en los estudios de campo (Pérez *et al.*, 1996; Corpa *et al.*, 2000a; González *et al.*, 2005). Según este modelo, algunos animales que desarrollan una mayor capacidad de resistencia, son capaces de controlar la infección de manera que presentan lesiones focales, que podrían persistir por largos periodos de tiempo, localizadas exclusivamente en el tejido linfoide intestinal, sin asociarse a la aparición de signos clínicos. El mayor número de animales con formas focales en los terneros vacunados respecto a los testigos infectados a los 330 dpv sugiere que la vacunación lograría un incremento de la resistencia de los animales a la infección, de forma que aunque se hubieran infectado, las lesiones granulomatosas de tipo focal permanecerían bajo esta forma y en esta localización durante un periodo de tiempo mayor que si no se hubieran inmunizado. Esta importancia del tejido linfoide como asiento de lesiones latentes había sido ya referida en otros estudios en casos

experimentales (Nisbet *et al.*, 1962; Juste *et al.*, 1994; Reyes, 2007) o naturales (Pérez *et al*., 1996; Corpa *et al*., 2000a; García Pariente *et al*, 2002, 2004, 2005; González *et al*., 2005) o incluso en ovejas infectadas en edades adultas que mostraron una mayor resistencia a la infección, en las que sólo aparecieron lesiones focales localizadas en las placas de Peyer (Delgado *et al.*, 2013).

En todos estos estudios llevados a cabo en la especie ovina, además de una mayor persistencia de las lesiones focales, se observó que la mayor resistencia de los animales, bien asociada a la edad o conferida por la vacunación, se asociaría a la aparición de granulomas de tipo regresivo, con un mayor grado de fibrosis (Nisbet *et al*., 1962; Juste *et al*., 1994; Gwozdz *et al*., 2000a; Reyes, 2007; Delgado *et al*., 2013) que indicarían que dichas lesiones podrían ir disminuyendo hasta llegar a desaparecer. Como se ha indicado, este hallazgo no ha sido verificado en este estudio. Sin embargo, ello no implica que la vacunación no haya provocado una latencia de las lesiones, ya que granulomas similares a los encontrados en las formas focales de los terneros vacunados son los que también aparecen en animales adultos, presumiblemente infectados en edades tempranas, que no han desarrollado la enfermedad (González *et al.*, 2005).

Los resultados de este estudio indican que la zona de tejido linfoide donde aparecen más lesiones iniciales son las placas de Peyer yeyunales, especialmente la PPYM, lo que estaría en consonancia con los hallazgos de Reyes (2007) y Delgado *et al*. (2013) en los corderos infectados experimentalmente de sus estudios. En otros estudios con corderos (Verna *et al*., 2007) o con ovejas adultas (Delgado *et al*., 2013) las lesiones paratuberculosas iniciales aparecían mayoritariamente en la placa de Peyer de la VIC, que es la segunda zona afectada en el primer sacrificio. Ambos tejidos linfoides han sido descritos como los más afectados en estudios previos en pequeños rumiantes (García Marín *et al*., 1992a, Juste *et al*., 1994, Pérez *et al*., 1996, Valheim *et al*., 2002b; Fernández *et al*., 2014a). Esto pudiera ser debido a las similitudes morfológicas y funcionales que existiría entre el tejido linfoide de ambas localizaciones, que son además las que persisten en los individuos adultos, y que serían diferentes a la placa de Peyer del íleon (Mutwiri *et al.*, 1999; Corpa *et al*., 2001; Valheim *et al*., 2002b; Delgado *et al*., 2013). Además, según los resultados de nuestro estudio, en los terneros

sacrificados a los 270 dpi ya se observan lesiones más abundantes en otras PPY y en el íleon, lo que indicaría que las lesiones progresarían desde la VIC o PPYM hacia el resto de localizaciones según avanza la infección.

La aparición de lesiones iniciales mayoritariamente en la PPYM, sin embargo, no estaría en consonancia con lo recogido en anteriores estudios en bovino en los que parece que las primeras lesiones se producen de forma más numerosa en los nódulos linfáticos ileoceal y yeyunal caudal (Larsen *et al*., 1975a). En nuestro trabajo, aunque terneros sacrificados a los 120 dpi también presentaban lesiones en los nódulos linfáticos, estas aparecían en menor número que en las placas de Peyer. Además, de nuevo, y de acuerdo a Verna *et al.* (2007), Delgado *et al*. (2013) y Fernández *et al*. (2014a), las lesiones en nódulos linfáticos mesentéricos y su intensidad están directamente relacionadas con las lesiones en el intestino. Debe tenerse en cuenta que en los estudios que refieren un mayor predominio de los nódulos linfáticos como localización de lesiones o bien no se ha estudiado de forma exhaustiva el tejido linfoide intestinal (Larsen *et al.*, 1975) o bien se han llevado a cabo en casos de infección natural (González *et al.*, 2005), asociándose a formas latentes, lo que podría indicar que en esas fases de latencia este tipo de lesiones predominaría en los nódulos linfáticos, algo a lo que aún no habría dado tiempo en los terneros de nuestro estudio. De hecho, en los animales sacrificados a los 270 dpi, son los nódulos linfáticos ileales una de las localizaciones donde se observa un mayor grado de lesión, especialmente lesiones focales, apoyando esta hipótesis. Tampoco debe descartarse que la dificultad que en ocasiones presenta la localización y muestreo de las placas de Peyer yeyunales en animales adultos haya provocado una infravaloración de las lesiones en esta localización, mientras que en nuestro estudio se han recogido y valorado un porcentaje muy elevado de las placas presentes en los terneros.

En cuanto a la distribución de las lesiones en los distintos nódulos linfáticos examinados y aunque no había diferencias significativas en el número de granulomas entre las distintas localizaciones en los animales sacrificados a los 120 dpi, los nódulos en los que había un mayor área ocupada por lesiones eran los yeyunales caudales, seguidos de los ileales, yeyunales e ileocecales, en ese orden. En bovinos (Larsen *et al*., 1975) y ovinos experimentalmente infectados con cepas bovinas que han desarrollado

lesiones focales, los granulomas aparecen principalmente en los nódulos linfáticos ileal y yeyunal y menos frecuentemente en los ileocecales (Verna *et al*., 2007). En general estos resultados serían coincidentes con los nuestros y las diferencias pudieran deberse al número de nódulos linfáticos y secciones examinadas en cada uno de los estudios.

En el segundo sacrificio las lesiones estaban presentes principalmente en el íleon y en las PPYP y PPYM, mientras que la VIC era la que menor afectación presentaba de las diferentes localizaciones intestinales. Además, el tejido linfoide seguía estando más afectado que la lámina propia. A ello contribuía la mayor afectación de los nódulos linfáticos yaque, como se ha descrito previamente, el número de lesiones en ellos guarda una relación directa con la cantidad de lesiones intestinales, al igual de lo observado en otros estudios experimentales en la especie ovina (Verna *et al*., 2007; Delgado *et al*., 2013; Fernández *et al*., 2014a). Los nódulos linfáticos con mayor extensión de lesión eran los ileales, seguidos del yeyunal caudal, que era el más alterado en los animales sacrificados a los 120 dpi. Precisamente en el estudio llevado a cabo por González *et al*. (2005) sobre 116 vacas de casos naturales de paratuberculosis, con y sin clínica, se señaló la importancia de tomar como muestra los nódulos ileal y yeyunal caudal, por ser estos los que se encontraron más lesionados en los animales examinados.

Finalmente, dos de los terneros desarrollaron lesiones de carácter difuso, uno de tipo linfocítico, en el grupo NVI y el otro de tipo intermedio (lote VI). Ya se ha discutido previamente las posibles causas que habrían inducido la aparición de estas formas en el ternero vacunado. Las mismas hipótesis podrían ser válidas para el caso del animal del grupo NVI. En ambos casos, el que se hayan desarrollado estas formas tan pronto como a los 270 dpi pudiera estar relacionado con la elevada cantidad de micobacterias que formaban parte del inóculo.

Además, la aparición de dos tipos diferentes de lesiones difusas confirmaría la validez del modelo lesional propuesto por González *et al.* (2005) a partir de casos naturales, donde ya describe tanto las formas intermedias como las linfocíticas. No está suficientemente aclarado por qué se desarrollan unas u otras formas. Se ha sugerido que estarían en relación con la diferente respuesta inmunitaria de los animales, de forma que

las formas linfocíticas se relacionarían con una mayor respuesta de tipo celular, como ha podido ser confirmado en este ternero. En cualquier caso resulta llamativo que el ternero vacunado haya desarrollado una forma intermedia, asociada a una mayor carga bacteriana. Este resultado estaría de acuerdo con la baja respuesta celular mostrada, en el momento del sacrificio, por este ternero.

Respecto a la presencia de BAAR en los distintos tipos lesionales, en las lesiones focales y multifocales, aparecen pocas bacterias, tanto identificadas por ZN como por IHQ, como ya ha sucedido en otros estudios (Pérez *et al*., 1996; González *et al*., 2005; Verna *et al*., 2007; Delgado *et al*., 2013; Fernández *et al*., 2014a). La técnica de ZN sólo detecta bacilos completos y no aquellos deficientes de pared como los esferoplastos (Condron *et al*., 1994), que son los que pudieran encontrarse en este tipo de lesiones. Además, la IHQ que sí sería capaz de teñir micobacterias previamente degradadas (Pérez *et al*., 1990; García Marín *et al*., 1992a; Thorensen *et al*., 1994; Plante *et al*., 1996; Stabel *et al*., 1996; Coetsier *et al*., 1998; Brees *et al*., 2000; Balseiro *et al*., 2003; Kheirandish *et al*., 2008; Delgado *et al*., 2009), tampoco identificó *Map* en mayor medida que el ZN, como ha ocurrido en otras infecciones experimentales en lesiones de este tipo (Delgado *et al*., 2013). La baja sensibilidad de estas técnicas en las lesiones localizadas en tejido linfoide se debería a la escasa cantidad de BAAR presentes en ellas, en comparación a las que se observan en lámina propia, donde suelen ser más abundantes (Chávez, 1993; Pérez *et al*., 1996; Corpa *et al*., 2000a; Valheim *et al*., 2002b; González *et al*., 2005; Reyes, 2007).

La cantidad de bacterias en las lesiones multifocales fue similar a las de las focales, detectadas tanto por ZN como por IHQ, a pesar de que en otros trabajos se considera que en este tipo lesional se encontrarían con más frecuencia que en las formas focales, en las que estas técnicas, como hemos señalado, presentan menor sensibilidad (García Marín *et al*., 1992c; Pérez *et al*., 1996; Corpa *et al*., 2000a; González *et al*., 2005; Kheirandish *et al*., 2008). En la lesión de tipo difuso había una gran diferencia en cuanto a la presencia de *Map* según fuera una forma linfocítica o intermediaEn las primeras, como se ha descrito, los BAAR o antígenos de *Map* mediante IHQ se observaban, pero en número muy reducido, mientras que la tinción con ambas técnicas en las lesiones de tipo intermedio era muy evidente en la mayoría de las localizaciones

como ya se ha observado en trabajos previos (Pérez *et al*., 1996; Clarke, 1997; Corpa *et al*., 2000a; González *et al*., 2005).

Se ha propuesto que las diferentes formas patológicas representan diferentes estadios de la infección, donde el estado inmunológico del animal juega un papel muy importante (Little *et al.*, 1996; Pérez *et al*., 1997, 1999: Stabel, 1996; Clarke, 1997; Burrells *et al*., 1998; Storset *et al*., 2001; Koets *et al*., 2002; Kurade *et al*., 2004; Kurade y Tripathi, 2008; Begg *et al*., 2009; Delgado *et al*., 2013). La respuesta innata frente a *Map*, de la cual se ha señalado que el IFN-γ_0 podría ser un indicador (Olsen y Storset, 2001; Geijo, 2007), se ha valorado en los terneros de este estudio, observándose un incremento paulatino en la liberación de IFN-γ_0 hasta los 45 dpi, cuando desciende para volver a elevarse a los 150 dpi hasta el final del experimento. En el modelo patogénico propuesto por Geijo (2007) en paratuberculosis bovina y por Juste *et al*. (2009b) en enfermedad inflamatoria intestinal en humanos, los niveles de IFN-γ_0 se relacionan directamente con la progresión de las lesiones. Los resultados de nuestro estudio, en el que los animales control, sin lesiones, son los que producen mayor cantidad de esta citoquina, no parecen estar en consonancia con los resultados de estos autores. Sin embargo, si lo están con los obtenidos por Delgado *et al*. (2012; 2013) que encuentra que esta citoquina solo se encontraba elevada en las ovejas adultas infectadas que sin embargo manifestaban lesiones focales, indicativas de control de la progresión de la infección, a diferencia de los corderos, donde la expresión de IFN-γ_0 inespecífico fue menor y sin embargo manifestaban lesiones más graves. Una posible explicación propuesta por Delgado *et al*. (2012) y que se podría aplicar a este estudio es que bajo condiciones experimentales y con la inoculación de altas dosis de *Map*, el modelo patogénico puede no seguir el mismo patrón que bajo condiciones naturales, aunque las lesiones y la respuesta inmune adaptativa de los animales del estudio de Delgado *et al*. (2012, 2013) y de este, sí que sigan el patrón de las condiciones naturales (Clarke, 1997; Pérez *et al*., 1997, 1999; Stabel, 2006). Además puede que la respuesta inmunitaria innata no solo dependa del IFN-γ no específico, aunque sea considerada la principal citoquina involucrada en la patogenia de la paratuberculosis, y habría otros mecanismos innatos que no son analizados en estos trabajos que tengan su influencia (Delgado *et al*., 2012).

En el espectro inmunopatológico propuesto para la paratubeculosis la respuesta inmune celular o de tipo Th1, con predominio de células CD4+ y secreción de IFN-γ, tiene lugar en las fases iniciales y subclínicas de la infección tras la exposición a *Map* y se asocia con lesiones focales y multifocales (Chiodini *et al*., 1984a; Clarke, 1997; Pérez *et al*., 1999; García-Marín *et al*., 2000; Stabel, 2000a; Coussens, 2001; Kurade y Tripathi, 2008). La respuesta inmune celular está considerada la respuesta más eficiente en el control de la infecciones micobacterianas (Clarke, 1997; Stabel, 2006). El IFN-γ, como la principal citoquina de tipo Th1, juega un papel crucial en la diferenciación de linfocitos T y la activación de macrófagos tras la infección por *Map* (Stabel, 2006), inhibiendo la multiplicación de las micobacterias y controlando la infección (Flesh y Kaufmann, 1990; Huygen *et al*., 1994). Aunque recientemente se ha sugerido que las respuestas inmunitarias periféricas elevadas estarían en relación con la extensión de la lesión (Vázquez *et al*., 2013; Fernández *et al.*, 2014a), las lesiones focales y multifocales se han relacionado con una respuesta periférica de tipo celular (Juste *et al*., 1994; Pérez *et al*., 1996; García Marín *et al*., 1999a; Pérez *et al*., 1999; González, 2003; Delgado *et al*., 2012, 2013). En nuestro estudio, la producción de IFN-γ fue mayor en los animales infectados (NVI) que en los controles (NVNI) a partir de los 60 dpi, manteniéndose en niveles elevados hasta el final del experimento, en consonancia con lo sugerido tradicionalmente en paratuberculosis, donde una respuesta de tipo celular se asociaría a las fases iniciales y subclínicas de la infección (Stabel, 2000a;). En cuanto a su relación con los tipos lesionales, en los terneros que mostraron lesiones focales en el momento del sacrificio la respuesta celular era elevada y la humoral baja, de acuerdo con lo señalado por otros autores (Pérez *et al.*, 1999; González, 2003).

En el único animal que presentaba lesión difusa en el grupo NVI -cuya respuesta inmune no se habría visto afectada por la vacunación-, ésta era de tipo linfocítico, asociada a un valor de IFN-γ en el momento del sacrificio elevado (DO=11,96), mientras que la respuesta al ELISA indirecto se encontraba por debajo del umbral de positividad (DO=664). Este resultado estaría de acuerdo con lo indicado en otros estudios (Clarke, 1997; Pérez *et al.*, 1999) que relacionan este tipo de lesión con una respuesta de tipo Th1 elevada y descontrolada, asociada a un incremento de linfocitos CD4+ y γδ en las lesiones (Little *et al*., 1996), y a una baja respuesta de tipo humoral.

En cuanto a los diferentes tipos de técnicas empleadas para valorar la respuesta inmunitaria celular periférica, se ha sugerido que la IDR es más sensible que el test de IFN-γ tanto en ovino como en bovino (Pérez *et al*., 1999; Dunn *et al*., 2005; Fernández *et al*., 2014a). No obstante, en nuestro estudio el test de liberación de IFN-γ detecta más animales positivos que la IDR en los tres momentos post-vacunación en los que esta se llevó a cabo. Respecto a su relación con las lesiones, el único ternero con lesión focal a los 120 dpi fue el que ofreció una respuesta más intensa a la IDR (11 mm), apoyando lo descrito anteriormente acerca de que este tipo de lesión está asociada a mayores respuestas de tipo celular. En ningún caso el incremento de grosor cutáneo producido al inocular PPD bovina fue superior al inducido por la PPD aviar, excepto en el ternero 9107 a los 15 dpi, que tenía 3 mm de incremento en el punto de inoculación de la PPD bovina y nada de incremento en el de la PPD aviar. Ya se ha señalado que la especificidad de esta prueba puede verse comprometida por la posibilidad de producirse reacciones cruzadas por contactos previos con otras micobacterias (Lauzi *et al*., 2000; Olsen *et al*., 2002). Al tratarse de una respuesta tan baja que posteriormente no se mantuvo, posiblemente incluso podría haberse debido a un error en la ejecución de la técnica.

Se ha descrito que en animales infectados con *M. bovis* hay un incremento de producción de IFN-γ hasta 59 días después de realizar la IDR (Rothel *et al*., 1992; Wood y Rothel, 1994). En el caso de la paratuberculosis también se ha descrito una mayor producción de IFN-γ tras una re-exposición al antígeno (Stabel *et al*., 2007). Estos hallazgos no han podido ser confirmados en nuestro estudio, al no haberse encontrado modificaciones en la secreción de esta citoquina en los muestreos posteriores a la IDR, en consonancia con los señalado por Ryan *et al.* (2000) en tuberculosis bovina.

La respuesta de tipo humoral suele observarse en los estadios finales de la enfermedad (Pérez *et al*., 1997; Stabel, 2006), relacionada con la aparición de lesiones graves normalmente con abundante carga bacteriana (Clarke, 1997, Pérez *et al*., 1997, 1999; Kurade *et al*., 2004; Kurade y Tripathi, 2008; Begg *et al*., 2009) y asociada a una disminución de la respuesta de tipo Th1. En nuestro estudio, el grupo de terneros no vacunados e infectados (NVI) presentó valores de anticuerpos significativamente más

altos que los controles no infectados (NVNI) a los 150 dpi, y por tanto, después que la respuesta celular (60 dpi), permaneciendo más elevados hasta el final del experimento, pero sin llegar a alcanzar en ningún momento valores considerados como positivos en el diagnóstico serológico habitual de paratuberculosis en la infección natural (Gráfica IV.3), si bien uno de los terneros del grupo infectado (5956) mostró un resultado positivo en el muestreo de los 180 dpi (Tabla IX.1). El hecho de que este animal no mostrara lesiones graves con abundante carga bacteriana o presencia de *Map* en heces, y que este resultado no se mantuviera en el tiempo, hace pensar que pudiera tratarse de un problema en la ejecución de la técnica.

Los resultados de este estudio están en consonancia con lo encontrado por otros autores y ya mencionado, que asocian niveles elevados de anticuerpos con los estadios finales de la infección, ya que los terneros de esta experiencia fueron sacrificados antes de llegar a dicha fase, sin haber tenido tiempo de desarrollar una marcada respuesta de tipo humoral. El único animal con lesión grave, asociada a formas avanzadas fue el ternero 9107 que mostró una forma linfocítica, la cual no se suele asociar a una respuesta humoral elevada (Clarke, 1997; Pérez *et al*., 1999; González, 2003). El otro ternero con lesión difusa y mayor carga bacteriana sí que presentaba una respuesta humoral intensa, pero al tratarse de un animal vacunado no se puede concretar si estaba relacionada con la infección o con la vacunación.

Respecto al inicio de la respuesta humoral en el curso de la infección, hay estudios en terneros que señalan la aparición de anticuerpos de forma algo más temprana que en nuestro estudio, a los 134 dpi, antes incluso que la respuesta celular (Waters *et al.*, 2003). De todas formas, los estudios no son comparables ya que difieren en la dosis de infección y en el antígeno empleado en la ejecución de la técnica ELISA. En ovino, aunque hay autores que señalan que los anticuerpos comienzan a elevarse a los 9 meses de haber sido inoculados, y justo previamente al inicio de los signos clínicos (Begg *et al*., 2005), hay otros que apuntan la aparición de respuesta humoral a los 110 (Delgado *et al*., 2012; 2013) o incluso a los 90 dpi (Kurade *et al*., 2004). La prueba de IDGA, como ya se había señalado previamente (Colgrove *et al*., 1989; Pérez e*t al.*, 1997; Whittington *et al*., 2003a), es menos eficaz en la detección de la respuesta inmune humoral que el ELISA indirecto.

Recientemente, también hay varios estudios que señalan que el cambio entre respuesta Th1 y Th2 no sería tan marcado, coexistiendo ambas en largos periodos de tiempo, sin necesidad de asociarse a la fase clínica (Stewart *et al*., 2004; Begg *et al.*, 2009, 2011; Vázquez *et al.*, 2013; Fernández *et al.*, 2014a). Nuestro trabajo, aún teniendo en cuenta las limitaciones del corto periodo de estudio, no parece estar de acuerdo con este hallazgo, ya que los animales desarrollaron una respuesta celular muy intensa a partir de los 120 dpi que comenzó a decrecer a los 240 dpi, sin que la respuesta humoral fuera aún muy elevada; no obstante, desde los 150 dpi ya era más alta que en los controles, por lo que no puede descartarse que, de haberse prolongado el experimento, pudieran haber coexistido ambas en niveles elevados.

Respecto a los momentos de realización de la prueba de IDR, tras su ejecución no se observaron modificaciones significativas en la producción de anticuerpos frente a paratuberculosis a lo largo del experimento que pudieran atribuirse a la prueba en los animales infectados con paratuberculosis, al contrario de lo sucedido en otros estudios experimentales también en paratuberculosis bovina (Varges *et al*., 2009) y ovina (Delgado *et al*., 2012). Las diferencias en las condiciones experimentales (inóculo empleado, momentos de realización de la prueba, etc) podrían explicar estas diferencias.

Además de la respuesta inmune periférica, se ha valorado la respuesta inmune local frente a *Map* mediante la evaluación de la producción *in vitro* de IFN-γ en muestras de tejido y linfocitos extraídos del NLP, NLIl, PPY e ILD. Como ya se ha indicado anteriormente, la valoración de la producción de citoquinas debería realizarse a partir de linfocitos extraídos de los tejidos y no de secciones de tejido como habían propuesto Gwozdz y Thompson (2002).

Al comparar la producción de IFN-γ entre grupos, sólo se observaron diferencias en las muestras de linfocitos de PPY e ILD, donde los NVI mostraban mayor cantidad que los NVNI. Estos resultados son parcialmente coincidentes con los de Delgado (2010) que encuentra mayores niveles en PPY y nódulos linfáticos mesentéricos y que sugieren que los linfocitos del tejido linfoide intestinal participarían en el incremento de IFN-γ observado en los animales infectados. Se ha señalado incluso que la producción

de esta citoquina por parte del tejido linfoide intestinal podría superar a la sanguínea (Gowzdz y Thompson, 2002). Comparado con los hallazgos en los animales inmunizados, destaca que el efecto de la vacunación parece actuar sobre todo a nivel de los nódulos linfáticos, más que del tejido linfoide intestinal, donde si lo haría la infección por *Map*, sugiriendo la existencia de poblaciones de linfocitos con distinta respuesta según el antígeno de *Map* se localice directamente en el tejido o llegue por vía linfática o sanguínea tras la vacunación. Además, y en relación con la presencia de lesiones, podría plantearse la hipótesis de que, tras la infección por *Map* el establecimiento de la bacteria en zonas de tejido linfoide intestinal induciría una mayor liberación local de IFN-γ que podría ejercer su influencia en el posterior desarrollo de la infección. En los animales vacunados esa mayor respuesta se produciría en los nódulos linfáticos regionales y podría contribuir a frenar la progresión de las lesiones a estas localizaciones (que está además relacionada con su evolución en el intestino), ya que se ha encontrado un menor número de lesiones en dichas localizaciones en los terneros inmunizados en comparación con los únicamente infectados.

Al igual que en el grupo de terneros vacunados e infectados, en los del grupo NVI tampoco se obtuvo ningún aislamiento positivo en el cultivo fecal. Como ya se ha señalado al hablar de la eficacia vacunal, es posible que al tratarse de animales en las fases iniciales de la infección aún no se haya producido la excreción fecal de *Map* (Merkal, 1973; Sockett *et al.*, 1992a; Whipple, 1992; Whittington *et al.*, 2000c). Otras causas probables como la posible inactivación de *Map* durante el proceso de descontaminación, junto con la menor viabilidad de las micobacterias debido a la congelación de las muestras hasta el procesado de las mismas (Redacliff *et al.*, 2003) también deberían considerarse.

De la misma forma que el cultivo, la PCR llevada a cabo sobre muestras de heces no arrojó ningún resultado positivo en este estudio. Las causas que se han señalado para el cultivo podrían aplicarse a los resultados de esta técnica. Además, la PCR sobre muestras de heces presenta el problema de la aparición de falsos negativos debido a la presencia de sustancias inhibidoras de la amplificación (Vary *et al*., 1990; Van der Giessen *et al*., 1992; Collins *et al*., 1993a, 1993b; Mori *et al*., 1999; Englund *et al*., 2001; Mason *et al.*, 2001). No obstante, hay estudios en los que esta técnica es

considerada más sensible que el cultivo, aunque los resultados fueran muy variables en función de la edad (Geijo, 2007).

En cuanto al cultivo de tejidos (VIC, ILD, PPY NLYc, NLIl) se obtuvieron resultados positivos en 4 de los 6 animales del grupo NVI, con el 16,67% de la muestras examinadas con algún aislamiento, mientras que no se obtuvo positividad en los terneros control (NVNI). El mayor número de resultados positivos se obtuvo cuando se empleó el medio de Herrold suplementado con micobactina frente al de Löwenstein-Jensen. Esta mayor eficacia del medio de Herrold en la especie bovina ya había sido señalada por varios autores (Merkal *et al*., 1968; Juste *et al*., 1991b; Whipple *et al*., 1992; Aduriz *et al*., 1995a; Eamens *et al*., 2000; Nielsen *et al*., 2004). Aunque el cultivo sea una técnica 100% específica (Whitlock *et al*., 1992), su sensibilidad es relativamente baja, sobre todo por los falsos negativos que ocasionan los animales con infección subclínica e incluso aquellos con formas lesionales graves con pocas micobacterias (Whittington *et al*., 2000c; Corpa *et al*., 2000a), si bien no es nuestro caso, donde se pudo aislar *Map* en los dos terneros con lesiones difusas.

En los mismos tejidos utilizados para el cultivo se llevó a cabo la PCR a partir de tejido fresco consiguiéndose identificar *Map* en un mayor número de animales y muestras que con el cultivo en el grupo NVI. La mayor sensibilidad a la PCR realizada sobre muestras de tejido en lugar de heces también ha sido señalada (Garrido *et al*., 2000a). Esto puede ser debido a que, como ya se ha indicado, la PCR identifica ácidos nucleicos de la micobacteria y por tanto, ésta no necesita estar viable ni mantener su integridad para que el resultado sea positivo (Garrido *et al*., 2000a). Sin embargo, cuando la técnica de PCR se aplicó sobre muestras de tejido incluidas en parafina, la sensibilidad fue inferior a la del tejido fresco, detectándose como positivos únicamente 3 de 6 animales y un 6,10% de las muestras. Aunque las muestras estuvieron poco tiempo en formol antes de su procesado, esta pérdida de sensibilidad, además de a otras causas como las diferencias en las muestras analizadas por cada técnica, puede ser debida a la fragmentación que la fijación con formol produce en los ácidos nucleicos (Greer *et al*., 1991; Plante *et al*., 1996; Benavides *et al*., 2006). Una alternativa que se ha propuesto para incrementar la sensibilidad en estudios con este tipo de muestras ha sido la PCR anidada, que a pesar de ser más laboriosa, detectaría un mayor número de

animales positivos que la PCR convencional empleada en este estudio (Collins *et al.*, 1993b; Englund *et al.*, 1999; Erume *et al.*, 2001; Buergelt y Williams, 2004; Gao *et al.*, 2009; Soumya *et al.*, 2009; Delgado, 2010). Posiblemente si hubiéramos empleado dicha PCR anidada se hubiera incrementado el porcentaje de muestras con resultado positivo, tal y como encuentra Delgado (2010) en un estudio experimental en la especie ovina, donde se analiza el mismo tipo de muestras que en el nuestro y se comparan ambos métodos.

Un hecho destacable ha sido que, tanto en el cultivo de tejidos como en la PCR a partir de muestras incluidas en parafina, el mayor número de resultados positivos se encontrara en las secciones de ILD, a pesar de que la localización donde se observó un mayor número de lesiones fue PPYM. En el caso de las muestras incluidas en parafina la PCR se llevó a cabo en las mismas muestras de tejido que se examinaron microscópicamente para su valoración lesional. Además de que los procedimientos diagnósticos empleados detectan diferentes evidencias de la infección (lesiones y presencia de ácidos nucleicos de *Map*) que no tienen por qué guardar una correlación estrecha, el hecho de que las lesiones localizadas en PPYM, más numerosas, fueran mayoritariamente de tipo focal, con pocas evidencias microscópicas de presencia de *Map* o sus antígenos, mientras que las presentes en ILD tuvieran carácter multifocal o difuso, con mayor carga bacteriana, podría ser una explicación para este hallazgo. En el caso de la PCR a partir de tejido fresco, sin embargo, la muestra que ofreció mayor positividad fue el NLYc, que no se correspondía con el mayor número de lesiones. Posiblemente el hecho de que no se analizaran las mismas muestras que en la valoración lesional, o diferencias inherentes a ambas técnicas, pudieran explicar este resultado. En otros estudios en ovino, esta localización junto con la VIC han sido señaladas como las muestras en las que se obtienen mejores resultados (Gwozdz *et al*., 1997; Delgado, 2010).

También se llevó a cabo la prueba de detección de ADN de *Map* en el suero de los animales experimentales, ofreciendo un resultado positivo 5 de los 6 terneros infectados (NVI) y ninguno de los terneros utilizados como control de la infección (NVNI). Para la realización de esta técnica se usaron dos parejas de cebadores (RJ1-PT91 y C1-C2) siendo más sensibles los C1-C2. El porcentaje de animales positivos a

lo largo de los diferentes muestreos fue variando, pero se pudieron detectar a lo largo de todo el experimento, indicando que habría paso de ADN de *Map* a sangre circulante, posiblemente a partir del intestino o nódulos linfáticos regionales, que es donde estaría presente en las lesiones, que por otra parte no se encontraron en ninguna otra muestra de tejido extraintestinal examinada. La presencia de ADN de *Map* en sangre periférica ya había sido puesta de manifiesto en estudios previos, como el llevado a cabo por Geijo (2007) donde identifican ADN en un 17% de bovinos de un rebaño con paratuberculosis, o en el caso de la enfermedad inflamatoria crónica intestinal de la especie humana, donde mediante una PCR anidada se llegó a evidenciar con más frecuencia ADN de *Map* en controles sanos de la enfermedad que en enfermos, como resultado contrario al paradigma de la etiología de las enfermedades infecciosas (Juste *et al*., 2009b).

Finalmente, se ha llevado a cabo un estudio comparativo entre los diferentes métodos de detección del agente etiológico o la respuesta inmunitaria en relación con las lesiones presentadas por los animales. En general nuestros resultados confirman la existencia de una baja concordancia entre las pruebas empleadas, como ya había sido puesto de manifiesto anteriormente, debido a las variaciones que existen en los animales a lo largo del espectro inmunopatológico de la paratuberculosis (Jorgensen, 1965; Garrido, 2001; Balseiro, 2004; Geijo, 2007).

En cuanto a la valoración de la respuesta inmune humoral mediante IDGA y ELISAse ha observado que ninguno de los animales infectados y no vacunados, a pesar de presentar lesión, muestra reacción positiva a estas pruebas de diagnóstico al sacrificio. No obstante, las lesiones presentadas por estos terneros son en un caso de tipo focal, en cuatro de tipo multifocal y en otro de tipo difuso linfocítico, que como ya se ha señalado al discutir la respuesta inmune asociada a la infección, presentarían sobre todo una respuesta inmune celular, de tipo Th1 (Clarke, 1997; Pérez *et al*., 1999; García-Marín *et al*., 2000; Stabel, 2000a; Coussens, 2001; Kurade y Tripathi, 2008) y no de tipo Th2 o humoral (Clarke, 1997; García-Marín *et al*., 2000; Stabel, 2000a; Coussens, 2001; Delgado, 2010). Precisamente en todos los animales se observa una gran respuesta celular al sacrificio y aunque haya uno de los animales con lesión

multifocal en el que no se produce un incremento positivo a la inoculación de la PPD, todos presentan positividad al test de liberación del IFN-γ, confirmando el modelo propuesto que asocia una mayor respuesta celular a las fases iniciales de la infección (Bendixen, 1978; Chiodini *et al*., 1984a; Chiodini, 1996; Clarke, 1997; García-Marín *et al*., 2000; Stabel, 2000a).

En lo que respecta al cultivo de tejido fresco, y teniendo en cuenta a todos los animales infectados de este estudio, se observa que no detecta a ningún animal sin lesión, mientras que sí se consigue el aislamiento en tejidos en el 40% de los animales con lesión focal, el 50% de los de lesión multifocal y el 100% de lesión difusa. Aunque con estos resultados la concordancia entre ambas pruebas es débil (κ=0,270), serían resultados lógicos en los que la positividad aumenta al incrementarse la gravedad de las lesiones, como ya observaron otros autores (Pérez *et al*., 1996; González *et al.*, 2005). Bien es cierto que el tejido en el que se aísla el mayor número de colonias es la VIC del ternero 9109, que no presenta lesión en ese zona (Tabla IV.22), lo que indicaría que la presencia de bacterias en el tejido no necesariamente provoca lesión como ya se ha señalado (Delgado *et al*., 2013; Fernández *et al*., 2014a) o que ésta no se ha podido detectar con la metodología empleada. También habría que considerar que este ternero está vacunado y muy probablemente ello haya impedido que se desarrollen más lesiones en el animal. Al estudiar las localizaciones pormenorizadamente, se aislaron colonias en el 13,79% de las muestras sin lesión, el 9,52% de las que presentaban lesiones focales, el 2,86% de las multifocales, 66,67% de las difusas intermedias y el 50% de las difusas linfocíticas (Tabla IV.22). Llama la atención el bajo número de aislamientos en muestras de tejido con lesiones focales y especialmente multifocales, a pesar de que en estas últimas se evidenciaron BAAR con más frecuencia que en las primeras. Ya se ha indicado (Delgado, 2010; Vázquez *et al.*, 2013) que la sensibilidad del cultivo bacteriológico sería menor que la del método histopatológico para detectar evidencias de la infección, a pesar de que el primero se ha considerado como método *gold standard*.En este estudio donde se han estudiado animales infectados y manejados de manera controlada, las lesiones se han encontrado únicamente en terneros infectados, lo que apoyaría su especificidad y por lo tanto la mayor sensibilidad de la valoración lesional.

La PCR, tanto en tejido fresco como incluido en parafina, ha ofrecido niveles bajos de concordancia con el diagnóstico histopatológico (κ=-0,182), a pesar de que detecta el total de los animales con lesiones difusas y un porcentaje elevado de aquellos que muestran lesión focal y multifocal. Sin embargo, también se detectó ADN en los dos animales vacunados que no presentaban lesión. La explicación a estos resultados sería la misma que se acaba de discutir en el cultivo, apoyada por los hallazgos de Delgado *et al*. (2013) y Fernández *et al*. (2014a). Al estudiar de forma pormenorizada las distintas muestras analizadas de cada localización, el porcentaje de detección es elevado para aquellas con lesión difusa intermedia, algo inferior en las formas linfocíticas y bajo para las lesiones focales y multifocales, encontrándose asimismo un número considerable de muestras sin lesión positivas. Estos resultados mejoran los encontrados con el cultivo bacteriológico, pero aún así llama la atención el bajo porcentaje de detección en secciones con lesiones focales y multifocales, especialmente en comparación con los tejidos sin lesión. El que un gran porcentaje de los animales con lesiones focales fueran vacunados podría explicar que haya habido una mayor destrucción bacteriana asociada a la inflamación activa presente en esas zonas.

La concordancia entre las lesiones y el diagnóstico mediante PCR en suero resultó escasa (κ=0,064) ya que tan sólo en el 25% de los animales con lesión multifocal y en el 50% de los animales con lesión difusa se detectó ADN en el suero en el momento del sacrificio. Se trata por tanto de la técnica con menor capacidad de detección de terneros con lesión e indica que la presencia de ADN en suero no estaría relacionada estrechamente con la existencia de lesiones, si bien el mayor porcentaje encontrado en los animales con lesión difusa apuntaría a que si existe relación con la cantidad de BAAR en el tejido. No obstante, debe tenerse en cuenta que el bajo número de animales analizados no permite extraer conclusiones determinantes.

Finalmente, y por lo que respecta a las técnicas de diagnóstico etiológico empleadas, la concordancia mostrada entre el cultivo y la PCR de tejido fresco ha resultado escasa (κ=0,222), de manera que la PCR detecta dos animales infectados más que el cultivo. Este resultado sería razonable en vista de lo que ya se ha venido discutiendo de que la PCR identifica ácidos nucleicos de la micobacteria y que por

tanto, esta no necesita estar viable ni mantener su integridad para que el resultado sea positivo (Garrido *et al*., 2000a).

VI.CONCLUSIONES

VI.1. CONCLUSIONES

1.- La vacunación con Silirum® se ha mostrado eficaz en el control de la infección experimental con *Map* en terneros, al provocar una reducción en la cantidad y extensión de las lesiones, y en el aislamiento bacteriológico de *Map* a partir de tejidos. Sin embargo, dicha protección no es absoluta ya que un ternero vacunado desarrolló formas lesionales graves con abundante carga micobacteriana.

2.- La vacunación con Silirum® no previene la infección de los animales. Su efecto estaría en provocar un enlentecimiento en la progresión de las lesiones y la multiplicación de *Map* en los tejidos del animal.

3.- La inoculación subcutánea de Silirum® en terneros no afecta a su estado general de salud, más allá de la aparición de un nódulo subcutáneo que persiste al menos hasta los 330 dpv.

4.- La vacunación con Silirum® induce una respuesta inmunitaria celular periférica frente a paratuberculosis que no se ve afectada por la infección con *Map* y evidenciable mediante las técnicas de IDR y liberación de IFN-γ ya a los 45 dpv y que persistiría al menos hasta los 270 dpv, interfiriendo con el diagnóstico de la infección por *Map* con estas pruebas. Sin embargo, la vacunación no produce ningún efecto en la producción inespecífica de IFN-γ en sangre periférica.

5.- La inmunización con Silirum® también provoca la aparición de una respuesta inmunitaria humoral periférica, que no se ve afectada por la infección con *Map*, a partir de los 60 dpv, que se mantiene al menos hasta los 330 dpv, y que interferiría con el diagnóstico serológico de la paratuberculosis.

6.- Los animales vacunados desarrollan una respuesta inmunitaria periférica, tanto celular como humoral, frente a *M. bovis* que disminuye con el tiempo pero que podría dar lugar a interferencias con el diagnóstico *in vivo* de la tuberculosis bovina. Sin embargo, dichas interferencias podrían ser eliminadas en su mayor parte empleando las pruebas de IDR y de liberación de IFN-γ comparadas

7.- El método histopatológico de valoración de la morfología, extensión y cuantificación de lesiones empleado en este estudio ha mostrado su utilidad en la valoración de la eficacia de la vacunación con Silirum® en un modelo experimental en terneros.

8.- El tejido linfoide intestinal, principalmente el de las placas de Peyer yeyunales, y los nódulos linfáticos ileales son las localizaciones más importantes en cuanto a la aparición de las lesiones granulomatosas iniciales o de carácter latente en la infección experimental por *Map* en terneros. Además, la intensidad de las lesiones en los nódulos linfáticos está relacionada con la extensión de las lesiones intestinales.

9.- Los hallazgos lesionales en los terneros infectados experimentalmente por *Map* confirman la validez del modelo histopatológico de desarrollo y evolución de lesiones de la infección paratuberculosa anteriormente propuesto a partir del estudio de casos naturales.

10.- La infección experimental por *Map* en terneros induce una respuesta inmunitaria humoral y celular periférica. Esta última está asociada predominantemente con animales que desarrollan lesiones de tipo focal, mulitifocal y difusa linfocítica.

11.- La infección por *Map* induce una mayor liberación de IFN-γ a nivel local, en el íleon y placa de Peyer yeyunal, mientras que con la vacunación dicha respuesta se produce mayormente en los nódulos linfáticos preescapulares e ileal. Este hallazgo podría estar relacionado con la menor progresión de las lesiones hacia los nódulos linfáticos de la región intestinal encontrado en los animales vacunados.

12.- Las pruebas de diagnóstico empleadas muestran, en general, una baja concordancia entre ellas. La valoración histopatológica tiene una mayor sensibilidad que el cultivo bacteriológico de tejidos o la PCR en tejidos incluidos en parafina o en suero, siendo similar a la PCR de tejido fresco.

VII.RESUMEN

SUMMARY

VII.1. RESUMEN

La paratuberculosis o enfermedad de Johne es una enfermedad infecciosa causada por *Mycobacterium avium* subespecies *paratuberculosis* (*Map*), que afecta a numerosas especies de rumiantes tanto domésticos como silvestres, así como a diferentes especies de monogástricos. Los animales que la padecen presentan una enteritis y linfadenitis granulomatosa de curso crónico que provoca, como signos clínicos más frecuentes, adelgazamiento progresivo, diarrea, y finalmente la muerte de los individuos afectados. Para su control la vacunación se ha señalado como un método útil en ovino y caprino, sin embargo en la especie bovina es una práctica prohibida en nuestro país por la posible interferencia que ésta supone para las campañas de lucha contra la tuberculosis bovina.

El principal objetivo de esta tesis ha sido valorar la eficacia de una nueva vacuna (Silirum®) frente a la paratuberculosis bovina en un modelo en terneros infectados experimentalmente con *Map*, empleando para ello un método de valoración histopatológica de las lesiones y la detección del agente etiológico. Adicionalmente, se han estudiado aspectos de la patogenia de las fases iniciales de la infección por *Map* y la utilidad de diferentes pruebas de diagnóstico etiológico.

Para ello se han empleado 18 terneros de 3 meses de edad. Ocho de ellos (grupo VI) fueron vacunados con 1 ml de la vacuna inactivada frente a paratuberculosis Silirum® y, dos meses después, infectados con $6{,}9 \times 10^{10}$ bacilos ácido-alcohol resistentes (BAAR). En otros seis terneros (grupo NVI) se practicó únicamente la infección. De los cuatro restantes, dos fueron solamente vacunados (lote VNI) y el resto (grupo NVNI) no recibieron ninguno de estos tratamientos. El inóculo infectante se obtuvo a partir del raspado de mucosa de fragmentos de intestino de tres vacas con paratuberculosis clínica, y se comprobó que se correspondía con cepas del patrón bovino. La infección se llevó a cabo por vía oral en 6 tomas en 20 días, con un intervalo mínimo de 2 días entre ellas. Se tomaron muestras de suero, sangre completa y heces a periódicamente entre los días 0 y 330 post-vacunación (dpv) con el fin de valorar la respuesta inmune humoral mediante el test de ELISA indirecto frente a paratuberculosis y tuberculosis, y la respuesta inmune celular, tanto específica frente a paratuberculosis y tuberculosis, como inespecífica, mediante la prueba de liberación del IFN-γ, así como

hacer cultivos y PCR de heces. Además, a los 0, 45, 150 y 330 dpv se realizó la prueba de la intradermorreacción (IDR) comparada. Se llevó a cabo la valoración de las posibles reacciones provocadas por la vacunación mediante el seguimiento clínico y valoración de la temperatura corporal en las primeras 120 horas, así como la formación y evolución del nódulo vacunal coincidiendo con la toma de muestras de sangre y heces. Un primer grupo de cinco animales, tres del grupo VI y dos del NVI, fue sacrificado a los 180 dpv (120 dpi), y el resto a los 330 dpv (270 dpi). Se practicó la necropsia reglada y se tomaron muestras de diferentes localizaciones de intestino y tejido linfoide relacionado (placas de Peyer y nódulos linfáticos) que fueron procesadas de forma convencional para su examen histológico. Los animales fueron clasificados en diferentes tipos de lesión en función de sus características morfológicas, localización, extensión y la presencia de BAAR detectados por la técnica de ZN y por métodos inmunohistoquímicos. Además, se realizó una valoración cuantitativa de las lesiones mediante el recuento de granulomas en los distintos compartimentos intestinales y nódulos linfáticos regionales, así como un análisis de la extensión relativa que dichas lesiones ocupaban en los nódulos linfáticos. También se llevaron a cabo estudios bacteriológicos para el aislamiento de *Map* en muestras de heces y tejidos, así como la técnica de PCR para la detección de ADN de *Map* en heces, tejido fresco e incluido en parafina, y suero sanguíneo. Finalmente, se valoró la respuesta inmune local mediante el análisis de la secreción in vitro de IFN-γ a partir de linfocitos del íleon, placas de Peyer yeyunales y nódulos linfáticos ileal y preescapular.

No se observaron reacciones que afectaran al estado de salud de los terneros tras la inoculación de la vacuna ni a lo largo del estudio. Los animales vacunados desarrollaron un nódulo vacunal cuyo mayor tamaño se alcanzó entre los 150 y los 240 dpv. Dichos nódulos eran firmes, sin adherencias y no se observó la formación de fístulas o supuración alguna.

La valoración de la respuesta inmune periférica mediante el test de ELISA frente a paratuberculosis resultó significativamente mayor en los animales vacunados que la de los terneros no vacunados a partir de los 60 dpv, incrementándose las diferencias a los 90 dpv, cuando en los animales inmunizados se alcanzaron valores considerados como positivos, alcanzando los mayores valores a los 240 dpv. Los animales que no fueron vacunados nunca alcanzaron positividad a esta técnica, siendo mayores los niveles de

anticuerpos séricos en el caso de los animales infectados a partir de los 210 dpv. En cuanto a los resultados obtenidos con el test ELISA frente a tuberculosis, los animales vacunados produjeron mayor cantidad de anticuerpos séricos que los no vacunados a partir de los 60 dpv, alcanzando las máximas diferencias a los 210 dpv. Los animales no vacunados no presentaron variaciones asociadas con la infección por *Map.* Mediante IDGA, solamente algunos animales vacunados ofrecieron respuestas positivas de forma esporádica entre los 60 y 180 dpv. La respuesta humoral periférica no se vio influenciada por la realización de la prueba de la IDR con ninguna de las dos pruebas.

La valoración de la respuesta celular llevada a cabo mediante la prueba de la IDR proporcionó resultados positivos a la inoculación con la PPD aviar en los animales vacunados en todos los momentos en los que se llevó a cabo, siendo las reacciones mayores a los 45 dpv y disminuyendo progresivamente hasta el final del estudio. Los incrementos cutáneos con la PPD bovina también fueron superiores en los animales vacunados en todos los momentos en que se realizó esta prueba, y siempre con resultados inferiores a los obtenidos con la PPD aviar. Los terneros del grupo NVI mostraron resultados positivos en las dos inoculaciones realizadas tras la infección con incrementos superiores provocados por la PPD aviar que por la PPD bovina. En los animales NVNI no se obtuvo ningún incremento positivo.

Mediante el test de liberación del IFN-γ tras el estímulo de los linfocitos sanguíneos con PPD aviar se observó un incremento significativo en la producción de esta citoquina por parte de los animales vacunados respecto al grupo NVNI a partir de los 45 dpv y hasta los 270 dpv, y de los NVI en todos los muestreos excepto a los 210 y 300 dpv. Entre estos dos últimos grupos las diferencias comenzaron a aparecer a los 120 dpv (60 dpi), con mayores niveles de IFNγ liberados en el grupo NVI, que se mantuvieron superiores hasta el final del estudio. Los valores de esta citoquina tras la estimulación de la sangre con PPD bovina presentaron una cinética similar a la observada con la PPD aviar, pero los niveles fueron superiores cuando se estimuló con PPD aviar en la mayoría de los casos, y cuando eran superados por los de la PPD bovina, las diferencias no fueron significativas. Tas la IDR se ha encontrado un incremento en la producción de IFN-γ tras la estimulación de las sangres con ambas tuberculinas en los animales vacunados. Según estos resultados, aunque podrían darse

interferencias de la vacunación con el diagnóstico de la tuberculosis, éstas podrían verse reducidas mediante el empleo de las pruebas de IDR y liberación de IFN-γ comparadas.

También se valoró la producción basal de IFN-γ (IFN- γ_0) como un marcador de la respuesta innata inespecífica. Se observó como en todos los grupos la producción de la citoquina tras la estimulación con PBS se incrementa ligeramente desde el inicio del estudio hasta llegar a los 105 dpv, y, en términos generales, desciende gradualmente para comenzar a elevarse ligeramente a partir de los 210 dpv hasta el final del estudio. Se encontraron picos de secreción de IFN-γ_0 en el grupo de animales NVNI a los 15, 105 y 270 dpv, muestreo este último en que los niveles de esta citoquina son elevados en todos los grupos. La infección no influyó en la producción de esta citoquina al no observarse diferencias entre los grupos VI y VNI, sin embargo hay una mayor producción del IFN-γ inespecífico por parte de los controles (NVNI) con respecto a los terneros vacunados a los 15 y 105 dpv, mientras que el resultado inverso se obtiene a los 300 dpv.

No se observaron signos clínicos a lo largo de toda la experiencia en ninguno de los animales. Sin embargo, se observaron lesiones macroscópicas asociadas a paratuberculosis en un ternero del grupo VI que fue sacrificado a los 330 dpv. Se observó que la vacunación produjo una reducción en el número animales con lesiones, de forma que se encontraron en cinco de los ocho terneros (62,5%) del grupo VI y en los seis terneros (100%) del lote NVI. Además, también influyó sobre los tipos de lesión que mostraron los animales. En cuatro terneros de los cinco del grupo VI que presentaban lesiones (uno sacrificado a los 180 dpv y tres a los 330 dpv) y solamente en uno de los terneros NVI, sacrificado a los 180 dpv, éstas eran de tipo focal, caracterizadas por la presencia de granulomas bien definidos exclusivamente en el tejido linfoide intestinal o nódulos linfáticos. En cuatro animales del grupo NVI (uno sacrificado a los 180 dpv y el resto a los 330 dpv) las lesiones se clasificaron como de tipo multifocal b, donde además de granulomas en el tejido linfoide, también aparecían en la lámina propia asociada o no con el mismo, sin llegar a modificar sustancialmente la arquitectura intestinal. Finalmente, en los dos terneros restantes (uno de cada grupo infectado, sacrificados a los 330 dpv) la lesión fue de tipo difuso, con presencia de un infiltrado granulomatoso que afectaba a varios tramos del intestino, provocando el engrosamiento de la mucosa, y a los nódulos linfáticos. En el ternero del grupo NVI la lesión se clasificó como difusa linfocítica, por presentar un predominio de este tipo

celular en el infiltrado inflamatorio, donde podían verse pequeños granulomas con presencia escasa o nula de BAAR; en el ternero restante, del grupo VI, la lesión era de tipo difuso intermedio, con existencia tanto de macrófagos como de linfocitos infiltrando la pared intestinal, con abundantes BAAR. En cuanto a la morfología de los granulomas, no se han encontrado diferencias que sugirieran fenómenos regresivos asociadas a la vacunación. Además, la vacunación produjo una reducción en el número de granulomas, que fue significativamente mayor en el grupo NVI. Cuando se analizó su localización, se encontró que el número de granulomas se reducía en todas ellas en el grupo vacunado, pero especialmente en la lámina propia tanto asociada como no al tejido linfoide. En los nódulos linfáticos, la vacunación también produjo una disminución de la extensión de las lesiones en ambos sacrificios, siendo las diferencias con el grupo sin vacunar más marcadas en el segundo sacrificio. Cuando se analizó el recuento de granulomas según el momento de sacrificio, se observó que, a pesar de ser siempre menores en los terneros vacunados, aumentaron en número y extensión en los dos grupos entre los 180 y 330 dpv. Según estos resultados, se ha planteado la hipótesis de que el efecto de la vacunación resida en provocar un enlentecimiento o retraso en la evolución de las lesiones asociadas a la infección por *Map*, respecto a los animales no vacunados.

La identificación de *Map* mediante cultivo o la detección de su ADN por PCR fueron negativas en heces tanto en los terneros infectados como vacunados, pero sí se observó una disminución significativa en el número de animales, muestras y colonias obtenidas en el grupo de terneros VI mediante cultivo de muestras de tejido. Sin embargo, mediante PCR tanto de tejido incluido en parafina pero sobre todo de tejido fresco, se identificó ADN en un mayor número de animales vacunados, sin que las diferencias fueran significativas. Estos resultados sugieren que la vacunación no previene la infección pero si reduce el número de formas viables de *Map* a pesar de que haya aún presente ADN en los tejidos. Respecto a la PCR en suero, fue menos sensible que las otras dos, aunque detectó en un momento u otro a todos los animales infectados, pero con un porcentaje ligeramente superior de muestreos positivos en los terneros no vacunados.

En cuanto a la presencia de lesiones y su desarrollo, se ha encontrado que éstas se iniciarían principalmente en la placa de Peyer yeyunal, especialmente en la zona

media, y posteriormente se extenderían hacia otras zonas del intestino y nódulos linfáticos. En esta última localización, su mayor intensidad lesional está relacionada con la mayor gravedad de las lesiones intestinales. El conjunto de lesiones encontradas así como su progresión en el modelo experimental de *Map* en terneros ha supuesto la validación de la clasificación lesional de paratuberculosis propuesta anteriormente en bovinos infectados de forma natural.

La producción de IFN-γ local, valorada a los 330 dpv, fue superior en los animales vacunados en los linfocitos extraídos de los nódulos linfáticos preescapular e ileal. Sin embargo, en los terneros infectados y no vacunados, los mayores niveles aparecían en íleon y placa de Peyer yeyunal. En relación con la presencia de lesiones, estos resultados sugerirían que la infección induciría una mayor producción de esta citoquina en el intestino, donde se asientan las primeras lesiones, mientras que la vacunación lo haría en los nódulos linfáticos, lo que podría estar relacionado con el menor número de lesiones encontrado en estos órganos en los terneros vacunados.

Las pruebas diagnósticas utilizadas muestran, en general, una escasa concordancia entre ellas. En cuanto a la relación con los tipos lesionales encontrados, las formas focales, multifocales y difusas linfocíticas se han asociado con una respuesta inmune celular periférica más intensa. Tanto el cultivo como la PCR han identificado la mayor parte de secciones con lesión difusa, pero ha disminuido su eficacia en la detección de formas focales y multifocales. Además, se ha identificado ADN de *Map* en muestras sin lesión. La valoración histopatológica ha resultado ser más sensible que el cultivo bacteriológico y que la PCR en tejido incluido en parafina o suero, para demostrar la infección por *Map*, mostrando niveles semejantes a la de la PCR a partir de tejidos frescos.

VII.2. SUMMARY

Paratuberculosis or Johne´s disease, is a chronic infectious disease caused by *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (*Map*), which affects a wide range of both domestic and wild ruminants, as well as several monogastric species. The affected animals show a chronic granulomatous enteritis and lymphadenitis, and the clinical signs are mostly characterized by progressive weight loss, diarrhoea, and finally death. Vaccination has been established as a good and effective control measure in the field in ovine and caprine. However, in our country, this strategy is not allowed in bovine, as it could interfere with the diagnosis of tuberculosis in the national tuberculosis eradication programs.

The main objective of this thesis consists in evaluating the efficacy of a new vaccine (Silirum®) against paratuberculosis in a bovine experimental infection model with *Map*, by assessing the lesions and detecting the aetiologic agent. Besides, the pathogenesis of *Map* infection in the early stages, as well as the usefulness of different aetiological diagnostic tests, were studied.

For this aim, eighteen three-month-old calves were used in this study. Eight of them (VI group) were subcutaneously injected with 1 ml of the heat-inactivated vaccine against paratuberculosis (Silirum®), and two months post-vaccination, were inoculated with oral doses of 6.9×10^{10} acid-fast bacteria (AFB). Six other calves were only infected, but not vaccinated (NVI group). Among the four remaining animals, two of them were only vaccinated (VNI group), and the other two calves were kept as negative controls, non-vaccinated and non-infected (NVNI group). The challenge inoculum was obtained from intestinal mucosa scrapings of three clinically paratuberculosis affected cows, and was confirmed to be a bovine field strain of *Map*. The inoculum was administered in six oral doses at two days intervals.

Samples of serum, whole blood and faeces were periodically collected between 0 and 330 days post-vaccination (dpv), in order to assess the peripheral humoral response against tuberculosis and paratuberculosis by an indirect ELISA test, and to evaluate the cell-mediated specific and non-specific immune responses with the interferon-γ (IFN-γ) release test. *Map* faecal shedding was also assessed periodically by culture and PCR.

Furthermore, a comparative intradermal skin test (IDT) was also performed at 0, 45, 150 and 330 dpv. Post-vaccination adverse reactions were also evaluated by a periodical clinical follow-up and body temperature assessment during the first 120 hours, as well as the evaluation of the development of vaccination nodules, at the same time of blood and faeces sampling.

A first group of five animals (three VI and two NVI) were slaughtered at 180 dpv (120 dpi), and the remaining calves at 330 dpv (270 dpi). Complete necropsies were performed, and samples of intestine and related lymphoid tissue (Peyer´s patches and lymph nodes) were systematically collected and routinely processed for histological examination. Animals were classified into different types of lesions according to their morphological changes, their distribution and extension, as well as the number of AFB detected by Ziehl-Neelsen (ZN) and immunohistochemical methods. Besides, lesion intensity was also assessed by counting the number of granulomas present in the different intestinal compartments and related lymph nodes, as well as evaluating the relative extension of those lesions through the aforementioned lymph nodes. Furthermore, bacteriological studies were conducted by culture in order to isolate *Map* from faeces and tissues, and PCR was also performed to detect *Map* DNA from faeces, fresh and paraffin-embedded tissues, and blood serum. Finally, the local immune response was also assessed measuring the *in vitro* IFN-γ secretion from the lymphocytes isolated from ileum, jejunal´s Peyer´s patches, ileal and prescapular lymph nodes.

No adverse clinical reactions that could affect the animals´ overall health were observed in any case after the vaccination or throughout the experiment. A persistent vaccination nodule at the injection site appeared in all the vaccinated calves that reached the largest size between the 150 and 240 dpv. Those nodules were firm, with no adherence and did not show any ulceration.

Regarding the peripheral humoral immune response assessed by ELISA, the anti-*Map* antibody level was significantly higher in the vaccinated calves than in the non vaccinated ones from 60 dpv, and the differences were especially significant at 90 dpv. From then on, the immunized animals´ humoral response reached values considered as positive, and that became higher at 240 dpv. Unvaccinated calves never show positive results to this technique. Among the calves from the NVI group, antibody

levels increased from 210 dpv. Regarding the ELISA test for tuberculosis diagnosis, all the vaccinated animals showed higher levels of antibodies than the unvaccinated calves from 60 dpv, reaching the highest differences at 210 dpv. Unvaccinated animals did not show any variation related to *Map* infection. By using AGID method, only some calves showed positive responses sporadically, between 60 and 180 dpv. Peripheral humoral immune response was not affected by the IDT.

All the vaccinated calves gave positive results to all the performed IDT tests after the inoculation of avian PPD. The highest reactions were observed at 45 dpv and they were decreasing until the end of the experiment. Vaccinated animals also showed positive reactions along the experiment, but the increases of the skin thickness were always lower than those seen after avian PPD injection. Calves from group NVI gave positive results to both PPDs in the two IDT tests performed after *Map* infection but they were always higher after avian PPD inoculation. Calves from NVNI group did not show any reaction.

A significant increase in the IFN-γ production was seen in all the vaccinated calves after blood stimulation with avian PPD. Differences with the NVNI group were appreciated from 45 to 270 dpv and with the NVI group in all the samplings except at 210 and 300 dpv. In comparison with the controls, animals from NVI group also showed an increase from 120 dpv (60 days post-infection –dpi-) until the end of the experiment. IFN-γ production after blood stimulation with bovine PPD showed a similar kinetics but the levels were lower than those seen after avian PPD treatment. In those cases in which IFN-γ levels were higher in bovine PPD stimulated samples, differences were not statistically significant. After IDT performing, an increase in the IFN-γ production was observed in the blood stimulated with both PPDs in all the vaccinated animals. According to these results, although vaccination could cause interferences with tuberculosis diagnosis, those could be overcome by using comparative IDT and IFN-γ release tests.

The basal, unspecific IFN-γ (IFN-γ_0) was evaluated as a marker of the innate immune response. In all the groups, the production of this cytokine after PBS stimulation was moderately increasing from the beginning of the study up to 105 dpv. Then, it gradually decreased until 210 dpv, and from then on, it started to slightly

increase again until the end of the study. Significant increases of IFN-γ_0 were seen in animals from NVNI group at 15, 105 and 270 dpv. In the latter sampling, IFN-γ_0 levels were high in all the groups. *Map* infection did not show any influence on the IFN-γ_0 production, but an increase was seen in the control (NVNI) group in relation to vaccinated calves at 15 and 105 dpv whereas the opposite result was seen at 300 dpv.

No evident paratuberculosis clinical signs were seen along the experiment in any of the animals. However, gross lesions related to paratuberculosis were detected in one calf from VI group culled at 330 dpv. Vaccination caused a significant reduction in the number of animals with lesions. These were detected in 5 out of the 8 calves (62.5%) from VI group and in the six (100%) calves from NVI group. Vaccination also showed an influence on the types of lesion observed in the animals. Four out of the five calves from VI group showed focal lesions, characterized by the presence of well-demarcated granulomas located exclusively in the intestinal lymphoid tissue or lymph nodes. In four animals of NVI group (one culled at 180 dpv and the remaining at 330 dpv), lesions were classified as multifocal b type. In those animals, besides the presence of granulomas in the lymphoid tissue, they were also detected in the lamina propria both related or not to the lymphoid tissue, without causing a substantial modification of the normal intestinal architecture. In the two remaining calves (one from each infected group, both culled at 330 dpv) lesions were classified as diffuse. They consisted of a severe granulomatous inflammatory infiltrate affecting several areas of the intestine that showed enlargement, and the lymph nodes. In the animal from NVI group, lesion was categorized as diffuse lymphocytic, characterized by the presence of large numbers of lymphocytes in the infiltrate, with some small granulomas scattered among them, with none of few AFB; the remaining calf, from VI group, showed a diffuse intermediate lesion, with a similar proportion of lymphocytes and macrophages in the infiltrate, and abundant AFB. No differences in the morphology of the granulomas associated with the vaccination, suggesting regressive changes, were detected. Vaccination also caused a significant decrease in the number of granulomas, which were more numerous in the NVI group. Regarding to their location, a significant decrease was observed in all the areas, but especially in the lamina propria both related or not to the Peyer's patches. In the lymph nodes, a marked reduction in the number of granulomas was seen in the vaccinated animals, more evident in those killed at 330 dpv. When the effect of the time of culling was analysed, the number of granulomas increased in all the infected groups

between 180 and 330 dpv, but this increase was higher in the unvaccinated calves. According to these results the hypothesis that vaccination could induce a delay in the progression of the lesions caused by *Map* infection, was raised.

All the faecal samples were negative for *Map* isolation or *Map* DNA identification by PCR. However, a significant decrease in the number of positive animals, samples, and in the amount of *Map* colonies identified by tissue culture in calves from VI group was observed. Nevertheless, *Map* DNA was identified in a higher number of vaccinated animals from paraffin embedded and especially from fresh tissue by PCR, although differences were not statistically significant. These results suggest that vaccination would not prevent *Map* infection but would cause a reduction in the number of viable *Map* organisms, although *Map* DNA would still be present in the tissues. Sensitivity of serum PCR was lower than the two other PCR methods. However, all the infected animals were detected as positive by this technique along the experiment in the different blood samplings performed, with a higher percentage in the unvaccinated animals.

It has been found that the first lesions would take place in the jejunal Peyer's patches, mainly in the medium region. From this location, lesions would spread to other areas of the intestine or lymph nodes. In the latter location, the intensity of the lesions was related to the severity of the intestinal changes. The types of lesion found, as well as their progression in the experimentally infected calves, has allowed the validation of the histopathological classification of paratuberculosis associated lesions already proposed in naturally infected bovines.

Vaccinated animals showed a higher local production of IFN-γ, assessed at 330 dpv, in the lymphocytes extracted from the preescapular and ileal lymph nodes. However, in the infected and unvaccinated lambs, the higher levels were seen in the ileum and jejunal Peyer's patches. When considering the presence of lesions, these results could suggest that infection would induce a higher production of IFN-γ in the intestine, where the first lesions occur, while vaccination would stimulate its production in the lymph nodes. This fact could be related to the lower number of lesions encountered in this location in the vaccinated animals.

The paratuberculosis diagnostic tests used in this study showed a low agreement between them. Regarding the types of lesion found, focal, multifocal or diffuse lymphocytic forms were associated with a more intense cell peripheral immune response. Both the bacteriological culture and PCR have been able to identify *Map* or its DNA in most of the diffuse forms, but the efficacy of these techniques decreases in focal and multifocal lesions. *Map* DNA could also be identified in samples with no lesion. Histopathological examination showed higher sensitivity than bacteriological culture or paraffin-embedded tissue and serum PCR in *Map* detection in tissues. However, the sensitivity of histopathological methods and fresh tissue PCR was similar.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

VIII.1. BIBLIOGRAFIA

AAGAARD, C.; GOVAERTS, M.; MEIKLE, V.; GUTIÉRREZ-PABELLO, J.A.; MCNAIR, J.; ANDERSEN, P.; SUÁREZ-GÜEMES, F.; POLLOCK, J.; ESPITIA, C.; CATALDI, A. (2010). Detection of bovine tuberculosis in herds with different disease prevalence and influence of paratuberculosis infection on PPDB and ESAT-6/CFP10 specificity.*Prev Vet Med.*, 96:161-9.

AAGAARD, C.; GOVAERTS, M.; MENG OKKELS, L.; ANDERSEN, P.; POLLOCK, J.M. (2003). Genomic approach to identification of Mycobacterium bovis diagnostic antigens in cattle**.** *J Clin Microbiol*.8:3719-28.

ABLES, G. P.; TAKAMATSU, D.; NOMA, H.; EL SHAZLY, S.; JIN, H. K.; TANIGUCHI, T.; SEKIKAWA, K.; WATANABE, T.(2001). The roles of *Nramp1* and *Tnfa* genes in nitric oxide production and their effect on the growth of *Salmonella typhimurium* in macrophages from Nramp1 congenic and tumor necrosis factor- alpha -/- mice. *J. Interferon Cytokine Res.*, 21:53.

ABUBAKAR, I.; MYHILL, D.; ALIYU, S.H.; HUNTER, P.R. (2008). Detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* from patients with Crohn's disease using nucleic acid-based techniques: a systematic review and meta-analysis. *Inflamm. Bowel. Dis*., 14: 401-410.

ACOSTA, B.; REAL, F.; LEON, L.; DENIZ, S; FERRER, O.; ROSARIO, I.; RAMIREZ, A. (2000). ELISA for anti-MPB70: an option for the diagnosis of goat tuberculosis caused by Mycobacterium bovis. Aust. Vet. J., 78: 423-424.

ADAMS, J.; FOLLETT, D.; HAMILTON, H.; CZUPRYNSKI, C. (1993). Effects of administration of anti-CD4 and anti-CD8 monoclonal antibodies on *Mycobacterium paratuberculosis* infection in intragastrically challenged mice. *Immunol. Lett.*, 35: 183-189.

ADASKA, J.M.; ANDERSON, R.J. (2003). Seroprevalence of Johne's-disease infection in dairy cattle in California, USA. *Prev Vet Med*., 60:255-261.

ADEREM, A.; UNDERHILL, D.M. (1999). Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu. Rev. Immunol.*, 17: 593-623.

ADURIZ, G.; JUSTE, R.A.; GARRIDO, J.M.; GEIJO, M.V. (2000). Epidemiologia y control de la paratuberculosis bovina. En: Juste Editor. Paratuberculosis. *BOVIS*, Aula Veterinaria, vol. nº 93, pp. 63-93.

ADURIZ, J.J. (1993). Epidemiologia, diagnóstico y control de la paratuberculosis ovina en la Comunidad Autónoma del País Vasco. *Tesis doctoral*. Universidad de Zaragoza.

ADURIZ, J.J.; JUSTE, R.A.; CORTABARRIA, N. (1995a). Lack of mycobactin dependence of mycobacteria isolated on Middlebrook 7H11 from clinical cases of ovine paratuberculosis. *Vet. Microbiol.*, 45: 211-217.

ADURIZ, J.J.; JUSTE, R.A.; SAEZ DE OCARIZ, C. (1994). An epidemiologic study of sheep paratuberculosis in the Basque Country of Spain: serology and productive data. En: Chiodini, R.J.; Collins, M.T: Bassey, E.O.E. (Eds.). *Proc 4th Int. Coll. PTBC*. IAP.Providence. EEUU. pp:19-26.

ADURIZ, J.J.; JUSTE, R.A.; SÁEZ DE OCÁRIZ, C. (1995b). An epidemiologic study of sheep paratuberculosis in the Basque Country of Spain: serologiy and productive data. En: Chiodini, R.J.; Collins, M.T: Bassey, E.O.E. (Eds.). *Proc 4th Int. Coll. PTBC*. IAP. Rehpboth. EEUU.pp 19-26.

ALEXEJEFF-GOLOFF, N.A. (1929). Zur frage der pathogenese und bazillenausscheidung bei Rinderparatuberkulose". Zeitschr. *Infekt. Haus*., 36: 313-317.

ALINOVI, C.A.; WARD, M.P.; LIN, T.L.; WU, C.C. (2009). Sample handling substantially affects Johne's ELISA. *Prev. Vet. Med*., 90: 278-283

ALLEN, A.J.; BARRINGTON, G.M.; HAMILTON, M.J.; STABEL, J.R.; ROBBE-AUSTERMAN, S.; DAVIS, W.C. (2005). Development of a calf ileal cannulation model to facilitate testing of existing and candidate vaccines for *M. avium* subsp. *paratuberculosis*. *Proc. 8th Int. Coll. for PTBC.* IAP. Copenhague. Dinamarca. p. 148.

ALLEN, A.J.; PARK, K.T.; BARRINGTON, G.M.; LAHMERS, K.K.; HAMILTON, M.J.; DAVIS, W.C. (2009). Development of a bovine ileal cannulation model to study the immune response and mechanisms of pathogenesis of paratuberculosis. *Clin Vaccine Immunol.*, 16(4): 453-463.

ALLEN, W.M.; BERRETT, S.; PATTERSON, D.S. (1974). A biochemical study of experimental Johne's disease. I. Plasma protein leakage into the intestine of sheep. *J. Comp. Pathol* , 84:381-384.

ALLEN, W.M.; SABA, N.; PATTERSTON, D.S.P. (1968). Mycobacterium johnei infection of cattle: The effect of corticotrophin and anabolic steroids. Vet. Rec. May: 562-567.

ALLER, B.; FERNÁNDEZ-DÍEZ, M.; ESCUDERO-DÍEZ, A. (1973). Paratuberculosis ovina. *Sup. Cient. Bol. Inf. Cons. Gen. Col. Vet. Esp.*, 196: 11-18.

ALONSO-HEARN, M.; MOLINA, E.; GEIJO, M.; VÁZQUEZ, P.; SEVILLA, I.; GARRIDO, J.M.; JUSTE, R.A. (2009). Isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from muscle tissue of naturally infected cattle. *Foodborne Pathog. Dis*., 6: 513-518.

ALONSO-HEARN, M.; MOLINA, E.; GEIJO, M.; VAZQUEZ, P.; SEVILLA, I.A.; GARRIDO, J.M.; JUSTE, R.A. (2012). Immunization of adult dairy cattle with a new heat-killed vaccine is associated with longer productive life prior to cows being sent to slaughter with suspected paratuberculosis. *J. Dairy Sci*., 95: 618-629.

ALVAREZ, G.R.; ZWILLING, B.S.; LAFUSE, W.P. (2003). Mycobacterium avium inhibition of IFN-gamma signaling in mouse macrophages: Toll-like receptor 2 stimulation increases expression of dominant-negative STAT1 beta by mRNA stabilization. *J. Immunol.*, 171: 6766-6773.

ALVAREZ, J.; DE JUAN, J., BRIONES, V.; ROMERO, B., ARANAZ, A.; FERNÁNDEZ-GARAVZÁBAL, J.F.; MATEOS, A. (2005).*Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosi*s in fallow deer and wild boar in Spain. *Vet. Rec*., 156: 212-213.

ÁLVAREZ, J.; DE JUAN, L.; BEZOS, J.; ROMERO, B.; SÁEZ, J.L.; MARQUÉS, S.; DOMÍNGUEZ, C.; MÍNGUEZ, O.; FERNÁNDEZ-MARDOMINGO, B.; MATEOS, A.; DOMÍNGUEZ, L.; ARANAZ, A. (2009). Effect of paratuberculosis on the diagnosis of bovine tuberculosis in cattle herd with a mixed infection using interferon-gamma detection assay. *Vet Microbiol*. 135: 389-393.

ALVAREZ, J.; DE JUAN, L.; BEZOS, J.; ROMERO, B.; SÁEZ, J.L.; REVIRIEGO GORDEJO, F.J.; BRIONES, V.; MORENO, M.A.; MATEOS, A.; DOMÍNGUEZ, L.; ARANAZ, A. (2008). Interference of paratuberculosis with the diagnosis of tuberculosis in a goat flock with a natural mixed infection. *Vet. Microbiol*., 128: 72-80.

ALVAREZ, G.R.; ZWILLING, B.S.; LAFUSE, W.P. (2003). Mycobacterium avium inhibition of IFN-gamma signaling in mouse macrophages: Toll-like receptor 2 stimulation increases expression of dominant-negative STAT1 beta by mRNA stabilization. J Immunol.,171:6766-73.

ALY, S.S.; ANDERSON, R.J.; ADASKA, J.M.; JIANG, J.; GARDNER, I.A. (2010). Association between *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection and milk production in two California dairies. *J. Dairy Sci*., 93: 1030-1040.

ALY, S.S.; THURMOND, M.C. (2005). Evaluation of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis infection of dairy cows attributable to infection status of the dam. *J. Am. Vet. Med. Assoc*., 227: 450-454.

ALZUHERRI, H.M.; LITTLE, D.; CLARKE, C.J. (1997). Altered intestinal macrophage phenotype in ovine paratuberculosis. *Res. Vet. Sci.,63:139-43.*

ALZUHERRI, H.M.; WOODALL, C.J.; CLARKE, C.J. (1996). Increased intestinal TNF-alpha, IL-1 beta and IL-6 expression in ovine paratuberculosis. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 49: 331-345.

ANDERSEN, P. (1994). The T cell response to secreted antigens of *Mycobacterium tuberculosis. Immunobiology*. 191: 537-47.

ANDERSON, J.L.; MEECE, J.K.; KOZICZKOWSKI, J.J.; CLARK, D.L.Jr.; RADDCLIFF, R.P.; NOLDEN, C.A.; SAMUEL, M.D.; ELLINGSON, J.L. (2007).*Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in scavenging mammals in Wisconsin. *J. Wildl. Dis*., 43: 302-308.

ANGUS, K.W. (1990). Intestinal lesions resembling paratuberculosis in a wild rabbit (*Oryctolagus cuniculus*). *J. Comp. Pathol*., 103: 101-105

ANTOGNOLI, M.C.; GARRY, F.B.; HIRST, H.L.; LOMBARD, J.E.; DENNIS, M.M.; GOULD, D.H.; SALMAN, M.D. (2008). Characterization of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* disseminated infection in dairy cattle and its association with antemortem test results. *Vet. Microbiol*., 127: 300-308.

ARANAZ, A.; COUSINS, D.; MATEOS, A.; DOMÍNGUEZ, L. (2003). Elevation of *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* to species rank as *Mycobacterium caprae* comb. nov., sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol*. 53, 1785-1789.

ARANAZ, A.; DE JUAN, L.; BEZOS, J.; ALVAREZ, J.; ROMERO, B.; LOZANO, F.; PARAMIO, J.L.; LÓPEZ-SÁNCHEZ, J.; MATEOS, A.; DOMÍNGUEZ, L. (2006). Assessment of diagnostic tools for eradication of bovine tuberculosis in cattle co-infected with Mycobacterium bovis and M. avium subsp. paratuberculosis. *Vet Res.*, 37:593-606.

ARANAZ, A.; DE JUAN, L.; MONTERO, N.; SÁNCHEZ, C.; GALKA, M.; DELSO, C.; ÁLVAREZ, J.; ROMERO, B.; BEZOS, J.; VELA, A.I.; BRIONES, V.; MATEOS, A.; DOMÍNGUEZ, L. (2004). Bovine tuberculosis (*Mycobacterium bovis*) in wildlife in Spain. *J. Clin. Microbiol.* 42: 2602-2608.

ARGENTE, G.(1992). Efficiency of vaccination and other control measures estimated by fecal culturing in a regional program. En: Chiodini, R.J.; Kreeger, J.M. (Eds.). *Proc 3rd Int. Coll. PTBC.* IAP. Providence. EE.UU.pp. 495-498.

ARIAS, M.; ROJAS, M.; ZABALETA, J.; RODRIGUEZ, J.I.; PARIS, S.C.; BARRERA, L.F.;GARCIA, L.F. (1997). Inhibition of virulent *Mycobacterium tuberculosis* by Bcg(r) and Bcg(s) macrophages correlates with nitric oxide production. *J. Infect. Dis.*176:1552.

ARMITAGE, E.; DRUMMOND, H.E.; WILSON, D.C.; GHOSH, S. (2001). Increasing incidence of both juvenile-onset Crohn's disease and ulcerative colitis in Scotland. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol*., 13: 1439-1447.

ARSENAULT, J.; GIRARD, C.; DUBREUIL, P.; DAIGNAULT, D.; GALARNEAU, J.R.; BOISCLAIR, J.; SIMARD, C., BÉLANGER D. (2003). Prevalence of and carcass condemnation from maedi-visna, paratuberculosis and caseous lymphadenitis in culled sheep from Quebec, Canada. *Prev Vet Med*., 59:67-81.

ASTARIE-DEQUEKER, C.; N´DIAYE, E.N.; LE CABEC, V.; RITTIQ, M.G.; PRANDI, J-; MARIDONNEAU-PARINI, I. (1999). The mannose receptor mediates uptake of pathogenic and nonpathogenic mycobacteria and bypasses bactericidal responses in human macrophages. *Infect. Immun*., 67: 469-477.

ATALA, N.; AKCAY, E. (2001). Turkiye genelinde sgr paratuberkulozu prevalansnn ELISA ile arastrlmas. *Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi*., 12: 39-48.

AYELE, W.Y.; BARTOS, M.; SVASTOVA, P.; PAVLIK, I. (2004). Distribution of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in organs of naturally infected bull-calves and breeding bulls. *Vet. Microbiol*., 103: 209-217.

BABU, S.; BHAT, S.Q.; KUMAR, N.P.; KUMARASWAMI, V.; NUTMAN, T.B. (2010). Regulatory T cells modulate Th17 responses in patients with positive tuberculin skin test results. *J. Infect. Dis*., 201: 20-31.

BADI, F.A.; HAROON, A.I.; ALLUWAIMI, A,M. (2009). The gammadelta cells as marker of non-seroconverted cattle naturally infected with Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis. *Res Vet Sci.* : en prensa.

BADIOLA, J.J.; GARCÍA DE JALÓN, J.A.; CUERVO, L. **(1979).** Paratuberculosis ovina. *An. Fac. Vet. Zaragoza*, XIV-XV: 299-308.

BAISDEN, L.A.; JOHNSON, H.W.; LARSEN, A.B. (1950). Studies on johnin. VIII. Preliminary studies on the specificities of acid-fast allergens. *Am J Vet Res.*, 11:382-387.

BAKKER, D.; MUSKENS, J.; DINKLA, A.; EGER, A.; VAN ZIJDERVELD, F. (1999). Evaluation of long-term immune response in cattle after vaccination against paratuberculosis in two Dutch dairy herds. En: Manning, E.J.B.; Collins, M.T. (Eds.). *Proc 6th Int. Coll. PTBC.* IAP. Madison, EEUU. pp 255.

BAKKER, D.; WILLEMSEN, P.T.; VAN ZIJDERVELD, F.G. (2000). Paratuberculosis recognized as a problem at last: a review. *Vet. Q*., 22: 200-204.

BAKSH, F.K.; FINKELSTEIN, S.D.; ARIYANAYAGAM-BAKSH, S.M.; SWALSKY, P.A.; KLEIN, E.C.; DUNN, J.C. (2004). Absence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in the microdissected granulomas ofCrohn's disease. *Mod. Pathol*., 17: 1289-94.

BALDWIN, C.L.; SATHIVASEELAN, T.; ROCCHI, M.; McKEEVER, D. (2000). Rapid changes occur in the percentage of circulating bovine WC1(+)gamma delta Th1 cells. *Res. Vet. Sci*., 69: 175-180.

BALDWIN, E.W. (1976). Isoniazid therapy in two cases of Johne's disease.*Vet Med Small Anim Clin*. 71(10): 1359-1362.

BALSEIRO, A. (2004). Paratuberculosis bovina: valoración de las reacciones cruzadas con la prueba de la tuberculina, evaluación de técnicas diagnósticas y prevalencia en Asturias. *Tesis Doctoral*. Universidad de León.

BALSEIRO, A.; GARCÍA-MARÍN, J.F.; SOLANO, P.; GARRIDO, J.M.; PRIETO, J.M. (2008). Histopathological classification of lesions observed in natural cases of paratuberculosis in free-ranging fallow deer (Dama dama). *J. Comp. Pathol*., 138: 180-188.

BALSEIRO, A.; PRIETO, J.M.; ESPÍ, A.; PÉREZ, V.; GARCÍA-MARÍN, J.F. (2003). Presence of focal and multifocal paratuberculosis lesions in mesenteric lymph nodes and the ileocaecal valve of cattle positive to the tuberculin skin test. *Vet. J*., 166: 210-212.

BANAIEE, N.; KINCAID, E.Z.; BUCHWALD, U.; JACOBS, W.R. Jr; ERNST, J.D. (2006). Potent inhibition of macrophage responses to IFN-gamma by live virulent *Mycobacterium tuberculosis* is independent of mature mycobacterial lipoproteins but dependent on TLR2. *J. Immunol*., 176: 3019-3027.

BANASURE, K.D.; BASAGOUDANAVAR, S.H.; CHAUDHURY, P.; TIWARI, V.; PARIHAR, N.S.; GOSWAMI, P.P. (2001). Identification and characterization of a gene encoding a 35-kDa protein from *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *FEMS Microbiol Lett*.;196:195-199.

BANNANTINE, J.P.; BAECHLER, E.; ZHANG, Q.; LI, L.; KAPUR, V. (2002). Genome scale comparison of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* with *Mycobacterium avium* subsp. *avium* reveals potential diagnostic sequences. *J. Clin. Microbiol*., 40: 1303-1310.

BANNANTINE, J.P.; BAYLES, D.O.; WATERS, W.R.; PALMER, M.V.; STABEL, J.R.; PAUSTIAN, M.L. (2008). Early antibody response against *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* antigens in subclinical cattle. *Proteome Sci*., 6:5.

BANNANTINE, J.P.; HANSEN, J.K.; PAUSTIAN, M.L.; AMONSIN, A.;, LI, L.L.; STABEL, J.R.; KAPUR, V. (2004). Expression and immunogenicity of proteins encoded by sequences specific to Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis. *J Clin Microbiol.* 42:106-14.

BANNANTINE, J.P.; HUNTLEY, J.F. ;MILTNER, E.; STABEL, J.R.; BERMUDEZ, L.E. (2003). The *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* 35 kDa protein plays a role in invasion of bovine epithelial cells. *Microbiology*, 149: 2061-2069.

BANNANTINE, J.P.; STABEL, J.R. (2001). Identification of two *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* gene products differentially recognised by sera from rabbits immunised with live mycobacteria but not heat-killed mycobacteria. *J Med Microbiol*., 50:795-804.

BANNANTINE, J.P.;, STABEL, J.R. (2002). Killing of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* within macrophages. *BMC Microbiol*. 2:2.

BARBOSA, T.; ARRUDA, S.; FERNANDES, B.D.; CARVALHO, L.P.; CARDOSO, S.; CUNHA, S.; BARRETO, M.L.; PEREIRA, S.M,; RODRIGUES, L.C.; BARRAL-NETTO, M. (2003) BCG (Bacille of Calmette-Guérin) revaccination leads to improved in vitro IFN-gamma response to mycobacterial antigen independent of tuberculin sensitization in Brazilian school-age children. *Vaccine.* 2003 May 16;21(17-18):2152-60.

BARCLAY, R.; RATLEDGE, C. (1983). Iron-binding compounds of *Mycobacterium avium*, *M. intracellulare*, *M. scrofulaceum*, and mycobactin-dependent *M. paratuberculosis* and *M. avium*. *J. Bacteriol*., 153: 1138-1146.

BARKEMA, H.W.; GREEN, M.J.; BRADLEY, A.J.; ZADOKS, R.N. (2009). Invited review: The role of contagious disease in udder health. *J. Dairy Sci*., 92: 4717-4729.

BARRERA, L.F.; KRAMNIK, I.; SKAMENE, E.; RADZIOCH, D.. (1994). Nitrite production by macrophages derived from BCG-resistant and -susceptible congenic mouse strains in response to IFN-_ and infection with BCG. *Immunology* 82:457.

BARRY, C.; CORBETT, D.; BAKKER, D.; ANDERSEN, P.; MCNAIR, J.; STRAIN, S. (2011). The Effect of Mycobacterium avium Complex Infections on Routine Mycobacterium bovis Diagnostic Tests. *Vet. Med. Int.* 2011:145092.

BASSEY, E.O.; COLLINS, M.T. (1997). Study of T-lymphocyte subsets if healthy and Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis-infected cattle. *Infect. Immun.* 65(11):4869-72

BASTIDA, F; JUSTE, R.A. (2011). Parartuberculosis control: a review with a focus on vaccination. *J Immune Based Ter Vaccines.* 9:8.

BAUERFEIND, R.; BENAZZI, S.; WEISS, R.; SCHLIESSER, T.; WILLEMS, H.; BALJER, G. (1996). Molecular characterization of Mycobacterium paratuberculosis isolates from sheep, goats, and cattle by hybridization with a DNA probe to insertion element IS900. *J Clin Microbiol*., 34:1617-1621.

BAUMGART, D.C.; SANDBORN, W.J. (2012). Crohn's disease. Lancet, 380: 1590-605.

BEARD, P.M.; DANIELS, M.J.; HENDERSON, D.; PIRIE, A.; RUDGE, K.; BUXTON, D.; RHIND, S., GREIG, A.; HUTCHINGS, M.R.; McKENDRICK, I., STEVENSON, K.; SHARP, J.M. (2001a). Paratuberculosis infection of nonruminant wildlife in Scotland. *J. Clin. Microbiol*., 39: 1517-1521.

BEARD, P.M.; HENDERSON, D.; DANIELS, M.J.; PIRIE, A.; BUXTON, D.; GREIG, A.; HUTCHING, M.R.; McKENDRICK, I.; RHIND, S.; STEVENSON, K.; SHARP, J.M. (1999b). Evidence of paratuberculosis in fox (Vulpes vulpes) and stoat (Mustela ermine). Vet. Rec. 145:612-613.

BEARD, P.M.; HOPKINS, J.; RHIND, S.; STEVENSON, K.; SHARP. (1999a). Role of Nramp 1 in Johne´s disease. En: Manning, E.J.B.; Collins, M.T. (Eds.).*Proc6th Int. Coll. PTBC.* IAP. Madison, EEUU. p. 675.

BEARD, P.M.; RHIND, S.M., BUXTON, D.; DANIELS, M.J.; HENDERSON, D.; PIRIE, A.; RUDGE, K., GREIG, A.; HUTCHINGS, M.R.; STEVENSON, K.; SHARP, J.M. (2001b). Natural paratuberculosis infection in rabbits in Scotland. *J. Comp. Pathol*., 124: 290-299.

BEARD, P.M.; RHIND, S.M.; SINCLAIR, M.C.; WILDBLOOD, L.A.; STEVENSON, K.; MC KENDRICK, I.J.; SHARP, J.M.; JONES, D.G. (2000). Modulation of gammadelta T cells and CD1 in *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection. *Vet. Immunol. Immunopathol.,* 77: 311-319.

BEARD, P.M.; STEVENSON, K.; PIRIE, A.; RUDGE, K.; BUXTON, D.; RHIND, S.M.; SINCLAIR, M.C.; WILDBLOOD, L.A.; JONES, D.G.; SHARP, J.M. (2001c). Experimental paratuberculosis in calves following inoculation with a rabbit isolate of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis. J. Clin. Microbiol.,* 39: 3080-3084.

BECH-NIELSEN, S.; BURIANEK, L.L.; SPANGLER, E.; HEIDER, L.E.; HOFFSIS, G.F.; DORN, C.R. (1985). Characterization of *Mycobacterium paratuberculosis* antigenic proteins. *Am. J. Vet. Res*., 46: 2418-2420.

BEGARA-McGORUM, I.; WILDBLOOD, L.A.; CLARKE, C.J.; CONNOR, K.M.; STEVENSON, K.; MC INNES C.J.; SHARP, J.M.; JONES, D.G.(1998). Early immunopathological events in experimental ovine paratuberculosis. *Vet. Immunol. Immunopathol.,* 63: 265-287.

BEGARA-McGORUM, I.; WILDBLOOD, L.A.; JONES, D.G. (1997). Early immune events following experimental infection of lambs with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis. Biochem. Soc. Trans*., 25: 279S.

BEGG, D.J.; DE SILVA, K.; BOSWARD, K.; DI FIORE, L.; TAYLOR, D.L.; JUNGERSEN, G.; WHITTINGTON, R.J. (2009). Enzyme-linked immunospot: an alternative method for the detection of interferon gamma in Johne's disease. *J. Vet. Diagn. Invest.,21:187-96.*

BEGG, D.J.; DE SILVA, K.; DI FIORE, L.; TAYLOR, D.L.; BOWER, K.; ZHONG, L.; KAWAJI, S.; EMERY, D.; WHITTINGTON, R.J.(2010). Experimental infection model for Johne's disease using a lyophilised, pure culture, seedstock of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis. Vet. Microbiol.,* 141: 301-311.

BEGG, D.J.; GRIFFIN, J.F. (2005). Vaccination of sheep against *M. paratuberculosis*: immune parameters and protective efficacy. *Vaccine*, 23: 4999-5008.

BEGG, D.J.; O´BRIEN, R.; MACKINTOSH, C.G.; GRIFFIN, J.F.(2005). Experimental infection model for Johne´s disease in sheep. *Infect. Immun*., 73: 5603-5611.

BEGG, D.J.; WHITTINGTON, R.J. (2008). Experimental animal infection models for Johne´s disease, an infectious enteropathy caused by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Vet. J*., 176: 129-145.

BEGG, D.J.; DE SILVA, K.; CARTER, N.; PLAIN, K.M.; PURDIE, A.; WHITTINGTON, R.J. (2011). Does a Th1 over Th2 dominancy really exist in the early stages of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infections? *Immunobiology*, 216: 840-846.

BEHR, MA.; SCHURR, E. (2006). Mycobacteria in Crohn's disease: a persistent hypothesis. *Inflamm Bowel Dis*., 12:1000-1004

BEHRENS, H. (1955). Die Paratuberkulöse des Schafes. *DTW*,13-14:133-134.

BEHRENS, H. (1979). Paratuberkulöse. En: Behrens, H. (Ed.). Lehrbunch der Schafkrankheiten, 2. Paul Parey, Berlin, Alemania.

BEISSERT, S.; SCHWARZ, A.; SCHWARZ, T. (2006). Regulatory T cells. *J. Invest. Dermatol*., 126: 15-24.

BELLAMY R. (1999). The natural resistance-associated macrophage protein and susceptibility to intracellular pathogens. *Microbes Infect*., 1:23-27.

BEN-ALI, M.; BARBOUCHE, M.R.; BOUSNINA, S.; CHABBOU, A.; DELLAGI, K. (2004). Toll-like receptor 2 Arg677Trp polymorphism is associated with susceptibility to tuberculosis in Tunisian patients. *Clin. Diagn. Lab. Immunol*.**,** 11: 625-626.

BENAVIDES, J.; GARCÍA-PARIENTE, C.; GELMETTI, D.; FUERTES, M.; FERRERAS, M.C.; GARCÍA-MARÍN, J.F.; PÉREZ, V. (2006). Effects of fixative type and fixation time on the detection of Maedi Visna virus by PCR and immunohistochemistry in paraffin-embedded ovine lung samples.*J. Virol. Methods*., 137: 317-324.

BENAZZI, S.; EL HAMIDI, M.; SCHLIESSER, T. (1996). Paratuberculosis in sheep flocks in Morocco: a serological, microscopical and cultural survey.*Zentralbl. Veterinarmed. B.,*43:213-219.

BENDIXEN, P.H. (1977). Application of the direct leukocyte-migration agarose test in cattle naturally infected with *Mycobacterium paratuberculosis*. *Am. J. Vet. Res*., 38: 1161-1162.

BENDIXEN, P.H. (1978). Immunological reactions caused by infection with *Mycobacterium paratuberculosis*. A review. *Nord. Vet. Med*., 30: 163-168.

BENDIXEN, P.H.; BLOCH, B.; JORGENSEN, J.B. (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*., 42:109-113.

BENEDICTUS, A.; MITCHELL, R.M.; LINDE-WIDMANN, M.; SWEENEY, R.; FYOCK, T.; SCHUKKEN, Y.H.; WHITLOCK, R.H. (2000). Transmission parameters of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infections in a dairy herd going through a control program. *Prev. Vet. Med*., 88: 215-227.

BENEDICTUS, G. (1984). Evaluation of the organized control of paratuberculosis in the province of Friesland. *Tijdschr. Diergeneeskd*.**,** 109: 905-16.

BENEDICTUS, G.; BOSMA, J. (1985). Paratuberculosis: a surgical methods of diagnosis in practice. *Vet. Quart*., 7, 217-221.

BENEDICTUS, G.; DIJKHUIZEN, A.A.; STELWAGEN, J. (1985). Economic losses to farms due to paratuberculosis in cattle. *Tijdschr. Diergeneeskd*., 110: 310-319.

BENEDICTUS, G.; DIJKHUIZEN, A.A.; STELWAGEN, J. (1987). Economic losses due to paratuberculosis in dairy cattle. *Vet. Rec*., 121: 142-146.

BENEDICTUS, G.; DIJKSTRA, R.G.; HAAGSMA, J. (1984). Observations on diganostic tests for paratuberculosisi in cattle. Commission of the Economic Communites, Copenhagen. *Proc. Workshop PTBC*, pp. 43-58.

BENEDICTUS, G.; DINKLA, E.T.B.; WENTIK, G.H. (1988). Preliminary results of vaccination against paratuberculosis in adult dairy cattle. En: Thorel, M.F.; Merkal, R.S. (Eds.). *Proc 2nd Int. Coll. PTBC*. IAP. Paris. Francia. pp. 136-140.

BENEDICTUS, G.; HAAGSMA, J. (1986). The efficacy of mesenteric lymph node biopsy in the eradication of paratuberculosis from an infected dairy farm. *Vet. Quart*., 8, 5-11.

BENEDICTUS, G.; KALIS, C.J. (2003). Paratuberculosis: eradication, control and diagnostic methods. *Acta Vet. Scand*., 44: 231-241.

BERGEY, D. H.; HARRISON, F.C.; BREED, R.S.; HAMMER, B.W.; HUNTOON, F.M. (1923). Bergey's manual of determinative bacteriology. 1ª ed. Baltimore, EE.UU.: Williams & Wilkin.

BERGEY. (1986). The Mycobacteria. En: Senath, P.H.A.; Mair, N.S.; Sharpe, M.E.; Holt, J.G. editores. *Bergey´s Manual of Systematic Bacteriology*, pp. 1435-1457. Williams & Wilkins. Baltimore.

BERGHAUS, R.D.; FARVER, T.B.; ANDERSON, R.J.; JARAVATA, C.C.; GARDNER, I.A. (2006). Environmental sampling for detection of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* on large California dairies. *J. Dairy Sci.*, 89:963-970.

BERMUDEZ, L.E.; YOUNG, L.S.; ENKEL, H. (1991). Interaction of *Mycobacterium avium* complex with human macrophages: roles of membrane receptors and serum proteins. *Infect. Immun*., 59: 1697-1702

BERNABE, A.; GOMEZ, M.A.; NAVARRO, J.A.; GOMEZ, S.; SANCHEZ, J. (1996). Morfología de la tuberculosis vaprina. En: *Tuberculosis caprina, OVIS*, 46: 33-43.

BERNSTEIN, C.N.; BLANCHARD, J.F.; RAWSHORNE, P.; COLLINS, M.T. (2004). Population-based case control study of seroprevalence of *Mycobacterium paratuberculosis* in patients with Crohn's disease and ulcerative colitis. *J. Clin. Microbiol*., 42: 1129-1135.

BEYERBACH, M.; ORTMANN, G.; GERLACH, G.F. HOMUTH, M.; STRUTZBERG, K.; KREIENBROCK, L. (2004). Considerations concerning diagnostic certainties and cut-off values for a bulk milk ELISA for *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*. *Dtsch Tierarztl Wochenschr*., 111:220-5.

BEZOS, J.; DE JUAN, L.; ROMERO, B.; ALVAREZ, J.; MAZZUCCHELLI, F.; MATEOS, A.; DOMÍNGUEZ, L.; ARANAZ, A. (2010). Experimental infection with *Mycobacterium caprae* in goats and evaluation of immunological status in tuberculosis and paratuberculosis co-infected animals. *Vet. Immunol. Immunopathol*., 133: 269-275.

BEZOS, J.; MARQUÉS, S.; ÁLVAREZ, J.; CASAL, C.; ROMERO, B.; GRAU, A.; MÍNGUEZ, O.; DOMÍNGUEZ, L.; DE JUAN, L. (2014). Evaluation of single and comparative intradermal tuberculin tests for tuberculosis eradication in caprine flocks in Castilla y León (Spain). *Res. Vet. Sci*., 96: 39-46.

BEZOS, J.; ALVAREZ, J.; ROMERO, B.; ARANAZ, A.; JUAN, L.D. (2012). Tuberculosis in goats: assessment of current in vivo cell-mediated and antibody-based diagnostic assays.*Vet J*., 191(2):161-165.

BHIDE, M.R.; MUCHA, R.; MIKULA, I Jr.; KISOVA, L.; SKRABANA, R.; NOVAK, M.; MIKULA I Sr. (2009). Novel mutations in TLR genes cause hyporesponsiveness to *Mycobacterium avi*um subsp. *paratuberculosis* infection. *BMC Genet*., 10: 21.

BILLMAN-JACOBE, H.; CARRIGAN, M.; COCKRAM, F.; CORNER, L.A.; GILL, I.J.; HILL, J.F.; JESSEP, T.; MILNER, A.R.; WOOD, P.R. (1992). A comparison of the interferon gamma assay with the absorbed ELISA for the diagnosis of Johne's disease in cattle. *Aust. Vet. J*., 69: 25-28.

BLACKWELL, J.M.; GOSWAMI, T.; EVANS, C.A.; SIBTHORPE, D.; PAPO, N.; WHITE, J.K.; SEARLE, S.; MILLER, E.N.; PEACOCK, C.S.; MOHAMMED, H.; IBRAHIM, M (2001). SLC11A1 (formerly NRAMP1) and disease resistance. *Cell Microbiol* 12:773–784.

BLACKWELL, J.M.; SEARLE, S.; MOHAMED, H.; WHITE, JK. (2003). Divalent cation transport and susceptibility to infectious and autoimmune disease: continuation of the Ity/Lsh/Bcg/Nramp 1 1/Slc11a1 gene story. *Immunol Lett.*, 85:197–203.

BLOOD, D.C.; RADOSTITS, O.M. (1989). Paratuberculosis (Johne´s disease). Vet. Med. 7. pp:722-729

BLOOD, D.C.; RADOSTITS, O.M.; GAY, C.C.(1989). Paratuberculosis (Johne´s disease). En: Veterinary Medicine. 7th ed. Ballière and Tidall. Londres. Reino Unido. pp:841-850.

BOCHUD, P.Y.; HAWN, T.R.; ADEREM, A. (2003). Cutting edge: a Toll-like receptor 2 polymorphism that is associated with lepromatous leprosy is unable to mediate mycobacterial signaling. *J. Immunol*., 170: 3451-3454.

BOELAERT, F.; WALRAVENS, K.; BIRONT, P.; VERMEERSCH, J.P.; BERKVENS, D., GODFROID, J. (2000). Prevalence of paratuberculosis (Johne's disease) in the Belgian cattle population. *Vet. Microbiol*., 77: 269-281.

BOLSKE, G.; ENGLUND, S.; JOHANSSON, K.E.; KONIGSSON, M.H. (2002). False positive *Mycobacterium av*ium subsp. *paratuberculosis*IS900 PCR and its diagnostic implications. En: Juste, R.A.; Geijo, M.V.; Garrido, J.M. (Eds.) *Proc. 7th Int. Coll. PTBC*. IAP. Bilbao, España. pp: 261-266.

BORODY, T.J.; LEIS, S.; WARREN, E.F.; SURACE, R. (2002). Treatment of severe Crohn's disease using antimycobacterial triple therapy--approaching a cure? *Dig. Liver Dis.*, 34: 29-38.

BOSSHARD, C.; STEPHAN, R.; TASARA, T. (2006). Application of an F57 sequence-based real-time PCR assay for *Mycobacterium paratuberculosis* detection in bulk tank raw milk and slaughtered healthy dairy cows. *J. Food. Prot*., 69: 1662-1667.

BRADNER, L.; ROBBE-AUSTERMAN, S.; BEITZ, DC.; STABEL, JR. (2013a). Optimization of hexadecylpyridinium chloride decontamination for culture of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from milk. *J. Clin. Microbiol.*, 51(5):1575-7.

BRADNER, L.; ROBBE-AUSTERMAN, S.; BEITZ, DC.; STABEL, JR. (2013b). Chemical decontamination with N-acetyl-L-cysteine-sodium hydroxide improves recovery of viable *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* organisms from cultured milk. *J. Clin. Microbiol.*, 51(7):2139-46.

BRADY, C.; O´GRADY, D.; O´MEARA, F.; EGAN, J.; BASSETT, H. (2008). Relationships between clinical signs, pathological changes and tissue distribution of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in 21 cows from herds affected by Johne's disease. *Vet. Rec*., 162: 147-152.

BRAUN, R.K.; BUERGELT, C.D.; LITTELL, R.C.; LINDA, S.B.; SIMPSON, J.R. (1990). Use of an enzyme-linked immunosorbent assay to estimate prevalence of paratuberculosis in cattle of Florida. *J Am Vet Med Assoc*. 196:1251-1254.

BREES, D.J.; REIMER, S.B.; CHEVILLE, N.F.; FLORANCE, A.; THOEN, C.O. (2000). Immunohistochemical detection of *Mycobacterium paratuberculosis* in formalin-fixed, paraffin-embedded bovine tissue sections. *J. Vet. Diagn. Invest*., 12: 60-63.

BRETSCHER, P.A.; HAMILTON, D.; OGUNREMI, O. (2002). What information is needed to design effective vaccination against intracellular pathogens causing chronic disease? *Expert. Rev. Vaccines*, 1: 179-192.

BREY, B.J.; RADCLIFF, R.P.; CLARK, D.L. Jr., ELLINGSON, J.L. (2006). Design and development of an internal control plasmid for the detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* using real-time PCR. *Moll. Cell. Probes*, 20: 51-59.

BROTHERSTON, J.G.; GILMOUR, N.J.L.; SAMUEL, J.M. (1961a). Quantitative studies of *Mycobacterium johnei* in the tissues of sheep. I. Routes of infection and assay of viable *M. johnei*. *J. Comp. Pathol*., 71: 286-299.

BROTHERSTON, J.G.; GILMOUR, N.J.L.; SAMUEL, J.M. (1961b). Quantitative studies of *Mycobacterium johnei* in the tissues of sheep. II. Protection afforded by dead vaccines. *J. Comp. Pathol*., 71: 300-310.

BROWN, C.C.; BAKER, D.C.; BARKER, I.K. (2007). The Alimentary System. Paratuberculosis (Johne´s disease). En: Jubb, K.V.F.; Kennedy, P.C.; Palmer, N. (Eds.). Pathology of Domestic Animals.5th ed. Elsevier Saunders. Londres. Reino Unido. Vol. 2. pp. 222-225.

BROWN, I.N. (1982).*Animal models and immune mechanisms in mycobacterial infection*. En: Ratledge, c; Stanford, J.L. (Eds.). *The Biology of the micobacteria. Phisiology. Identification and classification*. Vol.1 Londres: Academic Press, pp. 173-234.

BROWN, W.C.; DAVIS, W.C.; CHOI, S.H.; DOBBELAERE, D.A.; SPLITTER, G.A. **(1994).** Functional and phenotypic characterization of WC1+ gamma/delta T cells isolated from Babesia bovis-stimulated T cell lines. *Cell Immunol*., 153: 9-27.

BRUMBAUGH, G.W.; EDWARDS, J.F.; ROUSSEL, A.J. Jr.; THOMSON, T.D. (2000). Effect of monensin sodium on histological lesions of naturally occurring bovine paratuberculosis. *J. Comp. Pathol*., 123: 22-28.

BUDDLE, B.M.; ALDWELL, F.E.; PFEFFER, A.; DE LISLE, G.W.; CORNER, L.A. (1994). Experimental *Mycobacterium bovis* infection of cattle: effect of dose of *M. bovis* and pregnancy on immune responses and distribution of lesions. *N. Z. Vet. J*., 42: 167-172.

BUDDLE, B.M.; DE LISLE, G.W.; PFEFFER, A.; ALDWELL, F.E. (1995). Immunological responses and protection against *Mycobacterium bovis* in calves vaccinated with a low dose of BCG. *Vaccine*, 13: 1123-1130.

BUDDLE, B.M.; PARLANE, N.A.; KEEN, D.L.; ALDWELL, F.E.; POLLOCK, J.M.; LIGHTBODY, K.; ANDERSEN, P. (1999). Differentiation between *Mycobacterium bovis* BCG-vaccinated and *M. bovis*-infected cattle by using recombinant mycobacterial antigens. *Clin. Diagn. Lab. Immunol*., 6: 1-5.

BUERGELT, C.D.; DELISLE, G.; HALL, C.E.; MERKAL, R.S.; DUNCAN, J.R. (1978a). In vitro lymphocyte transformation as a herd survey method for bovine paratuberculosis. *Am. J. Vet. Res*., 39:591-595.

BUERGELT, C.D.; DUNCAN, J.R. (1978). Age and milk production data of cattle culled from a dairy herd with paratuberculosis. *J. Am. Vet. Med. Assoc*., 173: 478-480.

BUERGELT, C.D.; GINN, P.E. (2000). The histopathologic diagnosis of subclinical Johne's disease in North American bison (*Bison bison*). *Vet Microbiol*., 77: 325-331.

BUERGELT, C.D.; HALL, C.; McENTEE, K.; DUNCAN, J.R. (1978b). Pathological evaluation of paratuberculosis in naturally infected cattle. *Vet. Pathol*., 15: 196-207.

BUERGELT, C.D.; HALL, C.E.; MERKAL, R.S.; WHITLOCK, R.H.; DUNCAN, J.R. (1977). Lymphocyte transformation: an aid in the diagnosis of paratuberculosis. *Am. J. Vet. Res*., 38: 1709-1715.

BUERGELT, C.D.; LAYTON, A.W.; GINN, P.E.; TAYLOR, M.; KING, J.M.; HABECKER, P.L.; MAULDIN, E.; WHITLOCK, R.; ROSSITER, C.; COLLINS, M.T. (2000). The pathology of spontaneous paratuberculosis in the North American bison (*Bison bison*). *Vet. Pathol*., 37: 428-438.

BUERGELT, C.D.; WILLIAMS, J.E. (2004). Nested PCR on blood and milk for the detection of *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* DNA in clinical and subclinical bovine paratuberculosis. *Aust. Vet. J*., 82: 497-503.

BULAGA, L.L.; COLLINS, M.T.(1999). U.S. Voluntary Johne´s disease herd status program for cattle. En: Manning, E.J.B.; Collins, M.T. (Eds.). *Proc 6th Int. Coll. PTBC.* IAP. Madison, EEUU. pp 39-47.

BULL, T.J..; GILBERT, S.C.; SRIDHAR, S.; LINEDALE, R.; DIERKES, N.; SIDI-BOUMEDINE, K.; HERMON-TAYLOR, J. (2007). A novel multi-antigen virally vectored vaccine against *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *PLoS One.*, 2: 1229.

BULL, T.J.; HERMON-TAYLOR, J.; PAVLIK, I.I.; EL-ZAATARI, F.; ,TIZARD M. (2000). Characterization of IS900 loci in *Mycobacteriumavium* subsp. *paratuberculosis* and development of multiplex PCR typing. *Microbiology*., 146: 2185-2197.

BULL, T.J.; McMINN, E.J.; SIDI-BOUMEDINE, K.; SKULL, A.; DURKIN, D.; NEILD, P.; RHODES, G.; PICKUP, R.; HERMON-TAYLOR, J. (2003). Detection and verification of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in fresh ileocolonic mucosal biopsy specimens from individuals with and without Crohn's disease. *J. Clin. Microbiol.*, 41: 2915-2923.

BURNSIDE, D.M.; ROWLEY, B.O. (1994). Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of paratuberculosis in goats. *Am. J. Vet. Res*., 55: 465-466.

BURRELLS, C.; CLARKE, C.J.; COLSTON, A.; KAY, J.M.; PORTER, J.; LITTLE, D.; SHARP, J.M. (1998).A study of immunological responses of sheep clinically-affected with paratuberculosis (Johne's disease). The relationship of blood, mesenteric lymph node and intestinal lymphocyte responses to gross and microscopic pathology. *Vet. Immunol. Immunopathol*., 66: 343-358.

BURRELLS, C.; CLARKE, C.J.; COLSTON, A.; KAY, J.M.; PORTER, J.; LITTLE, D.; SHARP, J.M. (1999). Interferon-gamma and interleukin-2 release by lymphocytes derived from the blood, mesenteric lymph nodes and intestines of normal sheep and those affected with paratuberculosis (Johne's disease). *Vet Immunol Immunopathol.*, 68:139-48.

BURRELLS, C.; INGLIS, N.F.; DAVIES, R.C.; SHARP, J.M. (1995). Detection of specific T cell reactivity in sheep infected with *Mycobacterium avium* subspecies *silvaticum* and *paratuberculosis* using two defined mycobacterial antigens. *Vet. Immunol. Immunopathol*., 45: 311-320.

BUSH, R.D.; WINDSOR, P.A.; TORIBIO, J.A. (2006). Losses of adult sheep due to ovine Johne's disease in 12 infected flocks over a 3-year period. *Aust. Vet. J*., 84: 246-253.

BUSTIN, S.A.; BENES, V., GARSON, J.A.; HELLEMANS, J.; HUGGETT, J.; KUBISTA, M.; MUELLER, R.; NOLAN, T.; PFAFFI, M.W.; SHIPLEY, G.L.; VANDESOMPELE, J.; WITTWER, C.T. (2009). The

MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin. Chem*., 55: 611-622.

CAI, H.; YU, D.H.; TIAN, X.; ZHU, Y.X. (2005). Coadministration of interleukin 2 plasmid DNA with combined DNA vaccines significantly enhances the protective efficacy against *Mycobacterium tuberculosis. DNA Cell. Biol*.. 24: 605-13.

CARPENTER, T.E.; GARDNER, I.A.; COLLINS, M.T.; WHITLOCK, R.H. (2004). Effects of prevalence and testing by enzyme-linked immunosorbent assay and fecal culture on the risk of introduction of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*-infected cows into dairy herds. *J. Vet. Diagn. Invest*., 16: 31-38.

CARRIGAN, M.J.; SEAMAN, J.T. (1990). The pathology of Johne's disease in sheep. *Aust. Vet. J*., 67: 47-50.

CASANOVA, J.L. (2000). Genetic predisposition to infective diseases in humans. Mendelian predisposition to mycobacterial infections. *Bull. Acad. Natl. Med*., 184: 1409-1415.

CASSIDY, J.P. (2008). The pathology of bovine tuberculosis: Time for an audit. *Vet. J.*, 354-360.

CASSIDY, J.P. (2006). The pathogenesis and pathology of bovine tuberculosis with insights from studies oftuberculosis in humans and laboratory animal models. *Vet. Microbiol*., 112: 151-161.

CELLIER, C.; DE BEENHOUWER, H.; BERGER, A.; PENNA, C.; CARBONNEL, F.; PARC, R.; CUGNENC, P.H.; LE QUINTREC, Y.; GENDRE, J.P.; BARBIER, J.P.; PORTAELS, F. (1998). *Mycobacterium paratuberculosis* and *Mycobacterium avium* subsp. *silvaticum* DNA cannot be detected by PCR in Crohn's disease tissue. *Gastroenterol. Clin. Biol.*, 22: 675-8.

CERVINO AC1, LAKISS S, SOW O, HILL AV. (2000). Allelic association between the NRAMP1 gene and susceptibility to tuberculosis in Guinea-Conakry. *Ann Hum Genet.*, 64:507-512

CETINKAYA, B.; EGAN, K.; HARBOUR, D.A.; MORGAN, K.L. (1996). An abattoir-based study of the prevalence of subclinical Johne's disease in adult cattle in south west England. *Epidemiol. Infect.*, 116: 373-379.

CETINKAYA, B.; ERDOGAN, H.M.; MORGAN, K.L. (1998). Prevalence, incidence and geographical distribution of Johne's disease in cattle in England and the Welsh borders. *Vet. Rec*., 143: 265-269.

CHACON, O.; BERMÚDEZ, L.E.; BARLETTA, R.G. (2004). Johne's disease, inflammatory bowel disease, and *Mycobacterium paratuberculosis*. *Annu. Rev. Microbiol*., 58: 329-363.

CHALLANS, J.A.; STEVENSON, K.; REID, H.W.; SHARP, J.M. (1994). A rapid method for the extraction and detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* from clinical specimens. *Vet. Rec*., 134: 95-96.

CHAN, J.; FAN, X.D.; HUNTER, S.W.; BRENNAN, P.J.; BLOOM, B.R. (1991). Lipoarabinomannan, a possible virulence factor involved in persistence of *Mycobacterium tuberculosis* within macrophages. *Infect. Immun*., 59: 1755-1761.

CHAN, J.; XING, Y.; MAGLIOZZO, R.S.; BLOOM, B.R. **(1992**). Killing of virulent *Mycobacterium tuberculosis* by reactive nitrogen intermediates produced by activated murine macrophages. *J. Exp. Med*., 175: 1111-1122.

CHANDLER, R.L. (1962). Infection of laboratory animals with *Mycobacterium johnei.* V.- Further studies on the comparative susceptibility of C57 black mice. *J. Comp. Pathol.*, 72: 198-213.

CHANDLER, R.L.(1961a). Infection of laboratory animals with *Mycobacterium johnei.* II. Infection in white rats; effect of cortisone treatment. *J. Comp. Pathol.*, 71: 131-134.

CHANDLER, R.L.(1961b). Infection of laboratory animals with *Mycobacterium johnei*. IV. Comparative susceptibility to infection of C.57, C.B.A and Swiss white mice. *J. Comp. Pathol.*, 71: 233-242.

CHARTIER, C.; MERCIER, P.; PELLET, M.P.; VIALARD, J. (2012) Effect of an inactivated paratuberculosis vaccine on the intradermal testing of goats fortuberculosis. *Vet J*.,191:360-363

CHÁVEZ, G. (1993). Estudio comparativo de las lesiones y de la respuesta inmunológica observadas en corderos infectados experimentalmente con *Mycobacterium paratuberculosis* y *Mycobacterium avium* sp. *silvaticum*. *Tesis doctoral*. Universidad de Zaragoza.

CHEVILLE, N.F.; HOSTETTER, J.; THOMSEN, B.V.; SIMUTIS, F.; VANLOUBEECK, Y.; STEADHAM, E. (2001). Intracellular trafficking of *Mycobacterium avium* ss. *paratuberculosis* in macrophages. *Dtsch. Tierarztl. Wochenschr*., 108: 236-243.

CHIODINI, R.J. (1989). Crohn's disease and the mycobacterioses: a review and comparison of two disease entities. *Clin. Microbiol. Rev*., 2: 90-117.

CHIODINI, R.J. (1996). Immunology: resistance to paratuberculosis**.** *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.*, 12: 313-343.

CHIODINI, R.J., HERMON-TAYLOR, J. (1993). The thermal resistance of *Mycobacterium paratuberculosis* in raw milk under conditions simulating pasteurization. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 5: 629-631.

CHIODINI, R.J.; BUERGELT, C.D. (1993). Susceptibility of Balb/c, C57/B6 and C57/B10 mice to infection with *Mycobacterium paratuberculosis*. *J. Comp. Pathol.*, 109: 309-319.

CHIODINI, R.J.; DAVIS, W.C. (1992). The cellular immunology of bovine paratuberculosis: the predominant response is mediated by cytotoxic gamma/delta T lymphocytes which prevent CD4+ activity. *Microb. Pathog.*, 13: 447-463.

CHIODINI, R.J.; DAVIS, W.C. (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::355-67.*

CHIODINI, R.J.; ROSSITER, C.A. (1996). Paratuberculosis: a potential zoonosis? *Vet. Clin. North. Am. Food Anim. Pract.*, 12: 457-67.

CHIODINI, R.J.; VAN KRUININGEN, H.J. (1983). Eastern white-tailed deer as a reservoir of ruminant paratuberculosis. *J. Am. Vet. Med. Assoc*., 182: 168-169.

CHIODINI, R.J.; VAN KRUININGEN, H.J. (1985). Characterization of Mycobacterium paratuberculosis of bovine, caprine, and ovine origin by gas-liquid chromatographic analysis of fatty acids in whole-cell extracts. *Am J Vet Res.* 46:1980-1989.

CHIODINI, R.J.; VAN KRUININGEN, H.J. (1986). The prevalence of paratuberculosis in culled New England cattle. *Cornell Vet*., 76: 91-104.

CHIODINI, R.J.; VAN KRUININGEN, H.J.; MERKAL, R.S. (1984a). Ruminant paratuberculosis (Johne's disease): the current status and future prospects. *Cornell Vet.*, 74: 218-262.

CHIODINI, R.J.; VAN KRUININGEN, H.J.; MERKAL, R.S.; THAVER, W.R. Jr.; COUTU, J.A. (1984b). Characteristics of an unclassified *Mycobacterium* species isolated from patients with Crohn's disease. *J. Clin. Microbiol*., 20: 966-971.

CHIODINI, R.J.; VAN KRUININGEN, H.J.; THAVER, W.R.; COUTU, J.A. (1986). Spheroplastic phase of mycobacteria isolated from patients with Crohn's disease. *J. Clin. Microbiol.*, 24 : 357-363.

CHUI, L.W.; KING, R.; LU, P.; MANNINEN, K.; SIM, J. (2004). Evaluation of four DNA extraction methods for the detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* by polymerase chain reaction. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis*., 48:39-45.

CLARK, R.G.; GRIFFIN, J.F.; MACKINTOSH, C.G. (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: 90-97.

CLARKE, C.J. (1994). Host responses to Mycobacterium paratuberculosis/M.avium infection. En: Chiodini, R.J.; Hines, M.E.; Collins, M.T. (Eds.). *Proc 5th Int. Coll. PTBC.* IAP. Rehoboth. EEUU. pp. 345-354.

CLARKE, C.J. (1997). The pathology and pathogenesis of paratuberculosis in ruminants and other species. *J. Comp. Pathol*., 116: 217-261.

CLARKE, C.J.; LITTLE, D. (1996). The pathology of ovine paratuberculosis: gross and histological changes in the intestine and other tissues. *J. Comp. Pathol*., 114: 419-437.

CLARKE, C.J.; PATTERSON, I.A.; ARMSTRONG, K.E.; LOW, J.C. (1996). Comparison of the absorbed ELISA and agar gel immunodiffusion test with clinicopathological findings in ovine clinical paratuberculosis. *VetRec.*, 139(25):618-21.

CLARKSTON, W.K.; PRESTI, M.E.; PETERSEN, P.F.; ZACHARY, P.E. JR; FAN W.X.; LEONARDI, C.L.; VERNAVA, A.M. 3RD; LONGO. W.E.; KREEGER, J.M. (1998). Role of *Mycobacterium paratuberculosis* in Crohn's disease: a prospective, controlled study using polymerase chain reaction. *Dis. Colon Rectum*, 41: 195-199.

CLIFTON-HADLEY, R.S.; WILESMITH, J.W. (1991). Tuberculosis in deer: a review. *Vet. Rec.*, 129: 5-12.

COAD, M.; CLIFFORD, D.J.; VORDERMEIER, H.M.; WHELAN, A.O. (2013). The consequences of vaccination with the Johne's disease vaccine, Gudair, on diagnosis of bovine tuberculosis. *Vet. Rec.* 172: 266.

COBB, A.J.; FROTHINGHAM, R. (1999). The GroES antigens of Mycobacterium avium and Mycobacterium paratuberculosis. *Vet Microbiol*.,67:31-35.

COCITO, C.; GILOT, P.; COENE, M.; DE KESEL, M.; POUPART, P.; VANNUFFEL, P. (1994). Paratuberculosis. *Clin. Microbiol. Rev*., 7: 328-345.

COELHO, A.C.; PINTO, M.L.; SILVA, S.; COELHO, A.M.; RODRIGUES, J.; JUSTE, R.A. (2007). Seroprevalence of ovine paratuberculosis infection in the Northeast of Portugal. *Small Rumin. Res*. 71: 298-303.

COETSIER, C.; HAVAUX, X.; MATTELARD, F.; SADATTE, S.; CORMONT, F.; BUERGELT, K.; LIMBOURG, B.; LATINNE, D.; BAZIN, H.; DENEF, J.F.; COCITO, C. (1998). Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in infected tissues by new species-specific immunohistological procedures. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 5: 446-451.

COETSIER, C.; VANNUFFEL, P.; BLONDEEL, N.; DENEF, J.F.; COCITO, C.; GALA, J.L. (2000). Duplex PCR for differential identification of Mycobacterium bovis, M. avium, and *M. avium* subsp. *paratuberculosis* in formalin- fixed paraffin-embedded tissues from cattle. *J. Clin. Micorbiol*., 38: 3048-3054.

COHAVY. O.; HARTH, G.; HORWITZ, M.; EGGENA, M.; LANDERS, C.; SUTTON, C.; TARGAN, S.R.; BRAUN, J. (1999). Identification of a novel mycobacterial histone H1 homologue (HupB) as an antigenic target of pANCA monoclonal antibody and serum immunoglobulin A from patients with Crohn's disease. *Infect. Immun.*, 67: 6510-7.

COHEN, S. (1990). Lymphokines and the Immune Response. *CRC Press, Boca Raton*, pp.145-179.

COLGROVE, G.S.; THOEN, C.O.; BLACKBURN, B.O.; MURPHY, C.D. (1989). Paratuberculosis in cattle: a comparison of three serologic tests with results of fecal culture. *Vet. Microbiol*., 19: 183-187.

COLLINS MT. (2002). Interpretation of a commercial bovine paratuberculosis enzyme-linked immunosorbent assay by using likelihood ratios. *Clin Diagn Lab Immunol*., 9:1367-1371.

COLLINS, D.M.; DE LISLE, G.W.; COLLINS, J.D.; COSTELLO, E. (1994). DNA restriction fragment typing of *Mycobacterium bovis* isolates from cattle and badgers in Ireland. *Vet. Rec.*, 134: 681-682.

COLLINS, D.M.; DE ZOETE, M.; CAVAIGNAC, S.M. (2002).*Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* strains from cattle and sheep can be distinguished by a PCR test based on a novel DNA sequence difference. *J. Clin. Microbiol*., 40: 4760-4762.

COLLINS, D.M.; GABRIC, D.M.; DE LISLE, G.W. (1989). Identification of a repetitive DNA sequence specific to *Mycobacterium paratuberculosis*. *FEMS Microbiol. Lett*., 5: 175-178.

COLLINS, D.M.; GABRIC, D.M.; DE LISLE, G.W. (1990a). Identification of two groups of *Mycobacterium paratuberculosis* strains by restriction endonuclease analysis and DNA hybridization. *J. Clin. Microbiol*., 28: 1591-1596.

COLLINS, D.M.; HILBINK, F.; WEST, D.M.; HOSIE, B.D.; COOKE, M.M.; DE LISLE, G.W. (1993a). Investigation of *Mycobacterium paratuberculosis* in sheep by faecal culture, DNA characterisation and the polymerase chain reaction. *Vet. Rec*., 133: 599-600.

COLLINS, D.M.; STEPHENS, D.M.; DE LISLE, G.W. (1993b). Comparison of polymerase chain reaction tests and faecal culture for detecting *Mycobacterium paratuberculosis* in bovine faeces. *Vet. Microbiol*., 36: 289-299.

COLLINS, D.M; CAVAIGNAC, S.; DE LISLE, G.W. (1997). Use of four DNA insertion sequences to characterize strains of the Mycobacterium avium complex isolated from animals. *Mol Cell Probes*., 11:373-80.

COLLINS, F.M. (1975). Vaccines and cell-mediated immunity. *Bacteriol. Rev.* 38:0371-402.

COLLINS, M.T. (1996). Diagnosis of paratuberculosis. *Vet ClinNorth Am Food Anim Pract*., 12:357-371.

COLLINS, M.T.; ANGULO, A.; BUERGELT, C.D.; HENNAGER, S.G. ;HIETALA, S.K.; JACOBSON, R.H.; WHIPPLE, D.L.; WHITLOCK, R.H. (1993c). Reproducibility of a commercial enzyme-linked immunosorbent assay for bovine paratuberculosis among eight laboratories. *J. Vet. Diagn. Invest*., 5: 52-55.

COLLINS, M.T.; KENEFLICK, K.B.; SOCKETT, D.C.; LAMBRECHT, R.S.; McDONALD, J.; JORGENSEN, J. (1990b). Enhanced radiometric detection of *Mycobacterium paratuberculosis* by using filter-concentrated bovine fecal specimens. *J. Clin. Microbiol*., 28: 2514-2519.

COLLINS, M.T.; LAMBRECHT, R.S. ; McDONALD, J. (1988). Radiometric detection of Mycobacterium paratuberculosis from clinical specimens. En: Thorel, M.F.; Merkal, R.S. (Eds.). *Proc 2nd Int. Coll. PTBC*. IAP. Paris. Francia. pp 179-188.

COLLINS, M.T.; LISBY, G.; MOSER, C.; CHICKS, D.; CHRISTENSEN, S.; REICHELDERFER, M.; HOIBY, N.; HARMS, B.A.; THOMSEN, O.O.; SKIBSTED, U.; BINDER, V. (2000). Results of multiple diagnostic tests for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in patients with inflammatory bowel disease and in controls. *J. Clin. Microbiol*., 38: 4373-4381.

COLLINS, M.T.; NORDLUND, K. (1999). Milk production levels in cows ELISA positive for serum antibodies to M.paratuberculosis. En: Chiodini, R.J.; Collins, M.T: Bassey, E.O.E. (Eds.).*Proc 4th Int. Coll. PTBC. IAP*. Melbourne, Australia. pp 37-40.

COLLINS, M.T.; NORDLUND, K.(1992). Milk production levels in cows ELISA positive for serum antibodies to *M. paratuberculosis*. Preliminary results. En: Chiodini, R.J.; Kreeger, J.M. (Eds.). *Proc 3rd Int. Coll. PTBC*. IAP. Providence. EE.UU. pp 402-409.

COLLINS, M.T.; SOCKETT, D.C. (1993). Accuracy and economics of the USDA-licensed enzyme-linked immunosorbent assay for bovine paratuberculosis. *J Am Vet Med Assoc*. 203:1456-1463.

COLLINS, M.T.; SOCKETT, D.C.; GOODGER, W.J.; CONRAD, T.A.; THOMAS, C.B.; CARR, D.J. (1994). Herd prevalence and geographic distribution of, and risk factors for, bovine paratuberculosis in Wisconsin. *J. Am. Vet. Med. Assoc*., 204: 636-641.

COLLINS, M.T.; WELLS, S.J.; PETRINI, K.R.; COLLINS, J.E.; SCHULTZ, R.D.; WHITLOCK, R.H. (2005). Evaluation of five antibody detection tests for diagnosis of bovine paratuberculosis. *Clin Diagn Lab Immunol.*, 12(6):685-692.

COLLINS, P.; MATTHEWS, P.R.; MC DIARMID, A; BROWN, A. (1983). The pathogenicity of *Mycobacterium avium* and related mycobacteria for experimental animals. *J. Med. Microbiol*. 16: 27-35.

COLLINS. M.T. (2006). Proper estimation of sensitivity and specificity.*Clin Vaccine Immunol.*, 13: 1373.

COLSTON, A.; MCCONNELL, I.; BUJDOSO, R. (1994). Cloning and expression in Escherichia coli of DNA encoding a 60 kDa stress protein of *Mycobacterium paratuberculosis*, the causative agent of Johne's disease. *Microbiology*. 140 :3329-36.

CONDRON, R.J.; SCHROEN, C.J.; BLACK, C.A.; RIDGE, S.E.; HOPE, A.F. (1994). Histological confirmation of subclinical infection with M. paratuberculosis in cattle. En: Chiodini, R.J.; Collins, M.T: Bassey, E.O.E. (Eds.). *Proc 4th Int. Coll. PTBC. IAP*. Providence. EEUU.pp 37-40.

COOPER, A.M.; MAGRAM, J.; FERRANTE, J.; ORME, I.M. (1997). Interleukin 12 (IL-12) is crucial to the development of protective immunity in mice intravenously infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Exp. Med*., 186: 39-45.

COOPER, A.M.; ROBERTS, A.D.; RHOADES, E.R.; CALLAHAN, J.E.; GETZY, D.M.; ORME, I.M. (1995). The role of interleukin-12 in acquired immunity to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Immunology*, 84: 423-432.

CORNER, L.A.; BARRETT, L.H.; LEPPER, A.W.D.; LEWIS, V.; PEARSON, C.W. (1981). A survey of mycobacteriosis of feral pigs in the Northern Territory. *Aust. Vet. J.*, 57: 537-542.

CORNER, L.A.; PFEIFFER, D.U.; ABBOTT, K.A. (2004). The respiratory tract as a hypothetical route of infection of cattle with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis. Aust Vet J*.,82: 170-173.

CORPA, J.M. (1995). Contribución al conocimiento de la paratuberculosis caprina. *Tesina de Licenciatura.* Universidad Complutense de Madrid.

CORPA, J.M.(1999). Aspectos inmunopatológicos de la paratuberculosis de los pequeños ruminates. Respuesta inmune asociada a la vacunación. *Tesis Doctoral*. Universidad de León.

CORPA, J.M.; GARCÍA-MARÍN, J.F.; PÉREZ, V. (1998). Diagnóstico de paratuberculosis en ganado vacuno. *Med. Vet*., 15: 618-624.

CORPA, J.M.; GARRIDO, J.; GARCÍA-MARÍN, J.F.; PÉREZ, V. (2000a). Classification of lesions observed in natural cases of paratuberculosis in goats. *J. Comp. Pathol*., 122: 255-265.

CORPA, J.M.; JUSTE, R.A.; GARCÍA-MARÍN, J.F.; REYES, L.E.; GONZÁLEZ, J.; PÉREZ, V. (2001). Distribution of lymphocyte subsets in the small intestine lymphoid tissue of 1-month-old lambs. *Anat. Histol. Embryol*., 30: 121-127.

CORPA, J.M.; PÉREZ, V.; GARCÍA- MARÍN J.F. (2000b). Control of paratuberculosis (Johne's disease) in goats by vaccination of adult animals. *Vet. Rec*., 146: 195-196.

CORPA, J.M.; PÉREZ, V.; GARCÍA- MARÍN J.F. (2000c). Differences in the immune responses in lambs and kids vaccinated against paratuberculosis, according to the age of vaccination. *Vet. Microbiol*., 77: 475-485.

CORR, S.C.; GAHAN, C.C.; HILL, C. (2008). M-cells: origin, morphology and role in mucosal immunity and microbial pathogenesis. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 52: 2-12.

CORTI, S.; STEPHAN, R. (2002). Detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* specific IS*900* insertion sequences in bulk-tank milk samples obtained from different regions throughout Switzerland. *BMC Microbiol*., 2: 15.

COUSINS, D.; WHITTINGTON, R.; MARSH, I.; MASTERS, A.; EVANS, R.J.; KLUVER, P. (1999b). Mycobacteria distinct from *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolated from the faeces of ruminants possess IS*900*-like sequences detectable by IS*900* polymerase chain reaction: implications for the diagnosis. *Mol. Cell. Probes*., 13: 431-442.

COUSINS, D.; WHITTINGTON, R.; MASTERS, A.; MARSH, I.; EVANS, R.J.; KLUVER, P. (1999a). Investigation of false-positives in the IS*900* PCR for identification of *Mycobacterium avium* subsp.

paratuberculosis. En: Manning, E.J.B.; Collins, M.T. (Eds.). *Proc 6th Int. Coll. PTBC.* IAP. Madison, EEUU.pp. 259-264.

COUSINS, D.; WILLIAMS, S.N.; HOPE, A., EAMENS, G.J. (2000). DNA fingerprinting of Australian isolates of *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* using IS*900* RFLP. *Aust. Vet. J.*, 78: 184-190.

COUSINS, D.V.; EVANS, R.J.; FRANCIS, B.R. (1995). Use of BACTEC radiometric culture method and polymerase chain reaction for the rapid screening of faeces and tissues for *Mycobacteriumparatuberculosis. Aust Vet J.*, 72:458-62.

COUSSENS, P.M. **(2001).***Mycobacterium paratuberculosis* and the bovine immune system. *Anim. Health Res. Rev*., 2: 141-161.

COUSSENS, P.M. (2004). Model for immune responses to *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in cattle. *Infect. Immun.*, 72: 3089-3096.

COUSSENS, P.M.; VERMAN, N.; COUSSENS, M.A.; ELFTMAN, M.D.; McNULTY, A.M. (2004). Cytokine gene expression in peripheral blood mononuclear cells and tissues of cattle infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: evidence for an inherent proinflammatory gene expression pattern. *Infect. Immun*., 72: 1409-1422.

COX, J.C.; DRANE, D.P.; JONES, S.L.; RIDGE, S.; MILNER, A.R. (1991). Development and evaluation of a rapid absorbed enzyme immunoassay test for the diagnosis of Johnee's disease in cattle. Asut. Vet. J., 68:157-160.

CRANWELL, M.P. (1993). Control of Johne's disease in a flock of sheep by vaccination. *Vet. Rec*., 133: 219-220.

CRAWSHAW, T.; DANIEL, R.; CLIFTON-HADLEY, R.; CLARK, J.; EVANS, H.; ROLFE, S.; DE LA RUA-DOMENECH, R. (2008). TB in goats caused by *Mycobacterium bovis*. *Vet. Rec*., 163: 127.

CROHN, B.B.; GINZBURG, I.; OPPENHEIMER, G.D. (1932). Regional ileitis: a pathologic and clinical entity. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 99: 1323-1328.

CROSSLEY, B.M.; ZAGMUTT-VERGARA, F.J.; FYOCK, T.L.; WHITLOCK, R.H.; GARDNER, I.A. (2005). Fecal shedding of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* by dairy cows. *Vet. Microbiol*., 107:257-263.

CROWTHER, R.W.; POLYDOROU, K.; NITTI, S.; PHYRILLA, A. (1976). Johne's disease in sheep in Cyprus. *Vet. Rec*., 98: 463.

CUERVO, L.A.; GONZÁLEZ, L. (1987). Patogenesis. Cuadro lesional y clínico. En: Juste, R.A. editor. *Bovis.* Paratuberculosis, pp.23-40.

CUEZVA-SAMANIEGO, J. (1966). Erradicación de la tuberculosis bovina. Ed. Avigan, Valencia, España.

CURTIS, M.M.; WAY, S.S. (2009). Interleukin-17 in host defence against bacterial, mycobacterial and fungal pathogens. *Immunology*, 126: 177-185.

CYWES, C.; HOPPE, H.C.; DAFFÉ, M.; EHLERS, M.R. (1997). Nonopsonic binding of *Mycobacterium tuberculosis* to complement receptor type 3 is mediated by capsular polysaccharides and is strain dependent. *Infect. Immun*., 65: 4258-4266.

DAHL, K.E.; SHIRATSUCHI, H.; HAMILTON, B.D.; ELLNER, J.J.; TOOSSI, Z. (1996). Selective induction of transforming growth factor beta in human monocytes by lipoarabinomannan of *Mycobacterium tuberculosis. Infect Immun*., 64:399-405.

DALZEIL, T.K. (1913). Chronic interstitial enteritis. *Br. Med. J.;* (ii): 1068-1070.

DAMATO, J.J.; COLLINS, M.T. (1990). Growth of *Mycobacterium paratuberculosis* in radiometric, Middlebrook and egg-based media. *Vet. Microbiol*., 22: 31-42.

DANIELS, M.J.; BALL, N.; HUTCHINGS, M.R.; GREIG, A. (2001). The grazing response of cattle to pasture contaminated qith rabbit faeces and the implications for the transmission of paratuberculosis. *Vet. J.*, 161: 306-313.

DANIELS, M.J.; HENDERSON, D.; GREIG, A.; STEVENSON, K.; SHARP, J.M.; HUTCHINGS, M.R. (2003a). The potential role of wild rabbits *Oryctolagus cuniculus* in the epidemiology of paratuberculosis in domestic ruminants. *Epidemiol. Infect*., 130: 553-559.

DANIELS, M.J.; HUTCHINGS, M.R.; BEARD, P.M.; HENDERSON, D.; GREIG, A.; STEVENSON, K.; SHARP, J.M. (2003b). Do non-ruminant wildlife pose a risk of paratuberculosis to domestic livestock and vice versa in Scotland? *J. Wildl. Dis*., 39: 10-15.

DARGATZ, D.A.; BYRUM, B.A.; BARBER, L.K.,; SWEENEY, R.W.; WHITLOCK, R.H.; SHULAW, W.P.; JACOBSON, R.H.; STABEL, J.R.; (2001a). Evaluation of a commercial ELISA for diagnosis of paratuberculosis in cattle. *J Am Vet Med Assoc*. 218:1163-1166.

DARGATZ, D.A.;1, BYRUM BA, HENNAGER SG, BARBER LK, KOPRAL CA, WAGNER BA, WELLS SJ. (2001b). Prevalence of antibodies against mycobacterium avium subsp paratuberculosis among beef cow-calf herds. *J Am Vet Med Assoc*. 219:497-501.

DAVIDSON, R.S.; MARION, G.; WHITE, P.C.; HUTCHINGS, M.R. (2009). Use of host population reduction to control wildlife infection: rabbits and paratuberculosis. *Epidemiol. Infect.*,137: 131-138.

DE ALMEIDA, D.E.; COLVIN, C.J.; COUSSENS, P.M. (2008). Antigen-specific regulatory T cells in bovine paratuberculosis. *Vet. Immunol. Immunopathol*., 125: 234-245.

DE JUAN, L.; MATEOS, A.; DOMÍNGUEZ, L.; SHARP, J.M.; STEVENSON, K. (2005).Genetic diversity of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* isolates from goats detected by pulsed-field gel electrophoresis. *Vet. Microbiol*., 106: 249-257.

DE KESEL, M.; GILOT, P.; MISONNE, M.C.; COENE, M.; COCITO, C. (1993). Cloning and expression of portions of the 34-kilodalton-protein gene of Mycobacterium paratuberculosis: its application to serological analysis of Johne's disease. Clin Microbiol., 31:947-954.

DE LA RUA-DOMENECH, R.; GOODCHILD, A.T.; VORDERMEIER, H.M.; HEWINSON, R.G.; CHRISTIANSEN, K.H.; CLIFTON-HADLEY, R.S. (2006). Ante mortem diagnosis of tuberculosis in cattle: a review of the tuberculin tests, gamma-interferon assay and other ancillary diagnostic techniques. *Res. Vet. Sci*., 81: 190-210.

DE LISLE, G.W. (2002). Johne's disease in New Zealand: the past, present and a glimpse into the future. *N. Z. Vet. J*., 50: 53-56.

DE LISLE, G.W.; CANNON, M.C.; YATES, G.F. ; COLLINS, D.M.(2006). Abattoir surveillance of paratuberculosis in farmed deer in New Zealand. En: Manning, E.B.; Nielsen, S.S. (Eds.). *Proc 8th Int. Coll. PTBC*. IAP. Madison, EEUU. pp. 601-604.

DE LISLE, G.W.; COLLINS, D.M.; HUCHZERMEYER, H.F. (1992). Characterization of ovine strains of *Mycobacterium paratuberculosis* by restriction endonuclease analysis and DNA hybridization. *Onderstepoort J Vet Res*., 59:163-5.

DE LISLE, G.W.; DUNCAN, J.R. (1981). Bovine paratuberculosis III. An evaluation of a whole blood lymphocyte transformation test. *Can J Comp Med*., 45:304-309.

DE LISLE, G.W.; HAVILL, P.F. (1985). Mycobacteria isolated from deer in New Zealand from 1970-1983. *N. Z. Vet. J.*, 33: 138-140.

DE LISLE, G.W.; MILESTONE, B.A. (1989). The economic impact of Johnes´s disease in New Zeland. En: Milner. A.R. and Wood, P.R. (Eds.) *Johne´s disease: current trends in research and management*. CSIRO, Melbourne, Australia. pp: 41-45.

DE LISLE, G.W.; SEGUIN, P.; SAMAGH, B.S.; CORNER, A.H.; DUNCAN, J.R. (1980). Bovine paratuberculosis I. A herd study using complement fixation and intradermal tests. *Can. J. Comp. Med*., 44: 177-182.

DE LISLE, G.W.; YATES, G.F.; COLLINS, D.M. (1993). Paratuberculosis in farmed deer: case reports and DNA characterization of isolates of *Mycobacterium paratuberculosis*. *J. Vet. Diagn. Invest*., 5: 567-571.

DE SILVA, K.; BEGG, D.; CARTER, N.; TAYLOR, D.; DI FIORE, L.; WHITTINGTON, R. (2010). The early lymphocyte proliferation response in sheep exposed to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* compared to infection status. *Immunobiology*, 215: 12-25.

DELBRIDGE, L.M.; O´RIORDAN, M.X. (2007). Innate recognition of intracellular bacteria. *Curr. Opin. Immunol*., 19: 10-16.

DELGADO, F.; ETCHECHOURY, D.; GIOFFRÉ, A.; PAOLICCHI, F.; BLANCO VIERA, F.; MUNDO, S.; ROMANO, M.I. (2009). Comparison between two in situ methods for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* detection in tissue samples from infected cattle. *Vet. Microbiol*., 134: 383-387.

DELGADO, L. (2010). Estudio de la patogenia de la paratuberculosis: relación entre la respuesta inmune y el desarrollo de las lesiones en ovinos jóvenes y adultos. *Tesis doctoral*. Universidad de León.

DELGADO, L.; MARÍN, J.F.; MUÑOZ, M.; BENAVIDES, J.; JUSTE, R.A.; GARCÍA-PARIENTE, C.; FUERTES, M.; GONZÁLEZ, J.; FERRERAS, M.C.; PÉREZ, V. (2013). Pathological findings in young and adult sheep following experimental infection with 2 different doses of *Mycobacteriumavium* subspecies *paratuberculosis*. *Vet. Pathol*. 50:857-866.

DELGADO, L.; JUSTE, R.A.; MUÑOZ, M.; MORALES, S.; BENAVIDES, J.; FERRERAS, M.C.; MARÍN, J.F.; PÉREZ, V. (2012). Differences in the peripheral immune response between lambs and adult ewes experimentally infected with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 145:23-31.

DELL'ISOLA, B.; POYART, C.; GOULET, O.; MOUGENOT, J.F.; SADOUN-JOURNO, E.; BROUSSE, N; SCHMITZ, J.; RICOUR, C.; BERCHE, P. (1994). Detection of *Mycobacterium paratuberculosis* by polymerase chain reaction in children with Crohn's disease. *J. Infec. Dis.*, 169: 449-451.

DELL'ISOLA, B.; POYART, C.; GOULET, O.; RICOUR, C.; VALCKE, J.C.; BERCHE, P. (1992). Crohn's disease as infectious disease. Detection of *Mycobacterium paratuberculosis* in Crohn's disease by polymerase chain reaction. Preliminary results. *Rev. Med. Interne*, 13:401.

DENIS, M.(1991). Interferon-gamma-treated murine macrophages inhibit growth of tubercle bacilli via the generation of reactive nitrogen intermediates. *Cell Immunol*., 132: 150-157.

DESMECHT, M. (1977). Redement compare de diverses methodes de diagnostic de la paratuberculose. *Ann. Med. Vet*., 121:421-423.

DHAND, N.K.; JOHNSON, W.O.; EPPLESTON, J.; WHITTINGTON, R.J.; WINDSOR, P.A. (2013). Comparison of pre- and post-vaccination ovine Johne's disease prevalence using a Bayesian approach. *Prev. Vet. Med*. 111: 81-91.

DHEENADHAYALAN, V.;SHIN, K.S.;CHANG, C.F.;CHANG, C.D.;WANG, S.J.;McDONOUGH, S.;McDONOUGH, P.;STEHMAN, S.;SHIN, S.;TORRES, A.;CHANG, Y.F. (2002). Cloning and characterization of the genes coding for antigen 85A, 85B and 85C of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis.DNA Seq*., 13:287-294.

DIÉGUEZ, F.J.; GONZÁLEZ, A.M.; MENÉNDEZ, S.; VILAR, M.J.; SANJUÁN, M.L.; YUS, E.; ARNAIZ, I. (2009). Evaluation of four commercial serum ELISAs for detection of *Mycobacteriumavium* subsp. *paratuberculosis* infection in dairy cows. *Vet. J*., 180: 231-235.

DIÉGUEZ, F.J.; ARNAIZ, I.; SANJUÁN, M.L.; VILAR, M.J.; LÓPEZ, M.; YUS, E. (2007). Prevalence of serum antibodies to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in cattle in Galicia (northwest Spain). *Prev. Vet. Med*., 82: 321-326.

DIERCKINS, M.S.; SHERMAN, D.M.; GENDRON-FITZPATRICK, A. (1990). Probable paratuberculosis in a Sicilian ass. *J. Am. Vet. Med. Assoc*., 196: 459-461.

DIMARELLI-MALLI, Z.; SARRIS, K. (2001). Comparassion of DNA probe test and cultivation methods for detection of *Mycobacterium avium*subesp. *paratuberculosis* in caprine and ovine faeces. *Aust. Vet. J.*, 79:47-50.

DIMARELLI-MALLI, Z.; SARRIS, K.; PAPADOPOULOS, O.N.I.; XENOS, G.A.M.; PAPADOPOULOS, G. (1997). Evaluation of an inactivated whole cell experimental vaccine against paratuberculosis in sheep and goats. *PTBC Newsletter*, 9: 10-17.

DIMARELLI-MALLI, Z.; SARRIS, K.; XENOS, G.; PAPADOPOULOS, G. (1992). Comparison of the ELISA, AGID, and CF tests for the diagnosis of caprine and ovine paratuberculosis. En: Chiodini, R.J.; Kreeger, J.M. (Eds.). *Proc 3rd Int. Coll. PTBC.* IAP. Providence. EE.UU. pp. 151-155.

DINARELLO, C.A. (1996). Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood*, 87 : 2095-2147.

DJONNE, B.; JENSEN, M.R.; GRANT, I.R.; HOLSTAD, G.(2003). Detection by immunomagnetic PCR of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk from dairy goats in Norway. *Vet. Microbiol*., 92: 135-143.

DJONNE, B.; PAVLIK, I.; SVASTONA, P.; BARTOS, M.; HOLSTAD, G. (2005). IS*900* restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolates from goats and cattle in Norway. *Acta Vet. Scand.* 46: 13-8.

DOHERTY, M.L.; MONAGHAN, M.L.; BASSETT, H.F.; QUINN, P.J. (1995). Effect of a recent injection of purified protein derivative on diagnostic tests for tuberculosis in cattle infected with *Mycobacterium bovis*. *Res. Vet. Sci*., 58: 217-221.

DOHMANN, K.; STROMMENGER, B.; STEVENSON, K.; DE JUAN, L.; STRATMANN, J.; KAPUR, V.; BULL, T.J.; GERLACH, G.F. (2003). Characterization of genetic differences between *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* type I and type II isolates. *J Clin Microbiol*., 41:5215-23.

DOMINGO, M.; LIEBANA, E.; CARRERA, J.; VILAFRANCA, M.; CASAL, J.; ARANAZ, A.; ALTAMIRA, J.; VIDAL, D.; MARCO, A.; PLANELL, J.M.; MATEOS, A.; DOMINGUEZ, L. (1995). Eficacia comparativa de la intradermorreacción y de la prueba de liberación de γ-interferón para el diagnóstico de la tuberculosis bovina en pruebas de campo. *Med. Vet.*, 12: 307-317.

DONAGHY, J.A.; TOTTON, N.L.; ROWE, M.T. (2004). Persistence of *Mycobacterium paratuberculosis* during manufacture and ripening of cheddar cheese. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70: 4899-4905.

DONAT, K.; EULENBERGER, K.; KAMPFER, P. (2005). Blutserologishe Untersuchungen zur Verbreitung von *Mycobacterium avium* spp. *paratuberculosis* in sachsischen Rinderbestanden. *Tieraerzliche Umschau*., 60: 497-501.

DONNELLY, J.J.; ULMER, J.B.; LIU, M.A. (1995). Protective efficacy of intramuscular immunization with naked DNA. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 772: 40-46.

DONNELLY, J.J.; WAHREN, B.; LIU, M.A. (2005). DNA vaccines: progress and challenges. *J.Immunol*., 175: 633-639.

DORSHORST, N.C; COLLINS, M.T.; LOMBARD, J.E. (2006). Decision analysis model for paratuberculosis control in commercial dairy herds. *Prev. Vet. Med*., 75: 92-122.

DOYLE, T.M. (1945). Vaccination against Johne´s disease. *Vet. Rec*., 57: 385-387.

DOYLE, T.M. **(1956).** Johne´s disease. *Vet. Rec***.,** 68: 869-878.

DOYLE, T.M. (1958). Foetal infection in Johne´s disease. *Vet. Rec*.70:238.

DOYLE, T.M. (1964). Vaccination against Johne´s disease. *Vet. Rec*., 76: 73-77.

DOYLE, T.M.(1953). Susceptibility to Johne´s disease in relation to age. *Vet. Rec*., 65**:** 363-365.

DOYLE, T.M.; SPEARS, H.N. (1951). A Johne´s disease survey. *Vet. Rec*., 20: 355-363.

DREIER, S.; KHOL, J.L.; STEIN, B.; FUCHS, K.; GUTLER, S.; BAUMGARTNER, W. (2006). Serological, bacteriological and molecular biological survey of paratuberculosis (Johne's disease) in Austrian cattle. J. *Vet. Med. B. Infect. Dis. Vet. Public Health*, 53: 477-481.

DUBASH, K.; SHULAW, W.P.; BECH-NIELSEN, S.; STILLS, H.F. Jr.; SLEMONS, R.D. (1996). Evaluation of an agar gel immunodiffusion test kit for detection of antibodies to Mycobacterium paratuberculosis in sheep. J Am Vet Med Assoc. 208:401-403.

DUKES, T.W.; GLOVER, G.J.; BROOKS, B.W.; DUNCAN, J.R.; SWENDROWSKI, M. (1992). Paratuberculosis in saiga antelope (*Saiga tatarica*) and experimental transmission to domestic sheep. *J. Wildl. Dis*., 28: 161-170.

DUNDEE, L.; GRANT, I.R.; BALL, H.J.; ROWE, M.T. (2001). Comparative evaluation of four decontamination protocols for the isolation of *Mycobacterium avium* subesp. *paratuberculosis* from milk. *Lett. Appl. Microbiol.*, 33:173-177.

DUNGWORTH, D.L. (1993). The respiratory system. En: Jubb, K.; Kennedy, P.C.; Palmer, N. (Eds). *Pathology of domestic animals*. 4ª ed., Vol.2, pp. 493-504. Academic Press, San Diego, EE.UU.

DUNKIN, G.W. (1934). Johne´s disease. Its economic significance and early detection. *Vet. Rec.,14:*1551-1559.

DUNKIN, G.W.; BALFOUR-JONES, S.E.B. (1935). Preliminary investigation of a disease of sheep processing certain characteristics simulating Johnei disease. *Vet. Microbiol.*, 77: 357-367.

DUNN, J.R.; KANEENE, J.B; GROOMS, D,L.; BOLIN, S.R.; BOLIN, C.A.; BRUNING-FANN, C.S. (2005). Effects of positive results for Mycobacterium avium subsp paratuberculosis as determined by microbial culture of feces or antibody ELISA on results of caudal fold tuberculin test and interferon-gamma assay for tuberculosis in cattle**.***J Am Vet Med Assoc*., 226:429-35.

EAMENS, G.; SPENCE, S.; TURNER, M. (2001). Survival of *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* in amitraz cattle dip fluid. *Aust. Vet. J*., 79: 703-706.

EAMENS, G.J.; WHITTINGTON, RJ, MARSH, I.B.; TURNER, M.J.; SAUNDERS, V.; KEMSLEY, P.D.; RAYWARD, D. (2000). Comparative sensitivity of various faecal culture methods and ELISA in dairy cattle herds with endemic Johne's disease**.** *Vet Microbiol*.77:357-67.

EDA, S.; BANNANTINE, J.P.; WATERS, W.R.; MORI, Y.; WHITLOCK, R.H.; SCOTT, M.C.; SPEER, C.A. (2006). A highly sensitive and subspecies-specific surface antigen enzyme- linked immunosorbent assay for diagnosis of Johne's disease. *Clin Vaccine Immunol*, 13:837-844.

EHLERS, S.; KUTSCH, S.; EHLERS, E.M.; BENINI, J.; PFEFFER, K. (2000). Lethal granuloma disintegration in mycobacteria-infected TNFRp55-/- mice is dependent on T cells and IL-12. *J. Immunol*., 165: 483-492.

EISENBERG, S.W.; NIELEN, M.; SANTEMA, W.; HOUWERS, D.J.; HEEDERIK, D.; KOETS, A.P. (2010). Detection of spatial and temporal spread of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in the environment of a cattle farm through bio-aerosols. *Vet. Microbiol*., 143: 284-292.

EISENBERG, S.W.; KOETS, A.P.; 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.

ELGUEZABAL, N.; ARRAZURIA, R.; MOLINA, E.; SEVILLA, I.A.; GARRIDO, J.M., JUSTE, R.A. (2014). Evaluation of different vaccination strategies of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in rabbits. *Proc. 12nd Int. Coll. PTBC*. Minneapolis. Minnesota. EEUU.

ELGUEZABAL, N.; CHAMORRO, S.; MOLINA, E.; GARRIDO, J.M.; IZETA, A.; RODRIGO, L.; JUSTE, R.A. (2012). Lactase persistence, NOD2 status and *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection associations to Inflammatory Bowel Disease. *Gut. Pathog*., 4:6.

ELLINGSON, J.L.; STABEL, J.R.; RADCLIFF, R.P.; WHITLOCK, R.H.; MILLER, J.M. (2005). Detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in free-ranging bison (*Bison bison*) by PCR. *Mol. Cell. Probes*., 19: 219-225.

ELLIS, T.M.; NORRIS, R.T.; MARTIN, P.; CASEY, R.H.; HAWKINS, C.D. (1998). Evidence for freedom from Johne's disease in cattle and goats in Western Australia. *Aust Vet J*., 76:630-633.

ELTHOLTH, M.M.; MARSH, V.R.; VAN WINDEN, S.; GUITIAN, F.J. (2009). Contamination of food products with *Mycobacterium avium paratuberculosis*: a systematic review. *J. Appl. Microbiol*., 107: 1061-1071.

EL-ZAATARI FA1, NASER SA, ENGSTRAND L, BURCH PE, HACHEM CY, WHIPPLE DL, GRAHAM DY. (1995). Nucleotide sequence analysis and seroreactivities of the 65K heat shock protein from Mycobacterium paratuberculosis.*Clin Diagn Lab Immunol.*, 2: 657-664.

EL-ZAATARI, F.A,; NASER, S.A.; ENGSTRAND, L.; HACHEM, C.Y.; GRAHAM, D.Y. (1994). Identification and characterization of *Mycobacterium paratuberculosis* recombinant proteins expressed in *E. coli.Curr Microbiol*. 29:177-184.

EL-ZAATARI, F.A.; NASER, S.A.; HULTEN, K.; BURCH, P.; GRAHAM, D.Y. (1999. Characterization of Mycobacterium paratuberculosis p36 antigen and its serorectivities in Crohn´s disease. *Curr. Microbiol*., 39: 115-119.

EL-ZAATARI, F.A.; NASER, S.A.; MARKESICH, D.C.; KALTER, D.C.; ENGSTAND, L.; GRAHAM, D.Y. (1996). Identification of *Mycobacterium avium* complex in sarcoidosis. *J. Clin. Microbiol.*, 34: 2240-2245.

EL-ZAATARI, F.A.; OSATO, M.S.; GRAHAM, D.Y. **(2001).** Etiology of Crohn's disease: the role of *Mycobacterium avium paratuberculosis. Trends. Mol. Med.*, 7: 247-252.

EL-ZAATARI, F.A.K.; HULTEN, K.; EL-ZIMAITY, H.M.T.; COLLINS, M.T.; GRAHAM, D.Y. (2002). Pathogenesis of Johne´s disease : a possible role of cell-wall deficient forms of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. En: Juste, R.A.; Geijo, M.V.; Garrido, J.M: (Eds.). *Proc 7th Int. Coll. PTBC*. IAP. Madison, EEUU. pp.: 45-48.

EL-ZAATARI, F.A.K.; HULTEN, K.; EL-ZIMAITY, H.M.T.; COLLINS, M.T.; GRAHAM, D.Y. (2003). Pathogenesis of Johne´s disease : a possible role of cell-wall deficient forms of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. En: Juste, R.A.; Geijo, M.V.; Garrido, J.M: (Eds.). *Proc 7th Int. Coll. PTBC*. IAP. Madison, EEUU. pp.: 45-48.

ELZO, M.A.; RAE, D.O.; LANHART, S.E. (2009). Association between cow reproduction and calf growth traits and ELISA scores for paratuberculosis in multibreed herd of beef cattle. *Trop Anim Health Prod*. 41(6): 851-858.

EMERY, D.L.; WHITTINGTON, R.J. (2004). An evaluation of mycophage therapy, chemotherapy and vaccination for control of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection. *Vet. Microbiol*., 104: 143-155.

ENGLUND, S. (2003). IS900/ERIC-PCR as a tool to distinguís *Mycobacteriumavium* subsp. *paratuberculosis* from closely related micobacteria. *Vet. Microbiol*., 96: 277-287.

ENGLUND, S.; BALLAGI-PORDÁNY, A.; BÖLSKE, G.; JOHANSSON, K.E. (1999). Single PCR and nested PCR with a mimic molecule for detection of*Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Diagn. Microbiol., Infect. Dis.*, 33: 163-171.

ENGLUND, S.; BÖLSKE, G.; BALLAGI-PORDÁNY, A.; JOHANSSON, K.E. (2001). Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in tissue samples by single, fluorescent and nested PCR based on the IS*900* gene. *Vet. Microbiol*., 81: 257-271.

ENGLUND, S.; BÖLSKE, G.; JOHANSSON, K.E. (2002). AnIS*900*-like sequence found in a *Mycobacterium* sp. other than *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis. FEMS Microbiol. Lett.*, 209: 267-271.

EPPLESTON, J. REDDACLIFF, L.; WINDSOR, P.; WHITTINGTON, R.; JONES, S. (2004). Field studies on vaccination for the control of OJD in Australia an overview. En: S.Williams, S (Eds). *ASVS, Eight Mile Plains*, Queensland, Australia. pp: 56-59.

EPPLESTON, J.; REDDACLIFF, L.; WINDSOR, P.; LINKS, I.; WHITTINGTON, R. (2005). Preliminary observations on the prevalence of sheep shedding *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* after 3 years of vaccination program for ovine Johne's disease. *Aust. Vet. J.*, 83: 637-638.

EPPLESTON, J.; WHITTINGTON, R.J. (2001). Isolation of *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* from the semen of rams with clinical Johne's disease. *Aust Vet J*., 79:776-777.

EPPLESTON, J.; WINDSOR, P. (2007). Lesions attributed to vaccination of sheep with Gudair trade mark for the control of ovine paratuberculosis: post farm economic impacts at slaughter. *Aus. Vet. J.*, 85: 129-133.

EPPLESTON, J.; WINDSOR, P.; WHITTINGTON, R. (2011). Effect of unvaccinated Merino wether lambs on shedding of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in flocks vaccinating for ovine Johne's disease. *Aust. Vet. J.*, 89: 38-40.

ERNST, J.D. (1998). Macrophage receptors for *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Immun*., 66: 1277-1281.

ERUME, J.; SPERGSER, J.; ROSENGARTEN, R. (2001). Rapid detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from cattle and zoo animals by nested PCR. *Afr. Health Sci*., 1: 83-89.

EUROPEAN COMMISSION. (2000). Possible links between Crohn´s disease and paratuberculosis: Report of the Scientific Committee on Animal Health and Animal Welfare. Adopted 21 March 2000. (http://www.johnes.org/handouts/files/out38_en.pdf).

FARRERAS, P. (1915). Sobre la enfermedad de Johne. *Revista Veterinaria de España*, IX: 277-283.

FEARON, D.T.; LOCKSLEY, R.M. (1996). The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. *Science*, 272: 50-53.

FECTEAU, M.E.; ROSS, J.; TENNENT-BROWN, B.S.; HABECKER, P.L.; SWEENEY, R.W.; WHITLOCK, R.H. (2009).*Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* high shedding in an adult female alpaca, and its implications for the rest of the herd. *J. Vet. Intern. Med*., 23: 1311-1314.

FEIZABADI, M.M.; ROBERTSON, I.D.; HOPE, A.; COUSINS, D.V.; HAMPSON, D.J. (1997). Differentiation of Australian isolates of *Mycobacterium paratuberculosis* using pulsed-field gel electrophoresis. *Aust. Vet. J.*, 75: 887-889.

FELLER, M.; HUWILER, K.; STEPHAN, R.; ALTPETER, E.; SHANG, A.; FURRER, H.; PFYFFER, G.E.; JEMMI, T.; BAUMGARTNER, A.; EGGER, M. (2007).*Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* and Crohn's disease: a systematic review and meta-analysis. *Lancet. Infect. Dis*., 7: 607-613.

FENHALLS, G.; WONG, A.; BEZUIDENHOUT, J.; VAN HELDEN, P.; BARDIN, P.; LUKEY, P.T. (2000). In situ production of gamma interferon, interleukin-4, and tumor necrosis factor alpha mRNA in human lung tuberculous granulomas. *Infect. Immun.*, 68: 2827-36.

FERNÁNDEZ BENITO, V.; SÁNCHEZ GARCÍA, R.; VELASCO DIEGO, J. (2001). Estimación serológica e intradermorreacción doble (Tuberculosis-Paratuberculosis) en 30 rebaños caprinos de la comarca de Béjar (Salamanca). En: *Producción ovina y caprina*, nº XXVI. SEOC. Sevilla, España. pp. 714-721.

FERNANDEZ DE LUCO, D.; CALVETE, C.; GORTAZAR, C.; BOLEA, R.; GARCIA MARIN, J.F. (1995). Paratuberculosis en el conejo silvestre (*Oryctolagus cuniculus*). VIII Reunión de la Sociedad Española de Anatomía Patológica Veterinaria, León.

FERNÁNDEZ, M.; ALLER, J.M.; ALVAREZ, M. (1980). Prevalencia de la infección en un foco de paratuberculosis ovina. *An. Fac. Vet. Leon*, 27: 131-136.

FERNANDEZ, M.; BENAVIDES, J.; ROYO, M.; FUERTES, M.; CASTAÑO, P.; FERRERAS, M.C.; PEREZ, V. (2014). Diagnóstico de paratuberculosis bovina mediante métodos inmunológicos en sangre y leche y su relación con la excreción de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. XIX *Congreso Internacional de ANEMBE*. Oviedo, España. En prensa.

FERNÁNDEZ, M.; BENAVIDES, J.; SEVILLA, I.A.; FUERTES, M.; CASTAÑO, P.; DELGADO, L.; GARCÍA MARÍN, J.F.; GARRIDO, J.M.; FERRERAS, M.C.; PÉREZ, V. (2014a). Experimental infection of lambs with C and S-type strains of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*: immunological and pathological findings. *Vet. Res.* 16; 45:5.

FERREIRA, R.; FONSECA, L.S.; LILENBAUM, W. (2002). Agar gel immunodiffusion test (AGID) evaluation for detection of bovine paratuberculosis in Rio de Janeiro, Brazil. *Lett. Appl. Microbiol*., 35: 173-175.

FERWERDA, G.; KULLBERG, B.J.; DE JONG, D.J.; GIRARDIN, S.E.; LANGENBERG, D.M.; VAN CREVEL, R.; OTTENHOFF, T.H.; VAN DER MEER, J.W.; NETEA, M.G. (2007).*Mycobacterium paratuberculosis* is recognized by Toll-like receptors and NOD2. *J Leukoc Biol*., 82:1011-1018.

FETHERSTON, C. (1997). M cells: portals to the mucosal immune system. *The Lancet*., 350: 1230.

FIDLER, H.M.; THURRELL, W.; JOHNSON, N.M.; ROOK, G.A.; MCFADDEN, J.J. (1994). Specific detection of *Mycobacterium paratuberculosis* DNA associated with granulomatous tissue in Crohn's disease. *Gut*, 35: 506-10.

FISCHER, O. A.; MÁTLOVÁ, L.; DVORSKÁ, L.; SVÁSTOVÁ, P.; PAVLÍK, I. (2003b). Nymphs of the Oriental cockroach (*Blatta orientalis*) as passive vectors of causal agents of avian tuberculosis and paratuberculosis. *Med. Vet. Entomol*., 17: 145-150.

FISCHER, O. A.; MÁTLOVÁ, L.; DVORSKÁ, L.; SVÁSTOVÁ, P.; PERAL, D.L.; WESTON, R.T.; BARTOS, M.; PAVLÍK, I. (2004). Beatles as possible vectors of infections caused by *Mycobacterium avium* species. *Vet. Microbiol*., 102: 247-255.

FISCHER, O.A.; MATLOVA, L.; BARTL, J.; DVORSKA, L.; SVASTOVA, P.; DU MAINE, R.; MELICHAREK, I.; BARTOS, M.; PAVLIK, I. (2003a). Earthworms (Oligochaeta, Lumbricidae) and mycobacteria. *Vet Microbiol*., 91:325-338.

FISCHER, O.A.; MÁTLOVÁ, L.; DVORSKÁ, L.; SVÁSTOVÁ, P.; BARTL, J.; MELICHÁREK, I.; WESTON, R.T.; PAVLÍK, I. (2001). Diptera as vectors of mycobacterial infections in cattle and pigs. *Med. Vet. Entomol*., 15: 208-211.

FLESCH, I.E.; KAUFMANN, S.H. (1990). Activation of tuberculostatic macrophage functions by gamma interferon, interleukin-4, and tumor necrosis factor.*Infect Immun*., 58:2675-2677.

FLOROU, M.; LEONTIDES, L.; KOSTOULAS, P.; BILLINIS, C.; SOFIA, M.; KYRIAZAKIS, I.; LYKOTRAFITIS, F. (2008). Isolation of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* from non-ruminant wildlife living in the sheds and on the pastures of Greek sheep and goats. *Epidemiol. Infect*., 136: 644-652.

FODSTAD, F.H.; GUNNARSSON, E. (1979). Post-mortem examination in the diagnosis of Johne´s disease in goats. *Acta. Vet. Scand*., 20: 157-167.

FORMICA, S.; ROACH, T. I.; BLACKWELL, J. M. (1994). Interaction with extracellular matrix proteins influences *Lsh/Ity/Bcg* (candidate Nramp) gene regulation of macrophage priming/activation for tumour necrosis factor and nitrite release. *Immunology.*, 82:42.

FRANCIS, J. **(1943).** Infection of laboratory animals with Mycobacterium johnei. *J. Comp. Pathol*., 53: 140-150.

FRANCIS, J.; MACTURK, H.M.; MADINAVEITIA, J.; SNOW, G.A. (1953). Mycobactin. A growth factor for *Mycobacterium johnei*. I.- Isolation from *Mycobacterium johnei*. *Biochem J*. 55: 596-607.

FRANK, T.S.; COOK, S.M. (1996). Analysis of paraffin sections of Crohn's disease for *Mycobacterium paratuberculosis* using polymerase chain reaction. *Mod. Pathol*., 9: 32-35.

FRATAZZI, C.; ARBEIT, R.D.; CARINI, C.; BALCEWICZ-SABLINSKA, M.K.; KEANE, J.; KORNFELD, H.; REMOLD, H.G. (1999). Macrophage apoptosis in mycobacterial infections. *J. Leukoc. Biol*., 66: 763-764.

FREHEL, C.; CANONNE-HERGAUX, F.; GROS, P.; DE CHASTELLIER, C. (2002). Effect of Nramp1 on bacterial replication and on maturation of Mycobacterium avium-containing phagosomes in bone marrow-derived mouse macrophages. *Cell Microbiol*., 4: 541-556.

FRELIER, P.F.; TEMPLETON, J.W.; ESTES, M.; WHITFORD, H.W.; KIENLE, R.D. (1990). Genetic regulation of *Mycobacterium paratuberculosis* infection in recombinant inbred mice. *Vet. Pathol*. 27: 362-364.

FRIDRIKSDOTTIR, V.; GUNNARSSON, E.; SIGURDARSON, S.; GUDMUNDSDOTTIR, K.B. (2000). Paratuberculosis in Iceland: epidemiology and control measures, past and present. *Vet. Microbiol.* 77: 263-267.

FRITSCHE, G.; DLASKA, M.; BARTON, H.; THEURL, I.; GARIMORTH, K.; WEISS, G. (2003). Nramp 1 functionality increases inductible nitric oxide synthase transcriotion via stimulation of INF regulatory factor 1 expression. *J. Immunol.*, 171: 1994-1998.

FUENTES, O.; CEBRIAN, J. (1988). El conejo de monte ¿reservorio de la paratuberculosis ovina y caprina? *Symposium de Patología Ovina y Caprina, I*, p. 32. AIDA, Zaragoza.

FUJIMURA, Y.; OWEN, R.L. (1996). M cells as portals of infection: clinical and pathophysiological aspects. *Infect. Agents Dis*., 5: 144-156.

FUKAO, T.; MATSUDA, S.; KOYASU, S. (2000). Synergistic effects of IL-4 and IL-18 on IL-12-dependent IFN-gamma production by dendritic cells. *J. Immunol*., 164: 64-71.

GALLATI, H.; PRACHT, I.; SCHMIDT, J.; HÄRING, P.; GAROTTA, G. (1987). A simple, rapid and large capacity ELISA for biologically active native and recombinant human IFN gamma. J Biol Regul Homeost Agents. 1987 Jul-Sep;1(3):109-18.

GANS, H.A.; ARVIN, A.M.; GALINUS, J.; LOGAN, L.; DeHOVITZ, R.; MALDONADO, Y.(1998). Deficiency of the humoral immune response to measles vaccine in infants immunized at age 6 months. *JAMA*, 280: 527-532.

GAO, A.; MUTHARIA, L.; CHEN, S.; RAHN, K.; ODUMERU, J. (2002). Effect of pasteurization on survival of *Mycobacterium paratuberculosis* in milk. *J. Dairy Sci*., 85: 3198-3205.

GAO, A.; ODUMERU, J.; RAYMOND, M.; HENDRICK, S.; DUFFIELDD, T.; MUTHARIA, L. (2009). Comparison of milk culture, direct and nested polymerase chain reaction (PCR) with fecal culture based on samples from dairy herds infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Can. J. Vet. Res*., 73: 58-64.

GARCÍA MARÍN, J.F.; BENAZZI, S.; PEREZ, V.; BADIOLA, J.J.(1992a). Study of entrance of *M. paratuberculosis* in the lambs intestinal mucosa using immunohistochemical methods for antigens detection. En: Chiodini, R.J.; Kreeger, J.M. (Eds.). *Proc 3rd Int. Coll. PTBC*. IAP. Providence. EE.UU. pp 371-377.

GARCÍA MARÍN, J.F.; CHAVEZ, G.; ADÚRIZ, J.J.; PÉREZ, V.; JUSTE, R.A.; BADIOLA, J.J. (1992b). Prevalence of paratuberculosis in infected goats flocks and comparison of different methods of diagnosis. En: Chiodini, R.J.; Kreeger, J.M. (Eds.). *Proc 3rd Int. Coll. PTBC*. IAP. Providence. EE.UU. pp 157-163.

GARCÍA MARÍN, J.F.; JUSTE, R.A.; PERIS, B.; MARCO, J.C.; SÁEZ DE OCÁRIZ, O.; BADIOLA, J.J. (1988). Study of the initial phases of the experimental infection with *Mycobacterium paratuberculosis* in vaccinated and unvaccinated sheep.En: Thorel, M.F.; Merkal, R.S. (Eds.). *Proc 2nd Int. Coll. PTBC*. IAP. Paris. Francia. pp 354-360.

GARCÍA MARÍN, J.F.; PEREZ, V.; BADIOLA, J.J. (1992c). Prevalence and type of paratuberculosis lesions in sheep and their relation with the diagnosis by AGID test. En: Chiodini, R.J.; Kreeger, J.M. (Eds.). *Proc 3rd Int. Coll. PTBC*. IAP. Providence. EE.UU. pp. 172-180.

GARCÍA MARÍN, J.F.; PEREZ, V.; GONZÁLEZ, J. (2000). La interacción bovino-bacteria y los mecanismos de enfermedad. En: Juste Editor. Paratuberculosis. *BOVIS*, Aula Veterinaria, vol. nº 93, pp. 29-38.

GARCÍA MARÍN, J.F.; PERIS, B.; JUSTE, R.; PEREZ, V.; CHÁVEZ, G.; BOLEA, R.; GUTIÉRREZ, M.; TELLECHEA, J.M.; BADIOLA, J.J. (1995a). Studies on pathogenesis of ovine paratuberculosis. *Proc. XIII Congr. Eur. Soc. Vet. Pathol.* Edimburgo. Reino Unido.

GARCIA MARIN, J.F.; PERIS, B.; PEREZ, V.; BADIOLA, J.J. (1995c). Pathological findings in lambs experimentally infected with Mycobacterium avium subsp. silvaticum and Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis. En: Chiodini, R.J. (Ed.). *Proc 4th Int. Coll. PTBC*. IAP. Rehoboth. EEUU. pp. 208.

GARCÍA MARÍN, J.F.; TELLECHEA, J.; GUTIÉRREZ, M. ; PÉREZ, V. (1995b). Histopathological evaluation of a killed vaccine against paratuberculosis in sheep. *Proc. XIII Congr. Eur. Soc. Vet. Pathol.* Edimburgo. Reino Unido.

GARCÍA MARÍN, J.F.; TELLECHEA, J.; GUTIÉRREZ, M. ; PÉREZ, V. ; JUSTE, R.A. (1997). Paratuberculosis vaccination in sheep modifies and limits the development of lesions. En: Chiodini, R.J.; Hines, M.E.; Collins, M.T. (Eds.). *Proc 5th Int. Coll. PTBC*. IAP. Rehoboth. EEUU. pp. 223.

GARCÍA MARÍN, J.F.; TELLECHEA, J.; GUTIÉRREZ, M.; CORPA, J.M.; PÉREZ, V. (1999b). Evaluation of two vaccines (Killed and attenuated) against small ruminant paratuberculosis. *Abstacts of the 6th International Colloquium on Paratuberculosis.* Melbourne. Australia. pp.:40.

GARCÍA MARÍN, J.F.; TELLECHEA, J.M.; CORPA, M.; GUTIÉRREZ, M.; PEREZ, V. (1999a). Relationship between ovine paratuberculosis lesions and cellular and humoral immune responses in diagnostic tests. En: Manning, E.J.B.; Collins, M.T. (Eds.). *Proc 6th Int. Coll. PTBC*. IAP. Madison, EEUU. pp. 593-598.

GARCÍA PARIENTE, C.; MORENO, O.; MUÑOZ, M.; GONZÁLEZ, J.; REYES, L.E.; JUSTE, R.1; BENAVIDES, J.; FUERTES, M.; FERRERAS, M.C.; GARCÍA MARÍN, J.F. Y PÉREZ, V. (2004). Vacunación de ovinos adultos frente a paratuberculosis: seguimiento durante tres años en un rebaño de raza assaf. En: *Producción ovina y caprina*, nº XXIX. SEOC. Lleida., España. pp. 260-262.

GARCÍA-MARÍN, J.F.; PÉREZ, V.; GARCÍA DE JALÓN, J.A.; DE LAS HERAS, M.; BARBERÁN, M.; FERNÁNDEZ DE LUCO, D.; BADIOLA, J.J. (1994). Diagnóstico de casos clínicos de paratuberculosis ovina y caprina. *Med. Vet*., 11: 491-502.

GARCÍA-PARIENTE, C.; GONZÁLEZ, J.; FERRERAS, M.C.; FUERTES, M.; BENAVIDES, J.; REYES, L.E.; MORENO, O.; GARCIA-MARÍN, J.F.; PÉREZ, V. (2002). Paratuberculosis vaccination of adult animals in two flocks of dairy sheep. En: Juste, R.A.; Geijo, M.V.; Garrido, J.M: (Eds.). *Proc 7th Int. Coll. PTBC*. IAP. Bilbao, España. pp. 507-510.

GARCÍA-PARIENTE, C.; PÉREZ, V.; GEIJO, M.V.; MORENO, O.; MUÑOZ, M.; FUERTES, M.; PUENTES, E.; DOCE, J.; FERRERAS, M.C.; GARCIA-MARÍN, J.F. (2005). The efficacy of a killed vaccine against paratuberculosis (SILIRIUM®) in cattle. A field study. En: Manning, E.B.; Nielsen, S.S. (Eds.). *Proc 8th Int. Coll. PTBC*. IAP. Madison, EEUU. pp. 208-217.

GARRIDO JM, ADURIZ G, GEIJO MV, SEVILLA I, JUSTE RA. (2002). Comparison of different indirect ELISA methods on reference cattle. En: Juste, R.A.; Geijo, M.V.; Garrido, J.M: (Eds.). *Proc 7th Int. Coll. PTBC.* Bilbao, España.

GARRIDO, J.M. (2001). Puesta a punto de las técnicas de PCR en heces y de ELISA para el diagnóstico de la paratuberculosis. Estudio de prevalencia en ganado bovino. *Tesis Doctoral.* Universidad de Zaragoza.

GARRIDO, J.M.; ADURIZ, G.; GARCÍA-MARÍN, J.F.; PÉREZ, V.; CHÁVEZ, G.; JUSTE, R.A. (1998a). Mejora del ELISA indirecto para el diagnóstico de la paratuberculosis ovina. En: *Producción ovina y caprina*, nº XXIII SEOC. Vitoria., España. pp. 287-290.

GARRIDO, J.M.; ADURIZ, G.; GARCÍA-MARÍN, J.F.; PÉREZ, V.; CORPA, J.M.; JUSTE, R.A. (1999). A new assessment of the absorbent ELISA for diagnosis of ovine paratuberculosis. En: Chiodini, R.J.; Collins, M.T: Bassey, E.O.E. (Eds.).*Proc4th Int. Coll. PTBC.* IAP. Melbourne, Australia.pp 395-399.

GARRIDO, J.M.; ADURIZ, G.; JUSTE, R.A.; GEIJO, M.V.(2000a). Los métodos de diagnóstico de la paratuberculosis en el ganado vacuno. En: Juste Editor. Paratuberculosis*. BOVIS*, Aula Veterinaria, vol. nº 93, pp. 49-61.

GARRIDO, J.M.; CORTABARRÍA, N.; ADÚRIZ, G.; JUSTE, R.A. (1998b). Utilización de la PCR como técnica de diagnóstico de paratuberculosis a partir de heces. En: *Producción ovina y caprina*, nº XXIII. SEOC. Vitoria. pp. 291-294.

GARRIDO, J.M.; CORTABARRÍA, N.; OGUIZA, J.A.; ADÚRIZ, G.; JUSTE, R.A. (2000b). Use of a PCR method on fecal samples for diagnosis of sheep paratuberculosis. *Vet. Microbiol*., 77: 379-386.

GARRIDO, J.M.; PLAZAOLA, J.M.; SEVILLA, I.; GEIJO, M.V.; ELGUEZABAL, N.; ADURIZ, G.; DOCE, J.; PUENTES, E.; JUSTE, R.A. (2005). Control of paratuberculosis in dairy farms in the Basque Country. En: Manning, E.B.; Nielsen, S.S. (Eds.). *Proc 8th Int. Coll. PTBC.* IAP. Madison, EEUU. pp. 261.

GARRIDO, J.M.; VÁZQUEZ, P.; MOLINA, E.; PLAZAOLA, J.M.; SEVILLA, I.A.; GEIJO, M.V.; ALONSO-HEARN, M.; JUSTE, R.A. (2013). Paratuberculosis vaccination causes only limited cross-reactivity in the skin test for diagnosis of bovine tuberculosis. *PLoS One*, 8: e80985.

GASTEINER, J.; AWAD-MASALMEH, M.; BAUMGARTNER, W. (2000). *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in cattle in Austria, diagnosis with culture, PCR and ELISA. *Vet Microbiol*., 77:339-349.

GASTEINER, J.; AWAD-MASALMEH, M.; BAUMGARTNER, W. (2000). *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in cattle in Austria, diagnosis with culture, PCR and ELISA. *Vet Microbiol*., 77:339-349.

GASTEINER, J.; WENZL, H.; FUCHS, K.; JARK, U.; BAUMGARTNER W. (1999). Serological cross-sectional study of paratuberculosis in cattle in Austria. *Zentralbl Veterinarmed B*., 46:457-466.

GAZOULI, M.; MANTZARIS, G.; KOTSINAS, A.; ZACHARATOS, P.; PAPALAMBROS, E.; ARCHIMANDRITIS, A.; IKONOMOPOULOS, J.; GORGOULIS, VG. (2005). Association between polymorphisms in the Toll-like receptor 4, CD14, and CARD15/NOD2 and inflammatory bowel disease in the Greek population. *World. J. Gastroenterol.*, 11: 681-685

GEIJO, M.V. (2007). Estudio de variables inmunológicas y bacteriológicas en relación con la inmunización frente a paratuberculosis en los rumiantes. Tesis Doctoral. Universidad de León.

GEY VAN PITTIUS, N.C.; GAMIELDIEN, J.; HIDE, W.; BROWN, G.D.; SIEZEN, R.J.; BEYERS, A.D. (2001). The ESAT-6 gene cluster of Mycobacterium tuberculosis and other high G+C Gram-positive bacteria. *Genome Biol.* 2: 1-18.

GHADIALI, A.H.; STROTHER, M.; NASER, S.A.; MANNING, E.J.; SREEVATSAN, S. (2004). *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* strains isolated from Crohn's disease patients and animal species exhibit similar polymorphic locus patterns. *J. Clin. Microbiol*., 42: 5345-5348.

GIACOMETTI, M.; TOLARI, F.; MANNELLI, A.; LANFRANCHI, P. (1995). Seroepidemiologic investigations in the Alpine ibex (Capra i. ibex) of Piz Albris in the canton of Grigioni (Switzerland). *Schweiz Arch Tierheilkd*. 137:537-542.

GIESE SB1, AHRENS P. (2000). Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk from clinically affected cows by PCR and culture. *Vet Microbiol*. 77:291-217.

GILLAN, S.; HUGHES, A.D.; O´BRIEN, R.; GRIFFIN, J.F. (2010a). Ovine immune parameters following immunisation against *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* using a lipid-based live-cell vaccine. *Vet. Immunol. Immunopathol*., 137: 109-119.

GILLAN, S.; O´BRIEN, R.; HUGHES, A.D.; GRIFFIN, J.F. (2010b). Identification of immune parameters to differentiate disease states among sheep infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Clin. Vaccine Immunol*., 17: 108-117.

GILMOUR, N.J. (1965). Recent research on Johne´s disease. *Vet. Rec*., 77: 1322-1330.

GILMOUR, N.J. (1976).The pathogenesis, diagnosis and control of Johne's disease. *Vet. Rec*., 99: 433-434.

GILMOUR, N.J.; ANGUS, K.W. (1976). The specificity and sensitivity of the fluorescent antibody test in cattle experimentally infected with *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium johnei*. *Res. Vet. Sci*., 20: 6-9**.**

GILMOUR, N.J.; ANGUS, K.W. (1991). Johne´s disease. En: Martin y Aitken (Eds.) Diseases of sheep, 2. pp. 95-99. Blackwell Scientific Publications. Londres.

GILMOUR, N.J.; ANGUS, K.W.(1973). Effect of revaccination on Mycobacterium johnei infection in sheep. *J. Comp. Pathol.*, 83: 437-45.

GILMOUR, N.J.; BROTHERSTON, J.G. (1962). Quantitative studies of *Mycobacterium johnei* in the tissues of sheep. IV. The distribution of *M. johnei* shortly after oral dosing. *J. Comp. Pathol*., 72: 165-169.

GILMOUR, N.J.; BROTHERSTON, J.G. (1966). Further studies on immunity to *Mycobacterium johnei* in sheep. Relationship between Hypersensitivity and host response to infection. *J. Comp. Pathol*., 76: 341-349.

GILMOUR, N.J.; CAMPBELL, J.; BROTHERSTON, J.G. (1963). The pathogenesis of *Mycobacterium johnei* in orally dosed hamsters. *J. Comp. Pathol*., 73: 98-106.

GILMOUR, N.J.; HALHEAD, W.A.; BROTHERSTON, J.G. (1965b). Studies of immunity to *Mycobacterium johnei* in sheep. *J. Comp. Pathol*., 75: 165-173.

GILMOUR, N.J.; NISBET, D.I.; BROTHERSTON, J.G. (1965a). Experimental oral infection of calves with *Mycobacterium johnei. J. Comp. Pathol*., 75: 281-286.

GILMOUR, N.J.L. (1966). Studies on the effect of the rimino phenazine B663 (G30320) on *Mycobacterium johnei.* Brit. Vet. J. 122: 517-521.

GILMOUR, N.J.L. (1968). The effect of the rimino phenazine B663 (G30320) on pre-clinical M. johnei. Infections in sheep.*Brit. Vet. J*. 124: 492-497.

GILMOUR, N.J.L.; ANGUS, K.W.; MITCHELL, B. (1978). Intestinal infection and host response to oral administration of *Mycobacterium johnei* in sheep. *Vet. Microbiol*., 2:223-235.

GILMOUR, N.J.L.Y ANGUS, K.W. (1971). Effect of the rimino phenazine B663 (G30320) on *Mycobacterium.* Infection and reinfection in sheep.*J Comp. Path.* 81: 221-226.

GILOT, P.; COCITO, C. (1993). Comparative analysis of three sensitins used in cutaneous testing for tuberculosis and paratuberculosis in cattle. *FEMS Microbiol Lett*., 110:307-11.

GILOT, P.; DE KESEL, M.; MACHTELINCKS, 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: 4930-4935.

GITNICK, G.; COLLINS, J.; BEAMAN, B.; BROOKS, D.; ARTHUR, M.; IMAEDA, T.; PALIESCHESKY, M. (1989). Preliminary report on isolation of mycobacteria from patients with Crohn's disease. Dig. Dis. Sci., 34: 925-32.

GLANEMANN, B.; HOELZLE, L.E.; BOGLI-STUBER, K.; JEMMI, T.; WITTENBRINK, M.M. (2004). Detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in Swiss dairy cattle by culture and serology. *Schweis. Arch. Tierheilkd*., 146: 409-415.

GLAWISCHING, W.; AWAD-MASALMEH, M.; KHASCHABI, D.; SCHONBAUER, M. (2004). Detection of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis from the testicles of a clinically infected breeding animal. *Berl.Munch. Tierartzl. Wochenschr*., 117: 136-139.

GODDEN, S.; MCMARTIN, S.; FEIRTAG, J.; STABEL, J.; BEY, R.; GOYAL, S.; METZGER, L.; FETROW, J.; WELLS, S.; CHESTER-JONES, H. (2006). Heat-treatment of bovine colostrum. II: effects of heating duration on pathogen viability and immunoglobulin G. *J. Dairy Sci.*, 89: 3476-3483.

GODFROID, J.; BOELAERT, F.; HEIER, A.; CLAVAREAU, C.; WELLEMANS, V.; DESMECHT, M.; ROELS, S.; WALRAVENS, K. (2000). First evidence of Johne's disease in farmed red deer (*Cervus elaphus*) in Belgium. *Vet. Microbiol*., 77: 283-290.

GONZALEZ LLAMAZARES, O.R.; GUTIERREZ MARTÍN, C.B.; ÁLVAREZ, N.D.; DE LA PUENTE REDONDO, V.A.; DOMÍNGUEZ, R.L.; RODRÍGUEZ FERRI, E.F. (1999). Field evaluation of the single intradermal cervical tuberculin test and the interferon-gamma assay for detection and eradication of bovine tuberculosis in Spain. *Vet. Microbiol*., 70: 55-66.

GONZÁLEZ, J. (1998). Empleo de un método histológico para el estudio de la prevalencia de la paratuberculosis ovina. *Tesina de Licenciatura*. Universidad de León.

GONZÁLEZ, J. (2003). Caracterización lesional y evaluación de técnicas diagnósticas de la paratuberculosis bovina. *Tesis Doctoral*. Universidad de León.

GONZÁLEZ, J.; GEIJO, M.V.; GARCÍA-PARIENTE, C.; VERNA, A.; CORPA, J.M.; REYES, L.E.; FERRERAS, M.C.; JUSTE, R.A.; GARCÍA MARÍN, J.F.; PÉREZ, V.(2005). Histopathological classification of lesions associated with natural paratuberculosis infection in cattle. *J. Comp. Pathol*., 133: 184-196.

GOODGER, W.J.; COLLINS, M.T.; NORDLUND, K.V.; EISELE, C.; PELLETIER, J.; THOMAS, C.B.; SOCKETT, D.C. (1996). Epidemiologic study of on-farm management practices associated with prevalence of *Mycobacterium paratuberculosis* infections in dairy cattle. *J. Am. Vet. Med. Assoc*., 208: 1877-1881.

GORMLEY, E.; DOYLE, M.B.; FITZSIMONS, T.; MCGILL, K.; COLLINS, J.D. (2006). Diagnosis of Mycobacterium bovis infection in cattle by use of gamma-interferon (Bovigam®) assay. *Vet. Microbiol*.,112: 171-179.

GORMLEY, E.; DOYLE, M.B.; McGILL, K.; COSTELLO, E.; GOOD, M.; COLLINS, J.D. (2004). The effect of the tuberculin test and the consequences of a delay in blood culture on the sensitivity of a gamma-interferon assay for the detection of *Mycobacterium bovis* infection in cattle.*Vet. Immunol. Immunopathol*., 102: 413-420.

GOSWANI, T.K.; JOADAR, S.N.; RAM, G.C. (2000). In-vitro and in-vivo detection of cross-reacting antigens of M. paratuberculosis and M. bovis. *J. Appl. Anim. Res.*, 17: 285-290.

GOUDSWAARD, J. (1970). Een onderzoek naar het vookomen vn Mycobacterium johenei in de organen van experimenteel besmette geiten, *Tijdschr, Diergeneesk*., 95: 1025-1035.

GOUDSWAARD, J. (1972). De Ziekte van Johne bij de geit: verslag van enige onderzoekingen betreffende de immunogene en chemotherapeutische profylaxe ende serologische diagnostick van deze ziekte. *Tijdschr. Diergeneesk*. 97: 827-834.

GOUDSWAARD, J.; GILMOUR, N.J.; DIJKSTRA, R.G.; VAN BEEK, J.J. (1976). Diagnosis of Johne's disease in cattle: a comparison of five serological tests under field conditions. *Vet. Rec*., 98:461-2.

GOYETTE, P.; LABBÉ, C.; TRINH, T.T.; XAVIER, R.J.; RIOUX, J.D. (2007). Molecular pathogenesis of inflammatory bowel disease: genotypes, phenotypes and personalized medicine. *Ann. Med*., 39: 177-199.

GRANGE, J.M. (1990). The Mycobacteia. En: Parker, M.T. & Duerden B.I. Edward Arnold editors. *Topley & Wilsnon´s.Principles of Bacteriology, Virology and Immunity*.8ª edición. 2:74-97. Londres, Reino Unido.

GRANGE, J.M.; YATES, M.D.; BOUGHTON, E. (1990). The avian tubercle bacillus and its relatives. *J. Appl. Microbiol*., 68: 411-431.

GRANT, I.R. (2003).*Mycobacterium paratuberculosis* and milk. *Acta. Vet. Scand*., 44: 261-266.

GRANT, I.R. (2005). Zoonotic potential of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*: the current position. *J. Appl. Microbiol*., 98: 1282-1293.

GRANT, I.R.; BALL, H.J.; ROWE, M. (1998). Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from milk by immunomagnetic separation. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64:3153-3158.

GRANT, I.R.; O´RIORDAN, L.M.; BALL, H.J.; ROWE, M.T. (2001). Incidence of *Mycobacterium paratuberculosis* in raw sheep and goats' milk in England, Wales and Northern Ireland. *Vet. Microbiol*., 79: 123-131.

GRANT, I.R.; HITCHINGS. E.I.; MCCARTNEY, A.; FERGUSON, F.; ROWE, M.T. (2002). Effect of commercial-scale high-temperature, short-time pasteurization on the viability of *Mycobacterium paratuberculosis* in naturally infected cows' milk. *Appl. Environ. Microbiol*., 68: 602-7.

GREEN, E.P.; TIZARD, M.L.; MOSS, M.T.; THOMPSON, J.; WINTERBOURNE, D.J.; McFADDEN, J.J.; HERMON-TAYLOR, J. (1989). Sequence and characteristics of IS*900*, an insertion element identified in a human Crohn's disease isolate of *Mycobacterium paratuberculosis. Nucleic Acid. Res*., 17: 9063-9073.

GREEN, L.R.; JONES, C.C.; SHERWOOD, A.L.; GARKAVI, I.V.; CANGELOSI, G.A.; THACKER, T.C.; PALMER, M.V.; WATERS,W.R.; RATHE, C.V. (2009). Single-Antigen Serological Testing For Bovine Tuberculosis. *Clin. Vaccine Immunol.*, 16: 1309-1313.

GREENSTEIN, R.J. (2003). Is Crohn's disease caused by a mycobacterium? Comparisons with leprosy, tuberculosis, and Johne's disease. *Lancet. Infect. Dis*., 3: 507-514.

GREENSTEIN, R.J.; COLLINS, M.T. (2004). Emerging pathogens: is *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* zoonotic? *Lancet*, 364: 396-7.

GREENSTEIN, R.J.; SU, L.; HAROUTUNIAN, V.; SHAHIDI, A.; BROWN, S.T. (2007a). On the action of methotrexate and 6-mercaptopurine on *M. avium* subspecies *paratuberculosis*. *PLoS One*, 2: e161.

GREENSTEIN, R.J.; SU, L.; JUSTE, R.A.; BROWN, S.T. (2008). On the action of cyclosporine A, rapamycin and tacrolimus on *M. avium* including subspecies *paratuberculosis*. *PLoS One*, 3: e2496.

GREENSTEIN, R.J.; SU, L.; SHAHIDI, A.; BROWN, S.T. (2007b). On the action of 5-amino-salicylic acid and sulfapyridine on *M. avium* including subspecies *paratuberculosis*. *PLoS One*, 2: e516.

GREER, C.E.; PETERSON, S.L.; KIVIAT, N.B.; MANOS, M.M. (1991). PCR amplification from paraffin-embedded tissues. Effects of fixative and fixation time. *Am. J. Clin. Pathol*., 95: 117-124.

GREIG, A.; STEVENSON, K.; HENDERSON, D.; PÉREZ, V.; HUGHES, V.; PAVLIK, I.; HINES M.E. 2ND.; McKENDRICK, I.; SHARP, J.M. (1999). Epidemiological study of paratuberculosis in wild rabbits in Scotland. *J. Clin. Microbiol*., 37: 1746-1751.

GREIG, A.; STEVENSON, K.; PÉREZ, V.; PIRIE, A.A.; GRANT, J.M. SHARP, J.M. (1997). Paratuberculosis in wild rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). *Vet. Rec*., 140: 141-143.

GRIEBEL, P.J.; DAVIS, W.C.; REYNOLDS, J.D. (1992). An analysis of the growth and differentiation of B cells isolated from follicles of the ileal Peyer's patch of sheep. *Immunology*, 75: 601-607.

GRIEBEL, P.J.; HEIN, W.R. (1996). Expanding the role of Peyer's patches in B-cell ontogeny. *Immunol. Today*, 17: 30-39.

GRIFFIN, J.F.; HUGHES, A.D.; LIGGETT, S.; FARQUHAR, P.A.; MACKINTOSH, C.G.; BAKKER, D. (2009). Efficacy of novel lipid-formulated whole bacterial cell vaccines against *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in sheep. *Vaccine*. 27(6): 911-918.

GRIFFIN, J.F.; SPITTLE, E.; RODGERS, C.R.; LIGGETT, S.; COOPER, M.; BAKKER, D.; BANNANTINE, J.P. (2005). Immunoglobulin G1 enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of Johne's Disease in red deer (*Cervus elaphus*). *Clin. Diagn. Lab. Immunol*., 12: 1401-9.

GROENENDAAL, H.; NIELSEN, M.; JALVINGH, A.W.; HORST, S.H.; GALLIGAN, D.T.; HESSELINK, J.W. (2002). A simulation of Johne's disease control. *Prev. Vet. Med*., 54: 225-245.

GUI, G.P.; THOMAS, P.R.; TIZARD, M.L.; LAKE, J.; SANDERSON, J.D.; HERMON-TAYLOR, J. (1997). Two-year-outcomes analysis of Crohn's disease treated with rifabutin and macrolide antibiotics. *J. Antimicrob. Chemother*., 39: 393-400.

GUILBERT, M.H.; ARGENTÉ, G.; THOREL, M.F. (1999). Prevalence of bovine paratuberculosis in France in 1997. En: Manning, E.J.B.; Collins, M.T. (Eds.). *Proc 6th Int. Coll. PTBC*. IAP. Madison, EEUU. pp 248-251.

GUILLOU, J.P.; HÉNAULT, S.; OSTYN, A.; THOREL, M.F. (1993). Use of the in vitro enzymatic amplification method for the detection of Mycobacterium paratuberculosis in feces. *Rev. Sci. Tech.* 12:605-615.

GUMBER, S.; EAMENS, G.; WHITTINGTON, R.J. (2006). Evaluation of a Pourquier ELISA kit in relation to agar gel immunodiffusion (AGID) test for assessment of the humoral immune response in sheep and goats with and without Mycobacterium paratuberculosis infection. *Vet Microbiol.*, 115:91-101.

GUMBER, S.; WHITTINGTON, R.J. (2006). Comparison of BACTEC 460 and MGIT 960 systems for the culture of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* S strain and observations on the effect of inclusion of ampicillin in culture media to reduce contamination. *Vet. Microbiol*., 119: 42-52.

GUNNARSSON, E.; FODSTAD, F.H. (1979). Cultural and biochemical characteristics of *Mycobacterium paratuberculosis* isolated from goats in Norway. *Acta. Vet. Scand*., 20: 122-134.

GUPTA, R.K. (1996). **Is the test for abnormal toxicity, general safety or innocuity necessary for vaccines? *Vaccine*, 14: 1718.**

GUPTA, R.K.; SIBER, G.R. (1995). Adjuvants for human vaccines--current status, problems and future prospects. *Vaccine*,13: 1263-76.

GURUNATHAN, S.; KLINMAN, D.M.; SEDER, R.A. (2000A). DNA vaccines: immunology, application, and optimization. *Annu. Rev. Immunol.,* 18:9 27-74.

GURUNATHAN, S.; STOBIE, L.;PRUSSIN, C.; SACKS, D.L.;GLAICHENHAUS, N.; IWASAKI, A.;FOWELL, D.J.; LOCKSLEY, R.M.; CHANG, J.T.; WU, C.Y.; SEDER, R.A. (2000B). Requirements for the maintenance of Th1 immunity in vivo following DNA vaccination: a potential immunoregulatory role for CD8+ T cells. *J. Immunol.* 165: 915-24.

GURUNG, R.B.; BEGG ,D.J.; PURDIE, A.C.; DE SILVA, K.; BANNANTINE, J.P.; WHITTINGTON, R.J. (2014). Lymphoproliferative and gamma interferon responses to stress-regulated *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* recombinant proteins. *Clin. Vaccine Immunol*., 21: 831-837.

GUTIERREZ CANCELA, M. (1996). Contribución al conocimiento anatomopatológico y diagnóstico de la tuberculosis caprina y bovina por *Mycobacterium bovis. Tesis doctoral*. Universidad de León.

GUTIERREZ CANCELA, M.; GARCIA MARIN, J.F. (1993). Comparision of Ziehl-Neelsen stainig and immunohistochemistry for the detection of *Mycobacterium bovis in* bovine and caprine tuberculosis lesions. J. *Comp. Pathol.,* 109: 361- 370.

GUTIÉRREZ, M.; TELLECHEA, J.; GARCÍA-MARÍN, J.F. (1998). Evaluation of cellular and serological diagnostic tests for the detection of *Mycobacterium bovis*-infected goats. *Vet. Microbiol*., 62: 281-290.

GWOZDZ, J.M.; REICHEL, M.P.; MURRAY, A.; MANKTELOW, W.; WEST, D.M.; THOMPSON, K.G. (1997). Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in ovine tissues and blood by the polymerase chain reaction. *Vet. Microbiol*., 57: 233-244.

GWOZDZ, J.M.; THOMPSON, K.G. (2002). Antigen-induced production of interferon-gamma in samples of peripheral lymph nodes from sheep experimentally inoculated with *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis.Vet. Microbiol*. 84: 243-252.

GWOZDZ, J.M.; THOMPSON, K.G.; MANKTELOW, B.W. (2001). Lymphocytic neuritis of the ileum in sheep with naturally acquired and experimental paratuberculosis. *J. Comp. Pathol*., 124: 317-320.

GWOZDZ, J.M.; THOMPSON, K.G.; MANKTELOW, B.W.; MURRAY, A.; WEST, D.M. (2000a). Vaccination against paratuberculosis of lambs already infected experimentally with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosi*s. *Aust. Vet. J*., 78: 560-566.

GWOZDZ, J.M.; THOMPSON, K.G.; MURRAY, A.; REICHEL, M.P.; MANKTELOW, B.W.; WEST, D.M. (2000b). Comparison of three serological tests and an interferon-gamma assay for the diagnosis of paratuberculosis in experimentally infected sheep. *Aust. Vet. J.* 78: 779-783.

GWOZDZ, J.M.; THOMPSON, K.G.; MURRAY, A.; WEST, D.M.; MANKTELOW, B. W. (2000c). Use of the polymerase chain reaction assay for the detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in blood and liver biopsies from experimentally infected sheep. *Aust. Vet. J.,* 78: 622-624.

HACKAM, D.J.; ROTSTEIN, O.D.; ZHANG, W.; GRUENHEID, S.; GROS, P.; GRINSTEIN, S. (1998). Host resistance to intracellular infection: mutation of natural resistance-associated macrophage protein 1 (Nramp1) impairs phagosomal acidification. *J Exp Med*., 188:351-364.

HAGAN, W.A. (1935). Vaccination against Johne's disease. Cornell Vet., 25: 344-353.

HAGAN, W.A.(1938). Age as a factor in susceptibility to Johne´s disease. *Cornell Vet*., 28: 34-40.

HAGHKHAH, M.; ANSARI-LAR, I M.; NOVIN-BAHERAN, A.M.; BAHRAMY, A. (2008). Herd-level prevalence of Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis by bulk-tank milk PCR in Fars province (southern Iran) dairy herds. *Prev Vet Med.* 86 :8-13.

HALL, R.M.; RATLEDGE, C. (1984). Mycobactins as Chemotaxonomic Characters for Some Rapidly Growing Mycobacteria. *J. Gen. Microbiol.* 130: 1883-1892.

HAMILTON, H.L.; COOLEY, A.J.; ADAMS, J.L.; CZUPRYNSKI, C.J. (1991).*Mycobacterium paratuberculosis* monoassociated nude mice as a paratuberculosis model. *Vet. Pathol*., 28: 146-155.

HAMILTON, H.L.; FOLLET, D.M.; SIEGFRIED, L.M.; CZUPRYNSKI, C.J. (1989). Intestinal multiplication of *Mycobacterium paratuberculosis* in athymic nude gnotobiotic mice. *Infect. Immun*., 57: 225-230.

HANLY, W.C.; ARTWOHL, J.E.; BENNETT, B.T. (1995). Review of Polyclonal Antibody Production Procedures in Mammals and Poultry. *ILAR J.*, 37: 93-118.

HANNA, J.; NEILL, S.D.; O'BRIEN, J.J. (1992). ELISA tests for antibodies in experimental bovine tuberculosis. *Vet. Microbiol.*, 31: 243-249.

HARBOE, M.; WIKER, H.G.; DUNCAN, J.R.; GARCÍA, M.M.; DUKES, T.W.; BROOKS, B.W.; TURCOTTE, C.; NAGAI, S. (1990). Protein G-based enzyme-linked immunosorbent assay for anti-MPB70 antibodies in bovine tuberculosis. *J. Clin. Microbiol*., 28: 913-821.

HARBOE, M.; WIKER, H.G.; ULVUND, G.; LUND-PEDERSEN, B.; ANDERSEN, A.B.; HEWINSON, R.G.; NAGAI, S. (1998). MPB70 and MPB83 as indicators of protein localization in mycobacterial cells. Infect Immun. 1998 Jan;66(1):289-96.

HARDIN, L.E.; THORNE, J.G. (1996). Comparison of milk with serum ELISA for the detection of paratuberculosis in dairy cows. *J. Am. Vet. Med. Assoc*., 209: 120-122.

HARDING, H.P. (1957). Experimental infection with *Mycobacterium johnei*. II.- The histopathology of infection in experimental goats. *J. Comp. Pathol*., 67: 37-52.

HARDING, H.P. (1959). The histopathology of *Mycobacterium johne*i infection in small laboratory animals. *J. Pathol. Bacteriol*, 78: 157-169.

HARRIS, N.B.; BARLETTA, R.G. (2001). Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in Veterinary Medicine. *Clin Microbiol Rev.*, 14:489-512.

HASVOLD, H.J.; VALHEIM, M.; BERNSTEN, G.; STORST, A.K. (2002). In vitro responses to purified protein derivated of caprine T lymphocytes following vaccination with live strains of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 90:79-89.

HAYDAY, A.C. (2000). Gamma delta cells: a right time and a right place for a conserved third way of protection. *Annu. Rev. Immunol*., 18: 975-1026.

HEATH, G.B.S. (1955). Survey of sheep diseases. *Vet. Rec*, 67 980-983,

HEATH, G.B.S. (1955). Survey of sheep diseases. *Vet. Rec*, 67 980-983

HEDGES, J.F.; LUBICK, K.J.; JUTILA, M.A. (2005). Gamma delta T cells respond directly to pathogen-associated molecular patterns. *J. Immunol*., 174: 6045-6053.

HEIN, W.R.; DUDLER, L.; BEYA, M.F.; MACKAY, C.R. (1991). Epitopes of the T19 lymphocyte surface antigen are extensively conserved in ruminants. *Vet. Immunol. Immunopathol*., 27: 173-181.

HEIN, W.R.; MACKAY, C.R. (1991). Prominence of gamma delta T cells in the ruminant immune system. *Immunol. Today*, 12: 30-34.

HELGERSON, J.L.; WESTON, K.D.; THOEN, C.O. (2006). Natural exposure of purchased heifers in a Johne´s disease herd. Johne´s Disease Integrated Program (JDIP). En: 2nd Annual Conference, University of California. Davis, EEUU. p.29.

HELLEMANS, J.; MORTIER, G.;DE PAEPE, A.; SPELEMAN, F.; VANDESOMPELE, J. (2007). qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biol*., 8: R19.

HENDRICK SH1, KELTON DF, LESLIE KE, LISSEMORE KD, ARCHAMBAULT M, BAGG R, DICK P, DUFFIELD TF. (2006). Efficacy of monensin sodium for the reduction of fecal shedding of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in infected dairy cattle. *Prev Vet Med*., 75:206-220.

HENDRICK, S.; DUFFIELD, T.; LESLIE, K.; LISSEMORE, K.; ARCHAMBAULT, M.; KELTON, D. (2005a). The prevalence of milk and serum antibodies to *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in dairy herds in Ontario. *Can Vet J*., 46:1126-9.

HENDRICK, S.H.; DUFFIELD, T.E.; KELTON, D.E.; LESLIE, K.E.; LISSEMORE, K.D.; ARCHAMBAULT, M. (2005b). Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays performed on milk and serum samples for detection of paratuberculosis in lactating dairy cows. *J. Am. Vet. Med. Assoc*., 226: 424-428.

HESKETH. J.; DOBBELAERE, D.; GRIFFIN, J.F.; BUCHAN, G. (1993). Detection of proliferating cell nuclear antigens and interleukin-2 beta receptor molecules on mitogen- and antigen-stimulated lymphocytes. Immunology., 79:465-470.

HIETALA, S.K. (1992). The optiones in diagnosing ruminant paratuberculosis. *Vet.Med*.,11:1122-1131.

HILBINK, F.; WEST, D. (1990). The antibody response of sheep to vaccination against Johne's disease. *N. Z. Vet. J*., 38:168-169.

HILBINK, F.;,WEST, D.M.; DE LISLE, G.W.; KITTELBERGER, R.; HOSIE, B.D.; HUTTON, J.; COOKE, M.M.; PENROSE, M. (1994). Comparison of a complement fixation test, a gel diffusion test and two absorbed and unabsorbed ELISAs for the diagnosis of paratuberculosis in sheep. *Vet Microbiol*., 41:107-16.

HILBORN, E.D.; COVERT, T.C.; YAKRUS, M.A.; HARRIS, S.I.; DONNELLY, S.F.; RICE, E.W.; TONEY, S.; BAILEY, S.A.; STELMA, G.N. Jr. (2006). Persistence of nontuberculous mycobacteria in a drinking water system after addition of filtration treatment. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72: 5864-5869.

HILL, B.B.; WEST, M.; BROCK, K.V. (2003): An estimated prevalence of Johne's disease in a subpopulation of Alabama beef cattle. *J Vet Diagn Invest*. 15:21-25.

HILL, J.F. (1989). Vaccination against Johne's disease. En: Milner, A.R. y Wood, P.R. *Johne's disease: current trends in research, diagnosis and management*. Melbourne, Australia. CSIRO Publications, 1989. Pp. 95-98.

HINES II, M.E.; STABEL, R.J.; SWEENEY, R.W.; GRIFFIN, F.; TALAAT, A.M.; BAKKER, D.; BENEDICTUS, G.; DAVIS, W. C.; de LISLE, G.W.; GARDNER, I.A.; JUSTE, R.A.; KAPUR, V.; KOETS, A; McNAIR, J.; PRUITT, G.; WHITLOCK, R.H. (2007b). Experimental challenge models for Johne´s disease: a review and proposed international guidelines. *Vet Microbiol.*, 122: 197-222.

HINES II, M.E.; STYER, E.L. (2003). Preliminary characterization of chemically generated *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* cell wall deficient forms (spheroplasts). *Vet. Microbiol*., 95: 247-258.

HINES II, M.E.; STIVER, S.; GIRI, D.; WHITTINGTON, L.; WATSON, C.; JOHNSON, J.; MUSGROVE, J.; PENCE, M.; HURLEY, D.; BALDWIN, C.; GARDNER, I.A.; ALY, S. (2007a). Efficacy of spheroplastic and cell-wall competent vaccines for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in experimentally-challenged baby goats. *Vet. Microbiol.* 120(3-4): 261-83.

HINES II, M.E.; TURNQUIST, S.E.; ILHA, M.R.; RAJEEV, S.; JONES, A.L.; WHITTINGTON, L.; BANNANTINE, J.P.; BARLETTA, R.G.; GRÖHN, Y.T.; KATANI, R.;TALAAT, A.M.; LI, L.; KAPUR, V. (2014). Evaluation of novel oral vaccine candidates and validation of a caprine model of Johne's disease. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 4:26.

HINES, M.E. (1997). Debate/Discussion. Nomenclature: *M.paratuberculosis* vs. *M. avium* subsp. *paratuberculosis* and strain definitions and diferenciation (Moderator´s comments). En: Chiodini, R.J.; Hines, M.E.; Collins, M.T. (Eds). Proc *5th Int Coll PTBC*. Rehoboth, EEUU. pp: 102-113.

HINES, S.A.; BUERGELT, C.D.; WILSON, J.H.; BLISS, E.L.(1987). Disseminated *Mycobacterium paratuberculosis* infection in a cow. *J. Am. Vet. Med., Assoc*., 190: 681-683.

HIRCH, A. (1956). Infection of hamsters and rabbits with *Mycobacterium johnei. J. Comp. Pathol*., 66: 260-269.

HOLE, N.H.(1958). Johne´s disease. *Adv. Vet. Sci*., 4: 341-387.

HOPE, A.; RIDGE, S.E.: CONDRON, R.J. (1995). Johne's disease in alpacas (*Lama pacos*) in Australia. En: Chiodini, R.J.; Collins, M.T: Bassey, E.O.E. (Eds.). *Proc 4th Int. Coll. PTBC.* IAP. Providence. EEUU.pp 32-40.

HOPE, A.F.; KLUVER, P.F.; JONES, S.L.; CONDRON, R.J. (2000). Sensitivity and specificity of two serological tests for the detection of ovine paratuberculosis. *Aust. Vet. J.*, 78: 850-856.

HOPE, J.C.; THOM, M.L.; VILLARREAL-RAMOS, B.; VORDERMEIER, H.M.; HEWINSON, R.G.; HOWARD, C.J. (2005). Exposure to *Mycobacterium avium* induces low-level protection from *Mycobacterium bovis* infection but compromises diagnosis of disease in cattle. *Clin Exp Immunol.*,141:432-439.

HORE, D.E.; McQUEEN, D.S.; McKINNA, D.A. (1971). Infection of dairy cattle with *Mycobacterium johnei* in a partially vaccinated herd. *Aust. Vet. J.*, 47: 421-423.

HORI, S.; NOMURA, T.; SAKAGUCHI, S. (2003). Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science*, 299: 1057-1061.

HOSTETTER, J.; HUFFMAN, E.; BYL, K.; STEADHAM, E. (2005). Inducible nitric oxide synthase immunoreactivity in the granulomatous intestinal lesions of naturally occurring bovine Johne's disease. *Vet. Pathol*., 42: 241-249.

HOSTETTER, J.; STEADHAM, E.; HAYNES, J.; BAILEY, T.; CHEVILLE, N. (2003). Phagosomal maturation and intracellular survivalof *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in J774 cells. Comp. Immunol. Microbiol. *Infect. Dis*., 26: 269-283.

HOSTETTER, J.; STEADHAM, E.M.; HAYNES, J.S.; BAILEY, J.S.; CHEVILLE, N.F. (2002). Cytokine effects on maturation of the phagosomes containing *Mycobacteria avium* subspecies *paratuberculosis* in J774 cells. *FEMS Immunol. Med. Microbiol*., 34: 127-134.

HOVAV, A.H.; MULLERAD, J.; DAVIDOVITCH, L.; FISHMAN, Y.; BIGI, F.; CATALDI, A.; BERCOVIER, H. (2003). The *Mycobacterium tuberculosis* recombinant 27-kilodalton lipoprotein induces a strong Th1-type immune response deleterious to protection. *Infect. Immun*., 71: 3146-3154.

HUCHZERMEYER, H.F.; BASTIANELLO, S.S. (1992). Serological, microscopio, cultural and pathological findings from 135 sheep originating from a paratuberculosis flock in South Africa. En: Chiodini, R.J.; Kreeger, J.M. (Eds.). *Proc 3rd Int. Coll. PTBC*. IAP. Providence. EEUU. pp 140-146.

HUCHZERMEYER, H.F.; BRÜCKNER, G.; VAN HEERDEN, A.; KLEEBERG, H.H.; VAN RESBURG, I.B.; KOEN, P.; LOVEDAY, R.K. (1994). Tuberculosis. En: Coetzer, J.A.W., Thompson, G.R.; Tustin, R.C. (Eds.). *Infectious diseases of livestock. Vol. 2*, pp. 1425-1443. Oxford University Press, UK.

HUDA, A.; JENSEN, H.E. (2003). Comparison of histopathology, cultivation of tissues and rectal contents, and interferon-gamma and serum antibody responses for the diagnosis of bovine paratuberculosis. *J. Comp. Pathol*., 129: 259-267.

HUDA, A.; LIND, P.; CHRISTOFFERSEN, A.B.; JUNGERSEN, G. (2003). Analysis of repeated tests for interferon-gamma (IFN-gamma) response and faecal excretion for diagnosis of subclinical paratuberculosis in Danish cattle. *Vet. Immunol. Immunopathol*., 94: 95-103.

HUGOT, J.P.; CHAMAILLARD, M.; ZOUALI, H.; LESAGE, S.; CÉZARD, J.P.; BELAICHE, J.; ALMER, S.; TYSK, C.; O´MORAIN, C.A.; GASSULL, M.; BINDER, V.; FINKEL, Y.; CORTOT, A.; MODIGLIANI, R.; LAURENT-PUIG, P.; GOWER-ROUSSEAU, C.; MACRY, J.; COLOMBEL, J.F.; SAHBATOU, M.; THOMAS, G. (2001). Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature*, 411: 599-603.

HUITEMA, H. (1967). Johne's disease in cattle and vaccination. *Bull. Off. Int. Epizoot*., 68: 743-748.

HUITEMA, H. (1968). Johne's disease in cattle and vaccination. *Neth. J. Vet. Sci*., 1: 189-196.

HULTEN, K.; EL-ZIMAITY, H.M.; KARTTUNEN, T.J.; ALMASHHRAWI, A.; SCHWARTZ, M.R.; GRAHAM, D.Y.; EL-ZAATARI, F.A. (2001). Detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in Crohn's diseased tissues by *in situ* hybridization. *Am. J. Gastroenterol*., 96: 1529-1535.

HULTEN, K.; KARTLUNEN, T.J.; EL-ZIMAITY, H.M.; NASER, S.A.; COLLINS, M.T.; GRAHAM, D.Y.; EL-ZAATARI, F.A. (2000a). Identification of cell wall deficient forms of *M. avium* subsp.*paratuberculosis* in paraffin embedded tissues from animals with Johne's disease by in situ hybridization. *J. Microbiol. Methods*, 42: 185-195.

HULTEN, K.; KARTTUNEN, T.J.; EL-ZIMAITY, H.M.; NASER, S.A.; ALMASHHRAWI, A.; GRAHAM, D.Y.; EL-ZAATARI, F.A. (2000b). In situ hybridization method for studies of cell wall deficient *M. paratuberculosis* in tissue samples. *Vet. Microbiol*., 77: 513-518.

HUNTLEY, J.F.; WHITLOCK, R.H.; BANNANTINE, J.P.; STABEL, J.R. (2005). Comparison of diagnostic detection methods for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in North American bison. *Vet. Pathol*., 42: 42-51.

HURLEY, S.; EWING, E. (1983). Results of a field evaluation of a whole cell bacterin. En: Merkal, R.S. (Ed.). *Proc 1st Int. Coll. PTBC*. IAP. Ames. EEUU. pp 244-248. Ames. EEUU.

HUSSAIN, S.; ZWILLING, B.S.; LAFUSE, W.P. (1999). Mycobacterium avium infection of mouse macrophages inhibits IFN-gamma Janus kinase-STAT signaling and gene induction by down-regulation of the IFN-gamma receptor.*J Immunol.*, 163(4):2041-2048.

HÜTTNER, K.; KRÄMER, U.; KLEIST, P. (2012). Effect of *Map*-vaccination in ewes on body condition score, weight and *Map*-shedding. *Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr*., 125: 449-451.

HUTYRA, F.; MAREK, J. (1930). Enteritis paratuberculosa de los bóvidos. En*: Patología y terapéutica especiales de los animales domésticos*. Ed. Revista veterinaria de España, 1º ed., pp. 613-620. Barcelona. España.

HUYGEN, K. (2003). On the use of DNA vaccines for the prophylaxis of mycobacterial diseases. *Infect. Immun*.,71: 1613-21.

HUYGEN, K.; LOZES, E.; GILLES, B.; DROWART, A.; PALFLIET, K.; JURION, F.; ROLAND, I.; ART, M.; DUFAUX, M.; NYABENDA, J.; BRUYN , J.; VAN VOORENM, J.(1994).Mapping of TH1 helper T-cell epitopes on major secreted mycobacterial antigen 85A in mice infected with live Mycobacterium bovis BCG.*Infect. Immun.*, 62:363-370.

IKONOMOPOULOS J1, BALASKAS C, KANTZOURA B, FRAGIADAKI E, PAVLIK I, BARTOS M, LUKAS JC, GAZOULI M. (2007) Comparative evaluation of positive tests to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in clinically healthy sheep and goats in south-west Greece using molecular techniques, serology, and culture. *Vet J.*, 174:337-43.

IKONOMOPOULOS, J.; PAVLIK, I.; BARTOS, M.; SVASTOVA, P.; AYELE, W.Y.; ROUBAL, P.; LUKAS, J.; COOK, N.; GAZOULI, M. (2005). Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in retail cheeses from Greece and the Czech Republic. *Appl. Environ. Microbiol*., 71: 8934-8936.

IOB, L.; ARCANGELI, G.; MUTINELLI, F. (1996). Utilizzo delle metodiche immunoistochimica e del test gamma-interferon nella diagnosi precoce della paratuberculosi bovina. *Vet. Ital.,* 32:23-26.

IRENGE, L.M.; WALRAVENS, K.; GOVAERTS, M.; GODFROID, J.; ROSSEELS, V.; HUYGEN, K.; GALA, J.L. (2009). Development and validation of a triplex real-time PCR for rapid detection and specific identification of *M. avium* sub sp. *paratuberculosis* in faecal samples. *Vet. Microbiol*., 136: 166-172.

ISHII, M.; HOGABOAM, C.M.; JOSHI, A.; ITO, T.; FONG, D.J.; KUNKEL, S.L. (2008). CC chemokine receptor 4 modulates Toll-like receptor 9-mediated innate immunity and signaling. *Eur J Immunol*,. 38:2290-2302.

IWASAKI, A.; MEDZHITOV, R. (2004). Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat. Immunol*., 5: 987-995.

JAKOB, H.J.; SCHIEFER, B. (1969). Presencia de paratuberculosis entre las ovejas. *Panorama Veterinario:87-95.*

JARAVATA, C.V.; SMITH, W.L.; RENSEN, G.J.; RUZANTE, J.M.; CULLOR, J.S. (2006). Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in bovine manure using Whatman FTA card technology and Lightcycler real-time PCR. *Foodborne Pathog Dis*., 3: 212-215.

JEYANATHAN, M.; ALEXANDER, D.C.; TURENNE, C.Y.; GIRARD, C.; BEHR, M.A.(2006). Evaluation of in situ methods used to detect *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in samples from patients with Crohn's disease. *J. Clin. Microbiol*., 4:2942-2950.

JEYANATHAN, M.; BOUTROS-TADROS, O.; RADHI, J.; SEMRET, M.; BITTON, A.; BEHR, M.A. (2007). Visualization of *Mycobacterium avium* in Crohn's tissue by oil-immersion microscopy. *Microbes. Infect*., 9: 1567-1573.

JO, E.K.; YANG, C.S.; CHOI, C.H.; HARDING, C.V. (2007). Intracellular signalling cascades regulating innate immune responses to Mycobacteria: branching out from Toll-like receptors. *Cell. Microbiol*., 9: 1087-1098.

JOHANSEN, K.A.; HUGEN, E.E.; PAYEUR, J.B.(2006). Growth of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in the presence of hexadecylpyridinium chloride, natamycin, and vancomycin. *J. Food Prot.*, 69:878-883

JOHNE, H.A.; FROTHINGHAM, L. (1895). Ein eigenthümlicher Fall von Tuberkulose beim Rind. *Dtsch. Ztschr. Tiermed. Path*., 21: 438-454.

JOHNSON HW, LARSON AB, et al. (1949). Studies on johnin; the relationship of the allergens of *Mycobacterum paratuberculosis, Mycobacterium tuberculosis var, avium, bovis,* and *hominis,* and *Mycobacterium phlei*. *Am. J. Vet. Res.,* 10: 138-41.

JOHNSON, D.W.; MUSCOPLAT, C.C.; LARSEN, A.B.; THOEN, C.O. (1977). Skin testing, fecal culture, and lymphocyte immunostimulation in cattle inoculated with *Mycobacterium paratuberculosis*. Am. *J. Vet. Res.,* 38: 2023-2025.

JOHNSON, E.P.; PRATT, B.S.(1944). Johne´s disease and Johnin reactions. Am. *J. Vet. Res*., April: 117-124.

JOHNSON, H.W.(1944). Studies on Johnin: V.-Producing and standardizing a potent product. *Am. J. Vet. Res.*, 5: 320-328.

JOHNSON-IFEARULUNDU YJ1, KANEENE JB, SPRECHER DJ, GARDINER JC, LLOYD JW. (2000). The effect of subclinical Mycobacterium paratuberculosis infection on days open in Michigan, USA, dairy cows. *Prev Vet Med*. 46:171-81.

JOHNSON-IFEARULUNDU, Y.; KANEENE, J.B. (1999). Distribution and environmental risk factors for paratuberculosis in dairy cattle herds in Michigan. *Am J Vet Res*. 60:589-596.

JOHNSON-IFEARULUNDU, Y.; KANEENE, J.B.; LLOYD, J.W. (1999). Herd-level economic analysis of the impact of paratuberculosis on dairy herds. *J. Am. Vet. Med. Assoc*., 214: 822-825.

JONES, D.G.; KAY, J.M. (1996). Serum biochemistry and the diagnosis of Johne's disease (paratuberculosis) in sheep. *Vet. Rec.*, 139:498-499.

JONES, P.H.; FARVER, T.B.; BEAMAN, B.; CETINKAVA, B.; MORGAN, K.L. (2006). Crohn's disease in people exposed to clinical cases of bovine paratuberculosis. *Epidemio. Infect*., 134: 49-56.

JORGENSEN, J.B. (1965). On the occurrence of Mycobacterioum johnei in the mesenteric luph nodes of abbatoir cattle. Nor. Vet. Med., 17: 97-102.

JORGENSEN, J.B. (1972). Studies on the occurrence of paratuberculoisis in cattle in Denmark. *Nordisk Veterinaer Medizin,* 24: 297-308.

JORGENSEN, J.B. (1977). Survival of *Mycobacterium paratuberculosis* in slurry. *Nord. Vet. Med*., 29: 267-270.

JORGENSEN, J.B. (1982). An improved medium for culture of *Mycobacterium paratuberculosis* from bovine faeces. *Acta Vet. Scand*., **23:** 325-335.

JORGENSEN, J.B.(1969). Paratuberculosis in pigs. Experimental infection by oral administration of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Acta. Vet. Scand*., 10: 275-287.

JORGENSEN, J.B.(1983a). Diagnosis of clinical and non-clinical paratuberculosis by immunological and bacteriological methods. En: Merkal, R.S. (Ed.). *Proc 1st Int. Coll. PTBC.* IAP. Ames. EEUU. pp 136-141. Ames. EEUU.

JORGENSEN, J.B.(1983b). The effect of vaccination on the excretion of Mycobacterium paratuberculosis. *En: Merkal, R.S. (Ed.). Proc 1st Int. Coll. PTBC. IAP. Ames. EEUU.* pp 249-254. Ames. EEUU.

JORGENSEN, J.B.; JENSEN, P.T. (1978). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of antibodies to *Mycobacterium paratuberculosis* in cattle. *Acta. Vet. Scand*., 19: 310-312.

JUBB, T.; GALVIN J. (2000). Herd testing to control bovine Johne's disease. *Vet Microbiol*., 77:423-428.

JUDGE, J.; KYRIAZAKIS, I.; GREIG, A.; DAVIDSON, R.S.; HUTCHINGS, M.R. (2006). Routes of intraspecies transmission of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in rabbits (*Oryctolagus cuniculus*): a field study. *Appl. Environ. Microbiol*., 72: 398-403.

JULIAN, R.J. (1975). A short review and some observations on Johne's disease with recommendations for control. *Can. Vet. J*., 16: 33-43.

JUNGERSEN, G.; HUDA, A.; HANSEN, J.J.; LIND, P. (2002). Interpretation of the gamma interferon test for diagnosis of subclinical paratuberculosis in cattle. *Clin. Diagn. Lab. Immunol*., 9: 453-460.

JUSTE, R.A. (1987). Diagnóstico de la paratuberculosis. En: Juste Editor. Paratuberculosis. *BOVIS*, Aula Veterinaria, vol. nº 18 pp. 63-76.

JUSTE, R.A. (1990). Estudio experimental de las fases iniciales de la paratuberculosis ovina. *Tesis Doctoral*. Universidad de Zaragoza.

JUSTE, R.A. (1997). Johne´ s disease: a review of current knowledge. En: Allworth editor. Proc. 4th Int. Congr. Sheep Vet., pp. 140-150. ASVS, Armidale, NSW, Australia.

JUSTE, R.A. (2010). Crohn's disease and ruminant farming. Got lactase? *Med. Hypotheses*, 75: 7-13.

JUSTE, R.A. (2012). Current strategies for eradication of paratuberculosis and issues in public health. *Vet. Immunol. Immunopathol*., 148: 16-22.

JUSTE, R.A.(1984). Paratuberculosis: una revisión. *Med. Vet*., 1: 197-216.

JUSTE, R.A.; ADURIZ, G.; BASCONES, M.; FOLEY, E.: BARGAR, T.; BARLETTA, R. (1993). Effect of iron on *Mycobacterium* production an dependence in Micobacteria. *Prod. 74. Ann. Meet. CRWAD*. p.64.

JUSTE, R.A.; ADURIZ, J.J.(1990a). Aspectos epidemiológicos. En: Juste, R.A. (Ed.). Paratuberculosis ovina. *Ovis*. Luzán S.A. de Ediciones, Madrid. España. pp: 65-75.

JUSTE, R.A.; ADURIZ, J.J.(1990b). Diagnóstico En: Juste, R.A. (Ed.). Paratuberculosis ovina. *Ovis*. Luzán S.A. de Ediciones, Madrid. España. pp: 49-62.

JUSTE, R.A.; ADURIZ, J.J.; SÁEZ DE OCÁRIZ, C.; MARCO, J.C.; CUERVO, L. (1992a). Paratuberculosis in sheep flocks. Epidemiological aspects. En: Chiodini, R.J.; Kreege, J.M. *Proc 7t Int. Coll. PTBC.* IAP. Providence, EEUU pp: 424-427..

JUSTE, R.A.; ALONSO-HEARN, M.; MOLINA, E.; GEIJO, M.; VAZQUEZ, P.; SEVILLA, I.A.; GARRIDO, J.M. (2009a). Significant reduction in bacterial shedding and improvement in milk production in dairy farms after the use of a new inactivated paratuberculosis vaccine in a field trial. *BMC Res. Notes*, 2: 233.

JUSTE, R.A.; BADIOLA, J.J.; ARNAL, M.C.; BALAGUER, L.; GARCÍA-MARÍN, J.F.; SAEZ DE OCARIZ, C.; MARCO, J.C. (1991a). A survey of ovine paratuberculosis in Aragon (Spain) by different methods. *The paratuberculosis Newsletter*, 3: 3-4.

JUSTE, R.A.; CASAL, J. (1993). An economic and epidemiologic simulation of different control strategies foro vine paratuberculosis. *Prev. Vet. Med*., 15: 101-115.

JUSTE, R.A.; CUERVO, L.A.; GELABERT, J.L.; SÁEZ DE OCÁRIZ, C.; MARCO, J.C.; CAMON, J.(1983). Paratuberculosis bovina en Vizcaya. *Hyg. Pec*., 5: 57-67.

JUSTE, R.A.; ELGUEZABAL, N.; GARRIDO, J.M.; PAVON, A.; GEIJO, M.V.; SEVILLA, I.; CABRIADA, J.L.; TEJADA, A.; GARCÍA-CAMPOS, F.; CASADO, R.; OCHOTORENA, I.; IZETA, A.; GREENSTEIN, R.J. (2008). On the prevalence of *M. avium* subspecies *paratuberculosis* DNA in the blood of healthy individuals and patients with inflammatory bowel disease. *PLoS ONE*, 3: e2537.

JUSTE, R.A.; ELGUEZABAL, N.; PAVÓN, A.; GARRIDO, J.M.; GEIJO, M; SEVILLA, I.; CABRIADA, J.L.; TEJADA, A.; GARCÍA-CAMPOS, F.; CASADO, R.; OCHOTORENA, I.; IZETA, A. (2009b). Association between *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* DNA in blood and cellular and humoral immune response in inflammatory bowel disease patients and controls. *Int. J. Infect. Dis.*, 13: 247-254.

JUSTE, R.A.; GARCÍA MARÍN, J.F.; PERIS, B.; SÁEZ DE OCÁRIZ, C.S.; BADIOLA, J.J. (1994). Experimental infection of vaccinated and non-vaccinated lambs with *Mycobacterium paratuberculosis. J. Comp. Pathol*., 110: 185-194.

JUSTE, R.A.; GARRIDO, J.M.; ADÚRIZ, G. MORENO, B.; GEIJO, M.V.; GARCÍA-GOTI, M.; OGUIZA, J.A. (2000b). Prevalencia de la paratuberculosis bovina en España. *Cong. Int. Med. Bov. (ANEMBE)*, VI, pp: 282-285.

JUSTE, R.A.; GARRIDO, J.M.; ADÚRIZ, G. MORENO, B.; GEIJO, M.V.; GARCÍA-GOTI, M.; OGUIZA, J.A. (2000b). Prevalencia de la paratuberculosis bovina en España. *Cong. Int. Med. Bov. (ANEMBE)*, VI, pp: 282-285.

JUSTE, R.A.; GARRIDO, J.M.; ADÚRIZ, G.(2000a). El agente causal de la paratuberculosis y su situación taxonómica. En: Juste Editor. Paratuberculosis. *BOVIS*, Aula Veterinaria, vol. nº 93, pp. 13-28.

JUSTE, R.A.; GARRIDO, J.M.; GEIJO, M.; ELGUEZABAL, N.; ADURIZ, G.; ATXAERANDIO, R.; SEVILLA, I. (2005). Comparison of blood polymerase chain reaction and enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Mycobacterium avium* subsp. p*aratuberculosis* infection in cattle and sheep. *J. Vet. Diagn. Invest*., 17: 354-359.

JUSTE, R.A.; MARCO, J.C.; SÁEZ DE OCARIZ, C.; ADURIZ, J.J. (1991b). Comparison of different media for the isolation of small ruminant strains of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Vet. Microbiol*., 28: 385-390.

JUSTE, R.A.; SAEZ DE OCARIZ, C. (1990). Control. En: Juste, R.A. (Ed.). Paratuberculosis ovina. *Ovis*. Luzán S.A. de Ediciones, Madrid. España. pp: 77-85.

JUSTE, R.A.; SÁEZ DE OCÁRIZ, C.; ADURIZ, G. (1992b). Results of an ELISA with a common mycobacterial antigen in tuberculosis and paratuberculosis. I Conference on M.bovis. Dublin, Irlanda.

JUSTE, R.A.; SÁEZ DE OCARIZ, C.; MARCO, J.; BADIOLA, J. (1988). Diagnosis of clinical paratuberculosis in sheep: A comparison of pathological, bacteriological and serological methods. En: Thorel, M.F.; Merkal, R.S. (Eds.). *Proc 2nd Int. Coll. PTBC*. IAP. Paris. Francia. pp 220-226.

KADAM, M.; SHARDU,L S.; BHAGATH, J.L.; TIWARI, V.; PRASAD, N.; GOSWAMI, P.P. (2009). Coexpression of 16.8 kDa antigen of *Mycobacterium avium paratuberculosis* and murine gamma interferon in a bicistronic vector and studies on its potential as DNA vaccine. *Vet. Res. Commun*., 33: 597-610.

KAGINA, B.M.; ABEL, B.; BOWMAKER, M.; SCRIBA, T.J.; GELDERBLOEM, S.; SMIT, E.; ERASMUS, M.; NENE, N.; WALZL, G.; BLACK, G.; HUSSEY, G.D.; HESSELING, A.C.; HANEKOM, W.A. (2009). Delaying BCG vaccination from birth to 10 weeks of age may result in an enhanced memory CD4 T cell response. *Vaccine*, 27: 5488-5495.

KALIS, C.H.; BARKEMA, H.W.; HESSELINK, J.W.; VAN MAANEN, C.; COLLINS, M.T.(2002). Evaluation of two absorbed enzyme-linked immunosorbent assays and a complement fixation test as replacements for fecal culture in the detection of cows shedding *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 14:219-224.

KALIS, C.H.; BENEDICTUS, G.; VAN WEERING, H.J.; FLAMAND, F.; HAAGSMA, J. (1992). Experiences with the use of an experimental vaccine in the control of paratuberculosis in The Netherlands. En: Chiodini, R.J.; Kreeger, J.M. (Eds.). *Proc 3rd Int. Coll. PTBC*. IAP. Providence. EE.UU. pp 484-494.

KALIS, C.H.; COLLINS, M.T.; BARKEMA, H.W.; HESSELINK, J.W. (2004). Certification of herds as free of *Mycobacterium paratuberculosis* infection: actual pooled faecal results versus certification model predictions. *Prev. Vet.Med*., 65: 189-204.

KALIS, C.H.; COLLINS, M.T.; HESSELINK, J.W.; BARKEMA, H.W. (2003). Specificity of two tests for the early diagnosis of bovine paratuberculosis based on cell-mediated immunity: the Johnin skin test and the gamma interferon assay. *Vet. Microbiol*., 97: 73-86.

KALIS, C.H.; HESSELINK, J.W.; BARKEMA, H.W.; COLLINS, M.T. (2001). Use of long-term vaccination with a killed vaccine to prevent fecal shedding of *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* in dairy herds. *Am. J. Vet. Res*., 62: 270-274.

KALIS, C.H.; HESSELINK, J.W.; RUSSCHEN, E.W.; BARKEMA, H.W.; COLLINS, M.T.; VISSER, I.J. (1999b). Factors influencing the isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from bovine fecal samples. *J. Vet. Diagn. Invest*., 11: 345-351.

KALIS, C.H.J.; BARKEMA, H.W.; HESSELINK, J.W. (1999a) Certification of diary herds as free of paratuberculosis using cultures os strategically pooled fecal samples. En: Manning, E.J.B.; Collins, M.T. (Eds.). Proc *6th Int. Coll. PTBC. IAP*. Madison, EEUU. pp 55-58.

KAMATH, A.T.; FENG, C.G.; MACDONALD, M.; BRISCO,E H.; BRITTON, W.J. (1999). Differential protective efficacy of DNA vaccines expressing secreted proteins of *Mycobacterium tuberculosis. Infect. Immun*., 67: 1702-7.

KANEKO, H.; YAMADA, H.; MIZUNO, S.; UDAGAWA, T.; KAZUMI, Y.; SEKIKAWA, K.; SUGAWARA, I. (1999). Role of tumor necrosis factor-alpha in Mycobacterium-induced granuloma formation in tumor necrosis factor-alpha-deficient mice. *Lab. Invest.,* 79:379-86.

KANG, P.B.; AZAD, A.K.; TORRELLES, J.B.; KAUFMAN, T.M.; BEHARKA, A.; TIBESAR, E.; DESJARDIN, L.E.; SCHLESINGER, L.S. (2005). The human macrophage mannose receptor directs Mycobacterium tuberculosis lipoarabinomannan-mediated phagosome biogenesis. *J. Exp. Med*., 202: 987-999.

KANG, T.J.; CHAE, G.T. (2001). Detection of Toll-like receptor 2 (TLR2) mutation in the lepromatous leprosy patients. *FEMS Immunol. Med. Microbiol*., 31: 53-58.

KARPINSKI, T.; ZORAWSKI, C. (1975). Experimental paratuberculosis in sheep. I.- Clinical allergical, bacteriological and post-mortem examinations. *Bull. Vet. Inst. Pulawy*, 19: 59-63.

KATAYAMA, N.; SUZUKI, T.; OOTAKE, M.; TOTSUKA, T.; KAMATA, S.; YOKOMIZO, Y. (2002). Effects of ammonia treatment under various conditions on viability of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* inoculated in low moisture roughage. En: Juste, R.A.; Geijo, M.V.; Garrido, J.M: (Eds.). *Proc 7th Int. Coll. PTBC*. IAP. Bilbao, España. pp:16-20.

KATHAPERUMAL, K.; KUMANAN, V.; MCDONOUGH, S.; CHEN, L.H.; PARK, S.U.; MOREIRA, M.A.; AKEY, B.; HUNTLEY, J.; CHANG, C.F.; CHANG, Y.F. (2009). Evaluation of immune responses and protective efficacy in a goat model following immunization with a coctail of recombinant antigens and a polyprotein of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Vaccine*. 27: 123-35.

KATHAPERUMAL, K.; PARK, S.U.; MCDONOUGH, S.; STEHMAN, S.; AKEY, B.; HUNTLEY, J.; WONG, S.; CHANG, C.F.; CHANG, Y.F. (2008). Vaccination with recombinant *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* proteins induces differential immune responses and protects calves against infection by oral challenge. *Vaccine*. 26: 1652-63.

KATIC, I. (1977). Bibliography of literature on Johne´s disease (paratuberculosis) 1965-1975. *Supplementum to bibliography of literature on Johne´s disease (paratuberculosis) 1895-1964*. Royal Veterinary and Agriculture University. Copenhagen.

KAUFMANN, S.H. (1991). Role of T-cell subsets in bacterial infections.*Curr. Opin. Immunol.,* 3: 465-470.

KAUFMANN, S. H. (1995). Immunity to intracellular microbial pathogens. *Immunol Today*., 16:338-342.

KAUFMANN, S.H. (2000). Is the development of anew vaccine possible?. *Nat Med.* 6: 955-960.

KAUFMANN, S.H. (2001). How can immunology contribute to the control of tuberculosis? *Nat. Rev. Immunol.,* 1: 20-30.

KAUR, P.; FILIA, G.; SINGH, S.V.; PATIL, P.K.; SANDHU, K.S. (2010). Molecular detection and typing of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* from milk samples of dairy animals. *Trop. Anim. Health Prod*., 42: 1031-1035**.**

KAWAI, T.; AKIRA, S. (2007). TLR signaling. *Semin Immunol*., 19: 24-32.

KAWAJI, S.; TAYLOR, D.L.; MORI, Y.; WHITTINGTON, R.J. (2007). Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in ovine faeces by direct quantitative PCR has similar or greater sensitivity compared to radiometric culture. *Vet. Microbiol*., 125: 36-48.

KEEBLE, J.R.; WALKER, K.B. (2009). Therapeutic vaccine comprising Mycobacterium HSP70. *Expert Opin. Ther. Pat*., 19: 95-9.

KELLY, C.G.; YOUNSON, J.S. (2000). Anti-adhesive strategies in the prevention of infectious disease at mucosal surfaces. *Expert. Opin. Investig. Drugs*, 9: 1711-1721.

KENNEDY, D.J. ;BENEDICTUS, G. (2001). Control of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in agricultural species. *Rev. Sci. Tech*., 20: 151-179.

KENNEDY, D.J.; ALLWORTH, B. (2001). Ovine Johne's disease: progress and challenges. *Aus. Vet. J*., 79: 482-483.

KENNEDY, D.J.; CITER, L.; SERGEANT, E.S.G. (2006). Increasing improvement of herd owners in controlling paratuberculosis through assurance based trading. En: Manning, E.B.; Nielsen, S.S. (Eds.). *Proc 8th Int. Coll. PTBC*. IAP. Madison, EEUU. pp. 20-25.

KENSHEETS, H.; VAZQUEZ, N.; DONNELLY, R.P.; LARNER, A.C.; FINBLOOM, D.S. (1999). Interleukin-10 inhi**M.; DIC**bits expression of both interferon alpha- and i**ITO, S.; ANSARI, P.; SAKATSUME,**nterferon gamma- induced genes by suppressing tyrosine phosphorylation of STAT1. *Blood*, 93: 1456-1463.

KHADER, S.A.; COOPER, A.M. (2008). IL-23 and IL-17 in tuberculosis. *Cytokine*, 41: 79-83.

KHALIFEH, M.S.; AL-MAJALI, A.M.; STABEL, J.R. (2009). Role of nitric oxide production in dairy cows naturally infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis. Vet. Immunol. Immunopathol*., 131: 97-104.

KHALIFEH, M.S.; STABEL, J.R. (2004a). Upregulation of transforming growth factor-beta and interleukin-10 in cows with clinical Johne's disease. *Vet. Immunol. Immunopathol.,* 99: 39-46.

KHALIFEH, M.S.; STABEL, J.R. (2004b). 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: 1974-1982.

KHAN, F.A.; CHAUDHRY, Z.I.; ALI, M.I.; KHAN, S.; MUMTAZ, N.; AHMAD, I. (2010). Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in tissue samples of cattle and buffaloes. *Trop. Anim. Health Prod*., 42: 633-638.

KHARE, S.; ADAMS, L.G.; OSTERSTOCK, J.; ROUSSEL, A.; DAVID, L. (2008). Effects of shipping and storage conditions of fecal samples on viability of *Mycobacterium paratuberculosis. J. Clin. Microbiol*., 46: 1561-1562.

KHARE, S.; FICHT, T.A.; SANTOS, R.L.; ROMANO, J.; FICHT, A.R.; ZHANG, S.; GRANT, I.R.; LIBAL, M.; HUNTER, D.; ADAMS, L.G. (2004). Rapid and sensitive detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in bovine milk and feces by a combination of immunomagnetic bead separation-conventional PCR and real-time PCR. *J. Clin. Microbiol.,* 42:1075-1081.

KHEIRANDISH, R.; KHODAKARAM TAFTI, A.; HOSSEINI, A. (2008). The comparative evaluation of immunohistochemical and acid fast staining with histopathological changes in naturally occurring paratuberculosis in sheep. *Comp. Clin. Pathol.,* 17: 111-116.

KHOR, B.; GARDET, A.; XAVIER, R.J. (2011). Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature,* 474: 307-17

KIDD, P. (2003). Th1/Th2 balance: the hypothesis, its limitations, and implications for health and disease. *Altern. Med. Rev*., 8: 223-246.

KIM YG, BECH-NIELSEN S, GORDON JC, SLEMONS RD, SPANGLER E. (1988). Fecal culture of *Mycobacterium paratuberculosis* in cattle using a centrifugation specimen processing step. *Acta Vet Scand Suppl.* 84:203-205.

KIM, S.G.; SHIN, S.J.; JACOBSON, R.H.; MILLER, L.J.; HARPENDING, P.R.; STEHMAN, S.M.; ROSSITER, C.A.; LEIN, D.A. (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: 126-131.

KIM, Y.G.; BECH-NIELSEN, S.; GORDON, J.C.; SLEMONS, R.D.; SPANGLER, E. (1989). Comparision of two methods for isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from bovine fecal samples. *Am. J. Vet. Res.* 50: 1110-1113.

KIMBERLING, C.V.(1998). Paratuberculosis. (En: Lea y Febiger editores). Jensen & Swift´s diseases of sheep, 3, pp. 235-238. Filadelfia, E.E.U.U.

KIRKWOOD, C.D.; WAGNER, J.; BONIFACE, K.; VAUGHAN, J.; MICHALSKI, W.P.; CATTO-SMITH, A.G.; CAMERON, D.J.; BISHOP, R.F.(2009).*Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in children with early-onset Crohn's disease. *Inflamm. Bowel Dis*., 15: 1643-1655.

KLAUSEN J1, HUDA A, EKEROTH L, AHRENS P. (2003): Evaluation of serum and milk ELISAs for paratuberculosis in Danish dairy cattle. *Prev Vet Med.,* 58:171-178.

KLAWONN, W.; CUSSLER, K.; DRÄGER, K.G.; GYRA, H.; KÖHLER, H.; ZIMMER, K.; HESS, R.G. (2002). The importance of allergic skin test with Johnin, antibody ELISA, cultural fecal test as well as vaccination for the sanitation of three chronically paratuberculosis-infected dairy herds in Rhineland-Palatinate.*Dtsch. Tierarztl. Wochenschr.,*109:510-516.

KLIENEBERGER-NOBEL, E. (1961) Peripneumonia-like organisms (PPLO, mycoplasmataceae), their cultivation, morphology, serology and pathogenicity. *Klin Wochenschr.* 9:661-667.

KLUGE, J.P.; MERKAL, R.S.; MONLUX, W.S.; LARSEN, A.B.; KOPECKY, K.E.; RAMSEY, F.K.; LEHMANN, R.P. (1968). Experimental paratuberculosis in sheep after oral, intratracheal, or intravenous inoculation lesions and demonstration of etiologic agent. *Am. J. Vet. Res*., 29: 953-962.

KNUST, B.; PATTON, E.; RIBEIRO-LIMA, J.; BOHN, J.J.; WELLS, S.J. (2013). Evaluation of the effects of a killed whole-cell vaccine against *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* in 3 herds of dairy cattle with natural exposure to the organism. *J. Am. Vet. Med. Assoc*., 242: 663-669.

KOENIG, G.J.; HOFFSIS, G.F.; SHULAW, W.P.; BECH-NIELSEN, S.; RINGS, D.M.; ST-JEAN, G. (1993). Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from mononuclear cells in tissues, blood, and mammary glands of cows with advanced paratuberculosis. *Am. J. Vet. Res*., 54: 1441-1445.

KOETS, A. P. (2006). Immunology of bovine paratuberculosis: the hosts´ perspective. En: Manning, E.B.; Nielsen, S.S. (Eds.). *Proc 8th Int. Coll. PTBC*. IAP. Madison, EEUU. pp 77-87.

KOETS, A.P.; HOEK, A.; LANGELAAR, M.; OVERDIJK, M.; SANTEMA, W.; FRANKEN, P.; EDEN, W.; RUTTEN, V. (2006). Mycobacterial 70 kD heat-shock protein is an effective subunit vaccine against bovine paratuberculosis. *Vaccine*., 24: 2550-2559.

KOETS, A.P.; RUTTEN, V.; HOEK, A.; VAN MIL, F.; MÜLLER, K.; BAKKER, D.; GRUYS, E.; VAN EDEN, W. (2002). Progressive bovine paratuberculosis is associated with local loss of CD4(+) T cells, increased frequency of gamma delta T cells, and related changes in T-cell function. *Infect. Immun*., 70: 3856-3864.

KOETS, A.P.; RUTTEN, V.P.; BAKKER, D.; VAN DER HAGE, M.H.; VAN EDEN, W. (2000). Lewis rats are not susceptible to oral infection with *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis***.** *Vet. Microbiol.,* 77: 487-495.

KOETS, A.P.; RUTTEN, V.P.; 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: 1492-1498.

KOETS, A.P.; RUTTEN, V.P.; HOEK, A.; BAKKER, D.; VAN ZIJDERVELD, F.; MÜLLER, K.E.; VAN EDEN, W. (1999). Heat-shock protein-specific T-cell responses in various stages of bovine paratuberculosis. *Vet. Immunol. Immunopathol*., 70: 105-115.

KOETS, A.P.; SANTEMA, W.; MERTENS, H.; OOSTENRIJK, D.; KEESTRA, M.; OVERDIJK, M.; LABOURIAU, R.; FRANKEN, P.; FRIJTERS, A.; NIELEN, M.; RUTTEN, V. (2010). Susceptibility to paratuberculosis infection in cattle is associated with single nucleotide polymorphisms in Toll-like receptor 2 which modulate immune responses against *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Prev. Vet. Med*., 93: 305-315.

KOH, S.H.; DOBSON, K.J.; TOMASOVIC, A. (1988) A Johne's disease survey and comparision of diagnostic tests. *Aust. Vet. J.,* 65: 160-161.

KÖHLER, H., GYRA, H.; ZIMMER, K.; DRÄGER, K.G.; BURKERT, B.; LEMSER, B.; HAUSLEITHNER, D.; CUBLER, K.; KLAWONN, W.; HESS, R.G. (2001). Immune reactions in cattle after immunization with a *Mycobacterium paratuberculosis* vaccine and implications for the diagnosis of *M. paratuberculosis* and *M. bovis* infections. *J. Vet. Med. B. Infect Dis. Vet. Public Health*, 48: 185-195.

KÖHLER, H.; GIERKE, F.; SEIDLER, T.; ZILLER, M. (2010). Control of paratuberculosis by vaccination – a systematic review and meta-analysis. *Proc. 10th Int. Coll. PTBC.* Minneapolis. Minnesota. EEUU.

KOO, H.C.; PARK, Y.H; HAMILTON, M.J.; BARRINGTON, G.M.; DAVIS, C.J.; KIM, J.B.; DAHL, J.L.; WATERS, W.R.; DAVIS, W.C. (2004). Analysis of the immune response to*Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* in experimentally infected calves. *Infect.Inmun*., 77(12):6870-6883.

KOPECKY, K.E. (1977). Distribution of paratuberculosis in Wisconsin, by soil regions. *J. Am. Vet. Med. Assoc.,* 170: 320-4.

KOPECKY, K.E.; LARSEN, A.B. (1975). Intravenous johnin and tuberculin tests in cattle vaccinated qith *Mycobacterium paratuberculosis* cells and subsequently inoculated with *Mycobacterium bovis*. *Am. J. Vet. Res*., 36: 1727-1729.

KOPECKY, K.E.; LARSEN, A.B.; MERKAL, R.S. (1967). Uterine infection in bovine paratuberculosis. *Am. J. Vet. Res*., 28: 1043-1045.

KOPECNA, M.; ONDRUS, S.; LITERAK, I.; KLIMES, J.; HORVATHOVA, A.; MORAVKOVA, M.; BARTOS, M.; TRCKA, I.; PAVLIK, I. (2006). Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in two brown bears in the central European Carpathians. *J. Wildl. Dis.*, 42: 691-695.

KÖRMENDY B, KOPÁL T, BÁLINT T, SZILÁGYI M, BÉKI L. (1989). Economic losses caused by paratuberculosis in a dairy herd: case report. *Acta Vet Hung*. 37:45-53.

KÖRMENDY, B. **(1990).** Paratuberculosis in a cattle herd: comparison of allergic, serologic and faecal microscopic tests. *Acta Microbiol. Hung*., 37: 219-222.

KÖRMENDY, B. (1992). Paratuberculosis vaccine in a large dairy herd. *Acta. Vet. Hung*., 40: 171-184.

KÖRMENDY, B. (1994). The effect of vaccination on the prevalence of paratuberculosis in large dairy herds. *Vet. Microbiol.*, 41: 117-125.

KÖRMENDY, B.; TUBOLY, S.; NAGY, G. (1986). Infection experiments with *Mycobacterium paratuberculosis* strains. *Acta Vet. Hungarica*, 34: 37-47.

KOVALENKO, I.V.; DOROZHKOVA, I.R. (1986). Validation and development of an immunofluorescence method for isolating and identifying mycobacteria L forms. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol.*, 6:35-8.

KRAMSKY, J.A.; MILLER, D.S.; HOPE, A.; COLLINS, M.T. (2000). Modification of a bovine ELISA to detect camelid antibodies to *Mycobacterium paratuberculosis*. *Vet. Microbiol*., 77: 333-337.

KREEGER, J.M.(1991). Ruminant paratuberculosis--a century of progress and frustration. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 3: 373-382.

KRISHNAPPA, G.; JAGANNATH, C.; RAO, B.U. (1989). The specificity of antibody response in experimental and natural bovine paratuberculosis studied by crossed immunoelectrophoresis with intermediate gel. *Vet. Microbiol*., 21: 67-78.

KRUIP, T.A.; MUSKENS, J.; VAN ROERMUND, H.J.; BAKKER, D.; STOCKHOFE-ZURWIEDEN N. (2003). Lack of association of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* with oocytes and embryos from moderate shedders of the pathogen. *Theriogenology*. 59:1651-60.

KRUTZIK, S.R.; MODLIN, R.L. (2004). The role of Toll-like receptors in combating mycobacteria. *Semin Immunol.*, 16:35-41.

KUDAHL, A.; NIELSEN, S.S.; SØRENSEN, J.T. (2004). Relationship between antibodies against *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk and shape of lactation curves. *Prev Vet Med*., 62:119-134.

KUDAHL, A.B.; NIELSEN, S.S. (2009). Effect of paratuberculosis on slaughter weight and slaughter value of dairy cows. *J. Dairy Sci*., 92: 4340-4346.

KUDAHL, A.B.; SORENSEN, J.T.; NIELSEN, S.S.; OSTERGAARD, S. (2007). Simulated economic effects of improving the sensitivity of a diagnostic test in paratuberculosis control. *Prev. Vet. Med*., 78: 118-129.

KUEHNEL, M.P.; GOETHE, R.; HABERMANN, A.; MUELLER, E.; ROHDE, M.; GRIFFITHS, G.; VALENTIN-WEIGAND, P. (2001). Characterization of the intracellular survival of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*: phagosomal pH and fusogenicity in J774 macrophages compared with other mycobacteria. *Cell Microbiol*., 3: 551-566.

KUMAR A. (1984). Diagnosis of paratuberculosis in sheep. *Mod. Vet. Pract.*, 65:139-141.

KURADE, N.P.; TRIPATHI, B.N. (2008). Lymphoproliferative response and its relationship with histological lesions in experimental ovine paratuberculosis and its diagnostic implications. *Vet. Res. Commun*., 32: 107-119.

KURADE, N.P.; TRIPATHI, B.N.; RAJUKUMAR, K.; PARIHAR, N.S. (2004). Sequential development of histologic lesions and their relationship with bacterial isolation, fecal shedding, and immune responses during progressive stages of experimental infection of lambs with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis. Vet. Pathol.*, 41: 378-387.

KUSNER, D.J.(2005). Mechanisms of mycobacterial persistence in tuberculosis. *Clin. Immunol*., 114: 239-247.

LAGADIC, M.; LE MENEC, M.; ARGENTE, G.; LECOZ, N.; MASSART, M.T.; MOISSAN, J.; QUINIOU, M.A. (1983). Tecniques de cultures de *Mycobacterium paratuberculosis*:Leur utilisation en routine dans un laboratoire de diagnostic. *Rec. Med. Vet.*, 159:801-807.

LAMBETH, C.; REDDACLIFF, L.A.; WINDSOR, P.; ABBOTT, K.A.; McGREGOR, H.; WHITTINGTON, R.J. (2004). Intrauterine and transmammary transmission of *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* in sheep. *Aust. Vet. J.*, 82: 504-508.

LANDSVERK, T.; HALLERAKER, M.; ALEKSANDERSEN, M.; McCLURE, S.; HEIN, W.; NICANDER, L. (1991). The intestinal habitat for organized lymphoid tissues in ruminants; comparative aspects of structure, function and development. *Vet. Immunol. Immunopathol*., 28: 1-16.

LARSEN, A.B. (1973). Johne´s disease- immunization and diagnosis. *J. Am. Vet. Med. Assoc*., 163: 902-904.

LARSEN, A.B., MERKAL, R.S., CUTLIP, R.C. (1975a). Age of cattle as related to resistance to infection with *Mycobacterium paratuberculosis. Am. J. Vet. Res.* 36: 255-257.

LARSEN, A.B.; BAISDEN, L.A.; MERKAL, R.S.(1955). A comparison of regular intradermic Johnin and a purfied protein derivative of intradermic Johnin on artificially and naturally sensitized ruminants. *Am. J. Vet. Res*., 58: 35-37.

LARSEN, A.B.; CYSEWSKI, S.J.; MILLER, J.M. (1975b). Effect of aflatoxin on susceptibility of hamsters to *Mycobacterium paratuberculosis. Am. J. Vet. Res.*, 36: 1545-1547.

LARSEN, A.B.; HAWKINS, W.W. Jr, MERKAL, R.S. (1964). Experimental vaccination of sheep against Johne´s disease. *Am. J. Vet. Res*., 25: 974-976.

LARSEN, A.B.; KOPECKY, K.E. (1970).*Mycobacterium paratuberculosis* in reproductive organs and semen of bulls. *Am. J. Vet. Res*., 31: 255-258.

LARSEN, A.B.; MERKAL, R.S.; KOPECKY, K.E.; BOOTHE, A.D. (1969). Hypersensitivity and serologic responses in cattle vaccinated with disrupted *Mycobacterium paratuberculosis* cells and subsequently infected with *Mycobacterium bovis. Am. J. Vet. Res.,* 30: 2167-2172.

LARSEN, A.B.; MERKAL, R.S.; MOON, H.W. (1974). Evaluation of a paratuberculosis vaccine given to calves before infection. *Am. J. Vet. Res***.,** 35: 367-369.

LARSEN, A.B.; MERKAL, R.S.; VARDAMAN, T.H. (1956). Survival time of *Mycobacterium paratuberculosis. Am. J. Vet. Res*., 17: 549-551.

LARSEN, A.B.; MILLER, J.M. (1978). Effect of dexamethasone on *Mycobacterium paratuberculosis* infection in hamsters. *Am. J. Vet. Res*., 39: 1866-1867.

LARSEN, A.B.; MILLER, J.M.; KOPECKY, K.E. (1976). Susceptibility of the Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*) to *Mycobacterium paratuberculosis*. *Am. J. Vet. Res.,* 37: 1113-1114.

LARSEN, A.B.; MOON, H.W. (1972). Experimental *Mycobacterium paratuberculosis* infection in chickens. *Am. J. Vet. Res.,* 33: 1231-1235.

LARSEN, A.B.; MOON, H.W.; MERKAL, R.S. (1971). Susceptibility of swine to mycobacterium paratuberculosis. *Am. J. Vet. Res.,* 32:589-595.

LARSEN, A.B.; MOON, H.W.; MERKAL, R.S. (1972). Susceptibility of horses to *Mycobacterium paratuberculosis*. *Am. J. Vet. Res.,* 33: 2185-2189.

LARSEN, A.B.; MOYLE, A.I.; HIMES, E.M. (1978). Experimental vaccination of cattle against paratuberculosis (Johne's disease) with killed bacterial vaccines: a controlled field study. *Am. J. Vet. Res*., 39: 65-69.

LARSEN, A.B.; STALHEIM, O.H.; APPELL, L.H.; RICHARDS, W.D.; HIMES, E.M. (1981).*Mycobacterium paratuberculosis* in the semen and genital organs of a semen-donor bull. *J. Am. Vet. Med. Assoc*., 179: 169-171.

LARSEN, A.B.; VARDAMAN, T.H. (1952). The effect Viomycin, 4:4'diamino diphenyl sulfone , and other agents on Mycobacterium partuberculosis. Am. J. Vet. Res.13(49): 466-468.

LARSEN, A.B.; VARDAMAN, T.H. (1953). The effect of isonicotinic acid hydrazide on *Mycobacterium paratuberculosis. J. Am. Vet. Med. Assoc*., 122: 309-310.

LARSEN, A.B.; VARDAMAN, T.H. (1953). The effect of isonicotinic acid hydrazide on Mycobacterium Paratuberculosis. J. Am. Vet. Med. Assoc. 122 (913): 309-310.

LARSEN, A.B.; VARDAMAN, T.H.; GROTH, A.H. (1953). Preliminary studies on the effect od streptomycin and other agents on Mycobacterium Paratuberculosis. Am. J. Vet. Res. 11(41):374-377.

LAUZI, S.; PASOTTO, D.; AMADORI, M.; ARCHETTI, I.L.; POLI, G.; BONIZZI, L. (2000). Evaluation of the specificity of the gamma-interferon test in Italian bovine tuberculosis-free herds. *Vet. J*., 160: 17-24.

LAWRENCE, W.E. (1956). Congenital infection with *Mycobacterium johnei* in cattle. *Vet. Rec*. 68: 312-314.

LEE, H.; STABEL, J.R.; KEHRLI, M.E. Jr. (2001). Cytokine gene expression in ileal tissues of cattle infected with *Mycobacterium paratuberculosis*. *Vet. Immunol. Immunopathol.,* 82: 73-85.

LEE, J.S.; SHIN, S.J.; COLLINS, M.T.; JUNG, I.D.; JEONG, Y.I.; LEE, C.M.; SHIN, Y.K.; KIM, D.; PARK, Y.M. (2009).*Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* fibronectin attachment protein activates dendritic cells and induces a Th1 polarization. *Infect. Immun*., 77: 2979-2988.

LEHMANN, K.B.; NEUMANN, R. (1896) Atlas und Grundriss der Bakteriologie und Lehrbuch der speziellen bakteriologischen Diagnostik. 1st. ed.

LEHTOLA, M.J.; LOADES, C.J.; KEEVIL, C.W. (2005). Advantages of peptide nucleic acid oligonucleotides for sensitive site directed 16S rRNA fluorescence in situ hybridization (FISH) detection *of Campylobacter jejuni, Campylobacter coli* and *Campylobacter lari. J. Microbiol. Methods*., 62:211-219.

LEID, J.G.; HUNTER, D.; SPEER, C.A. (2002). Early diagnosis of Johne's disease in the American bison by monoclonal antibodies directed against antigen 85. *Ann. N. Y. Acad. Sci*., 969: 66-72.

LESLIE, P.; RIEMANN, H.; WEST, G.; MOE, A. (1988). Vaccination field trial for Mycobacterium paratuberculosis (Johne's disease) in the caprine species. En: Thorel, M.F. *Proc. 2nd Int. Coll. PTBC*. IAP Madison, EEUU, pp. 110-129.

LESSLIE, I.W.; HERBERT, C.N.; BURN, K.J.; MACCLANCY, B.N.; DONNELLY, W.J. (1975). Comparison of the specificty of human and bovine tuberculin PPD for testing cattle. 1--Republic of Ireland. *Vet Rec* .96:332-334.

LETTERIO, J.J.; ROBERTS, A.B. (1998). Regulation of immune responses by TGF-beta. *Annu. Rev. Immunol*., 16: 137-161.

LEVI, M.L.(1948). Experimental study of Johne´s disease in goats. *J. Comp. Pathol*., 58, 38-63.

LÉVY-FRÉBAULT, V.V.; PORTAELS, F. (1992). Proposed minimal standards for the genus Mycobacterium and for description of new slowly growing Mycobacterium species. *Int J Syst Bacteriol*.,42:315-23.

LI, L.; BANNANTINE, J.P.; ZHANG, Q.; AMONSIN, A.; MAY, B.J.; ALT, D.; BANERJI, N.; KANJILAL, S.; KAPUR, V. (2005). The complete genome sequence of *Mycobacterium avi*um subsp. *paratuberculosis. Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 102: 12344-12349.

LIE, K.L.; ALEKSANDERSEN, M.; LANDSVERK, T. (2005). Lymphoid follicles of different phenotype appear in ileum during involution of the sheep ileal Peyer's patch. *Dev. Comp. Immunol*., 29: 539-553.

LIEBANA, E.; ARANANZ, A.; URQUIA, J.J.; MATEOS, A.; DOMINGUEZ, L. (1998). Evaluation of the gamma-interferon assay for eradication of tuberculosis in a goat herd. *Aust. Vet. J.*, 76: 50-53.

LIEBANA, E.; JOHNSON, L.; GOUGH, J.; DURR, P.; JAHANS, K.; CLIFTON-HADLEY, R.; SPENCER, Y.; HEWINSON, R.G.; DOWNS, S.H. (2008). Pathology of naturally occurring bovine tuberculosis in England and Wales.*Vet. J.***,** 176: 354-360.

LIEBLER, E.M.; POHLENZ, J.F., CHEVILLE, N.F. (1988a). Gut-associated lymphoid tissue in the large intestine of calves. II. Electron microscopy.*Vet Pathol.* 25:509-515.

LIEBLER, E.M.; POHLENZ, J.F; WOODE, G.N. (1988b). Gut-associated lymphoid tissue in the large intestine of calves. I. Distribution and histology. *Vet Pathol.* 25:503-508.

LIEN, E.; SELLATI, T.J.; YOSHIMURA, A.; FLO, T.H.; RAWAD,I G.; FINBERG, R.W.; CARROLL, J.D.; ESPEVIK, T.; INGALLS, R.R.; RADOLF, J.D.; GOLENBOCK, D.T. (1999). Toll-like receptor 2 functions as a pattern recognition receptor for diverse bacterial products*. J Biol Chem*., 274:33419-33425.

LIGHTBODY, K.A.; SKUCE, R.A.; NEILL, S.D.; POLLOCK, J.M. (1998). Mycobacterial antigen-specific antibody responses in bovine tuberculosis: an ELISA with potential to confirm disease status. *Vet. Rec.*, 142(12):295-300.

LILENBAUM, W.; MARASSI, C.D.; VARGES, R.; MEDEIROS, L.; OELEMANN, W.M.; FONSECA, L.S. (2009). Ocurrence of false positive results in three Paratuberculosis-ELISAs performed in a tuberculous herd. *Vet. Res. Commun*. 33: 693-9.

LILLINI, E.; BITONTI, G.; GAMBERALE, F.; CERSINI, A.(2005). Prevalence of bovine paratuberculosis in the Latium region (Italy). En: Manning, E.B.; Nielsen, S.S. (Eds.). *Proc 8th Int. Coll. PTBC*. IAP. Madison, EEUU. pp. 638-644.

LIM, W.C.; HANAUER, S.B. (2004). Emerging biologic therapies in inflammatory bowel disease. *Rev. Gastroenterol. Disord.*, 4: 66-85.

LISBY, G.; ANDERSEN, J.; ENGBAEK, K.; BINDER, V. (1994). *Mycobacterium paratuberculosis* in intestinal tissue from patients with Crohn's disease demonstrated by a nested primer polymerase chain reaction. *Scand. J. Gastroenterol.*, 29: 923-9.

LITTLE, D.; ALZUHERRI, H.M.; CLARKE, C.J. (1996). Phenotypic characterisation of intestinal lymphocytes in ovine paratuberculosis by immunohistochemistry.*Vet Immunol Immunopathol.*, 55:175-87.

LITTLE, T.W.A.; BURN, K.J.; STUART, P. (1975). Virulence for calves of tubercle bacilli isolated from badgers. *Vet. Rec.*, 96: 533.

LIU, X.; FENG, Z.; HARRIS, N.B.; CIRILLO, J.D.; BERCOVIER, H.; BARLETA, R.G. (2001). Identification of a secreted superoxide dismutase in *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 202: 233.238.

LOMBARD, J.E.; BYREM, T.M.; WAGNER, B.A.; McCLUSKEY, B.J. (2006). Comparison of milk and serum enzyme-linked immunosorbent assays for diagnosis of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection in dairy cattle. *J. Vet. Diagn. Invest*., 18: 448-458.

LOMBARD, J.E.; GARRY, F.B.; MCCLUSKEY, B.J.; WAGNER, B.A. (2005). Risk of removal and effects on milk production associated with paratuberculosis status in dairy cows. *J. Am. Vet. Med. Assoc*., 227: 1975-1981.

LOMINSKI, I.; CAMERON, J.; ROBERTS, G.B.S. (1956). Experimental Johne´s disease in mice. *J. Pathol. Bacteriol.*, 71: 211-222.

LOSINGER, W.C. (2005). Economic impact of reduced milk production associated with Johne's disease on dairy operations in the USA. *J. Dairy Res*., 72: 425-432.

LOVELL, R.; LEVI, M.; ROTOV, W.I.; ROZNIATOUSHAEGEN, O.I. (1944). Studies on the survival of Johne´s bacilli. *J. Comp. Pathol*., 54: 120-129.

LU, Z.; MITCHELL, R.M.; SMITH, R.L.; VAN KESSEL, J.S.; CHAPAGAIN, P.P.; SCHUKKEN, Y.H.; GROHN, Y.T. (2008). The importance of culling in Johne's disease control. *J. Theor. Biol*., 254: 135-146.

LUBIS, I.; LADDS, P.W.; REILLY, L.R. (1982). Age associated morphological changes in the lymphoid system of tropical cattle. *Res. Vet. Sci*., 32: 270-277.

LUGTON, I. (1999). Mucosa-associated lymphoid tissues as sites for uptake, carriage and excretion of tubercle bacilli and other pathogenic mycobacteria. *Immunol Cell Biol.*, 77:364-72.

LYASHCHENKO, K.; WHELAN, A.O.; GREENWALD, R.; POLLOCK, J.M.; ANDERSEN, P.; HEWINSON, R.G.; VORDERMEIER, H.M. (2004). Association of tuberculin-boosted antibody responses with pathology and cell-mediated immunity in cattle vaccinated with *Mycobacterium bovis* BCG and infected with *M. bovis*. *Infect. Immun.* 72: 2462-7.

LYASHCHENKO, K.P.; SINGH, M.; COLANGELI, R.; GENNARO, M.L. (2000).A multi-antigen print immunoassay for the development of serological diagnosis of infectious diseases. *J. Immunol. Methods.* 242: 91-100.

LYLE, P.A.S.; MERKAL, R.S. (1983). Comparision of ELISA an gel diffusion precipitin test for paratuberculosis. *FEMS Microbiol. Lett.* 202: 233-238.

M´FADYEAN, sir J., SHEATHER, A.L.(1916). Johne´s disease. *J. Comp. Pathol*., 29, 62.

MACHACKOVA, M.; LAMKA, J.; YAYO AYELE, W.; PARMOVA, I.; SVASTOVA, P.; AMEMORI, T.; PAVLIK, I.(2003). Infection of ruminants by uncultivable strains of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in the Czech Republic. En: Juste, R.A.; Geijo, M.V.; Garrido, J.M: (Eds.). *Proc 7th Int. Coll. PTBC*. IAP. Madison, EEUU.pp. 191-196.

MACHACKOVA, M.; SVASTOVA, P.; LAMKA, J.; PARMOVA, I.; LISKA, V.; SMOLIK, J.; FISCHER, O.A.; PAVLIK, I. (2004). Paratuberculosis in farmed and free-living wild ruminants in the Czech Republic (1999-2001). *Vet Microbiol*.,101:225-34.

MACHUGH, N.D.; MBURU, J.K.; CAROL, M.J.; WYATT, C.R.; ORDEN, J.A.; DAVIS, W.C. (1997). Identification of two distinct subsets of bovine gamma delta T cells with unique cell surface phenotype and tissue distribution. *Immunology*, 92: 340-345.

MACKINTOSH, C.; HAIGH, J.C.; GRIFFIN, F. (2002). Bacterial disease of farmed deer and bison. *Rev. Sci. Tech*., 21: 249-263.

MACKINTOSH, C.G.; CLARK, R.G.; THOMPSON, B.; TOLENTINO, B.; GRIFFIN, J.F.; DE LISLE, G.W. (2010). Age susceptibility of red deer (*Cervus elaphus*) to paratuberculosis. *Vet. Microbiol*., 143: 255-261.

MACKINTOSH, C.G.; LABES, R.E.; CLARK, R.G.; DE LISLE, G.W.; GRIFFIN, J.F. (2007). Experimental infections in young red deer (*Cervus elaphus*) with a bovine and an ovine strain of *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis. N. Z. Vet. J.* 55: 23-29.

MACKINTOSH, C.G.; LABES, R.E.; GRIFFIN, J.F. (2005). The effect of Johne's vaccination on tuberculin testing in farmed red deer (*Cervus elaphus*). *N. Z. Vet. J.*, 53: 216-222.

MACKINTOSH, C.G.; LABES, R.E.; THOMPSON, B.R.; CLARK, R.G.; DE LISLE, G.W.; JOHNSTONE, P.D.; GRIFFIN, J.F. (2008). Efficacy, immune response and side effects of vaccines against Johne´s disese in young red deer (*Cervus elaphus*) experimentally challenged with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis. N Z Vet J*., 56: 1-9.

MACKINTOSH, C.G.; QURESHI, T.; WALDRUP, K.; LABES, R.E.; DODDS, K.G.; GRIFFIN, J.F.T. (2000). Genetic resistance to experimental infection with *Mycobacterium bovis* in red deer (*Cervus elaphus*). *Infect. Immunol.*, 68: 1620-1625.

MACKINTOSH, C.G.; CLARK, R.G.; TOLENTINO, B.; DE LISLE, G.W.; LIGGETT, S.; GRIFFIN, J.F. **(2011).**Immunological and pathological responses of red deer resistant or susceptible genotypes, to experimental challenge with *Mycobacteriumavium* subsp. *paratuberculosis.Vet. Immunol. Immunopathol.* 143(1-2): 131-42.

MAEDA, H.; KUWAHARA, H.; ICHIMURA, Y.; OHTSUKI, M.; KURAKATA, S.; SHIRAISHI, A. (1995). TGF-beta enhances macrophage ability to produce IL-10 in normal and tumor-bearing mice. *J. Immunol.*, 155: 4926-4932.

MAINAR-JAIME, R.C.; VÁZQUEZ-BOLAND, J.A. (1998). Factors associated with seroprevalence to *Mycobacterium paratuberculosis* in small-ruminant farms in the Madrid region (Spain). *Prev Vet Med*. 34):317-27.

MAJEED, S.; GOUDSWAARD, J. (1971). Aortic lesions in goats infected with *Mycobacterium johnei. J. Comp. Pathol*.,81: 571-574.

MALIK, Z.A.; THOMPSON, C.R.; HASHIMI, S.; PORTER, B.; LYER, S.S.; KUSNER, D.J. (2003). Cutting edge: *Mycobacterium tuberculosis* blocks Ca2+ signaling and phagosome maturation in human macrophages via specific inhibition of sphingosine kinase. *J. Immunol*., 170: 2811-2815.

MANNING, E.J.; COLLINS, M.T. (2001).*Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis:* pathogen, pathogenesis and diagnosis. *Rev. Sci. Tech*., 20: 133-150.

MARASSI, C.D.; FRÁGUAS, S.; GONZAGA, J.S.; RISTOW, P.; FERREIRA, R.; OELEMANN, W.M.R.; FONSECA, L.S.; LILENBAUM, W. (2005). Interference of anti-M. bovis antibodies in serological tests for paratuberculosis. En: Manning, E.B.; Nielsen, S.S. (Eds.). *Proc 8th Int. Coll. PTBC.* IAP. Madison, EEUU. pp. 511-515.

MARCO, I.; RUIZ, M.; JUSTE, R.; GARRIDO, J.M.; LAVIN, S. (2002). Paratuberculosis in free-ranging fallow deer in Spain. *J. Wildl. Dis.*, 38: 629-632.

MARCO, J.C.; ADÚRIZ, J.J. (1990). Sobre *Mycobacterium paratuberculosis* En: Paratuberculosis ovina. *OVIS*, 7: 49-62.

MARFELL, B.J.; O'BRIEN, R.; GRIFFIN, J.F. (2013). Global gene expression profiling of monocyte-derived macrophages from red deer (Cervus elaphus) genotypically resistant or susceptible to Mycobacterium avium subspeciesparatuberculosis infection.*Dev. Comp. Immunol.* 40(2): 210-7

MARLY, J.; THOREL, M.F.; PERRIN, G.; PARDON, P.; GUERRAULT, D. (1988). Suivi de vaccination de chevrettes contre le paratuberculose: consequences cliniques, serologiques et allergiques et epreuve virulente. En: Thorel, M.F.; Merkal, R.S. (Eds.). *Proc 2nd Int. Coll. PTBC.* IAP. Paris. Francia. pp. 136-140.

MARSH, I.; WHITTINGTON, R.; COUSINS, D. (1999). PCR-restriction endonuclease análisis for identification and strain typing of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and *Mycobacterium avium* subsp. *avium* based en polymorphisms in IS*1311*. *Mol. Cell. Probes.*, 13: 115-1

MASON, O.; MARSH, I.B.; WHITTINGTON, R.J. (2001).Comparison of immunomagnetic bead separation-polymerase chain reaction and faecal culture for the detection of Mycobacterium avium subsp paratuberculosis in sheep faeces. *Aust Vet J*., 79:497-500.

MASON, P.R.; GRANT, I.R.; BALL, H.J.; ROWE M.T. (1999). Use of immunomagnetic PCR (IMS-PCR) to aid the diagnosis of johne´s disease. *Proc. Int. Coll. PTBC.*, Madison, WI, USA, pp.413-419.

MASSONE, A.R.; ITAGAKI, S.; DOI, K.; GIMENO, E.J. (1991). Lectinhistochemical study on normal and paratuberculosis-affected bovine ileum.*J. Vet. Med. Sci.*, 53:761-763.

MATHEWS, F.P. (1930). Liver lesions in Johne´s disease. *J.Am. Vet. Med. Assoc.*, 29:248-250.

McCAUSLAND, I.P.(1980). Apparent Johne's disease in a sheep. *Aust. Vet. J*.,56:564.

McCLURE, H.M.; CHIODINI, R.J.; ANDERSON, D.C.; SWENSON, R.B.; THAYNER, W.R.; COUTU, J.A. (1987).*Mycobacterium paratuberculosis* infection in a colony of stumptail Maccaques (*Maccaca arctoides*). *J. Infect. Dis.*, 155: 1011-1019.

McDONALD, W.L.; O´RILEY, K.J.; SCHROEN, C.J.; CONDRON, R.J. (2005). Heat inactivation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk. *Appl. Environ. Microbiol*., 71: 1785-1789.

McDONALD, W.L.; RIDGE, S.E.; HOPE, A.F.; CONDRON, R.J. (1999). Evaluation of diagnostic tests for Johne's disease in young cattle. *Aust. Vet. J*., 77: 113-119.

McEWEN, A.D. (1939). Investigations on Johne´s disease of sheep. *J. Comp. Pathol*., 52, 69-87.

MCCFADDEN, J.J.; BUTCHER, P.D.; CHIODINI, R.; HERMON-TAYLOR, J. (1987). Crohn's disease-isolated mycobacteria are identical to *Mycobacterium paratuberculosis*, as determined by DNA probes that distinguish between mycobacterial species. *J. Clin. Microbiol.*, 25: 796-801.

MCFADDEN, J.J.; BUTCHER, P.D.; THOMPSON, J.; CHIODINI, R.; HERMON-TAYLOR, J. (1987). The use of DNA probes identifying restriction-fragment-length polymorphisms to examine *the Mycobacterium avium* complex. *Mol. Microbiol.*, 1: 283-291.

McGEE, Z.A.; WITTLER, R.G.; GOODER, H.; CHARACHE, P. (1971). Wall-defective microbial variants: terminology and experimental design. *J Infect Dis*., 123:433-438.

McGREGOR, H.; DHAND, N.K.; DHUNGYEL, O.P.; WHITTINGTON, R.J. (2012). Transmission of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: dose-response and age-based susceptibility in a sheep model. *Prev. Vet. Med*. 107: 76-84.

McKENNA, S.L.; KEEFE, G.P.; BARKEMA, H.W.; MCCLURE, J.; VANLEEUWEN, J.A.; HANNA, P.; SOCKETT, D.C. (2004). Cow-level prevalence of paratuberculosisi in culled dairy caows in Atlantica Canada and Maine. *J. Dairy Sci*., 87: 3770-3777.

McKENNA, S.L.; KEEFE, G.P.; BARKEMA, H.W.; SOCKETT D.C. (2005a). Evaluation of three ELISAs for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* using tissue and fecal culture as comparison standards. *Vet Microbiol*., 110:105-111.

McKENNA, S.L.; KEEFE, G.P.; TIWARI, A.; VANLEEUWEN, J.; BARKEMA, H.W. (2006). Johne's disease in Canada part II: disease impacts, risk factors, and control programs for dairy producers. *Can. Vet. J*., 47: 1089-1099.

McKENNA, S.L.; SOCKETT, D.C; KEEFE, G.P.; MCCLURE, J.; VANLEEUWEN, J.A; BARKEMA, H.W. (2005b). Comparison of two enzyme-linked immunosorbent assays for diagnosis of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis. *J Vet Diagn Invest*. 17:463-466.

McNAB, W.B.; MEEK, A.H.; DUNCAN, J.R.; BROOKS, B.W.; VAN DREUMEL, A.A.; MARTIN, S.W.; NIELSEN, K.H.; SUGDEN, E.A.; TURCOTTE, C. (1991a). An evaluation of selected screening tests for bovine paratuberculosis. *Can J Vet Res.* 55:252-259.

McNAB, W.B.; MEEK, A.H.; MARTIN, S.W. (1988). An epidemiological study of paratuberculosis in Ontario dairy cattle: study design and lipoarabinomannan antigen ELISA test results. *Acta Vet Scand Suppl*. 84: 206-208.

McNAB, W.B.; MEEK, A.H.; MARTIN, S.W.; DUNCAN, J.R. (1991b). Associations between dairy production indices and lipoarabinomannan enzyme-immunoassay results for paratuberculosis. *Can J Vet Res*. 55:356-361.

McQUILLEN, K. (1986). Bacterial protoplasts: effects of diaminopimelic acid deprival and penicillin addition compared in Escherichia coli. *Biochim Biophys Acta.*, 27:410-1.

MEANS, T.K.; LIEN, E.; YOSHIMURA, A.; WANG, S.; GOLENBOCK, D.T.; FENTON, M.J. (1999). The CD14 ligands lipoarabinomannan and lipopolysaccharide differ in their requirement for Toll-like receptors. J Immunol., 163:6748-6755.

MEDZHITOV, R.; JANEWAY, C.A. Jr. (1997). Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Curr. Opin. Immunol*., 9: 4-9.

MEDZHITOV, R.; JANEWAY, C.A. Jr. (2000). Innate immune recognition: mechanisms and pathways. *Immunol. Rev*., 173: 89-97.

MENCHEN, V. (1995). Estudio inmunocitoquímico de la tuberculosis y paratuberculosis caprina. *Tesis Doctoral*. Universidad de Murcia.

MENDES, S.; BOINAS, F.; ALBUQUERQUE, T.; FERNANDES, L.; ALFONSO, A.; AMADO, A. (2004). Epidemiological studies on paratuberculosis in small ruminants in Portugal. *Epidemiol. Sante Anim*., 45: 61-71.

MENDOZA, J.L.; LANA, R.; DÍAZ-RUBIO, M. (2009). *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* and its relationship with Crohn's disease. *World J. Gastroenterol*., 15: 417-422.

MERKAL RS, WHIPPLE DL, SACKS JM, SNYDER GR. (1987). Prevalence of *Mycobacterium paratuberculosis* in ileocecal lymph nodes of cattle culled in the United States. *J Am Vet Med Assoc*. 190:676-680.

MERKAL, R.S. (1970). Diagnostic methods for detection of paratuberculosis (Johne´s disease). *74th Ann. Meeting U.S. Anim. Hlth. Assoc*., 7: 620-623.

MERKAL, R.S. (1973). Laboratory diagnosis of bovine paratuberculosis. *J. Am. Vet. Med. Assoc*., 163: 1100-1102.

MERKAL, R.S. (1984). Paratuberculosis: advances in cultural, serologic, and vaccination methods. *J. Am. Vet. Med. Assoc*., 184: 939-943.

MERKAL, R.S. ; LARSEN, A.B.; NELSON, H.A.; PIER, A.C. (1973). Thermography of tuberculin reactions in cattle.*Infect Immun*.7:805-808.

MERKAL, R.S.; CURRAN, B.J. (1974). Growth and metabolic characteristics of *Mycobacterium paratuberculosis. Appl. Microbiol*., 28: 276-279.

MERKAL, R.S.; KOPECKY, K.E.; LARSEN, A.B. (1970). Immunologic mechanisms in bovine paratuberculosis. *Am. J. Vet. Res*., 31:475-85.

MERKAL, R.S.; KOPECKY, K.E.; LARSEN, A.B.; THURSTON, J.R. (1964). Improvemnents in the techniques for primary cultivation of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Am. J. Vet. Res.*, 25: 1290-1294.

MERKAL, R.S.; LARSEN, A.B. (1962). Improved methods for primary cultivation of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Am. J. Vet. Res.*, 23: 1307-1308.

MERKAL, R.S.; LARSEN, A.B. (1973). Clofazimine treatment of cows naturally infected with *Mycobacterium paratuberculosis*. *Am. J. Vet. Res*., 34: 27-28.

MERKAL, R.S.; LARSEN, A.B.; BOOTH, G.D. (1975a). Analysis of the effect of inapparent bovine paratuberculosis. *Am. J. Vet. Res*., 36: 837-838.

MERKAL, R.S.; LARSEN, A.B.; KOPECKY, K.E.; NESS, R.D. (1968). Comparison of examination and test methods for early detection of paratuberculous cattle. *Am. J. Vet. Res.* 29: 1533-1537.

MERKAL, R.S.; LARSEN, A.B.; VELICER, L.F.; THURSTON, J.R. (1965). Serologic and allergenic effects of 3 Mycobacterium paratuberculosis antigens. *Am J Vet Res*., 26:1267-1270.

MERKAL, R.S.; LITTLEDIKE, E.T.; COX, P.S. (1975b). A gel diffusion precipitin test for detection of paratuberculosis cattle. *X Joint US-Japan Tuberculosis Research Conference.* 10: 473-482.

MERKAL, R.S.; LYLE, P.A.S.; WHIPPLE, D.L. (1985). Decontamination, media and culture methods for *Mycobacterium paratuberculosis. Proc. Ann. Meet US Anim. Health Assoc.*, 89:519-522.

MERKAL, R.S.; McCULLOUGH, W.G.; TAKAYAMA, K. **(1981).** Mycobactins, the state of the art. *Bull. Inst. Pasteur*. 79: 251-259.

MERKAL, R.S.; MILLER, J.M. HINTZ, A.M.; BRYNER, J.H. (1982). Intrauterine inoculation of *Mycobacterium paratuberculosis* into guinea pigs and cattle. *Am. J. Vet. Res*., 43: 676-678.

MERKAL, R.S.; RICHARDS, W.D.(1972). Inhibition of fungal growth in the cultural isolation of mycobacteria. *Appl. Microbiol.*, 24:205-207.

MERKAL, R.S.; WHIPPLE, D.L. (1982). Effectiveness of disinfectants on *Mycobacterium paratuberculosis*. *Proc. 86th Annu. Meet. USAHA*, pp: 514-518.

MEYER, K.F. (1913). Johne´s disease of cattle. *J. Med. Res*., 29, 147.

MEYLAN, M.; NICOLET, J.; OPPLIGER, A.; BURNENS, A.; MARTIG, J. (1994). Evluation de deux techniques d'ELISA pour le diagnostic de la paratuberculose bovine. *Schweiz. Arch. Tierh.*, 136: 377-381.

MEYLAN, M.; RINGS, D.M.; SHULAW, W.P.; KOWALSKI, J.J.; BECH-NIELSEN, S.; HOFFSIS, G.F. (1996). Survival of *Mycobacterium paratuberculosis* and preservation of immunoglobulin G in bovine colostrum under experimental conditions simulating pasteurization. *Am. J. Vet. Res*., 57: 1580-1585.

MICHEL, A.L.; BASTIANELLO, S.S .(2000). Paratuberculosis in sheep: an emerging disease in South Africa. Vet Microbiol., 77:299-307.

MIKKELSEN, H.; JUNGERSEN, G.; NIELSEN, S.S. (2009). Association between milk antibody and interferon-gamma responses in cattle from *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infected herds. *Vet Immunol Immunopathol.*, 127:235-241.

MILLAR, D.; FORD, J.; SANDERSON, J.; WITHEY, S.; TIZARD, M.; DORAN, T.; HERMON-TAYLOR, J. (1996). IS900 PCR to detect *Mycobacterium paratuberculosis* in retail supplies of whole pasteurized cows' milk in England and Wales. *Appl Environ Microbiol*., 62:3446-52.

MILLER, B.H.; FRATTI, R.A.; POSCHET, J.F.; TIMMINS, G.S.; MASTER, S.S.; BURGOS, M.; MARLETTA, M.A.; DERETIC, V. (2004). Mycobacteria inhibit nitric oxide synthase recruitment to phagosomes during macrophage infection. *Infect. Immun.*, 72: 2872-2878.

MILLER, D.S.; COLLINS, M.T.; SMITH, B.B.; ANDERSON, P.R.; KRAMSKY, J.; WILDER, G.; HOPE, A. (2000). Specificity of four serologic assays for *Mycobacterium avium*ss *paratuberculosis* in llamas and alpacas: a single herd study. *J. Vet. Diagn. Invest*., 12: 345-353.

MILLER, J.; JENNY, A.; RHYAN, J.; SAARI, D.; SUAREZ, D. (1997). Detection of Mycobacterium bovis in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues of cattle and elk by PCR amplification of an IS6110 sequence specific for *Mycobacterium tuberculosis* complex organisms. *J. Vet. Diagn. Invest*., 9:244-249.

MILLER, J.M.; JENNY, A.L.; ELLINGSON, J.L. (1999). Polymerase chain reaction identification of *Mycobacterium avium* in formalin-fixed, paraffin-embedded animal tissues. *J. Vet. Diagn. Invest*., 11: 436-440.

MILNER, A.R.; LEPPER, A.W.; SYMONDS, W.N.; GRUNER, E. (1987). Analysis by ELISA and Western blotting of antibody reactivities in cattle infected with *Mycobacterium paratuberculosis* after absorption of serum with *M. phlei. Res. Vet. Sci.*, 42: 140-4.

MILNER, A.R.; MACK, W.N.; COATES, K.J. (1989). A modified ELISA for the detection of goats infected with *Mycobacterium paratuberculosis*. *Aust. Vet. J*., 66: 305-307.

MILNER, A.R.; WILKS, C.R.; BORLAND, R. (1981). In vitro responses of lymphocytes from cattle with advanced *Mycobacterium paratuberculosis* infection to homologous and heterologous antigens. *Res. Vet. Sci*., 31: 93-99.

MILNER, A.R;, MACK, W.N.; COATES, K.J.; 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*., 25:193-8

MINAS, A.; KOUTSOUKOU-HARTONA, E.; PAPASAVVAS, M.; TSANTAS, H.(1994). Epidimiologiki erevna sta poimnia provaton kai aigon stis Voreies Sporades gia parafymatiosi kai kai proiousa pnevmonia. *Deltion tis Ellinikis Ktiniatrikis Etaireias*., 45: 25-30.

MINNIKIN, D.E.; MINNIKIN, S.M.; GOODFELLOW, M.; STANFORD, J.L. (1982). The mycolic acids of *Mycobacterium chelonei. J. Gen. Microbiol*., 128: 817-22.

MITCHELL, R.M.; MEDLEY, G.F.; COLLINS, M.T.; SCHUKKEN, Y.H. (2012). A meta-analysis of the effect of dose and age at exposure on shedding of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (MAP) in experimentally infected calves and cows. *Epidemiol. Infect.* 140(2): 231-46.

MIYAKE K1, YAMASHITA Y, OGATA M, SUDO T, KIMOTO M. (1995). RP105, a novel B cell surface molecule implicated in B cell activation, is a member of the leucine-rich repeat protein family. *J Immunol*., 154:3333-3340.

MÖBIUS, P.; LUYVEN, G.; HOTZEL, H.; KÖHLER, H. (2007).High genetic diversity among *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* strains from German cattle herds shown by combination of IS900 restriction fragment length polymorphism analysis and mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem-repeat typing. *J. Clin. Microbiol.*, 46:972-981

MODLIN, R.L. (1994). Th1-Th2 paradigm: insights from leprosy. *J. Invest. Dermatol*., 102: 828-832.

MODLIN, R.L. (2000). Immunology. A Toll for DNA vaccines. *Nature*. 408: 659-60.

MOHR, P. (2000). Johne's can be managed. En: *Johne's can be managed,* pp. 16-17.

MOKRESH, A.H.; BUTLER, D.G. (1990). Granulomatous enteritis following oral inoculation of newborn rabbits with *Mycobacterium paratuberculosis* of bovine origin. *Can. J. Vet. Res.*, 54: 313-319.

MOKRESH, A.H.; CZUPRYNSKI, C.J.; BUTLER, D.G. (1989). A rabbit model for study of *Mycobacterium paratuberculosis* infection. *Infect. Immun*. 57: 3798-3807.

MOLINA, A.; MORERA, L.; LLANES, D. (1991). Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies against *Mycobacterium paratuberculosis* in goats. *Am. J. Vet. Res*., 52: 863-868.

MOLINA, J.M.; ANGUIANO, A.; FERRER, O. (1996). Study on immune response of goats vaccinated with a live strain of Mycobacterium paratuberculosis. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.*, 19:9-15.

MOLONEY, B.J.; WHITTINGTON, R.J. (2008). Cross species transmission of ovine Johne's disease from sheep to cattle: an estimate of prevalence in exposed susceptible cattle. *Aust. Vet. J.*. 86: 117-23.

MOMOTANI, E.; WHIPHIERMANN, A.B.; CHEVILLE, N.F. (1988). Role of M cells and macrophages in the entrance of *Mycobacterium paratuberculosis* into domes of ileal Peyer's patches in calves. *Vet. Pathol*., 25: 131-137.

MOMOTANI, E.; YOSHINO, T. (1984). Pathological changes of spontaneous dual infection of tuberculosis and paratuberculosis in beef cattle. *Nihon Juigaku Zasshi.,* 46: 625-31.

MONAGHAN, M.L.; DOHERTY, M.L.; COLLINS, J.D.; KAZDA, J.F.; QUINN, P.J. (1994). The tuberculin test. *Vet. Microbiol*., 40: 11-124.

MOREIRA, A.L.; TSENOVA, L.; AMAN, M.H.; BEKKER, L.G.; FREEMAN, S.; MANGALISO, B.; SCHRÖDER, U.; JAGIRDAR, J.; ROM, W.N.; TOVEY, M.G.; FREEDMAN, V.H.; KAPLAN, G.(2002). Mycobacterial antigens exacerbate disease manifestations in *Mycobacterium tuberculosis*-infected mice. *Infect. Immun.,* 70: 2100-7.

MORI, Y.; OKII, M.; SHIMOJI, Y.; YOKOMIZO, Y. (1999). Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in faecal samples by polymerase chain reaction: neutralisation of faecal inhibitory substances. En: Manning, E.J.B.; Collins, M.T. (Eds.). *Proc 6th Int. Coll. PTBC*. IAP. Madison, EEUU. pp. 506.

MORK, T.; HEIER, B.T.; ALVSEIKE, K.R.; LUND, A.(2003). Overvakings- og kontrollprogrammer for landdyr, fisk og skjell I Norge med vekt pa BSE-, salmonella- og paratuberkuloseprogrammene. *Norsk Veterinaertidsskrift*, 115: 707-717.

MORRISON, N.E. (1965). Circumvention of mycobactin requirement of *Mycobacterium paratuberculosis. J. Bacteriol.,* 89: 762-769.

MORTENSEN, H.; NIELSEN, S.S.; BERG, P. (2004). Genetic variation and heritability of the antibody response to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Danish Holstein cows. *J. Dairy Sci.,* 87: 2108-2113.

MOSS, M.T.; SANDERSON, J.D.; TIZARD, M.L.; HERMON-TAYLOR, J.; EL-ZAATARI, F.A.; MARKESICH, D.C.; GRAHAM, D.Y. (1992). Polymerase chain reaction detection of *Mycobacterium*

paratuberculosis and *Mycobacterium avium* subsp *silvaticum* in long term cultures from Crohn's disease and control tissues. *Gut*, 33: 1209-1213.

MOTIWALA, A.S.; AMONSIN, A.; STROTHER, M.; MANNING, E.J.; KAPUR, V.; SREEVATSAN, S. (2004). Molecular epidemiology of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolates recovered from wild animal species. *J. Clin. Microbiol.*, 42: 1703-1712.

MOTIWALA, A.S.; STROTHER, M.; AMONSIN, A.; BYRUM, B.; NASER, S.A.; STABEL, J.R.; SHULAW W.P.; BANNANTINE, J.P.; KAPUR, V.; SREEVATSAN, S. (2003). Molecular epidemiology of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis: evidence for limited strain diversity, strain sharing, and identification of unique targets for diagnosis. *J Clin Microbiol*., 41:2015-2026.

MUCHA, R.; BHIDE, M.R.; CHAKURKAR, E.B.; NOVAK, M.; MIKULA I S. (2009). Toll-like receptors TLR1, TLR2 and TLR4 gene mutations and natural resistance to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in cattle. *Vet. Immunol. ImmunopathoL.*, 128: 381-388.

MUEHLHERR, J.E.; ZWEIFEL, C.; CORTI, S.; BLANCO, J.E.; STEPHAN, R. (2003). Microbiological quality of raw goat's and ewe's bulk-tank milk in Switzerland. *J. Dairy Sci*., 86: 3849-3856.

MUHAMMED, S.I.; ELIASSON, E.C. (1979). The prevalence of antibodies to Mycobacterium johnei in colostrum derived lambs. *Vet. Rec.* 105: 11-12.

MUIRHEAD, R.H.; GALLAGER, J.; BURN, K.J. (1974). Tuberculosis in wild badgers in Gloucestershire: epidemiology. *Vet. Rec.*, 65:552-555.

MULLERAD, J.; HOVAV, A.H.; FISHMAN, Y.; BARLETTA, R.G.; BERCOVIER, H. (2002b). Antigenicity of *Mycobacterium paratuberculosis* superoxide dismutase in mice. *FEMS Immunol. Med. Microbiol*., 34: 81-88.

MULLERAD, J.; HOVAV, A.H.; NAHARY, R.; FISHMAN, Y.; BERCOVIER, H. (2003). Immunogenicity of a 16.7 kDa *Mycobacterium paratuberculosis* antigen. *Microb. Pathog*., 34: 81-90.

MULLERAD, J.; MICHAL, I.; FISHMAN, Y.; HOVAV, A.H.; BARLETTA, R.G.; BERCOVIER, H. (2002a). The immunogenicity of *Mycobacterium paratuberculosis* 85B antigen. *Med. Microbiol. Immunol*., 190: 179-187.

MULLIS, K.; FALOONA, F.; SCHARF, S.; SAIKI, R.; HORN, G.; ERLICH, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, 1:263-73

MUNJAL SK1, TRIPATHI BN, PALIWAL OP, BOEHMER J, HOMUTH M. (2007). Application of different methods for the diagnosis of experimental paratuberculosis in goats. *Zoonoses Public Health.* 54:140-146.

MUNJAL, S.K.; BOEHMER, J.; BEYERBACH, M.; STRUTZBERG-MINDER, K.; HOMUTH, M. (2004). Evaluation of a LAM ELISA for diagnosis of paratuberculosis in sheep and goats. *Vet Microbiol*., 103:107-114.

MUNJAL, S.K.; TRIPATHI, B.N.; PALIWAL, O.P. (2005). Progressive immunopathological changes during early stages of experimental infection of goats with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis. Vet. Pathol.*, 42: 427-436.

MUNK, M.E.; EMOTO, M. (1995). Functions of T-cell subsets and cytokines in mycobacterial infections. *Eur. Respir. J. Suppl*,. 20:668s-675s.

MUÑOZ, M.; DELGADO, L.; VERNA, A.; BENAVIDES, J.; GARCÍA-PARIENTE, C.; FUERTES, M.; FERRERAS, M.C.; GARCÍA-MARIN, J.F.; PÉREZ, V. (2009a). Expression of transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta1) in different types of granulomatous lesions in bovine and ovine paratuberculosis. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis*., 32: 239-252.

MUÑOZ, M.; DELGADO, L.; VERNA, A.; GARCIA-PARIENTE, C.; FERRERAS, M.C.; GARCIA-MARIN, J.F.; PEREZ, V. (2009b). Immunohistochemical expression of iNOS in different types or paratuberculosis granulomatous lesions. *Proc. 10th Int. Coll. PTBC.* p137. Minneapolis, Minnesota. EEUU.

MURA, M.; BULL, T.J.; EVANS, H.; SIDI-BOUMEDINE, K.; McMINN, L.; RHODES, G.; PICKUP, R.; HERMON-TAYLOR, J. (2006). Replication and long-term persistence of bovine and human strains of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* within *Acanthamoeba polyphaga*.. *Appl. Environ. Microbiol*., 72: 854-859.

MUSKENS, J.; BAKKER, D.; DE BOER, J.; VAN KEULEN, L. (2001). Paratuberculosis in sheep: its possible role in the epidemiology of paratuberculosis in cattle. *Vet Microbiol*., 78:101-109.

MUSKENS, J.; BARKEMA, H.W.; RUSSCHEN, E.; VAN MAANEN, K.; SCHUKKEN, Y.H.; BAKKER, D. (2000). Prevalence and regional distribution of paratuberculosis in dairy herds in The Netherlands. *Vet. Microbiol*., 77: 253-261.

MUSKENS, J.; ELBERS, A.R.; VAN WEERING, H.J.; NOORDHUIZEN, J.P. (2003a). Herd management practices associated with paratuberculosis seroprevalence in Dutch dairy herds. *J. Vet. Med. B. Infect. Dis. Vet. Public Health*, 50: 372-377.

MUSKENS, J.; MARS, M.H.; ELBERS, A.R.; VAN MAANEN, K.; BAKKER, D. (2003b). The results of using faecal culture as confirmation test of paratuberculosis-seropositive dairy cattle. *J. Vet. Med. B. Infect. Dis. Vet. Public Health*., 50: 231-234.

MUSKENS, J.; VAN ZIJDERVELD, F.; EGER, A.; BAKKER, D. (2002). Evaluation of the long-term immune response in cattle after vaccination against paratuberculosis in two Dutch dairy herds. *Vet Microbiol*., 86: 269-278.

MUTHARIA, L.M.; MORENO, W.; RAYMOND, M. (1997). Analysis of culture filtrate and cell wall-associated antigens of Mycobacterium paratuberculosis with monoclonal antibodies. *Infect. Immun*., 60: 4074-4079.

MUTWIRI, G.K.; BUTLER, D.G.; ROSENDAL, S.; YAGER, J. (1992). Experimental infection of severe combined immunodeficient beige mice with *Mycobacterium paratuberculosis* of bovine origin. *Infect. Immun*. 60: 4074-4079**.**

MUTWIRI, G.K.; KOSECKA, U.; BENJAMIN, M.; ROSENDAL, S.; PERDUE, M.; BUTLER, D.G. (2001).*Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* triggers intestinal pathophysiologic changes in beige/scid mice*. Comp. Med*., 51: 538-544.

MUTWIRI,G.;WATTS, T.; LEW, L.; BESKORWAYNE, T.; PAPP, Z.; BACA-ESTRADA, M.E.; GRIEBEL, P. (1999). Ileal and jejunal Peyer's patches play distinct roles in mucosal immunity of sheep. *Immunology*. 97:455-461.

NAIN, S.P.P.; CHANDIRAMANI, N.K.; KULSHESHITHA, R.C.; CHUNGH, S.K. (1985). Studies on tuberculine and johnin reactors-a preliminary report-. *Indian Vet. J*., 62:643-646.

NAKAMATSU, M.; FUJIMOTO, Y.; SATOH, H. (1968). The pathological study of paratuberculosis in goats, centered around the formation of remote lesions. *Jap. J. Vet. Res*., 16: 103-119.

NAKASE, H.; NISHIO, A.; TAMAKI, H.; MATSUURA, M.; ASADA, M.; CHIBA, T. OKAZAKI, K. (2006). Specific antibodies against recombinant protein of insertion element 900 of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in Japanese patients with Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis*.12:62-69.

NALUBAMBA, K.; SMEED, J.; GOSSNER, A.; WATKINS, C.; DALZIEL, R.; HOPKINS, J. (2008). Differential expression of pattern recognition receptors in the three pathological forms of sheep paratuberculosis. *Microbes Infect*., 10: 598-604.

NASER, S.A.; FELIX, J.; LIPING, H.; ROMERO, C.; NASER, N.; WALSH, A.; SAFRANEK, W. (1999). Occurrence of the IS*900* gene in *Mycobacterium avium* complex derived from HIV patients. *Moll. Cell Probes*, 13: 367-372.

NASER, S.A.; GHOBRIAL, G.; ROMERO, C.; VALENTINE, J.F. (2004). Culture of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* from the blood of patients with Crohn's disease. *Lancet*, 364: 1039-1044.

NASER, S.A.; HULTEN, K.; SHAFRAN, I.; GRAHAM, D.Y.; EL-ZAATARI, F.A. (2000a). Specific seroreactivity of Crohn's disease patients against p35 and p36 antigens of *M. avium* subsp. *paratuberculosis. Vet. Microbiol*., 77: 497-504.

NASER, S.A.; SHAFRAN, I.; SCHWARTZ. D.; EL-ZAATARI, F.; BIGGERSTAFF, J. (2002). In situ identification of mycobacteria in Crohn's disease patient tissue using confocal scanning laser microscopy. *Mol. Cell. Probes*., 16(1):41-8.

NASER, S.A.; SCHWARTZ, D.; SHAFRAN, I. (2000b). Isolation of *Mycobacterium avi*um subsp *paratuberculosis* from breast milk of Crohn's disease patients. *Am. J. Gastroenterol*., 95: 1094-1095.

NAVARRO, J.A.; BERNABÉ, A.; GÓMEZ, M.A.; SÁNCHEZ, J.; GÓMEZ, S. (1991). Mycobacterial antigen detection by immunohistochemistry in goat paratuberculosis. *Zentralbl. Veterinarmed. B*., 38:231-237.

NAVARRO, J.A.; RAMIS, G.; SEVA, J.; PALLARÉS, F.J.; SÁNCHEZ, J. (1998). Changes in lymphocyte subsets in the intestine and mesenteric lymph nodes in caprine paratuberculosis. *J. Comp. Pathol,. 118:109-21.*

NEDROW, A.J.; GAVALCHIN, J.; SMITH, M.C.; STEHMAN, S.M.; MAUL, J.K.; MCDONOUGH, S.P.; THONNEY, M.L. (2007). Antibody and skin-test responses of sheep vaccinated against Johne's Disease. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 116: 109-12.

NEWSHOLME, S.J.; PLETCHER, J.M. (1981). A mycobacteriosis in a sheep resembling paratuberculosis (Johne's disease*). J. S. Afr. Vet. Assoc*.;52:143-5.

NG, S.; NI, M.Y.; FANG, V.J.; IP, D.K.; CHAN, K.H.; LEUNG, G.M.; PEIRIS, J.S.; COWLING, B.J. (2014). Characteristics of vaccine failures in a randomized placebo-controlled trial of inactivated influenza vaccine in children. *Pediatr Infect Dis J.* , 33:63-66.

NIELSEN, S.S. (2008). Transitions in diagnostic tests used for detection of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis infections in cattle. *Vet Microbiol.*, 132:274-82.

NIELSEN, S.S.; BJERRE, H.; TOFT, N. (2008). Colostrum and milk as risk factors for infection with Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis in dairy cattle. J Dairy Sci. 91: 4610-4615.

NIELSEN, S.S.; ENEVOLDSEN, C.; GRÖHN, Y.T. (2002a). The *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* ELISA response by parity and stage of lactation. *Prev Vet Med*., 54:1-10.

NIELSEN, S.S.; GRÖHN, Y.T.; ENEVOLDSEN, C. (2002b). Variation of the milk antibody response to paratuberculosis in naturally infected dairy cows. *J Dairy Sci*., 85:2795-2802.

NIELSEN, S.S.; HOUE, H.; THAMSBORG, S.M.; BITSCH, V. (2001). Comparison of two enzyme-linked immunosorbent assays for serologic diagnosis of paratuberculosis (Johne's disease) in cattle using different subspecies strains of *Mycobacterium avium. J. Vet. Diagn. Invest.*, 13: 164-6.

NIELSEN, S.S.; KOLMOS, B.; CHRISTOFFERSEN, A.B. **(2004).** Comparison of contamination and growth of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis on two different media. *J Appl Microbiol.*, 96:149-53.

NIELSEN, S.S.; THAMSBORG, S.M.; HOUE, H.; BITSCH, V. (2000a). Bulk-tank milk ELISA antibodies for estimating the prevalence of paratuberculosis in Danish dairy herds. *Prev. Vet. Med*., 44: 1-7.

NIELSEN, S.S.; THAMSBORG, S.M.; HOUE, H.; BITSCH, V. (2000b). Corrigendum to "Bulk-tank milk ELISA antibodies for estimating the prevalence of paratuberculosis in Danish dairy herds". *Prev. Vet. Med*., 46: 297.

NIELSEN, S.S.; TOFT, N. (2007). Assessment of management-related risk factors for paratuberculosis in Danish dairy herds using Bayesian mixture models. *Prev. Vet. Med*., 81: 306-317.

NIELSEN, S.S.; TOFT, N. (2009). A review of prevalences of paratuberculosis in farmed animals in Europe. *Prev. Vet. Med*., 88: 1-14.

NIELSEN, S.S.; TOFT. N. (2006) Age-specific characteristics of ELISA and fecal culture for purpose-specific testing forparatuberculosis. *J Dairy Sci.*, 89:569-79.

NIGOU, J.; ZELLE-RIESER, C.; GILLERON, M.; THURNHER, M., PUZO, G. (2001). Mannosylated lipoarabinomannans inhibit IL-12 production by human dendritic cells: evidence for a negative signal delivered through the mannose receptor. *J Immunol.* 166:7477-1485.

NISBET, D.I.; GILMOUR, N.J.L.; BROTHERSTON, J.G.(1962). Quantitative studies of *Mycobacterium johnei* in tissues of sheep. III. Intestinal histopathology. *J. Comp. Pathol*., 72: 80-91.

NORDLUND, K.V.; GOODGER, W.J.; PELLETIER, J.; COLLINS, M.T. (1996). Associations between subclinical paratuberculosis and milk production, milk components, and somatic cell counts in dairy herds. *J. Am. Vet. Med. Assoc*., 208: 1872-1876.

NOSS, E.H.; PAI, R.K.; SELLATI, T.J.; RADOLF, J.D.; BELISLE, J.; GOLENBOCK, D.T.; BOOM, W.H.; HARDING, C.V. (2001). Toll-like receptor 2-dependent inhibition of macrophage class II MHC expression and antigen processing by 19-kDa lipoprotein of Mycobacterium tuberculosis. *J. Immunol*., 167: 910-918.

O´BRIEN, R.; MACKINTOSH, C.G.; BAKKER, D.; KOPECNA, M.; PAVLIK, I.; GRIFFIN, J.F. (2006). Immunological and molecular characterization of susceptibility in relationship to bacterial strain differences in *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in the red deer (Cervus elaphus). *Infect. Immun*. 74: 3530-3537.

O´REILLY, C.E.; O´CONNOR, L.; ANDERSON, W.; HARVEY, P.; GRANT, I.R.; DONAGHY, J.; ROWE, M.; O´MAHONY, P. (2004). Surveillance of bulk raw and commercially pasteurized cows' milk from approved Irish liquid-milk pasteurization plants to determine the incidence of *Mycobacterium paratuberculosis. Appl. Environ. Microbiol*., 70: 5138-5144.

OBASANJO, I.O.; GRÖHN, Y.T.; MOHAMMED, H.O.; (1997). Farm factors associated with the presence of *Mycobacterium paratuberculosis* infection in dairy herds on the New York State Paratuberculosis Control Program. *Prev Vet Med*. 32:243-51.

OCEPEK, M.; KRT, B.; POGACNIK, M. (2002). Seroprevalence of paratuberculosis in Slovenia between 1999 and 2001. *Slov. Vet. Res*., 39: 179-185.

OCEPEK, M.; POSEDI, J.; PISLAK, M. (1999). Prevalence of bovine paratuberculosis in Slovenia in 1997 and 1998. *Zbornik Veterinarske Fakultete Univerza Ljubljana*, 36: 111-119.

OGURA, Y.; BONEN, D.K.; INOHARA, N.; NICOLAE, D.L.; CHEN, F.F.; RAMOS, R.; BRITTON, H.; MORAN, T.; KARALIUSKAS, R.; DUERR, R.H.; ACHKAR, J.P.; BRANT, S.R.; BAYLESS, T.M.; KIRSHNER, B.S.; HANAUER, S.B.; NUÑEZ, G.; CHO, J.H. (2001a). A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature*, 411: 603-606.

OGURA, Y.; INOHARA, N.; BENITO, A.; CHEN, F.F.; YAMAOKA, S.; NUNEZ, G. (2001b). Nod2, a Nod1/Apaf-1 family member that is restricted to monocytes and activates NF-kappaB. *J. Biol. Chem*., 276: 4812-4818.

OIE. (2009). Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE), *Código sanitario para los Animales Terrestres*, 2009. Vol. 1: Capítulos 1.1 y 1.2. (http://www.oie.int/esp/normes /mcode/es_sommaire.htm).

OLSEN, I.; BOYSEN, P.; KULBERG, S.; HOPE, J.C.; JUNGERSEN, G.; STORSET, A.K. (2005). Bovine NK cells can produce gamma interferon in response to the secreted mycobacterial proteins ESAT-6 and MPP14 but not in response to MPB70. *Infect. Immun*., 73: 5628-5635.

OLSEN, I.; REITAN, L.J.; HOLSTAD, G.; WIKER, H.G. (2000). Alkyl hydroperoxide reductases C and D are major antigens constitutively expressed by Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis.*Infect Immun*., 68:801-8.

OLSEN, I.; SIGURDARDÓTTIR, G.; DJONNE, B. (2002). Paratuberculosis with special reference to cattle. A review. *Vet. Q*. 24: 12-28.

OLSEN, I.; STORSET, A.K. (2001). Innate IFN-gamma production in cattle in response to MPP14, a secreted protein from *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis*. *Scand. J. Immunol.*, 54: 306-313.

OLSEN, I.; TOLLEFSEN, S.; AAGAARD, C.; REITAN, L.J.; BANNANTINE, J.P.; ANDERSEN, P.; SOLLID, L.M.; LUNDIN, K.E. (2009). Isolation of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* reactive CD4 T cells from intestinal biopsies of Crohn's disease patients. *PLoS One*, 4: e5641.

OLSEN, I.; TRYLAND, M.; WIKER, H.G.; REITAN, L.J. (2001a). AhpC, AhpD, and a secreted 14-kilodalton antigen from *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* distinguish between paratuberculosis and bovine tuberculosis in an enzyme-linked immunosorbent assay. *Clin. Diagn. Lab. Immunol*., 8: 797-801.

OLSEN, I.; WIKER, H.G.; JOHNSON, E.; LANGEGGEN, H.; REITAN, L.J. (2001b). Elevated antibody responses in patients with Crohn's disease against a 14-kDa secreted protein purified from *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Scand. J. Immunol*., 53: 198-203.

ORME, I. (2004). Adaptive immunity to mycobacteria. *Curr. Opin. Microbiol*., 7: 58-61.

ORME, I.M.; ROBERTS, A.D.; GRIFFIN, J.P.; ABRAMS, J.S. (1993). Cytokine secretion by CD4 T lymphocytes acquired in response to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J. Immunol*., 151: 518-525.

OSTERSTOCK, J.B.; FOSGATE, G.T.; NORBY, B.; MANNING, E.J.; COLLINS, M.T.; ROUSSEL, A.J. (2007). Contribution of environmental mycobacteria to false positive serum ELISA results for paratuberculosis. J Am Vet Med Assoc. 230: 896-901.

OSTROWSKI, M.; MUNDO, S.L.; HARRIS, N.B.; BARLETTA, R.G.; LOPEZ, O.J. (2003). B-cell epitopes in the immunodominant p34 antigen of mycobacterium avium ssp. paratuberculosis recognized by antibodies from infected cattle. *Scand J Immunol*., 58:511-521.

OTT, S.L.; WELLS, S.J. ;WAGNER, B.A. (1999). Herd-level economic losses associated with Johne's disease on US dairy operations. *Prev. Vet. Med*., 40: 179-192.

OWEN, W.J.; THOEN, C.O. (1983). Experimental exposure of cattle to *Mycobacterium paratuberculosis* orally and intrauterine with attempted culture of the organism and detection of humoral antibodies. *Proc. USA An. Health Assoc*., 87: 570-581.

PAK, S.I.; KIM, D.; SALMAN, M. (2003). Estimation of paratuberculosis prevalence in dairy cattle in a province of Korea using an enzyme-linked immunosorbent assay: application of Bayesian approach. *J. Vet. Sci*., 4: 51-56.

PAKHOMOVA, S.; GAO, B.; BOEGLIN, W.E.; BRASH, A.R.; NEWCOMER, M.E. (2009). The structure and peroxidase activity of a 33-kDa catalase-related protein from *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*. *Protein Sci*., 18: 2559-2568.

PALING, R.W.; WAGHELA, S.; MACOWAN, K.J.; HEATH, B.R. (1988). The occurrence of infectious diseases in mixed farming of domesticated wild herbivores and livestock in Kenya. II. Bacterial diseases. *J. Wildl. Dis*., 24: 308-316.

PALIWAL, O.P.; KUMAR, R.; SOMVANSHI, R. (1985). The immune spectrum of *Mycobacterium jonei* infection in goats. *Indian J. Vet. Path.*,62:743-747.

PALIWAL, O.P.; RAJYA, B.S. (1982). Evaluation of paratuberculosis in goats: pathomorphological studies. *Indian J. Vet. Path*., 6: 29-34.

PALLASKE, G. (1962). Die Tuberkullose deer Lunge. En: Joest, E., pp. 238-276. *Handbuch der speziellen Pathologischen Anatomie der Haustiere*. Verlag Paul Parey, Berlín, Alemania.

PALMER, M.V.; WATERS, W.R.; THACKER, T.C. (2007). Lesion development and immunohistochemical changes in granulomas from cattle experimentally infected with *Mycobacterium bovis*. *Vet. Pathol*., 44: 863-874.

PALMER, M.V.; WATERS, W.R.; THACKER, T.C.; GREENWALD, R.; ESFANDIARI, J.; LYASHCHENKO, K.P. (2006). Effects of different tuberculin skin-testing regimens on gamma interferon and antibody responses in cattle experimentally infected with *Mycobacterium bovis*. *Clin. Vaccine Immunol*., 13: 387-394.

PALSSON, P.A. (1962). Paratuberculosis in Iceland sheep and its control by vaccination. *Bull. Off. Int. Epizoot.*, 58: 65-79.

PANT, S.D.; VERSCHOOR, C.P.; SCHENKEL, F.S.; YOU, Q.; KELTON, D.F.; KARROW, N.A. (2011). Bovine PGLYRP1 polymorphisms and their association with resistance to *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*.*Anim. Genet.* 42: 354-60.

PARK, S.U; KATHAPERUMAL, K.; MCDONOUGH, S.; AKEY, B.; HUNTLEY, J.; BANNANTINE, J.P.; CHANG, Y.F. (2008). Immunization with a DNA vaccine cocktail induces a Th1 response and protects mice against *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* challenge *Vaccine*. 26(34):4329-37.

PARRISH, N.M.; RADCLIFF, R.P.; BREY, B.J.; ANDERSON, J.L.; CLARK, D.L.JR. KOZICZKOWSKI, J.J.; KO, C.G.; GOLDBERG, N.D.; BRINKER, D.A.; CARLSON, R.A.; DICK, J.D.; ELLINGSON, J.L. (2009). Absence of mycobacterium subsp. Paratuberculosis in Crohn´s patients. *Inflam Bowel Dis*. 15(4): 558-565.

PATTERSON, J.P.; LAVENTURE, M.; HURLEY, S.S.; DAVIS, J.P. (1988) Accidental self-inoculation with *Mycobacterium paratuberculosis* bacterin (johne's bacterin) by veterinarians in Wisconsin. *J. Am. Vet. Assoc.*, 192: 1197-1199.

PATTON, E.; KONKLE, D.; FISH, R.; ENGRAV, J; BOHN, J. (2006). Role of vaccination in the control of Johne's disease in 3 Wisconsin dairy herds. Wisconsin Department of Agriculture, Trade and Consumer protection. Division of Animal Health.

PATTON, E.A. (2011). Paratuberculosis vaccination.*Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.*, 27: 573-580.

PAVLIK, I.; BARTL, A.; HORVATHOVA, L.; DVORSKA, L.; MATLOVA, O.; FISCHER, R.; DU MAINE, R.; ROZSYPALOVA, Z. (1999a). Study of differing *Mycobacteriumavium* subsp. *paratuberculosis* DNA fingerprints from farm and wild ruminants in the Czech Republic during 1995-1998. En: Manning, E.J.B.; Collins, M.T. (Eds.). *Proc 6th Int. Coll. PTBC*. IAP. Madison, EEUU. pp. 188-199.

PAVLIK, I.; BARTL, J.; DVORSKA, L.; SVASTOVA, P.; DU MAINE, R.; MACHACKOVA, M.; YAYO AYELE, W.; HORVATHOVA, A. (2000a). Epidemiology of paratuberculosis in wild ruminants studied by restriction fragment length polymorphism in the Czech Republic during the period 1995-1998. *Vet. Microbiol*., 77: 231-251.

PAVLIK, I.; BEICKOVÁ, L.; PAVLAS, M.; ROZSYPALOVÁ, Z.; KOSKOVÁ, S. (1995). Characterization by restriction endonuclease analysis and DNA hybridization using IS*900* of bovine, ovine, caprine and human dependent strains of *Mycobacterium paratuberculosis* isolated in various localities. *Vet. Microbiol*., 45: 311-318.

PAVLIK, I.; ROZSYPALOVA, Z.; VESELY. T.; BARTL, J.; MARTLOVA, L.; VRBAS, V.; VALENT, L.; RAJSKY, D.; MRACKO, I.; HIRKO, M.; MISKOVIC, P. (2000b). Control of paratuberculosis in five cattle farms by serological test and faecal culture during the period 1990-1999. *Vet. Med. Czech*, 45: 61-70.

PAVLIK, I.; VESELÝ, T.; BARTL, J.; HORVATHOVA, A.; MARTLOVÁ, L.; VRBAS, V.; VALENT, L.; MISKOVIC, P.; HIRKO, M. (1999b). Reliability of diagnostic methods (clinical examination, faecal culture, skin and serologic test) for paratuberculosis of cattle and sheep during the 1988-1998 erradication and control programme. En: Manning, E.J.B.; Collins, M.T. (Eds.). *Proc 6th Int. Coll. PTBC*. IAP. Madison, EEUU. pp. 371-383.

PAYNE, J.M., RANKIN, J.D. (1961a). The pathogenesis of experimental Johne ´s disease in calves. *Res. Vet. Sci*., 2:167-174.

PAYNE, J.M., RANKIN, J.D. (1961b). A comparison of the pathogenesis of experimental Johne´s disease in calves and cows. *Res. Vet. Sci*., 2:175-179.

PEARSON, J.K.L.; McCELLAND, T.G. (1955). Uterine infection and congenital Johne´s disease in cattle. Vet. *Rec*., 67: 615-616.

PELEMAN, R.; WU, J.; FARGEAS, C.; DELESPESSE, G. (1989). Recombinant interleukin 4 suppresses the production of interferon gamma by human mononuclear cells. *J. Exp. Med*., 170: 1751-1756.

PENCE, M., BALDWIN, C.; BLACK, C.C. III. (2003). The seroprevalence of Johne's disease in Georgia beef and dairy cull cattle. *J Vet Diagn Invest*. 15:475-747.

PEREIRA-SUÁREZ AL1, ESTRADA-CHÁVEZ C, ARRIAGA-DÍAZ C, ESPINOSA-CUETO P, MANCILLA R. (2006). Coexpression of NRAMP1, iNOS, and nitrotyrosine in bovine tuberculosis. *Vet Pathol.* 43:709-417.

PÉREZ DE VAL, B.; NOFRARÍAS, M.; LÓPEZ-SORIA, S.; GARRIDO, J.M.; VORDERMEIER, H.M.; VILLARREAL-RAMOS, B.; MARTÍN, M.; PUENTES, E.; JUSTE, R.A.; DOMINGO, M. (2012). Effects of vaccination against paratuberculosis on tuberculosis in goats: diagnostic interferences and cross-protection. *BMC Vet. Res*., 8: 191.

PÉREZ, V. (1992). Estudio de la paratuberculosis en la especie ovina. *Tesis doctoral*. Universidad de Zaragoza.

PÉREZ, V.; BOLEA, R.; CHÁVEZ, G.; CORTABARRÍA, N.; JUSTE, R.A.; BADIOLA, J.J.; GARCÍA-MARÍN, J.F. (1994a). Efficiency of PCR and culture in the detection of *Mycobacterium avium* subsp. *silvaticum* and *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in tissue samples of sheep. En: Chiodini, R.J.; Collins, M.T: Bassey, E.O.E. (Eds.). *Proc 4th Int. Coll. PTBC. IAP*. Providence. EEUU. pp 97-100.

PÉREZ, V.; CHÁVEZ, G.; GUTIÉRREZ, M.; TELLECHEA, J. ; BADIOLA, J.J. ; GARCÍA-MARÍN, J.F. (1994b). Evaluation of the AGID and γ-interferon test in lambs infected with *Mycobacterium avium* subsp. *silvaticum* and *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis.* En: Chiodini, R.J.; Collins, M.T: Bassey, E.O.E. (Eds.). *Proc 4th Int. Coll. PTBC. IAP*. Providence. EEUU. pp 91-95.

PÉREZ, V.; CORPA, J.M.; GARCÍA-MARÍN, J.F. (2000). El cuadro clínico y lesional de la paratuberculosis bovina En: Juste Editor. Paratuberculosis. *BOVIS*, Aula Veterinaria, vol. nº 93, pp. 39-47.

PÉREZ, V.; GARCÍA MARÍN, J.F.; BADIOLA, J.J. (1996). Description and classification of different types of lesion associated with natural paratuberculosis infection in sheep. *J. Comp. Pathol*., 114: 107-122.

PÉREZ, V.; GARCÍA MARÍN, J.F.; BRU, R.; MORENO, B.; BADIOLA, J.J. (1995). Resultados obtenidos en la vacunación de animals adultos frente a paratuberculosis. *Med. Vet*., 12: 196-201.

PÉREZ, V.; **GARCÍA MARÍN, J.F.; PERIS, P.; BADIOLA, J.J.; JUSTE, R.A. (1990).** Detección de M. paratuberculosis en secciones de tejido mediante la técnica de avidita-biotina-peroxidasa. Estudio comparativo con la técnica de Ziehl-Neelsen. *Informes técnicos del Departamento de Agricultura y Pesca del Gobierno Vasco*, 34: 30-34.

PÉREZ, V.; MORENO, O.; MUÑOZ, M.; GARCÍA-PARIENTE, C.; BENAVIDES, J.; DELGADO, L.; GONZÁLEZ, J.; LUIS, M.; FUERTES, M.; GARCÍA-MARÍN, J.F.; FERRERAS, M.C. (2009). Diagnosis of paratuberculosis in slaughtered calves in the Northwest of Castilla y León (Spain) by pathological methods. *Proc. 10th Int. Coll. PTBC*. p 184. Minneapolis. Minnesota. EEUU.

PÉREZ, V.; TELLECHEA, J.; BADIOLA, J.J.; GUTIÉRREZ, M.; GARCÍA MARÍN, J.F. (1997). Relation between serologic response and pathologic findings in sheep with naturally acquired paratuberculosis. *Am. J. Vet. Res*., 58: 799-803.

PÉREZ, V.; TELLECHEA, J.; CORPA, J.M.; GUTIÉRREZ, M.; GARCÍA MARÍN, J.F. (1999). Relation between pathologic findings and cellular immune responses in sheep with naturally acquired paratuberculosis. *Am. J. Vet. Res*., 60: 123-127.

PERIS, B. (1992). Contribución al conocimiento de los aspectos inmunopatológicos de la paratuberculosis mediante el estudio de la respuesta humoral y celular local. *Tesis doctoral*. Universidad de Zaragoza.

PETIT, E.(2001). Enquete serologique sur la paratuberculose bovine menée dans l´Yonne lors de la campagne 98-99. *Epidemiol, Sante Anim*., 40 : 23-39.

PICKUP, R.W.; RHODES, G.; ARNOTT, S.; SIDI-BOUMEDINE, K.; BULL, T.J.; WEIGHTMAN, A.; HURLEY, M.; HERMON-TAYLOR, J. (2005).*Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in the catchment area and water of the River Taff in South Wales, United Kingdom, and its potential relationship to clustering of Crohn's disease cases in the city of Cardiff. *Appl. Environ. Microbiol*., 71: 2130-2139.

PIERCE, E.S.(2009). Where are all the *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in patients with Crohn's disease? *PLoS Pathog*., 5: e1000234.

PILLAI SR1, JAYARAO BM, GUMMO JD, HUE EC, TIWARI D, STABEL JR, WHITLOCK RH. (2001). Identification and sub-typing of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and *Mycobacterium avium* subsp. avium by randomly amplified polymorphic DNA. *Vet Microbiol*., 79:275-284.

PILLARS, R.B.; GROOMS, D.L.; KANEENE, J.B. (2009). Longitudinal study of the distribution of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in the environment of dairy herds in the Michigan Johne's disease control demonstration herd project. *Can. Vet. J*., 50: 1039-1046.

PINEDO, P.J.; BUERGELT, C.D.; DONOVAN, G.A.; MELENDEZ, P.; MOREL, L.; WU, R.; LANGAEE, T.Y.; RAE, D.O.(2009a). Candidate gene polymorphisms (BoIFNG, TLR4, SLC11A1) as risk factors for paratuberculosis infection in cattle. *Prev. Vet. Med*., 91: 189-196.

PINEDO, P.J.; BUERGELT, C.D.; DONOVAN, G.A.; MELENDEZ, P.; MOREL, L.; WU, R.; LANGAEE, T.Y.; RAE, D.O. (2009b). Association between CARD15/NOD2 gene polymorphisms and paratuberculosis infection in cattle. *Vet. Microbiol*., 134: 346-352.

PINETON DE CHAMBRUN, G.; COLOMBEL, J.F.; POULAIN, D.; DARFEUILLE-MICHAUD, A. (2008). Pathogenenic agents in inflammaory bowel diseases. *Curr Opin Gastroenterol*. 24: 440-447.

PLAIN, K.M.; PURDIE, A.C.; BEGG, D.J.; DE SILVA, K,.; WHITTINGTON, R.J. (2010). Toll-like receptor (TLR)6 and TLR1 differentiation in gene expression studies of Johne's disease. *Vet Immunol Immunopathol*., 137:142-148.

PLANTE, Y.; REMENDA, B.W.; CHELACK, B.J.; HAINES, D.M. (1996). Detection of *Mycobacterium paratuberculosis* in formalin-fixed paraffin-embedded tissues by the polymerase chain reaction. *Can. J. Vet. Res.*,60: 115-120.

PLATTNER, B.L.; DOYLE, R.T.; HOSTETTER, J.M. (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: 587-597.

PLAYFAIR, L. (2001). La vacunación. En: Roitt, I. *Inmunología.* 5ª Ed. Ediciones Harcourt, S.A. pp. 263-272.

PODOLSKY, D.K. (2002). Inflammatory bowel disease. 347: 417-429.Inflammatory bowel disease *N. Engl. J. Med*., **347 (6)**: 417-429.

POLLOCK, J.M.; WELSH, M.D. (2002). The WC1(+) gammadelta T-cell population in cattle: a possible role in resistance to intracellular infection. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 89: 105-114.

POMPEI, L.; JANG, S.; ZAMLYNNY, B.; RAVIKUMAR, S.; MC BRIDE, A.; HICKMAN, S.P.; SALGAME, P. (2007). Disparity in IL-12 release in dendritic cells and macrophages in response to *Mycobacterium tuberculosis* is due to use of distinct TLRs. *J. Immunol*., 178: 5192-5199.

POTEL, K. (1974). La inflamación. En: *Tratado de Anatomía Patológica General Veterinaria*. Ed. Acribia, pp. 221-272. Zaragoza, España.

POTT, J.; BASLER, T.; DUERR, C.U.; ROHDE, M.; GOETHE, R.; HORNEF, M.W. (2009). Internalization-dependent recognition of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* by intestinal epithelial cells. *Cell Microbiol*., 11: 1802-1815.

PRESENT, D.H. (1999). Review article: the efficacy of infliximab in Crohn's disease--healing of fistulae. *Aliment. Pharmacol. Ther.*, 4:23-8.

PRITCHARD, D.G. (1988). A century of bovine tuberculosis 1888-1988: conquest and controversy. *J Comp Path.* 99:357-399.

PUGIN, J.; HEUMANN, I.D.; TOMASZ, A.; KRAVCHENKO, V.V.; AKAMATSU, Y.; NISHIJIMA, M.; GLAUSER, M.P.; TOBIAS, P.S.; ULEVITCH, R.J. (1994). CD14 is a pattern recognition receptor. *Immunity*, 1: 509-516.

QUESNIAUX, V.; FREMOND, C.; JACOBS, M.; PARIDA, S.; NICOLLE, D.; YEREMEEV, V.; BIHL, F.; ERARD, F.; BOTHA, T.; DRENNAN, M.; SOLER, M.N.; LE BERT, M.; SCHNYDER, B.; RYFFEL, B. (2004). Toll-like receptor pathways in the immune responses to mycobacteria. *Microbes Infect*., 6: 946-959.

QUINN, A.; JIANG, W.; VELAZ-FAIRCLOTH, M.; COBB, A.J.; HENRY, S.C.; FROTHINGHAM, R. (2002). In vivo protein expression and immune responses generated by DNA vaccines expressing mycobacterial antigens fused with a reporter protein. *Vaccine*. **20: 3187-92.**

QUIRKE, P. (2001). Antagonist *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* is a cause of Crohn's disease. *Gut*, 49: 757-60.

RADEMAKER, J.L.; VISSERS, M.M.; TE GIFFEL, M.C. (2007). Effective heat inactivation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in raw milk contaminated with naturally infected feces. *Appl. Environ. Microbiol*., 73: 4185-4190.

RADOSEVICH, T.J.; REINHARDT, T.A.; LIPPOLIS, J.D.; BANNANTINE, J.P.; STABEL, J.R. (2007). Proteome and differential expression analysis of membrane and cytosolic proteins from *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* strains K-10 and 187. *J. Bacteriol.*, 189: 1109-1117.

RADOSTITS, G.M.; GAY, C.C.; HINCHCLIFF, K.W. (2007). Paratuberculosis (Johne's disease). En: *Veterinary Medicine*. 10th ed. Elsevier Saunders. Londres. Reino Unido. pp. 1017-1044.

RAIZMAN, E.A.; FETROW, J.P.; WELLS, S.J. (2009). Loss of income from cows shedding *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* prior to calving compared with cows not shedding the organism on two Minnesota dairy farms. *J. Dairy Sci*., 92: 4929-4936.

RAIZMAN, E.A.; WELLS, S.J.; GODDEN, S.M.; BEY, R.F.; OAKES, M.J.; BENTLEY, D.C.; OLSEN, K.E. (2004). The distribution of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* in the environment surrounding Minnesota dairy farms. *J. Dairy Sci.*, 87:2959-2966.

RAIZMAN, E.A.; WELLS, S.J.; JORDAN, P.A.; DELGIUDICE, G.D.; BEY, R.R. (2005).*Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from free-ranging deer and rabbits surrounding Minnesota dairy herds. *Can. J. Vet. Res*.,69: 32-38.

RAJA, A.(2004). Immunology of tuberculosis. *Indian J. Med. Res*., 120: 213-232.

RAJUKUMAR, K.; TRIPATHI, B.N.; KURADE, N.P.; PARIHAR, N.S. (2001). An enzyme-linked immunosorbent assay using immonoaffinity-purified antigen in the diagnosis of caprine paratuberculosis and its comparison with conventional ELISAs. *Vet. Res. Commun*., 25:539-553.

RAJYA, B.S.; SINGH, C.M. **(1961).** Studies on the pathology of Johne´s disease in sheep: III. Pathologic changes in sheep with naturally occurring infections. *Am. J. Vet. Res*., 22:189-203.

RANKIN, J. D.(1959). Experimental infection. *Vet. Rec*., 71: 1157-1167.

RANKIN, J.D. (1958b). The experimental production of Johne's disease in laboratory rabbits. *J. Pathol. Bacteriol.,* 75: 363-366.

RANKIN, J.D. (1962). The experimental infection of cattle with *Mycobacterium johnei*. IV. Adult cattle maintained in an infectious environment. *J. Comp. Pathol*., 72: 113-117.

RANKIN, J.D.(1958a). The experimental infection of cattle with *Mycobacterium johnei*. I. Calves inoculated intravenously. *J. Comp. Pathol*., 68:331-337.

RANKIN, J.D.(1961a). The experimental infection of cattle with *Mycobacterium johnei*. II. Adult cattle inoculated intravenously. *J. Comp. Pathol*., 71: 6-9.

RANKIN, J.D.(1961b). The experimental infection of cattle with *Mycobacterium johnei*. III. Calves maintained in an infectious environment. *J. Comp. Pathol*., 71: 10-15.

RAST, L.; WHITTINGTON, R.J. (2005). Longitudinal study of the spread of ovine Johne´s disease in a sheep flock in southeastern New South Wales. *Aust. Vet. J.* 83: 227-232.**.**

RASTISLAV, M. ; MANGESH B. (2012). BoLA-DRB3 exon 2 mutations associated with paratuberculosis in cattle.*Vet J.,* 192:517-9.

RASTOGI, N.; LEGRAND, E.; SOLA, C. (2001). The mycobacteria: an introduction to nomenclature and pathogenesis. *Rev Sci Tech.* 20:21-54.

RATLEDGE, C.; PATEL, P.V.; MUNDY, J. (1982). Iron transport in *Mycobacterium smegmatis*: the location of mycobactin by electron microscopy. *J. Gen. Microbiol.,* 128: 1559-65.

RATNAMOHAN, T.N.; SPENCER, T.L. (1986). A technique for the purification of Mycobacterium paratuberculosis from the ileal mucosa of infected cattle. *Aust. Vet. J.,* 63: 185-187.

REBHUM, W.C. (1995). Infectious diseases of the gastrointestinal tract. En: *Diseases of dairy cattle.* Williams &Wilkins, 1st ed. pp. 208-213. Baltimore, E.E.U.U.

REDDACLIFF, L.A.; BEH, K.; MC GREGOR, H.; WHITTINGTON, R.J. (2005). A preliminary study of possible genetic influences on the susceptibility of sheep to Johne's disease. *Aust. Vet. J.,* 83: 435-441.

REDDACLIFF, L.A.; EPPLESTON, J.; WINDSOR, P.; WHITTINGTON, R.; JONES, S. (2006). Efficacy of a killed vaccine for the control of paratuberculosis in Australian sheep flocks. *Vet. Microbiol.,* 115: 77-90.

REDDACLIFF, L.A.; NICHOLLS, P.J.; VADALI, A.; WHITTINGTON, R.J. (2003a). Use of growth indices from radiometric culture for quantification of sheep strains of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis. Appl. Environ Microbiol*., 69: 3510-3516.

REDDACLIFF, L.A.; VADALI, A.; WHITTINGTON, R.J. (2003b). The effect of decontamination protocols on the numbers of sheep strain *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolated from tissues and faeces. *Vet. Microbiol*., 95: 271-282.

REDDACLIFF, L.A.; WHITTINGTON, R.J. (2003). Experimental infection of weaner sheep with S strain *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis. Vet. Microbiol.,* 96: 247-258.

REDDY, K.P.; KITTELBERGER, R.; PENROSE, M.E.; MEYNELL, R.M.; COUSIN, D.; ELLIS, T.; MUTHARIA, L.M.; SUGDEN, E.A.; JOHNS, A.H.; DE LISLE, G.F. (1999). Comparison of serological test and faecal culture for the detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in cattle and analysis of the antigen involved. *Vet. Microbiol*., 66:135-150.

REDDY, K.P.; SPIRAMAN, P.K.; GOPAL NAIDU, N.R.; RAMA RAO, P. (1984). Pathology of Johne´s disease in sheep. *Indiajorgensen Vet. J*., 61: 164-179.

REICHEL, M.P.; KITTELBERGER, R.; PENROSE, M.E.; MEYNELL, R.M.; COUSINS, D.; ELLIS, T.; MUTHARIA, L.M.; SUGDEN, E.A.; JOHNS, A.H.; DE LISLE, G.W. (1999). Comparison of serological tests and faecal culture for the detection of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis infection in cattle and analysis of the antigens involved. *Vet. Microbiol*., 66: 135-150.

REVIRIEGO, F.J.; MORENO, M.A.; DOMÍNGUEZ, L. (2000). Soil type as a putative risk factor of ovine and caprine paratuberculosis seropositivity in Spain. *Prev. Vet. Med*., 43: 43-51.

REYES, L.E.(2007). Evaluación de nuevos adyuvantes en la vacunación frente a la paratuberculosis ovina. *Tesis Doctoral*. Universidad de León.

REYNOLDS, J.D.; MORRIS, B. (1983). The evolution and involution of Peyer's patches in fetal and postnatal sheep. *Eur. J. Immunol.*, 13: 627-635.

RICE, C.E.; CARRIERE, J. (1969). Studies of changes in serum proteins in cows and calves in a herd affected with Johne´s disease. *Res Vet Sci.*, 10:188-196.

RICHARDS, W.D.; THOEN, C.O. (1977). Effect of freezing on the viability of *Mycobacterium paratuberculosis* in bovine feces. *J. Clin. Microbiol*., 6: 392-395.

RICHARDSON, G.D.; LINKS, II.; WINDSOR, P.A. (2005). Gudair (OJD) vaccine self-inoculation: a case for early debridement. *Med J Aust.* 183:151-152.

RICHTER, E.; WESSLING, J.; LÜGERING, N.; DOMSCHKE, W.; RÜSCH-GERDES, S. (2002). Mycobacterium avium subsp. Paratuberculosis infection in a patient with HIV, Germany. *Emerging Infectious diseases,* 8: 729-731.

RIDGE, S.E. (1993). Cultivation of *Mycobacterium paratuberculosis* from bovine fecal samples by using elements of the Roche MB Check system. J. Clin. Microbiol., 31:400-405.

RIDGE, S.E.; HARKIN, J.T.; BADMAN, R.T.; MELLOR, A.M.; LARSEN, J.W. (1995a). Johne's disease in alpacas (*Lama pacos*) in Australia. *Aust. Vet. J*., 72: 150-153.

RIDGE, S.E.; HOPE, A.; CONDRON, R.J. (1995b). Johne´s disease control in 25 victorian dairy herds 1990-1993. En: Chiodini, R.J.; Collins, M.T: Bassey, E.O.E. (Eds.). *Proc 4th Int. Coll. PTBC.* IAP. Providence. EEUU.pp 111-124.

RIDGE, S.E.; MORGAN, I.R.; SOCKETT, D.C.; COLLINS, M.T.; CONDRON, R.J.; SKILBECK, N.W.; 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.* 68:253-257.

RIDGE, S.E.; VIZARD, A.L. (1993). Determination of the optimal cutoff value for a serological assay: an example using the Johne's Absorbed EIA. *J Clin Microbiol*., 31:1256-1261.

RIDLEY, D.S.(1983). The histopathological spectrum of the mycobacterioses. En: Ratledge, C.; Stanford, J.L. (Eds.). *The biology of Mycobacteria. Immunological and environmental aspects.* Academic Press. Vol. 2. pp. 129-171. Londres. Reino Unido.

RIDLEY, D.S.; JOPLING, W.H. (1962). A classification of leprosy for research purposes. *Lepr. Rev*., 33: 119-128.

RIDLEY, D.S.; JOPLING, W.H. (1966). Classification of leprosy according to immunity. A five-group system. *Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.*, 34: 255-273.

RIEMANN, H.; ABBAS, B. (1983). Diagnosis and control of bovine paratuberculosis (Johne's disease). *Adv. Vet. Sci. Comp. Med*., 27: 481-506.

RIEMANN, H.; ZAMAN, M.R.; RUPPANER, R.; AALUND, O.; JORGENSEN, J.B.; WORSAAE, H.; BEHYMER, D. (1979). Paratuberculosis in cattle and free-living exotic deer. *J. Am. Vet. Med. Assoc*., 174: 841-843.

RINGDAL, G. (1963). Johne's disease in pigs. *Nord. Vet. Med.*, 15: 217-238.

RITACCO, V.; LÓPEZ, B.; DE KANTOR, I.N.; BARRERA, L.; ERRICO, F.; NADER, A. (1987). Reciprocal cellular and humoral immune responses in bovine tuberculosis. *Res. Vet. Sci.*, 50: 365-7.

RITCHIE, J.N. (1953). Control of bovine tuberculosis. En: *Advances in the control of zoonosis. Monogr. Ser. WHO.* Nº19, WHO. Ginebra, Suiza.

ROACH, D.R.; BEAN, A.G.; DEMANGEL, C.; FRANCE, M.P.; BRISCOE, H.; BRITTON, W.J. (2002). TNF regulates chemokine induction essential for cell recruitment, granuloma formation, and clearance of mycobacterial infection. *J. Immunol.*, 168: 4620-4627.

ROBBE-AUSTERMAN, S.; GARDNER, I.A.; THOMSEN, B.V.; MORRICAL, D.G. MARTIN, B.M.; PALMER, M.V.; THOEN, C.O.; EWING, C. (2006). Sensitivity and specificity of the agar-gel-immunodiffusion test, ELISA and the skin test for detection of paratuberculosis in United States Midwest sheep populations. *Vet. Res*., 37: 553-564.

ROBBI, C.; ROSSI, I.; NARDELLI, S.; ROSSI, E.; TOSON, M.; MARANGON, S.; VINCENZI, G.; VICENZONI, G. (2002). Prevalenza di Paratuberculosis (Johne´s disease) nella popolazione di bovine da latte della Regione Veneto., *Atti della Societa Italiana di Buiatria*, 34: 283-288.

ROBINSON, M., O´BRIEN, R.; MACKINTOSH. C., GRIFFIN, F. (2008). Differential immune responses of red Deer (*Cervus elaphus*) following experimental challenge with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis. Clin. Vaccine Immunol*., 15: 963-969.

ROBINSON, M.W., O´BRIEN, R.; MACKINTOSH. C.G., GRIFFIN, J.F. (2010). Peripheral blood mononuclear cell population changes associated with age and *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection in red deer (*Cervus elaphus*). *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 136: 211-218.

ROCA, R. (1935). Paratuberculosis en una vaca. *Rev. Hig. San. Pecu.*, 25: 839.

RODRÍGUEZ, E., SÁNCHEZ, L.P., PÉREZ, S., HERRERA, L., JIMÉNEZ, M.S., SAMPER, S., IGLESIAS, M.J., (2009). Human tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* and *M. caprae* in Spain, 2004-2007. *Int. J. Tuberc. Lung Dis*., 13: 1536-1541.

RODRÍGUEZ, S. (2000). Desarrollo y evaluación de una prueba ELISA indirecta para el serodiagnóstico de paratuberculosis ovina. *Tesina de Licenciatura*. Universidad de Córdoba.

ROGERS, A.N.; VANBUREN, D.G.; HEDBLOM, E.; TILAHUN, M.E.; TELFER, J.C.; BALDWIN, C.L. (2005). Function of ruminant gammadelta T cells is defined by WC1.1 or WC1.2 isoform expression. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 108: 211-217.

ROHOLL, P.J.; HERREWEGH, A.; VAN SOOLINGEN, D. (2002). Positive IS*900in situ* hybridization signals as evidence for role of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in etiology of Crohn's disease. *J. Clin. Microbiol.*, 40: 3112-3113.

ROMERO, C.; HAMDI, A.; VALENTINE, J.F.; NASER, S.A. (2005). Evaluation of surgical tissue from patients with Crohn's disease for the presence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* DNA by in situ hybridization and nested polymerase chain reaction. *Inflamm. Bowel Dis*., 11: 116-125.

ROOK, G.A. **(2007).** Th2 cytokines in susceptibility to tuberculosis. *Curr. Mol. Med*., 7: 327-337.

ROSSEELS, V.; MARCHE, S.; ROUPIE, V.; GOVAERTS, M; GODFROID, J.; WALRAVENS, K.; HUYGENS, K. (2006a). Members of the 30 to 32 kilodalton mycolyl transferase family (Ag85) from culture filtrate of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* are immunodominant Th1-type antigens recognized early upon infection in mice and cattle. *Infect. Immunol.*, 74: 202-212.

ROSSEELS, V.; ROUPIE, V.; ZINNIEL, D.; BARLETTA, R.G.; HUYGEN, K. (2006b). Development of luminiscent *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* for rapid screening of vaccine candidates in mice. *Infect. Immunol.* 74: 3684-3686.

ROSSI, G.; NIGRO, G.; TATTOLI, I.; VINCENZETTI, S.; MARIANI, P.; MAGI, G.E.; RENZONI, G.; TACCINI, E.; BERNARDINI, M.L. (2009). Adhesion molecules and cytokine profile in ileal tissue of sheep infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis. Microbes Infect*., 11: 698-706.

ROSSITER, C.A.; BURHANS, W.S. (1996). Farm-specific approach to paratuberculosis (Johne's disease) control. *Vet. Clin. North Am., Food Anim. Pract*., 12: 383-415.

ROSSITER, C.A.; LEIN, D.H.; SHIN, S. (1992). Objectives and current status of the NYS paratuberculosis eradication and certification program. En: Chiodini, R.J.; Kreeger, J.M. (Eds.). *Proc 3rd Int. Coll. PTBC*. IAP. Providence. EE.UU. pp 448-454.

ROTHEL, J.S.; JONES, S.L.; CORNER, L.A.; COX, J.C.; WOOD, P.R. (1990). A sandwich enzyme immunoassay for bovine interferon-gamma and its use for the detection of tuberculosis in cattle. *Aust. Vet. J*., 67: 134-137.

ROTHEL, J.S.; JONES, S.L.; CORNER, L.A.; COX, J.C.; WOOD, P.R. (1992). The gamma-interferon assay for diagnosis of bovine tuberculosis in cattle: conditions affecting the production of gamma-interferon in whole blood culture. *Aust. Vet. J*., 69: 1-4.

ROWAN, N.J.; MACGREGOR, S.J.; ANDERSON, J.G.; CAMERON, D., FARISH, O. (2001). Inactivation of *Mycobacterium paratuberculosis* by pulsed electric fields. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67: 2833-2836.

ROWBOTHAM, D.S.; MAPSTONE, N.P.; TREJDOSIEWICZ, L.K.; HOWDLE, P.D.; QUIRKE, P. (1995). *Mycobacterium paratuberculosis* DNA not detected in Crohn's disease tissue by fluorescent polymerase chain reaction. *Gut*, 37: 660-7.

ROZEN, S.; SKALETSKY, H.(2000). Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. En Krawetz, S.; Misener, S. (eds) *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology.* Humana Press, Totowa, NJ, pp 365-386.

RUIZ-LARRAÑAGA, O.; GARRIDO, J.M.; IRIONDO, M.; MANZANO, C; MOLINA, E; KOETS, A.P.; RUTTEN, V.P.; JUSTE, R.A.; ESTONBA, A. (2010a). Genetic association between bovine CARD15 polymorphisms and infection by *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in Holstein-Friesian cattle. *Anim. Genet*., en prensa.

RUIZ-LARRAÑAGA, O.; GARRIDO, J.M.; MANZANO, C.; IRIONDO, M.; MOLINA, E.; GIL, A.; KOETS, A.P.; RUTTEN, V.P.; JUSTE, R.A.; ESTONBA, A. (2010c). Identification of single nucleotide polymorphisms in the bovine solute carrier family 11 member 1 (SLC11A1) gene and their association with infection by *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis. J. Dairy Sci*.,93: 1713-1721.

RUIZ-LARRAÑAGA, O.; MANZANO, C.; IRIONDO, M.; GARRIDO, J.M, MOLINA, E.; VAZQUEZ, P.; JUSTE, R.A.; ESTONBA, A.; (2011). Genetic variation of toll-like receptor genes and infection by Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis in Holstein-Friesian cattle. *J Dairy Sci.*, 94:3635-3641.

RUIZ-LARRAÑAGA, O.; GARRIDO, J.M.; IRIONDO, M.; MANZANO, C.; MOLINA, E.; MONTES, I.; VAZQUEZ, P.; KOETS, A.P.; RUTTEN, V.P.; JUSTE, R.A.; ESTONBA, A. (2010b). SP110 as a novel susceptibility gene for Mycobacterium avium subspecies paratuberculosisinfection in cattle.*J. Dairy. Sci.* 93(12): 5950-8

RUZANTE, J.M.; GARDNER, I.A.; CULLOR, J.S.; SMITH, W.L.; KIRK, J.H.; ADASKA, J.M. (2008). Isolation of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis from waste milk delivered to California calf ranches. *Foodborne Pathog. Dis.*, 5:681-686.

RUZANTE, J.M.; SMITH, W.L.; GARDNER, I.A.; THORNTON, C.G.; CULLOR, J.S. (2006). Modified culture protocol for isolation of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis from raw milk. *Foodborne Pathog. Dis.*, 3:457-460.

RYAN, P.; BENNETT, M.W.; AARONS, S.; LEE, G.; COLLINS, J.K.; O'SULLIVAN, G.C.; O'CONNELL, J.; SHANAHAN, F. (2002). PCR detection of *Mycobacterium paratuberculosis* in Crohn's disease granulomas isolated by laser capture microdissection. *Gut*., 51:665-670.

RYAN, P.; KELLY, R.G.; LEE, G.; COLLINS, J.K.; O'SULLIVAN, G.C.; O'CONNELL, J.; SHANAHAN, F. (2004). Bacterial DNA within granulomas of patients with Crohn's disease--detection by laser capture microdissection and PCR. *Am. J. Gastroenterol*., 99:1539-1543.

RYAN, T.J.; BUDDLE, B.M.; DE LISLE, G.W. (2000). An evaluation of the gamma interferon test for detecting bovine tuberculosis in cattle 8 to 28 days after tuberculin skin testing. *Res. Vet. Sci*., 69: 57-61.

SAINT-MARC, B.; GUILLEMIN, F.; MILWARD, G.; REYNAUID, F. ; LACOSTE, F. ; BRUN, A. (1992). Vaccination against paratuberculosis : new perspectives. En: Chiodini, R.J.; Kreeger, J.M. (Eds.). *Proc 3rd Int. Coll. PTBC*. IAP. Providence. EE.UU. pp. 469-474.

SALGADO, M.; MANNING, E.J.; COLLINS, M.T. (2005). Performance of a Johne's disease enzyme-linked immunosorbent assay adapted for milk samples from goats. *J Vet Diagn Invest*., 17:350-354.

SALGAME, P. (2005). Host innate and Th1 responses and the bacterial factors that control *Mycobacterium tuberculosis* infection.*Curr. Opin. Immunol*., 17: 374-380.

SANDERSON, J.D.; MOSS, M.T.; TIZARD, M.L.; HERMON-TAYLOR, J. (1992). Mycobacterium paratuberculosis DNA in Crohn's disease tissue. Gut. 33: 890-6.

SANGARI, F.J.; GOODMAN, J.; PETROFSKY, M.; KOLONOSKI, P.; BERMUDEZ, L.E. (2001).*Mycobacterium avium* invades the intestinal mucosa primarily by interacting with enterocytes. *Infect. Immun*., 69: 1515-1520.

SANNA, E.; WOODALL, C.J.; WATT, N.J.; CLARKE, C.J.; PITTAU, M.; LEONI, A.; NIEDDU, A.M. (2000). In situ-PCR for the detection of Mycobacterium paratuberculosis DNA in paraffin-embedded tissues. *Eur. J. Histochem*., 44:179-184.

SANTEMA, W.; HENSEN, S.; RUTTEN, V.; KOETS, A. (2009). Heat shock protein 70 subunit vaccination against bovine paratuberculosis does not interfere with current immunodiagnostic assays for bovine tuberculosis. *Vaccine.* 27:2312-2319.

SANTEMA, W.; 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: 1364-1373.

SANTEMA, W.J.; POOT, J.; SEGERS, R.P.; VAN DEN HOFF, D.J.; RUTTEN, V.P.; KOETS, A.P. (2012). Early infection dynamics after experimental challenge with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in calves reveal limited calf-to-calf transmission and no impact of Hsp70 vaccination. *Vaccine*. 30(49):7032-9.

SARTOR, MA.; TOMLINSON, CR. ; WESSELKAMPER , SC.; SIVAGANESAN, S.; LEIKAUF, GD.; MEDVEDOVIC, M. (2006). Intensity-based hierarchical Bayes method improves testing for differentially expressed genes in microarray experiments. *BMC Bioinformatics*. 7:538.

SARTOR, RB. (2005). Does Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis cause Crohn's disease?. *Gut*, 54: 896-898.

SASIKALA, M.; REDDY, D.N.; PRATAP, N.; SHARMA, S.K.; BALKUMAR, P.R.; SEKARAN, A.; BANERJEE, R.; REDDY, D.B. (2009). Absence of *Mycobacterium avium* ss *paratuberculosis*-specific IS*900* sequence in intestinal biopsy tissues of Indian patients with Crohn's disease. *Indian J. Gastroenterol*., 28: 169-174.

SAUNDERS, B.M.; COOPER, A.M. (2000). Restraining mycobacteria: role of granulomas in mycobacterial infections. *Immunol. Cell Biol*., 78: 334-341.

SAUNDERS, V.F.; EAMENS, G.J.; TURNER, M.J.; JESSEP, T.M. (2003). Identification of a new RFLP type of *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* in epidemiological tracing of bovine Johne's disease. *Aust. Vet. J.*, 81: 564-566..

SAXEGAARD F. (1985). Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from intestinal mucosa and mesenteric lymph nodes of goats by use of selective Dubos medium. *J Clin Microbiol*., 22:312-313.

SAXEGAARD, F. (1990). Experimental infection of calves with an apparently specific goat-pathogenic strain of Mycobacterium paratuberculosis. *J Comp Pathol.*,102:149-56.

SAXEGAARD, F.; FODSTAD, F.H. (1985). Control of paratuberculosis (Johne's disease) in goats by vaccination. *Vet. Rec.*, 116: 439-441.

SCANDURRA, G.M.; DE LISLE, G.W.; CAVAIGNAC, S.M.; YOUNG, M.; KAWAKAMI, R.P.; COLLINS, D.M. (2010). Assessment of live candidate vaccines for paratuberculosis in animal models and macrophages. *Infect. Immun*., 78: 1383-1389.

SCHÄFER, G.; GULER, R.; MURRAY, G.; BROMBACHER, F.; BROWN, G.D. (2009). The role of scavenger receptor B1 in infection with *Mycobacterium tuberculosis* in a murine model. *PloS One*, 4: e8448.

SCHILLER, I.; OESCH, B.; VORDERMEIER, H.M.; PALMER, M.V.; HARRIS, B.N.; ORLOSKI, K.A.; BUDDLE, B.M.; THACKER, T.C.; LYASHCHENKO, K.P.; WATERS, W.R. (2010). Bovine tuberculosis: a review of current and emerging diagnostic techniques in view of their relevance for disease control and eradication. *Transbound. Emerg. Dis*., 57: 205-220.

SCHLEIG, P.M.; BUERGELT, C.D.; DAVIS, J.K.; WILLIAMS, E.; MONIF., G.R.; DAVIDSON, M.K. (2005). Attachment of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* to bovine intestinal organ cultures: method development and strain differences. *Vet. Microbiol.*, 108: 271-279.

SCHLESINGER, L.S.; KAUFMAN, T.M.; IYER, S.; HULL, S.R.; MARCHIANDO, L.K. (1996). Differences in mannose receptor-mediated uptake of lipoarabinomannan from virulent and attenuated strains of *Mycobacterium tuberculosis* by human macrophages. *J. Immunol*., 157: 4568-4575.

SCHOREY, J.S.; COOPER, A.M. (2003). Macrophage signalling upon mycobacterial infection: the MAP kinases lead the way. *Cell Microbiol*., 5: 133-142.

SCHOREY, J.S.; HOLSTI, M.A.; RATTLIFF, T.L.; ALLEN, P.M.; BROWN, E.J. (1996). Characterization of the fibronectin-attachment protein of *Mycobacterium avium* reveals a fibronectin-binding motif conserved among mycobacteria. *Mol. Microbio*l., 21: 321-329.

SCHWARTZ, D.; SHAFRAN, I.; ROMERO, C.; PIROMALLI, C.; BIGGERSTAFF, J.; NASER, N.; CHAMBERLIN, W.; NASER, S.A. (2000). Use of short-term culture for identification of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in tissue from Crohn's disease patients. *Clin. Microbiol. Infect*., 6: 303-307.

SCOTT, H.M.; FOSGATE, G.T.; LIBAL, M.C.; SNEED, L.W.; EROL, E.; ANGULO, A.B.; JORDAN, E.R. (2007). Field testing of an enhanced direct-fecal polymerase chain reaction procedure, bacterial culture of feces, and a serum enzyme-linked immunosorbent assay for detecting *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* infection in adult dairy cattle. *Am. J. Vet. Res*., 68: 236-245.

SCOTT, P.R.; CLARKE, C.J.; KING, T.J. (1995). Serum protein concentrations in clinical cases of ovine paratuberculosis (Johne's disease). *Vet. Rec.*,137:173.

SCOTT-ORR, H.; EVERETT, R.E.; OTTOWAY, S.J.; NORTH, R.N. (1988). Estimation of direct and indirect losses due to Johnes disease in New South Wales, Australia. *Acta Vet Scand Suppl*. 84:411-414.

SEAMAN, J.T.; GARDNER, I.A.; DENT, C.H. (1981). Johne's disease in sheep. *Aust. Vet. J*., 57: 102-103.

SEAMAN, J.T.; THOMPSON, D.R. (1984). Johne's disease in sheep. *Aust. Vet. J.*,61:227-9.

SECHI, L.A.; GAZOULI, M.; IKONOMOPOULOS, J.; LUKAS, J.C.; SCANU, A.M.; AHMED, N.; FADDA, G.; ZANETTI, S. (2005).*Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, genetic susceptibility to Crohn's disease, and Sardinians: the way ahead. *J. Clin. Microbiol*, 43: 5275-7.

SECHI, L.A.; MURA, M.; TANDA, E.; LISSIA, A.; FADDA, G.; ZANETTI, S. (2004).*Mycobacterium avium* sub. *paratuberculosis* in tissue samples of Crohn's disease patients. *New Microbiol*., 27: 75-77.

SECHI, L.A.; MURA, M.; TANDA, F.; LISSIA, A.; SOLINAS, S.; FADDA, G.; ZANETTI, S. (2001). Identification of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in biopsy specimens from patients with Crohn's disease identified by *in situ* hybridization. *J. Clin. Microbiol*., 39: 4514-4517.

SECHI, L.A.; SCANU, A.M.; MOLICOTTI, P.; CANNAS, S.; MURA, M.; DETTORI, G.; FADDA, G.; ZANETTI, S. (2005). Detection and Isolation of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* from intestinal mucosal biopsies of patients with and without Crohn's disease in Sardinia. *Am. J. Gastroenterol*., 100: 1529-1536.

SECHI, LA.; AHMED, N.; FELIS, GE.; DUPRÈ, I.; CANNAS, S.; FADDA, G.; BUA, A.; 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: 236-43.

SECHI, LA.; GAZOULI, M.; SIESWERDA, LE.; MOLICOTTI, P.; AHMED, N.; IKONOMOPOULOS, J.; SCANU, AM.; PACCAGNINI, D.; ZANETTI, S. (2006b). Relationship between Crohn's disease, infection with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* and SLC11A1 gene polymorphisms in Sardinian patients. *World. J. Gastroenterol*. 12(44):7161-4.

SECOTT, T.E.; LIN, T.L.; WU, C.C. (2001). Fibronectin attachment protein homologue mediates fibronectin binding by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Infect. Immun*., 69: 2075-2082.

SECOTT, T.E.; LIN, T.L.; WU, C.C. (2002). Fibronectin attachment protein is necessary for efficient attachment and invasion of epithelial cells by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis. Infect. Immun.,* 70: 2670-2675.

SECOTT, T.E.; LIN, T.L.; WU, C.C. (2004).*Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* fibronectin attachment protein facilitates M-cell targeting and invasion through a fibronectin bridge with host integrins. *Infect. Immun*., 72: 3724-3732.

SECOTT, T.E.; OHME, A.M.; BARTON, K.S.; WU, C.C.; ROMMEL, F.A. (1999). *Mycobacterium paratuberculosis* detection in bovine feces is improved by coupling agar culture enrichment to an IS900-specific polymerase chain reaction assay.*J. Vet. Diagn. Invest.,* 11:441-447.

SEITZ, S.E.; HEIDER, L.E.; HEUSTON, W.D.; BECH-NIELSEN, S., RINGS, D.M.; SPANGLER, L. (1989). Bovine fetal infection with *Mycobacterium paratuberculosis. J. Am. Vet. Med. Assoc*., 194: 1423-1426.

SEPPIC. (1999). Adjuvants. En*: Who is Seppic*. Paris.

SERGEANT, E.S.; BALDOCK, F.C.(2002). The estimated prevalence of Johne's disease infected sheep flocks in Australia. *Aust Vet J.,* 80:762-8.

SERGEANT, E.S.; MARSHALL, D.J.; EAMENS, G.J.; KEARNS, C.; WHITTINGTON, R.J. (2003). Evaluation of an absorbed ELISA and an agar-gel immuno-diffusion test for ovine paratuberculosis in sheep in Australia. *Prev. Vet. Med*., 61: 235-248.

SERRAINO, A.; MARCHETTI, G.; SANGUINETTI, V.; ROSSI, M.C.; ZANONI, R.G.; CATOZZI, L.; BANDERA, A.; DINI, W.; MIGNONE, W.; FRANZETTI, F.; GORI. A. (1999). Monitoring of transmission of tuberculosis between wild boars and cattle: genotypical analysis of strains by molecular epidemiology techniques. *J. Clin. Microbiol.,* 37: 2766-2771.

SETTLES, M.; ZANELLA, R.; MCKAY, S.D.; SCHNABEL, R.D.; TAYLOR, J.F.; WHITLOCK, R.; SCHUKKEN, Y.; VAN KESSEL, J.S.; SMITH, J.M.; NEIBERGS, H. (2009). A whole genome association analysis identifies loci associated with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection status in US holstein cattle. *Anim Genet*.; 40:655-462.

SEVILLA, I.; ADURIZ, G.; GARRIDO, J.M.; GEIJO, M.V.; JUSTE, R.A. (2002). A preliminary survey on the prevalence of paratuberculosis in dairy cattle in Spain by bula milk PCR. En: Manning, E.J.B.; Collins, M.T. (Eds.). *Proc 6th Int. Coll. PTBC*. IAP. Madison, EEUU. pp. 332-336.

SEVILLA, I.; ADURIZ, G.; GARRIDO, J.M.; GEIJO, M.V.; JUSTE, R.A. (2003). A preliminary survey on the prevalence of paratuberculosis in dairy cattle in spain by bulk milk PCR. En: Juste, R.A.; Geijo, M.V.; Garrido, J.M: (Eds.). *Proc 7th Int. Coll. PTBC*. IAP. Madison, EEUU. pp. 332-336.

SEVILLA, I.; GARRIDO, J.M.; GEIJO, M.; JUSTE, R.A. (2007). Pulsed-field gel electrophoresis profile homogeneity of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolates from cattle and heterogeneity of those from sheep and goats. *BMC Microbiol.,* 7: 18.

SEVILLA, I.; LI, L.; AMONSIN, A.; GARRIDO, J.M.; GEIJO, M.V.; KAPUR, V.; JUSTE, R.A. (2008). Comparative analysis of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolates from cattle, sheep and goats by short sequence repeat and pulsed-field gel electrophoresis typing. *BMC Microbiol*., 8: 204.

SEVILLA, I.; SINGH, S.V.; GARRIDO, J.M.; ADURIZ, G.; RODRIGUEZ, S.; GEIJO, M.V.; WHITTINGTON, R.J.; SAUNDERS, V.; WHITLOCK, R.H.; JUSTE, R.A. (2005). Molecular typing of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* strains from different hosts and regions. *Rev. Sci. Tech*., 24:1061-1066.

SHAFRAN, I.; PIROMALLI, C.; DECKER, J.W.; SANDOVAL, J.; NASER, S.A.; EL-ZAATARI, F.A. (2002). Seroreactivities against Saccharomyces cerevisiae and *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* p35 and p36 antigens in Crohn's disease patients. *Dig. Dis. Sci.,* 47: 2079-81.

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):121-6.

SHARMA, G.; SINGH, SV.; SEVILLA, I.; SINGH, AV.; WHITTINGTON, RJ.; JUSTE, RA.; KUMAR, S.; GUPTA, VK.; SINGH, PK.; SOHAL, JS.; VIHAN, VS. (2008). Evaluation of indigenous milk ELISA with m-culture and m-PCR for the diagnosis of bovine Johne's disease (BJD) in lactating Indian dairy cattle. *Res Vet Sci.,* 84(1): 30-7.

SHERMAN, D.M. **(1985).** Current concepts in Johne´ s disease. *Med. Vet. Small Anim. Clin*., 80: 77-84.

SHERMAN, D.M.; GAY, J.M.; BOULEY, D.S.; NELSON, G.H. (1990). Comparison of the complement-fixation and agar gel immunodiffusion tests for diagnosis of subclinical bovine paratuberculosis. *Am. J. Vet. Res*., 51: 461-465.

SHERMAN, D.M.; MARKHAM, R.J.; BATES, F. (1984). Agar gel immunodiffusion test for diagnosis of clinical paratuberculosis in cattle. *J. Am. Vet. Med. Assoc*., 185: 179-182.

SHIN, S.J.; WU, C.W.; STEINBERG, H.; TALAAT, A.M. (2006). Identification of novel virulence determinants in *Mycobacterium paratuberculosis* by screening a library of insertional mutants. *Infect. Immunol.,* 74: 3825-3833.

SHIN, S.J.; YOO, H.S.; MCDONOUGH, S.P.; CHANG, Y.F. (2004). Comparative antibody response of five recombinant antigens in related to bacterial shedding levels and development of serological diagnosis based on 35 kDa antigen for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis.J Vet Sci*. 5:111-7.

SHINNICK, T.M.; GOOD, R.C. (1994). Mycobacterial taxonomy. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis*., 13: 884-901.

SHIVANANDA, S.; LENNARD-JONES, J.; LOGAN, R.; FEAR, N.; PRICE, A.; CARPENTER, L.; VAN BLANKENSTEIN, M. (1996). Incidence of inflammatory bowel disease across Europe: is there a difference between north and south? Results of the European Collaborative Study on Inflammatory Bowel Disease (EC-IBD). *Gut*, 39: 690-697.

SHULAW, W.P.; BECH-NIELSEN, S.; RINGS, D.M.; GETZY, D.M.; WOODRUFF, T.S. (1993). Serodiagnosis of paratuberculosis in sheep by use of agar gel immunodiffusion. *Am. J. Vet. Res*., 54: 13-19.

SIBLEY, J.A.; WOODBURY, M.R.; APPLEYARD, G.D.; ELKIN, B. (2007).*Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in Bison (*Bison bison*) from Northern Canada. *J. Wildl., Dis*., 43: 775-779.

SIELING, P.A.; MODLIN, R.L. (2001). Activation of toll-like receptors by microbial lipoproteins. *Scand J Infect.,* 33:97-100.

SIGURDARDÓTTIR, O.G.; BAKKE-McKELLEP, A.M.; DJONNE, B.; EVENSON, 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: 223-230.

SIGURDARDÓTTIR, O.G.; PRESS, C.M.; EVENSON, O. (2001). Uptake of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* through the distal small intestinal mucosa in goats: an ultrastructural study. *Vet. Pathol*., 38: 184-189.

SIGURDARDÓTTIR, O.G.; PRESS, C.M.; SAXEGAARD, F.; EVENSON, O. (1999). Bacterial isolation, immunological response, and histopathological lesions during the early subclinical phase of experimental infection of goat kids with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis. Vet. Pathol*., 36: 542-550.

SIGURDARDÓTTIR, O.G.; VALHEIM, M.; PRESS, C.M. (2004). Establishment of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in the intestine of ruminants. *Adv. Drug. Deliv. Rev*., 56: 819-834.

SIGURDSSON, B.; GUNNARSON, E. (1983). Paratuberculosis in sheep, cattle, goats and reinder in Iceland: A result of an import of a flock of sheep from Germany 1933. The control of the disease. En: Merkal, R.S. Proc 1st Int. Coll. PTBC. IAP. Ames, EEUU pp: 238-243.

SIGURDSSON, B. (1960). A killed vaccine against paratuberculosis (Johne's disease) in sheep. Am. J. Vet. Res., 21: 54-67.

SIGURDSSON, B.; TRYGGVADOTTIR, A.G. (1949). Immunization with heat-killed *Mycobacterium paratuberculosis* in mineral oil I. *J. Bacteriol*., 58: 271-278.

SIGURDSSON, B.; TRYGGVADOTTIR, A.G. (1950). Immunization with heat-killed *Mycobacterium paratuberculosis* in mineral oil II. *J. Bacteriol*., 59: 541-543.

SILBAQ, F.S.; CHO, S.N.; COLE, S.T.; BRENNAN, P.J. (1998). Characterization of 34-kilodalton protein of Mycobacterium leprae that is isologous to the immunodominant 34- kilodalton antigen of *Mycobacterium paratuberculosis. Infect. Immun*., 66: 5576-5579.

SIMPSON, C.F. (1966). Electron microscopy of arteriosclerosis in cows with Johne´s disease. *Am. J. Vet. Res*., 27: 1197-1204.

SIMUTIS, F.J.; CHEVILLE, N.F.; JONES, D.E. (2005). Investigation of antigen-specific T-cell responses and subcutaneous granuloma development during experimental sensitization of calves with *Mycobacterium avium* sbsp. *paratuberculosis*. *Am. J. Vet. Res.*, 66: 474-482.

SIMUTIS, F.J.; JONES, D.E.; HOSTETTER, J.M. (2007). Failure of antigen-stimulated gammadelta T cells and CD4+ T cells from sensitized cattle to upregulate nitric oxide and mycobactericidal activity of autologous *Mycobacterium avium* subsp. p*aratuberculosis*-infected macrophages. *Vet. Immuno. Immunopathol*., 116: 1-12.

SINGH, P.K.; SINGH, S.V.; KUMAR, H.; SOHAL, J.S.; SINGH, A.V. (2010). Diagnostic Application of IS*900* PCR Using Blood as a Source Sample for the Detection of *Mycobacterium avium* Subspecies *Paratuberculosis* in Early and Subclinical Cases of Caprine Paratuberculosis. *Vet. Med. Int*., 2010:748621.

SINGH, P.K.; SINGH, S.V.; SINGH, M.K.; SAXENA, V.K.; HORIN, P.; SINGH, A.V.; SOHAL, J.S. (2012). Effect of genetic variation in the MHC Class II DRB region on resistance and susceptibility to Johne's disease in endangered Indian Jamunapari goats.*Int. J. Immunogenet.* 39(4): 314-20.

SINGH, S.V.; SINGH, P.K.; SINGH, A.V.; SOHAL, J.S.; GUPTA, V.K.; VIHAN, V.S. (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: 7102-10

SINGH, K.; CHANDEL, B.S.; CHAUHAN, H.C.; DADAWALA, A.; SINGH, S.V.; SINGH, P.K. (2013). Efficacy of 'indigenous vaccine' using native 'Indian bison type' genotype of *Mycobacteriumavium* subspecies *paratuberculosis* for the control of clinical Johne's disease in an organized goat herd. *Vet. Res. Commun*., 37: 109-114.

SIVAKUMAR, P.; TRIPATHI, B.N.; SINGH, N. (2005). Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in intestinal and lymph node tissues of water buffaloes (*Bubalus bubalis*) by PCR and bacterial culture. *Vet. Microbiol.*, 108: 263-270.

SIVAKUMAR, P.; TRIPATHI, B.N.; SINGH, N., SHARMA, A.K. (2006). Pathology of naturally occurring paratuberculosis in water buffaloes (*Bubalus bubalis*). *Vet. Pathol*., 43: 455-462.

SKAMENE E1, SCHURR E, GROS P. (1998). Infection genomics: Nramp1 as a major determinant of natural resistance to intracellular infections. *Annu Rev Med*., 49:275-287.

SLOCOMBE, R.F. (1982). Combined Sreatomycin-Isoniazid-Rifampin therapy in the treatment of Johne's disease in goat. *Can Vet J*. 23(5):160-163.

SMEED, J.A.; WATKINS, C.A.; RHIND, S.M.; HOPKINS, J.(2007). Differential cytokine gene expression profiles in the three pathological forms of sheep paratuberculosis. *BMC Vet. Res*., 3: 18.

SMITH, K. (1969). Electron microscopical observations on Mycobacterium johnei. *Res Vet Sci*. 10:1-3.

SMITH, R.D. **(1995).** Veterinary clinical epidemiology. 2ª Ed. CRC Press. Boca Ratón.

SMITH, R.L.; GROHN, Y.T.; PRADAHAN, A.K.; WHITLOCK, R.H.; VAN KESSEL, J.S.; SMITH, J.M.; WOLFGANG, D.R.; SCHUKKEN, Y.H. (2009). A longitudinal study on the impact f Johne´s disease status on milk production in individual cows. *J Dairy Sci*., 92(6): 2653-2661.

SMYTH, R.H.; CHRISTIE, G.J. (1950). Some observations on Johne´s disease with a further note on the examination of faecal samples. *Vet. Rec., 62:429-450.*

SNIDER, T.G.; OLCOTT, B.M.; KREEGER, J.M.; HIMES, M.E.; TURQUIST, S.E.; VANCE, T.L.; FARRAR, R.G. (1992). The inmonopathogenesis of ruminant paratuberculosis. En: Chiodini, R.J.; Kreeger, J.M. (Eds.).*Proc3rd Int. Coll. PTBC.* IAP. Orlando. EE.UU. pp 317-325

SOCKETT, D.C.; CARR, D.J.; COLLINS, M.T. (1992a). Evaluation of conventional and radiometric fecal culture and a commercial DNA probe for diagnosis of Mycobacterium paratuberculosis infections in cattle. *Can. J. Vet. Res.*, 56:148-53

SOCKETT, D.C.; CONRAD, T.A.; THOMAS, C.B.; COLLINS, M.T. (1992b). Evaluation of four serological tests for bovine paratuberculosis. *J. Clin. Microbiol*., 30: 1134-1139.

SOHAL, J.S.; SINGH, S.V.; TYAGI, P.; SUBHODH, S.; SINGH, P.K.; SINGH, A.V.; NARAYANASAMY, K.; SHEORAN, N.; SINGH SANDHU, K. (2008). Immunology of mycobacterial infections: with special reference to *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. I*mmunobiology*, 213: 585-598.

SOMMERVILLE, E.M.; WAKELIN, R.L.; HUTTON, J.B. (1995). Vaccination of lambs at 3 to 4 months of age protects against Johne´s disease. *The paratuberculosis Newsletter*, 7: 25-29.

SORENSEN, O.; RAWLUK, S.; WU, J.; MANNINEN, K.; OLLIS, G. (2003).*Mycobacterium paratuberculosis* in dairy herds in Alberta. *Can Vet J.* 44: 221-226.

SOTOHY, A.S.; AWAD-MASALMEH, M.(1999). Epidemiological studies on Johne´s disease in cattle using the culture and PCR technique. *Assiut Vet. Med. J*., 41: 101-112.

SOUMYA, M.P.; PILLAI, R.M. ; ANTONY, P.X. ; MUKHOPADHYAY, H.K.; RAO, V.N.(2009). Comparison of faecal culture and IS*900* PCR assay for the detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in bovine faecal samples. *Vet. Res. Commun*., 33: 781-791.

SOUZA, C.D.; EVANSON, O.A.; SREEVATSAN, S.; WEISS, D.J. (2007). Cell membrane receptors on bovine mononuclear phagocytes involved in phagocytosis of *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis. Am. J. Vet. Res.,* 68: 975-980.

SOUZA, C.D.; EVANSON, O.A.; WEISS, D.J. (2008). Role of cell membrane receptors in the suppression of monocyte anti-microbial activity against *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis. Microb. Pathog*., 44: 215-223.

SPANGLER, E.; BECH-NIELSEN, S.; HEIDER, L.E. (1992a). Diagnostic performance of two serologic tests and fecal culture for subclinical paratuberculosis, and associations with production. *Prev. Vet. Med*., 13: 185-195.

SPANGLER, E.; BECH-NIELSEN, S.; HEIDER, L.E. DORN, C.R. (1992b). Interpretation of an enzyme immunosorbent assay responses of calves vaccinated with a killed *Mycobacterium paratuberculosis* vaccine. *Prev. Vet. Med*., 13:185-195.

SPANGLER, E.; HEIDER, L.E.; **BECH-NIELSEN, S.; DORN, C.R**. **(1991**). Serologic enzyme-linked immunosorbent assay responses of calves vaccinated with a killed *Mycobacterium paratuberculosis* vaccine. *Am. J. Vet. Res*., 52: 1197-2000.

SPEARS, H.N. (1959). Vaccination against Johne´s disease: The results of a field trial experiment. *Vet. Rec*., 71: 1154-1156.

SREENIVASULU, D.; KRISHNASWANY, S.; JANAKIRAMASHARNA, B.(1986). Study of in vitro techniques to assess the cell-mediated immune responses to vaccination against Johne´s disease in sheep. *Indian Vet. J.,* 63: 519-522.

ST JEAN, G.; JERNIGAN, A.D. (1991). Treatment of *Mycobacterium paratuberculosis* infection in ruminants. *Vet. Clin. North. Am. Food Anim. Pract.,* 7: 793-804.

ST ROSE, S.G.; HUNTER, N.; FOSTER, J.D.; DRUMMOND, D.; MC KENZIE, C; PARNHAM, D.; WILL, R.G.; WOOLHOUSE, M.E.; RHIND, S.M. (2007). Quantification of Peyer's patches in Cheviot sheep for future scrapie pathogenesis studies.*Vet. Immunol. Immunopathol*., 116: 163-171.

ST ROSE, S.G.; HUNTER, N.; MATTHEWS, L.; FOSTER, J.D.; CHASE-TOPPING, M.E.; KRUUK, L.E.; SHAW, D.J.; RHIND, S.M.; WILL, R.G.; WOOLHOUSE, M.E. (2006). Comparative evidence for a link between Peyer's patch development and susceptibility to transmissible spongiform encephalopathies. *BMC Infect. Dis***.,** 11**:**6:5.

STABEL, J.R. (1997). An improved method for cultivation of *Mycobacterium paratuberculosis* from bovine fecal samples and comparision to three other methods. *J. Vet. Diagn. Invest*., 9: 375-380.

STABEL, J.R. (1998). Johne's disease: a hidden threat. *J. Dairy Sci*., 81: 283-288.

STABEL, J.R. (2000a). Transitions in immune responses to *Mycobacterium paratuberculosis. Vet. Microbiol.,* 77: 465-473.

STABEL, J.R. (2000b). Cytokine secretion by peripheral blood mononuclear cells from cows infected with *Mycobacterium paratuberculosis*. *Am. J. Vet. Res.,* 61: 754-760.

STABEL, J.R. (2001). On-farm batch pasteurization destroys *Mycobacterium paratuberculosis* in waste milk. *J. Dairy Sci.,* 84: 524-527.

STABEL, J.R. **(2006).** Host responses to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: a complex arsenal. *Anim. Health Res. Rev*., 7: 60-70.

STABEL, J.R. (2008). Pasteurization of colostrum reduces the incidence of paratuberculosis in neonatal dairy calves. *J. Dairy Sci.,* 91: 3600-3606.

STABEL, J.R. ; BANNANTINE, J.P. (2005). Development of a nested PCR method targeting a unique multicopy element, ISMap02, for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in fecal samples. *J. Clin. Microbiol*., 43: 4744-4750.

STABEL, J.R.(1996). Production of gamma-interferon by peripheral blood mononuclear cells: an important diagnostic tool for detection of subclinical paratuberculosis. *J. Vet. Diagn. Invest.,* 8: 345-350.

STABEL, J.R.; ACKERMANN, M.R. (2002). Temporal *Mycobacterium paratuberculosis* infection in T-cell receptor (TSR)-alpha and TCR-delta-deficient mice. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 89: 127-132.

STABEL, J.R.; ACKERMANN, M.R.; GOFF, J.P. (1996). Comparison of polyclonal antibodies to three different preparations of *Mycobacterium paratuberculosis* in immunohistochemical diagnosis of Johne's disease in cattle. *J. Vet. Diagn. Invest*., 8: 469-473.

STABEL, J.R.; GOFF, J.P.; ACKERMANN, M.R. (1998). Dietary calcium modulates *Mycobacterium paratuberculosis* infection in beige mice. *Vet. Immunol. Immunopathol*. 66: 377-390.

STABEL, J.R.; KHALIFEH, M.S. (2008). Differential expression of CD5 on B lymphocytes in cattle infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Vet. Immunol. Immunopath*ol., 126: 211-219.

STABEL, J.R.; KIMURA, K.; ROBBE-AUSTERMAN, S. (2007). Augmentation of secreted and intracellular gamma interferon following johnin purified protein derivative sensitization of cows naturally infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 19: 43-51.

STABEL, J.R.; LAMBERTZ, A. (2004). Efficacy of pasteurization conditions for the inactivation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk. *J. Food Prot*., 67: 2719-2726.

STABEL, J.R.; PALMER, M.V.; HARRIS, B.; PLATTNER, B.; HOSTETTER, J.; ROBBE-AUSTERMAN, S. (2009). Pathogengarsis of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in neonatal calves after oral or intraperitoneal experimental infection. *Vet. Microbiol*. 136: 306-313.

STABEL, J.R.; PALMER, M.V.; WHITTLOCK, R.H. (2003). Immune responses after oral inoculation of weanling bison or beef calves with a bison or cattle isolate of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *J. Wildl. Dis*., 39: 545-555.

STABEL, J.R.; STEADHAM, E.M.; BOLIN, C.A. (1997). Heat inactivation of *Mycobacterium paratuberculosis* in raw milk: are current pasteurization conditions effective? *Appl. Environ. Microbiol*., 63: 4975-4977.

STABEL, J.R.; WHITLOCK, R.H. (2001). An evaluation of a modified interferon-gamma assay for the detection of paratuberculosis in dairy herds. *Vet. Immunol. Immunopathol*., 79: 69-81.

STABEL, J.R.; BANNANTINE, J.P.; EDA, S.; ROBBE-AUSTERMAN, S. (2011a). Induction of B cell responses upon experimental infection of neonatal calves with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis. Clin. Vaccine. Immunol.* 18: 1139-1149.

STABEL, J.R.; ROBBE-AUSTERMAN, S. (2011). Early immune markers associated with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in a neonatal calf model. *Clin. Vaccine Immunol*., 18: 393-405.

STABEL, J.R.; WATERS, W.R.; BANNANTINE, J.P.; LYASHCHENKO, K. (2011b). Mediation of host immune responses after immunization of neonatal calves with a heat-killed *Mycobacteriumavium* subsp. *paratuberculosis* vaccine. *Clin. Vaccine. Immunol.* 18: 2079-89.

STABEL, J.R.; BARNHILL, A.; BANNANTINE, J.P.; CHANG, Y.F.; OSMAN, M.A. (2012). Evaluation of protection in a mouse model after vaccination with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* protein cocktails. *Vaccine*, 31: 127-134.

STACKEBRANDT, E.; RAINEY, F.A.; WARD-RAINEY, N.L.(1997). Proposal for a New Hierarchic Classification System, *Actinobacteria*. *Classis. Nov. Int. J. Syst. Bacteriol*., 47: 479-491.

STAFORD, J.L. (1983). Inmunologically important constituents of Mycobacteria: Antigens. En: *Mycobacteria*, pp. 85-125. Academic Press. London.

STAHL, D.A.;URBANCE, J.W.; (1990). The division between fast- and slow-growing species corresponds to natural relationships among the mycobacteria. *J Bacteriol.*, 172:116-24.

STAINSBY, K.J.; LOWES, J.R.; ALLAN, R.N.; IBBOTSON,J.P. (1993). Antibodies to *Mycobacterium paratuberculosis* and nine species of environmental mycobacteria in Crohn's disease and control subjects. *Gut.* 34: 371-4.

STAMP, J.T. (1944). A review of the pathogenesis and pathology of bovine tuberculosis quth special reference to practical problems. *Vet. Rec.*, 56: 443-446.

STAMP, J.T.; WATT, J.A. (1954). Johne´s disease in sheep. *J. Comp. Pathol.*, 64: 26-39.

STÄRK, K.D., FREI-STÄHELI, C.; FREI, P.P.; PFEIFFER, D.U.; DANUSER, J.; AUDIGÉ, L.; NICOLET, J.; STRASSER, M.; GOTTSTEIN, B.; KIHM, U. (1997). Frequency and cost of health problems in Swiss dairy cows and their calves (1993-1994). *Schweiz. Arch. Tierheilkd.*, 139: 343-353.

STAVITSKY, A.B.; BECK, J.D. (1945). Reaction of the developing chicken embryo and the chorioallantoic membrane to inoculation with various strains of *Mycobacterium paratubeculosis* (Johne´s disease). *Am. J. vet. Res*. 7: 470-476.

STEADHAM, E.M.; MARTIN, B.M.; THOEN, C.O. (2002). Production of a *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* purified protein derivative (PPD) and evaluation of potency in guinea pigs. *Biologicals*, 30: 93-95.

STEEL, R.G.D.; TORRIE, J.H. (1980) Analysis of variance. II: Multiway classifications. En: Steel, R.G.D. (Eds). Principles and procedures of statistics. A biomedical approach. 2nd ed. McGraw-Hill Book Co., New York, EEUU. pp: 195-238

STEHMAN, S.M.(1996). Paratuberculosis in small ruminants, deer, and South American camelids. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract*., 12: 441-455.

STENDER, H.; FIANDACA, M.; HYLDIG-NIELSEN, J.J.; COULL, J. (2002). PNA for rapid microbiology. J. Microbiol. Methods., 48:1-17.

STENDER, H.; MOLLERUP, T.A.; LUND, K.; PETERSEN, K.H.; HONGMANEE, P.; GODTFREDSEN, S.E. (1999). Direct detection and identification of Mycobacterium tuberculosis in smear-positive sputum samples by fluorescence in situ hybridization (FISH) using peptide nucleic acid (PNA) probes. *Int. J. Tuberc. Lung. Dis*., 3:830-837.

STENGER, S.; MODLIN, R.L. (2002). Control of *Mycobacterium tuberculosis* through mammalian Toll-like receptors. *Curr. Opin. Immunol*., 14: 452-457.

STEPHAN, R.; BÜHLER, K.; CORTI, S. (2002). Incidence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in bulk-tank milk samples from different regions in Switzerland. *Vet. Rec*., 150: 214-215.

STERNBERG, S.; VISKE, D. (2003). Control strategies for paratuberculosis in Sweden. *Acta. Vet. Scand*., 44: 247-249.

STEVENSON, K. (2006). Studing the pathogenesis of paratuberculosis: the enduring challenge. En: Manning, E.B.; Nielsen, S.S. (Eds.). *Proc 8th Int. Coll. PTBC*. IAP. Madison, EEUU. pp 88-97.

STEVENSON, K.; ALVAREZ, J.; BAKKER, D.; BIET, F.; DE JUAN, L.; DENHAM, S., DIMARELI, Z., DOHMANN, K.; GERLACH, G.F.; HERON, I.; KOPECNA, M.; MAY, L.; PAVLIK, I.; SHARP, J.M.; THIBAULT, V.C.; WILLEMSEN, P.; ZADOCKS, R.N.; GREIG, A. (2009). Occurrence of *Mycobacterium avium* subspecies p*aratuberculosis* across host species and European countries with evidence for transmission between wildlife and domestic ruminants. *BMC Microbiol*., 9: 212.

STEVENSON, K.; HUGHES, V.M.; DE JUAN, L.; INGLIS, N.F.; WRIGHT, F.; SHARP, J.M. (2002). Molecular characterization of pigmented and nonpigmented isolates of Mycobacterium avium subsp. Paratuberculosis *J. Clin. Micobiol*., 40: 1798-1804.

STEVENSON, K.; HUGHES, V.M.; DE JUAN, L.; INGLIS, N.F.; WRIGHT, F.; SHARP, J.M. (2002). Molecular characterization of pigmented and nonpigmented isolates of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis. J. Clin. Microbiol*.,40: 1798-1804.

STEVENSON, K.; INGLIS, N.F.; RAE, B.; BURRELLS, C.; DONACHIE, W.; SHARP, J.M. (1992). Identification and characterization of immunogenic proteins of Mycobacterium paratuberculosis. En: Chiodini, R.J.; Kreeger, J.M. (Eds.). *Proc 3rd Int. Coll. PTBC*. IAP. Providence. EE.UU. pp. 238-240.

STEVENSON, K.; INGLIS, N.F.; RAE, B.; DONACHIE, W.; SHARP, J.M. (1991). Complete nucleotide sequence of a gene encoding the 70 kd heat shock protein of *Mycobacterium paratuberculosis. Nucleic Acids Res*., 19:4552.

STEVENSON, K.; SHARP, J.M. (1997). The contribution of molecular biology to *Mycobacterium avium* subspecies *Paratuberculosis* research. *Vet. J*., 153: 269-286.

STEWART, D.J.; VAUGHAN, J.A.; STILES, P.L.; NOSKE, P.J.; TIZARD, M.L.; PROWSE, S.J.; MICHALSKI, W.P.; BUTLER, K.L.; JONES, S.L.(2004). A long-term study in Merino sheep experimentally infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: clinical disease, faecal culture and immunological studies. *Vet. Microbiol*.,104: 165-178.

STEWART, D.J.; VAUGHAN, J.A.; STILES, P.L.; NOSKE, P.J.; TIZARD, M.L.; PROWSE, S.J.; MICHALSKI, W.P.; BUTLER, K.L.; JONES, S.L. (2006). A long-term study in Angora goats experimentally infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: clinical disease, faecal culture and immunological studies. *Vet. Microbiol*.,113:13-24.

STEWART, D.J.; VAUGHAN, J.A.; STILES, P.L.; NOSKE, P.J.; TIZARD, M.L.; PROWSE, S.J.; MICHALSKI, W.P.; BUTLER, K.L.; JONES, S.L. (2007). A long-term bacteriological and immunological study in Holstein-Friesian cattle experimentally infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and necropsy culture results for Holstein-Friesian cattle, Merino sheep and Angora goats. *Vet. Microbiol*.,122: 83-96.

STICH, R.W.; BYRUM, B.; LOVE, B.; THEUS, N.; BARBER, L.; SHULAW, W.P. (2004). Evaluation of an automated system for non-radiometric detection of *Mycobacterium avium paratuberculosis* in bovine feces. *J. Microbiol. Methods.,* 56: 267-75.

STORSET, A.K.; HASVOLD, H.J.; VALHEIM, M.; BRUN-HANSEN, H.; BERNTSEN, G.; WHIST, S.K.; DJØNNE, B.; PRESS, C.M.; HOLSTAD, G.; LARSEN, H.J. (2001). Subclinical paratuberculosis in goats following experimental infection. An immunological and microbiological study. *Vet. Immunol. Immunopathol*., 80: 271-287.

STREETER, R.N.; HOFFSIS, G.F.; BECH-NIELSEN. S.; SHULAW, W.P.; RINGS, D.M. (1995). Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from colostrum and milk of subclinically infected cows. *Am J Vet Res.*, 56(10):1322-4.

STROBER, W.; MURRAY, P.J.; KITANI, A.; WATANABE, T. (2006). Signalling pathways and molecular interactions of NOD1 and NOD2. *Nat. Rev. Immunol*., 6: 9-20.

STROMMENGER, B.; STEVENSON, K.; GERLACH, G.F.(2001). Isolation and diagnostic potential of ISMav2, a novel insertion sequence-like element from Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis. *FEMS Microbiol Lett.* 196 :31-7.

STUART, P. (1962). The diagnosis of Johne's disease in cattle and the effect of vaccination on tuberculin and johnin test. *Bull. Off. Int. Epizzot.*, 58: 33-50.

STUART, P. (1965a). A pigmented *M. johnei* strain of bovine origin. *Br. Vet. J*.,121: 332-334.

STUART, P. (1965b). Vaccination against Johne´s disease in cattle exposed to experimental infection. *Br. Vet. J*., 121: 289-318.

SUGAWARA, I.; YAMADA, H. ; KANEKO, H. ; MIZUNO, S. ; TAKEDA, K . ; AKIRA, S. (1999). Role of interleukin-18 (IL-18) in mycobacterial infection in IL-18-gene-disrupted mice. *Infect. Immun*., 67: 2585-2589.

SUGDEN, E.A.; **BROOKS, B.W.; CORNER, A.H.; NIELSEN, K.H.; TURCOTTE, C.;SHAPIRO, J.; DUNCAN, J.R**. (1988). A study of indirect enzyme immunoassay for ovine paratuberculosis using A and D potein antigens and lipoarabinomannan polysaccharide antigen. En: Thorel, M.F.; Merkal, R.S. (Eds.).*Proc2nd Int. Coll. PTBC.* IAP. Paris. Francia. pp. 231-235.

SUGDEN, E.A.; BROOKS, B.W.; YOUNG, N.M.; WATSON, D.C., NIELSEN, K.H.; CORNER, A.H.; TURCOTTE, C.; MICHAELIDES, A.; STEWART, R.B. (1991). Chromatographic purification and characterization of antigens A and D from *Mycobacterium paratuberculosis* and their use in enzyme-linked immunosorbent assays for diagnosis of paratuberculosis in sheep. *J Clin Microbiol.* 29:1659-1664.

SUGDEN, E.A.; CORNER, A.H.; SAMAGH, B.S.; BROOKS, B.W.; TURCOTTE, C.; NIELSEN, K.H.; STEWART, R.B.; DUNCAN, J.R. (1989). Serodiagnosis of ovine paratuberculosis, using lipoarabinomannan in an enzyme-linked immunosorbent assay. Am J Vet Res., 50:850-854.

SUGDEN, E.A.; STILWELL, K.; MICHAELIDES, A. (1997). A comparison of lipoarabinomannan with other antigens used in absorbed enzyme immunoassays for the serological detection of cattle infected with *Mycobacterium paratuberculosis*. *J. Vet. Diagn. Invest*., 9: 413-417.

SUNG, N.; COLLINS, M.T. (2000). Effect of three factors in cheese production (pH, salt, and heat) on *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* viability. *Appl. Environ. Microbiol*., 66: 1334-1339.

SWEENEY RW1, WHITLOCK RH, MCADAMS S, FYOCK T. (2006b). Longitudinal study of ELISA seroreactivity to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in infected cattle and culture-negative herd mates. *J Vet Diagn Invest*., 18:2-6.

SWEENEY, R.W. (1996). Transmission of paratuberculosis. *Vet. Clin.North. Am. Food Anim. Pract.*, 12: 305-312.

SWEENEY, R.W.; HUTCHINSON, L.J.; WHITLOCK, R.H.; GALLIGAN, D.T.; SPENCER, P.A.(1994a). Effect of *Mycobacterium paratuberculosis* infection on milk production in dairy cattle. En: Chiodini, R.J.; Collins, M.T: Bassey, E.O.E. (Eds.). *Proc 4th Int. Coll. PTBC*. IAP. Providence. EEUU. pp 133-135.

SWEENEY, R.W.; JONES, D.E.; HABECKER, P.; SCOTT, P. (1998). Interferon-gamma and interleukin 4 gene expression in cows infected with *Mycobacterium paratuberculosis*. *Am. J. Vet. Res*., 59: 842-847.

SWEENEY, R.W.; UZONNA, J.: WHITLOCK, R.H.; HABECKER, P.L.; CHILTON, P.; SCOTT, P. (2006a). Tissue predilection sites and effect of dose on *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* organism recovery in a short-term bovine experimental oral infection model. *Res. Vet. Sci*., 80:253-259.

SWEENEY, R.W.; WHITLOCK, R.H.; BOWERSOCK, T.L.; CLEARY, D.L.; MEINERT, T.R.; HABECKER, P.L.; PRUITT, G.W. (2009). Effect of subcutaneous administration of a killed *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* vaccine on colonization of tissues following oral exposure to the organism in calves. *Am. J. Vet. Res*., 70: 493-497.

SWEENEY, R.W.; WHITLOCK, R.H.; BUCKLEY, C.L.; SPENCER, P.; ROSENBERG, A.E.; HUTCHINSON, L.J. (1994b). Diagnosis of paratuberculosis in dairy cattle, using enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies against *Mycobacterium paratuberculosis* in milk. *Am. J. Vet. Res.,* 55: 905-909.

SWEENEY, R.W.; WHITLOCK, R.H.; BUCKLEY, C.L.; SPENCER, P.A. (1995). Evaluation of a commercial enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of paratuberculosis in dairy cattle. *J. Vet. Diagn. Invest*., 7: 488-493.

SWEENEY, R.W.; WHITLOCK, R.H.; HAMIR, A.N.; ROSENBERGER, A.E.; HERR, S.A. (1992a). Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* after oral inoculation in uninfected cattle. *Am. J. Vet. Res.,* 53: 1312-1314.

SWEENEY, R.W.; WHITLOCK, R.H.; ROSENBERGER, A.E.(1992b).*Mycobacterium paratuberculosis* cultured from milk and supramammary lymph nodes of infected asymptomatic cows. *J. Clin. Microbiol*. 30(1): 166-71.

SWEENEY, R.W.; COLLINS, M.T.; KOETS, A.P.; MCGUIRK, S.M.; ROUSSEL, A.J. (2012). Paratuberculosis (Johne's disease) in cattle and other susceptible species. *J. Vet. Intern. Med*., 26:1239-1250.

SWEET, L.; SINGH, P.P.; AZAD, A.K.; RAJARAM, M.V.; SCHLESINGER, L.S. ; SCHOREV, J.S. (2010). Mannose receptor-dependent delay in phagosome maturation by *Mycobacterium avium* glycopeptidolipids. *Infect. Immun*., 78: 518-526.

SWIFT, B.M.; REES, C.E. (2013). Detecting mycobacteria in cattle blood. *Vet. Rec*., 173: 522-3.

SZILAGYI, M.; KORMENDY, B.; SURI, A.; TUBOLY, S.; NAGY, Gy. (1989). Experimental paratuberculosis (Johne's disease) -studies on biochemical parameters in cattle. *Arch. Exp. Vet. Med. Leipzig,* 43: 463-470.

SZTEYN, J.; WISZNIEWSKA-LASZCZYCH, A.; RUSZCZYŃSKA, A. (2008) Effectiveness of *Mycobacterium paratuberculosis* isolation from raw milk by means of direct isolation of DNA and classic culture. *Pol J Vet Sci*., 11: 25-8.

TAFTI, A.K.; RASHIDI, K. (2000). The pathology of goat paratuberculosis: gross and histopathological lesions in the intestines and mesenteric lymph nodes. *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health,* 47: 487-495.

TAKA, S.; LIANDRIS, E.; GAZOULI, M.; SOTIRAKOGLOU, K.; THEODOROPOULOS, G.; BOUNTOURI, M.; ANDREADOU, M.; IKONOMOPOULOS, J. (2013). In vitro expression of the SLC11A1 gene in goat monocyte-derived macrophages challenged with Mycobacterium avium subsp paratuberculosis.*Infect. Genet. Evol.* 17: 8-15.

TAKEDA, K.; KAISHO, T.; AKIRA, S. (2003). Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol*., 21:335-376.

TANAKA, S.; ITOHARA, S.; SATO, M.; TANIQUCHI, T.; YOKOMIZO, Y. (2000). Reduced formation of granulomata in gamma(delta) T cell knockout BALB/c mice inoculated with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis. Vet. Pathol.,* 37: 415-421.

TANAKA, S.; SATO, M.; ONITSUKA, T.; KAMATA, H.; YOKOMIZO, Y. (2005). Inflammatory cytokine gene expression in different types of granulomatous lesions during asymptomatic stages of bovine paratuberculosis. *Vet. Pathol*., 42: 579-588.

TANAKA, S.; SATO, M.; TANIQUCHI, T.; YOKOMIZO, Y. (1994). Histopathological and morphometrical comparison of granulomatous lesions in BALB/c and C3H/HeJ mice inoculated with *Mycobacterium paratuberculosis*. *J. Comp. Pathol*.,110: 381-388.

TAVORNPANICH, S.; GARDNER, I.A.; CARPENTER, T.E.; JOHNSON, W.O.; ANDERSON, R.J.(2006) Evaluation of cost-effectiveness of targeted sampling methods for detection of *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* infection in dairy herds. *Am. J. Vet. Res*., 67:821-828.

TAYLOR, A.W. (1945). Ovine paratuberculosis (Johne´s disease of sheep). *J. Comp. Pathol*., 55: 41-44.

TAYLOR, A.W. (1951a). Varieties of *Mycobacterium johnei* isolated from sheep. *J. Pathol. Bacteriol*., 63: 333-336.

TAYLOR, A.W. (1951b). Johne´s disease: its diagnosis and control. *Vet. Rec*., 68: 776-782.

TAYLOR, A.W. (1953a). Experimental Johne´s disease in cattle. *J. Comp. Pathol*., 63: 355-367.

TAYLOR, A.W. (1957). Varieties of *Mycobacterium johnei* isolated from sheep. *J. Path. Bact*., 63: 333-336.

TAYLOR, A.W.(1953b). The experimental infection of cattle with varieties of *Mycobacterium johnei* isolated from sheep. *J. Comp. Pathol.,* 63: 368-373.

TAYLOR, D.L.; ZHONG, L.; BEGG, D.J.; de SILVA, K.; WHITTINGTON, R.J.(2008). Toll-like receptor genes are differentially expressed at the sites of infection during the progression of Johne´s disease in outbred sheep. *Vet Immunol Immunopathol*., 124: 132-51.

TAYLOR, J.L.; TURNER, O.C.; BASARABA, R.J.; BELISLE, J.T.; HUYGEN, K.; ORME, I.M. (2003). Pulmonary necrosis resulting from DNA vaccination against tuberculosis. *Infect. Immun.*, 71: 2192-8.

TAYLOR, K.H.; TAYLOR, J.F.; WHITE, S.N.; WOMACK, J.E. (2006). Identification of genetic variation and putative regulatory regions in bovine CARD15. *Mamm. Genome*, 17: 892-901.

TAYLOR, T.K.; WILKS, C.R.; McQUEEN, D.S. (1981). Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from the milk of a cow with Johne's disease. *Vet. Rec*., 109: 532-533.

TELLECHEA, J.; GUTIERREZ, M.; PEREZ, V.; GARCIA-MARIN, J.F.; BADIOLA, J.J. (1993). Valoración preliminar de las respuestas inmune humoral y celular en ovinos y caprinos inmunizados frente a paratuberculosis con vacunas inactivadas y atenuadas. En: *Libro de Actas de la XVIII Reunión de la SEOC.*

TEMPLE, R.M.; MUSCOPLAT, C.C.; THOEN, C.O.; HIMES, E.M.; JOHNSON, D.W. (1979). Observations on diagnostic tests for paratuberculosis in a deer herd. *J. Am. Vet. Med. Assoc*., 175: 914-915.

TESSEMA, M.Z.; KOETS, A.P.; RUTTEN, V.P.; GRUYS, E. (2001). How does *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* resist intracellular degradation?, *Vet. Q.*, 23: 153-162.

TEWARI, D.; HOVINGH, E.; LINSCOTT, R.; MARTEL, E.; LAWRENCE, J.; WOLFGANG, D; GRISWOLD, D. (2014). *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* antibody response, fecal shedding, and antibody cross-reactivity to *Mycobacterium bovis* in *M. avium* subsp. *paratuberculosis*-infected cattle herds vaccinated against Johne's disease. *Clin. Vaccine Immunol*., 21: 698-703.

THAKUR, A.; RIBER, U.; DAVIS, W.C.; JUNGERSEN, G. (2013). Increasing the ex vivo antigen-specific IFN-γ production in subpopulations of T cells and NKp46+ cells by anti-CD28, anti-CD49d and recombinant IL-12 costimulation in cattle vaccinated with recombinant proteins from *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 155: 276-83.

THAYER, W.R. JR.; COUTU, J.A.; CHIODINI, R.J.; VAN KRUININGEN, H.J.; MERKAL, R.S. (1984). Possible role of mycobacteria in inflammatory bowel disease. II. Mycobacterial antibodies in Crohn's disease. *Dig. Dis. Sci.*, 29: 1080-5.

THOEN, C.O.; BAUM, K.H. (1988). Current knowledge on paratuberculosis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 192: 1609-1611.

THOEN, C.O.; HAAGSMA, J. (1996). Molecular techniques in the diagnosis and control of paratuberculosis in cattle. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 209: 734-737.

THOEN, C.O.; JARNAGIN, J.L.; RICHARDS, W.D. (1975). Isolation and identification of mycobacteria from porcine tissues: a three-year summary. *Am.J. Vet. Res*., 36: 1383-1386.

THOEN, C.O.; MUSCOPLAT, C.C.(1979). Recent developments in diagnosis of paratuberculosis (Johne´s disease*). J. Am. Vet. Med. Assoc*., 174: 838-840.

THOM, M.; MORGAN, J.H.; HOPE, J.C.; VILLARREAL-RAMOS, B.; MARTIN, M.; HOWARD, C.J. (2004). The effect of repeated tuberculin skin testing of cattle on immune responses and disease following experimental infection with *Mycobacterium bovis. Vet. Immunol. Immunopathol*., 102: 399-412.

THOMAS GW. (1983). Paratuberculosis in a large goat herd. *Vet Rec*., 113:464-466.

THOMAS, G.A.; SWIFT, G.L.; GREEN, J.T.; NEWCOMBE, R.G.; BRANIFF-MATHEWS, C.; RHODES, J.; WILKINSON, S.; STROHMEVER, G.; KREUZPAINTER, G. (1998). Controlled trial of antituberculous chemotherapy in Crohn's disease: a five year follow up study. *Gut*, 42: 497-500.

THOMA-USZYNSKI, S.; KIERTSCHER, S.M.; OCHOA, M.T.; BOUIS, D.A.; NORGARD, M.V.; MIYAKE, K.; GODOWSKI, P.J.; ROTH, M.D.; MODLIN, R.L. (2000). Activation of toll-like receptor 2 on human dendritic cells triggers induction of IL-12, but not IL-10. *J. Immunol*., 165: 3804-3810.

THOMPSON, C.R.; LYER, S.S.; MELROSE, N.; VAN OOSTEN, R.; JOHNSON, K.; PITSON, S.M.; OBEID, L.M.; KUSNER, D.J. (2005). Sphingosine kinase 1 (SK1) is recruited to nascent phagosomes in human macrophages: inhibition of SK1 translocation by *Mycobacterium tuberculosis. J. Immunol.*, 174: 3551-3561.

THOMPSON, K.G.; WEST, D.M.; ANDERSON, P.V.A.; BURHAM, D.L. (2002) Subclinical Johne's disease in sheep. *Proc. N. Z. Soc. An. Prod*., 62: 284-287.

THOMSEN, B.V.; STEADHAM, E.M.; GALLUP, J.M.; ACKERMANN, M.R.; BREES, D.J.; CHEVILLE, N.F. (2001). T cell-dependent inducible nitric oxide synthase production and ultrastructural morphology in BALB/c mice infected with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *J. Comp. Pathol*., 125: 137-144.

THOMSEN, V.T.; NIELSEN, S.S.; THAKUR, A.; JUNGERSEN, G. (2012). Characterization of the long-term immune response to vaccination against *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Danish dairy cows. *Vet. Immunol. Immunopathol*. 145: 316-22.

THONNEY, M.L.; SMITH, M.C. (2005). Control of Johne's disease in sheep by vaccination. Preliminary report. *Control of Johne's disease in sheep by vaccination. Preliminary report. Cornell University.*

THOREL, M.F. (1984). Review of occurrence of mycobactin dependence among micobacteria species. *Ann. Rech. Vet*., **15:** 405-409.

THOREL, M.F.; KRICHEVSKY, M.; LÉVY-FRÉBAULT, V.V. (1990). Numerical taxonomy of mycobactin-dependent mycobacteria, emended description of *Mycobacterium avium*, and description of *Mycobacterium avium* subsp. *avium* subsp. *nov*., *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* subsp. *nov*., and *Mycobacterium avium* subsp. *silvaticum* subsp. *nov*. *Int. J. Syst. Bacteriol*., 40: 254-260.

THOREL, M.F.; VIALARD, J.; MANFRONI, F.; BERNARDOT, J.; OSTYN, A. ; VANDEVELDE, J.(1992). Paratuberculose expérimentale chez le mouton après inoculation par voie veineuse ou par voie orale: pouvoir pathogène et diagnostic biologique. *Ann. Rech. Vét.*, 23:105-115.

THORESEN, O.F.; FALK, K.; EVENSON, O. (1994). Comparison of immunohistochemistry, acid-fast staining, and cultivation for detection of *Mycobacterium paratuberculosis* in goats. *J. Vet. Diagn. Invest*., 6: 195-199.

THORESEN, O.F.; OLSAKER, I. (1994). Distribution and hybridization patterns of the insertion element IS*900* in clinical isolates of *Mycobacterium paratuberculosis.Vet. Microbiol*. 40: 293-303.

THORNE, J.G.; HARDIN, L.E. (1997). Estimated prevalence of paratuberculosis in Missouri, USA cattle. *Prev Vet Med*. 31:51-57.

THORNTON, C.G.; McLELLAN, K.M.; STABEL, J.R.; CAROTHERS, C.; WHITLOCK, R.H.PASSEN, S. (2002). Aplication of the C(18)-carboxypropylbetadine specimen processing method to recovery of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from ruminant tissue specimens. *J. Clin. Microbiol*., 40: 1783-1790.

THRUSFIELD, M.; ORTEGA, C.; DE BLAS, I.; NOORDHUIZEN, J.P.; FRANKENA, K. (2001). WIN EPISCOPE 2.0: improved epidemiological software for veterinary medicine. *Vet. Rec*., 148: 567-572.

THUONG, N.T.; HAWN, T.R.; THWAITES, G.E.; CHAU, T.T.; LAN, N.T.; QUY, H.T.; HIEU, N.T.; ADEREM, A.; HIEN, T.T.; FARRAR, J.J.; DUNSTAN, S.J. (2007). A polymorphism in human TLR2 is associated with increased susceptibility to tuberculous meningitis. *Genes Immun*., 8: 422-428.

TIWARI, A.; VANLEEUWEN, J.A.; DOHOO, I.R.; KEEFE, G.P.; WEERSINK, A.(2008). Estimate of the direct production losses in Canadian dairy herds with subclinical *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection. *Can. Vet. J.*, 49: 569-576.

TONTIS, A.; KÖNING, H. (1978) Paratuberculosis in the goat. *Schweiz Arch Tierheilkd.*, 1120(10): 527-32.

TOOKER, B.C.; BURTON, J.L.; COUSSENS, P.M. (2002). Survival tactics of *M. paratuberculosis* in bovine macrophage cells.*Vet. Immunol. Immunopathol*., 87: 429-437.

TORIBIO, J.A.; SERGEANT, E.S. (2007). A comparision of methods to estimate the prevalence of ovine johne's infection from pooled fecal samples. *Aust. Vet. J.*, 85: 317-324.

TORTOLI, E. (2003). Impact of genotypic studies on mycobacterial taxonomy: the new mycobacteria of the 1990s. *Clin Microbiol Rev*., 16:319-54.

TRYLAND, M.; OLSEN, I.; VIKOREN, T.; HANDELAND, K.; ARNEMO, J.M.; THARALDSEN, J.; DJONNE, B.; JOSEFSEN, T.D.; REITAN, L.J. (2004). Serologic survey for antibodies against *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in free-ranging cervids from Norway. *J. Wildl. Dis.*, 40: 32-41.

TURCOTTE, C.; BROOKS; B.W.; DION, W.M.; MARENGER, R. (1986). Bacterial and fungal contaminats interfering with the isolation of *Mycobacyetiumparatuberculosis*. *Proc. Annu. Meet. Am. Assoc. Vet. Lab. Diagn*., 29: 49-58.

TURNER, O.C.; ROBERTS, A.D.; FRANK, A.A.; PHALEN, S.W.; MCMURRAY, D.M.; CONTENT, J.; DENIS, O.; D'SOUZA, S.; TANGHE, A.; HUYGEN, K.; ORME, I.M. (2000). Lack of protection in mice and necrotizing bronchointerstitial pneumonia with bronchiolitis in guinea pigs immunized with vaccines directed against the hsp60 molecule of *Mycobacterium tuberculosis. Infect. Immun*., 68: 3674-9.

TURNQUIST, S.E.; SNIDER, T.G.; KREEGER, J.M.; MILLER, J.E.; HAGSTAD, H.V.; OLCOOTT, B.M. (1991). Serological evidence of paratubrculosis in Lousiana beef cattle herds as detected by ELISA. Prev. Vet. Med, 11: 125-130.

TWORT, F.W. (1910). A method for isolating and growing the lepra bacillus of man (preliminary note). *Proc. R. Soc. Lon. Ser. B.*, 83: 156-158.

TWORT, F.W.; INGRAM, GLY. (1911a). A method for isolating, and cultivating the Mycobacterium enteritidis chronicae pseudotuberculosar bovis, Johne, and some experiments on the preparation of a diagnostic vaccines for pseudo-tuberculous enteritis of bovines. *Roy Soc Proc B*, 84: 517-542.

TWORT, F.W.; INGRAM, GLY. (1911b). Further experimentas with the Mycobacterium enteritidis chronicae pseudotuberculosae bovis, Johne, and with vaccines prepared from this micro-organism. *Zbl Bakt Abt I*., 67: 126-135.

UEMATSU, S.; AKIRA, S. (2006). Toll-like receptors and innate immunity. *J. Mol. Med.*, 84: 712-725.

UNDERHILL, D.M.; OZINSKY, A. (2002). Phagocytosis of microbes: complexity in action. *Annu. Rev. Immunol*., 20: 825-852.

UZONNA, J.E.; CHILTON, P.; WHITLOCK, R.H.; HABECKER, P.L.; SCOTT, P.; SWEENEY, R.W. (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.

VALENTE, C.; CUTERI, V.; QUONDAM, GIANDOMENICO, R.; GIALETTI, L.; FRANCIOSINI, M.P. (1997). Use of an experimental chicks model for paratuberculosis enteritis (Johne's disease). *Vet. Res*., 28: 239-246.

VALENTIN-WEIGAND, P.; GOETHE, R. (1999). Pathogenesis of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infections in ruminants: still more questions than answers. *Microbes Infect*., 1: 1121-1127.

VALENTIN-WEIGAND, P.; MORIARTY, K.M. (1992).*Mycobacterium paratuberculosis* binds fibronectin. *Res Microbiol.*,143:75-79.

VALENTIN-WEIGAND, P.; MURRAY, C.; MORIARTY, K.M. (1991). Antibody reactivities of *Mycobacterium paratuberculosis* infected sheep as analyzed by enzyme-linked immunosorbent assay and western blotting. *FEMS Microbiol. Lett*., 62: 145-148.

VALHEIM, M.; HASVOLD, H.J.; STORSET, A.K; LARSEN, H.J; PRESS, C.M.(2002a). Localisation of CD25+ cells and MHCII+ cells in lymph nodes draining Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis vaccination granuloma and the presence of a systemic immune response. *Res Vet Sci.*, 73:77-85.

VALHEIM, M.; SIGURDARDÓTTIR, O.G.; STORSET, A.K.; AUNE, L.G.; PRESS, C.M. (2004). Characterization of macrophages and occurrence of T cells in intestinal lesions of subclinical paratuberculosis in goats. *J. Comp. Pathol*., 131: 221-232.

VALHEIM, M.; STORSET, A.K.; ALEKSANDERSEN, M.; BRUN-HANSEN, H.; PRESS, C.M. (2002b). Lesions in subclinical paratuberculosis of goats are associated with persistent gut-associated lymphoid tissue. *J. Comp. Pathol*., 127: 194-202.

VALLEÉ, H. (1924). *C.R. Acad. Sci*. Paris, Jan. 2nd, 152.

VALLÉE, H.; RINJARD, P. ; VALLÉE, M. (1934). Sur la prémonition de l´enterite paratuberculeuse des bovides. *Rev. Gen. Med. Vet*., 43 : 777-779.

VALLÉE, H.; RINJARD, P.(1926). Etude sur l´entérite paratuberculeuse des bovidés. *Revue Générale de Médecine Vétérinaire*., 409 : 1-9.

VAN CREVEL, R.; OTTENHOFF, T.H.; VAN DER MEER, J.W. (2002). Innate immunity to *Mycobacterium tuberculosis. Clin. Microbiol. Rev.*, 15: 294-309.

VAN DER GIESSEN, J.W.; EGER, A.; HAAGSMA, J.; HARING, R.M.; GAASTRA, W.; VAN DER ZEIJST, B.A. (1992a). Amplification of 16S rRNA sequences to detect *Mycobacterium paratuberculosis*. *J. Med. Microbiol*., 36(4):255-63.

VAN DER GIESSEN, J.W.; HARING, R.M.; VAUCLARE, E.; EGER, A.; HAAGSMA, J.; VAN DER ZEIJST, B.A. **(1992b).** Evaluation of the abilities of three diagnostic tests based on the polymerase chain reaction to detect *Mycobacterium paratuberculosis* in cattle: application in a control program. J. *Clin. Microbiol.*, 30: 1216-1219.

VAN DER GIESSON, J.; VAN DIJK, L.; BLEUMINK-PUYM, N.; EGER, T.; HAAGSMA, J.; VAN DER ZEIJST, B. (1994). The spatial distribution of *Mycobacterium paratuberculosis* in infected cattle. Implications for pathogenesis and diagnosis. En: Chiodini, R.J.; Collins, M.T: Bassey, E.O.E. (Eds.). *Proc 4th Int. Coll. PTBC.* IAP.Providence. EEUU.pp 61-66.

VAN KRUININGEN, H.J. (1995). On the use of antibiotics in Crohn´s disease. *J. Clin. Gastroenterol.*, 20(4): 310-6.

VAN KRUININGEN, H.J.; CHIODINI, R.J.; THAYER, W.R.; COUTU, J.A.; MERKAL, R.S.; RUNNELS, P.L.(1986). Experimental disease in infant goats induced by a *Mycobacterium* isolated from a patient with Crohn's disease. A preliminary report. *Dig. Dis. Sci.*, 31: 1351-1360.

VAN KRUININGEN, H.J.; RUIZ, B.; GUMPRECHT, L. (1991). Experimental disease in young chickens induced by a *Mycobacterium paratuberculosis* isolate from a patient with Crohn's disease. *Can. J. Vet. Res.*, 55: 199-202.

VAN SCHAIK, G.; KALIS, C.H.; BENEDICTUS, G.; DIJKHUIZEN, A.A.; HUIRNE, R.B. (1996). Cost-benefit analysis of vaccination against paratuberculosis in dairy cattle. *Vet. Rec*., 139: 624-627.

VAN SOOLINGEN, D.; DE HAAS, P.E.; HAAGSMA, J.; EGER, T.; HERMANS, P.W.; RITACCO, V.; ALITO ,A.; VAN EMBDEN, J.D. (1994). Use of various genetic markers in differentiation of *Mycobacterium bovis* strains from animals and humans and for studying epidemiology of bovine tuberculosis.*J. Clin. Microbiol*., 32: 2425-2433.

VANDERGRASFF, R.; BARTON, M.D.; BARRY, G.R.; VAN WIJK, J.C.A. (1995). Prevalence of Mycobacterium paratuberculosis in dairy cattle in South Australia. En: Chiodini, R.J.; Collins, M.T.; Bassey, E.O.E. (Eds). Proc *4th Int Coll PTBC*. pp: 9-18.

VANDESOMPELE, J.; DE PRETER, K.; PATTYN, F.; POPPE, B.; VAN ROY, N.; DE PAEPE, A.; SPELEMAN, F. (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome biol*., 3: RESEARCH0034.

VANLEEUWEN JA1, FORSYTHE L, TIWARI A, CHARTIER R. (2005). Seroprevalence of antibodies against bovine leukemia virus, bovine viral diarrhea virus, *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*, and *Neospora caninum* in dairy cattle in Saskatchewan. *Can Vet J*. 46: 56-58.

VANLEEUWEN, J.A. ; KEEFE G.P.; TIWARI, A. (2002). Seroprevalence and productivity effects of infection with bovine leukemia virus, *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* and Neospora caninum in maritime Canadian dairy cattle. *Bov. Pract*., pp:86-91.

VANLEEUWEN, J.A.; KEEFE, G.P.; TREMBLAY, R.; POWER, C.; WICHTEL, J.J. (2001). Seroprevalence of infection with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*, bovine leukemia virus, and bovine viral diarrhea virus in maritime Canada dairy cattle. *Can Vet J*., 42:193-198.

VANLEEUWEN, J.A.; TIWARI, A.; PLAIZIER, J.C.; WHITING, T.L. (2006). Seroprevalences of antibodies against bovine leukemia virus, bovine viral diarrhea virus, *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*, and *Neospora caninum* in beef and dairy cattle in Manitoba. *Can Vet J.* 2006 , 47:783-786.

VANNUFFEL, P.: GILOT, P.; LIMBOURG, B.; NAERHUYZEN, B.; DIETERICH, C.; COENE, M.; MACHTELINCKX, L.; COCITO, C. (1994). Development of species-specific enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of Johne's disease in cattle. *J Clin Microbiol*. 32:1211-1216.

VANSNICK, E.; DE RIJK, P.; VERCAMMEN, F.; GEYSEN, D.; RIGOUTS, L.; PORTAELS, F. (2004). Newly developed primers for the detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Vet. Microbiol*., 100: 197-204.

VARDAMAN, T.H. (1954). The effect of various chemical agents on the viability of *Mycobacterium paratuberculosisin vitro*. *Am. J. Vet. Res*., 15: 159-163.

VARGES, R.; MARASSI, C.D.; OELEMANN, W.; LILENBAUM, W. (2009). Interference of intradermal tuberculin tests on the serodiagnosis of paratuberculosis in cattle. *Res. Vet. Sci*., 86: 371-372.

VARY, P.H.; ANDERSEN, P.R.; GREEN, E.; HERMON-TAYLOR, J.; McFADDEN, J.J. (1990). Use of highly specific DNA probes and the polymerase chain reaction to detect *Mycobacterium paratuberculosis* in Johne's disease. J. *Clin. Microbiol*., 28: 933-937.

VASSELON, T.; DETMERS, P.A. (2002). Toll receptors: a central element in innate immune responses. *Infect. Immun*., 70: 1033-1041.

VAUGHAN, J.A.; LENGHAUS, C.; STEWART, D.J.; TIZARD, M.L.;MICHALSKI, W.P. (2005). Development of a Johne's disease infection model in laboratory rabbits following oral administration of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Vet. Microbiol*., 105: 207-213.

VÁZQUEZ, P.; MOLINA, E.; ALONSO-HEARN, M.; GEIJO, M.V.; SEVILLA, I.A.; ESTONBA, A.; RUIZ, O.; GARRIDO, J.M.; JUSTE, R.A. (2009). Age structure of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in culled Friesian cattle. *Proc. 10th Int. Coll. PTBC*. pp 185-188. Minneapolis. Minnesota. EEUU.

VÁZQUEZ, P.; GARRIDO, J.M.; JUSTE, R.A. (2012). Effects of paratuberculosis on Friesian cattle carcass weight and age at culling. *Span. J. Agric. Res*. 10: 662-670.

VÁZQUEZ, P.; GARRIDO, J.M.; JUSTE, R.A. (2013). Specific antibody and interferon-gamma responses associated with immunopathological forms of bovine paratuberculosis in slaughtered Friesian cattle. *PLoS One*, 28: e64568.

VEAZEY, R.S.; HOROHOV, D.W.; KRAHENBUHL, J.L.; TAYLOR, H.W.; OLIVER III, J.L.; SNIDER III, T.G. (1995a). Comparison of the resistance of C57BL/6 and C3H/He mice to infection with *Mycobacterium paratuberculosis*. *Vet. Microbiol*., 47: 79-87.

VEAZEY, R.S.; TAYLOR, R.S.; HOROHOV, D.W.; KRAHENBUHL, J.L.;OLIVER III, J.L.; SNIDER III, T.G. (1995b). Histopathology of C57BL/6 mice inoculated orally with *Mycobacterium paratuberculosis. J. Comp. Pathol*., 113: 75-80.

VELAZ-FAIRCLOTH, M.; COBB, A.J.; HORSTMAN, A.L.; HENRY, S.C.; FROTHINGHAM, R. (1999). Protection against *Mycobacterium avium* by DNA vaccines expressing mycobacterial antigens as fusion proteins with green fluorescent protein. *Infect. Immun.*, 67: 4243-50.

VELILLA, P.A.; RUGELES, M.T.; CHOUGNET, C.A. (2006). Defective antigen-presentinc cell function in human neonates. *Clin. Immunol*.,. 121: 251-259.

VERNA, A.E.; GARCIA-PARIENTE, C.; MUÑOZ, M.; MORENO, O.; GARCÍA-MARIN, J.F.; ROMANO, M.I.; PAOLICCHI, F.; PÉREZ, V.(2007). Variation in the immuno-pathological responses of lambs after experimental infection with different strains of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Zoonoses Public Health*., 54: 243–252.

VESOSKY, B.; TURNER, O.C.; TURNER, J; ORME, IM. (2004). Gamma interferon production by bovine gamma delta T cells following stimulation with mycobacterial mycolylarabinogalactan peptidoglycan. Infect. Immun., 4612-4618.

VICENZONI, G.; FILIPPI, L.; DOLCI, P.; CORRÒ, M.; JOB, L.; ROBBI, C.; MUTINELLI, F.; MARANGON, S. (1999). Prevalenza del *Mycobacterium paratuberculosis* in bovine macellate in provincia di Verona., *Atti della Societa Italiana di Buiatria*, 31: 277-281.

VIDAL, S.; TREMBLAY, M.L.; GOVONI, G.; GAUTHIER, S.; SEBASTIANI, G.; MALO, D.; SKAMENE, E.; OLIVIER, M.; JOTHY, S.; GROS, P. (1995). The Ity/Lsh/Bcg locus: natural resistance to infection with intracellular parasites is abrogated by disruption of the Nramp1 gene. *J Exp Med*. 182:655-666.

VINDODKUMAR, K.; SASEENDRANTH, M.R.; BABY, K.; BALAKRISHNAN, V.S.; ALEX, P.C. (1999). Modified johnin test for diagnosis of subclinical caprine paratuberculosis. *Indian J. Vet. Med., 19:14-16.*

WAGNER, D.; SANGARI, F.J.; KIM, S.; PETROFSKY, M.; BERMUDEZ, L.E. (2002). Mycobacterium avium infection of macrophages results in progressive suppression of interleukin-12 production *in vitro* and *in vivo. J. Leukoc.. Biol*., 71: 80-88.

WALDNER, C.L.; CUNNINGHAM, G.L.; JANZEN, E.D.; CAMPBELL, J.R. (2002). Survey of *Mycobacterium avium s*ubspecies *paratuberculosis* serological status in beef herds on community pastures in Saskatchewan. *Can Vet J*., 43:542-546.

WALL, S.; KUNZE, Z.M.; SABOOR, S.; SOUFLERI, I.; SEECHUM, P.; CHIODINI, R.; MC FADDEN, J.J. (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: 1241-1245.

WALRAVENS, K.; MARCHÉ, S.; ROSSEELS, V.; WELLEMANS, V.; BOELAERT, F.; HUYGEN, K.; GODFROID, J. (2002). IFN-gamma diagnostic tests in the context of bovine mycobacterial infections in Belgium.*Vet Immunol Immunopathol*., 87:401-6.

WANGOO, A.; JOHNSON, L.; GOUGH, J.; ACKBAR, R.; INGLUT, S.; HICKS, D.; SPENCER, Y.; HEWINSON, G.; VORDERMEIER, M. (2005). Advanced granulomatous lesions in *Mycobacterium bovis*-infected cattle are associated with increased expression of type I procollagen, gammadelta (WC1+) T cells and CD 68+ cells. *J.Comp. Pathol*., 133: 223-234.

WATERS, W.R.; BUDDLE, B.M.; VORDERMEIER, H.M.; GORMLEY, E.; PALMER, M.V.; THACKER, T.C.; BANNANTINE, J.P.; STABEL, J.R.; LINSCOTT, R.; MARTEL, E.; MILIAN, F.; FOSHAUG, W.; LAWRENCE, J.C. (2011). Development and evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for use in the detection of bovine tuberculosis in cattle. *Clin. Vaccine Immunol*., 18:1882-1888.

WATERS, W.R.; MILLER, J.M.; PALMER, M.V.; STABEL, J.R.; JONES DE, KOISTINEN, K.A.; STEADHAM, E.M.; HAMILTON, M.J.; DAVIS, W.C.; BANNANTINE, J.P. (2003). Early induction of humoral and cellular immune responses during experimental *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection of calves. *Infect. Immun.*, 71: 5130-5138.

WATERS, W.R.; STABEL, J.R.; SACCO, R.E.; HARP, J.A.; PESCH, B.A.; WANNEMUEHLER, M.J. (1999). Antigen-specific B-cell unresponsiveness induced by chronic *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection of cattle. Infect. *Immun*., 67: 1593-1598.

WATKINS, C.; SCHOCK, A.; MAY, L.; DENHAM, S.; SALES, J.; WELCH, L.; SHARP, J.M.; STEVENSON, K. (2010). Assessing virulence of vaccine strains of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in a calf model. *Vet. Microbiol*., En prensa.

WATT, J.A.A. (1954). Johne´s disease in a bovine associated with a pigmented strain of *Mycobacterium johnei. Vet. Rec*.**,** 66: 387.

WAYNE, L.G.; KUBICA, G.P.(1986). Mycobacteria. Family *Mycobacteriaceae* Chester 1897. En: Sneath, P.H.A.; Mair, N.S., Sharpe, M.E.; Holt, J.G. (EDS.). Bergey´s Manual of Systematic Bacteriology. Vol. 2. Williams & Wilkins. Baltimore. EEUU. pp: 1436-1457.

WEBER, A.; GURKE, R.; BAUER, K.; SCHREYER, K. (1992). [Bacterial studies on the occurrence of *Mycobacterium paratuberculosis* in fecal samples of zoo ruminants]. *Berl. Munch, Tierzaltl. Wochenschr.,* 105: 161-165.

WEISS, D.J.; EVANSON, O.A.; DENG, M.; ABRAHAMSEN, M.S. (2004a). Sequential patterns of gene expression by bovine monocyte-derived macrophages associated with ingestion of mycobacterial organisms. *Microb.Pathog*., 37: 215-224.

WEISS, D.J.; EVANSON, O.A.; DENG, M.; ABRAHAMSEN, M.S. (2004b). Gene expression and antimicrobial activity of bovine macrophages in response to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis.Vet Pathol*., 41:326-37.

WEISS, D.J.; EVANSON, O.A.; MC CLENAHAN, D.J.; ABRAHAMSEN, M.S.; WALCHECK, B.K. (2001). Regulation of expression of major histocompatibility antigens by bovine macrophages infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* or *Mycobacterium avium* subsp. *avium*. *Infect. Immun*., 69: 1002-1008.

WEISS, D.J.; EVANSON, O.A.; MORITZ, A.; DENG, M.Q.; ABRAHAMSEN, M.S. (2002). Differential responses of bovine macrophages to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and *Mycobacterium avium* subsp. *avium*. *Infect. Immun*., 70: 5556-5561.

WEISS, D.J.; EVANSON, O.A.; SOUZA, C.D. (2005). Expression of interleukin-10 and suppressor of cytokine signaling-3 associated with susceptibility of cattle to infection with *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis. Am. J. Vet. Res.,* 66:1114-1120.

WEISS, D.J.; EVANSON, O.A.; SOUZA, C.D. (2006). Mucosal immune response in cattle with subclinical Johne's disease. *Vet. Pathol*., 43: 127-135.

WEISS, D.J.; SOUZA, C.D.; EVANSON, O.A.; SANDERS, M.; RUTHERFORD, M. (2008). Bovine monocyte TLR2 receptors differentially regulate the intracellular fate of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and *Mycobacterium avium* subsp. *avium*. *J. Leukoc. Biol*.,83: 48-55.

WELDINGH, K.; ROSENKRANDS, I.; JACOBSEN, S.; RASMUSSEN, P.B.; ELHAY, M.J.;ANDERSEN, P. (1998). Two-dimensional electrophoresis for analysis of Mycobacterium tuberculosis culture filtrate and purification and characterization of six novel proteins. *Infect Immun*. 66:3492–500.

WELLS, R.W.; BLENNERHASSETT, M.G. (2005). The increasing prevalence of Crohn's disease in industrialized societies: the price of progress? *Can. J. Gastroenterol*., 19: 89-95.

WELLS, S.J.; COLLINS, M.T.; FAABERG, K.S.; WEES, C.; TAVORNPANICH, S.; PETRINI, K.R.; COLLINS, J.E.; CERNICCHIARO, N.; WHITLOCK, R.H. (2006). Evaluation of a rapid fecal PCR test for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in dairy cattle. *Clin. Vaccine Immunol.* 13: 1125-1130.

WELSH, M.D.; CUNNINGHAM, R.T.; CORBETT, D.M.; GIRVIN, R.M.; MCNAIR, J.; SKUCE, R.A.; BRYSON, D.G.; POLLOCK, J.M. (2005) Influence of pathological progression on the balance between cellular and humoral immune responses in bovine tuberculosis. *Immunology, 114:101-11.*

WENTINK, G.H.; BENEDICTUS, G.; DINKIA, E.T.B. (1988). Bovine tuberculin reactions after vaccination with an inactivated paratuberculosis vaccine. En: Thorel, M.F.; Merkal, R.S. (Eds.). *Proc 2nd Int. Coll. PTBC.* IAP. Paris. Francia. pp. 130-135.

WENTINK, G.H.; BONGERS, J.H.; ZEEUWEN, A.A. (1993). Relationship between negative skin test with Johnin after vaccination and post mortem findings. *Vet. Rec.,* 132: 38-39.

WENTINK, G.H.; BONGERS, J.H.; ZEEUWEN, A.A.; JAARTSVELD, F.H. (1992). Efficency of vaccination against paratuberculosis using an inactivated whole cell vaccine. En: Chiodini, R.J. (Ed.). *Proc 3rd Int. Coll. PTBC.* IAP.Providence. EEUU. pp 484-494.

WENTINK, G.H.; BONGERS, J.H.; ZEEUWEN, A.A.; JAARTSVELD, F.H. (1994). Incidence of paratuberculosis after vaccination against *M. paratuberculosis* in two infected dairy herds. *Zentralbl Veterinarmed* B., 41: 517-522.

WERLING, D.; PIERCY, J.; COFFEY, T.J. (2006). Expression of TOLL-like receptors (TLR) by bovine antigen-presenting cells-potential role in pathogen discrimination? *Vet. Immunol. Immunopathol*., 112: 2-11.

WHAN, L.; BALL, H.J.; GRANT, I.R.; ROWE, M.T. (2005). Occurrence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in untreated water in Northern Ireland. *Appl. Environ. Microbiol*., 71: 7107-7112.

WHAN, L.; GRANT, I.R.; ROWE, M.T. (2006). Interaction between *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and environmental protozoa. *BMC Microbiol*., 6: 63.

WHAN, L; GRANT, I.R.; BALL, H.J.; SCOTT, R.; ROWE, M.T. (2001). Bactericidal effect of chlorine on *Mycobacterium paratuberculosis* in drinking water. *Lett. Appl. Microbiol*., 33: 227-231.

WHIPPEL, D.L.; MERKAL, R.S. (1985). Modification in the techniques for cultivation of *Mycobacterium paratuberculosis*. En: Merkal, R.S. (Ed.). *Proc 1st Int. Coll. PTBC.* IAP. Ames. EEUU. pp 475-479. Ames. EEUU.

WHIPPLE, D.; KAPKE, P.; VARY, C. (1990). Identification of restriction fragment length polymorphisms in DNA from Mycobacterium paratuberculosis. *J Clin Microbiol*., 28:2561-2564.

WHIPPLE, D.L.; CALLIHAN, D.R.; JARNAGIN, J.L. (1991). Cultivation of *Mycobacterium paratuberculosis* from bovine fecal specimens and a suggested standardized procedure. *J. Vet. Diagn. Invest***.,** 3 : 368-373.

WHIPPLE, D.L.; KAPKE, P.A.; ANDERSEN, P.R. (1992). Comparision of commercial DNA probe test and three cultivation procedures for detection of *Mycobacterium paratuberculosis* in bovine feces. *Vet. Diagn. Invest.*, 4: 23-27.

WHIPPLE, D.L.; PALMER, M.V.; SLAUGHTER, R.E.; JONES, S.L. (2001). Comparison of purified protein derivatives and effect of skin testing on results of a commercial gamma interferon assay for dosis of tuberculosis

WHIST, S.K.; STORSET, A.K.; LARSEN, H.J. (2000). The use of interleukin-2 receptor expression as a marker of cell-mediated immunity in goats experimentally infected with *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis. Vet. Immunol. Immunopathol*., 73: 207-218.in cattle. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 13: 117-122.

WHITE, W.B.; WHIPPLE, D.L.; STABEL, J.R.; BOLIN, C.A. (1994). Comparision of cellular and extracellular proteins expressed by various isolates of Mycobacterium Paratuberculosis and other mycobacterial species. *Am. J. Vet. Res*., 10: 1399-1405.

WHITLOCK, R.H. (1998). Enfermedad de Johne (Paratuberculosis): Tests diagnósticos individuales y a nivel de rebaño. *ANEMBE Boletín Informativo*, 21: 24-26.

WHITLOCK, R.H.(1992). Laboratory diagnosis of Johne´s disease. En: Chiodini, R.J.; Kreeger, J.M. (Eds.). *Proc 3rd Int. Coll. PTBC*. IAP. Providence. EE.UU. pp 1-11.

WHITLOCK, R.H.; BUERGELT, C. (1996). Preclinical and clinical manifestations of paratuberculosis (including pathology). *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract*., 12: 345-356.

WHITLOCK, R.H.; ROSENBERG, A.E.; SWEENEY, R.W.; HUTCHINSON, L.J. (1992). Culture techniques and media constituents for the isolation of *Mycobacterium. Paratuberculosis* from bovine fecal samples. En: Chiodini, R.J.; Kreeger, J.M. (Eds.). *Proc 3rd Int. Coll. PTBC*. IAP. Providence. EE.UU. pp 94-111.

WHITLOCK, R.H.; SWEENEY, R.W.; HUTCHINSON, L.T.; VAN BUSKIRK, M. (1995). Pennsylvania Johne´s disease program (1973 to 1993): a review of the twenty year program. En: Chiodini, R.J.; Collins, M.T: Bassey, E.O.E. (Eds.). *Proc 4th Int. Coll. PTBC.* IAP. Providence. EEUU.pp 102-110.

WHITLOCK, R.H.; VAN BUSKIRK, M.; SWEENEY, R.W.; HUTCHINSON, L.T. (1994). Pennsylvania Johne´s disease control program (1973 to 1993): a review of the twenty year program. En: Chiodini, R.J.; Collins, M.T: Bassey, E.O.E. (Eds.). *Proc 4th Int. Coll. PTBC.* IAP.Providence. EEUU. pp 102-110.

WHITLOCK, R.H.; WELLS, S.J.; SWEENEY, R.W.; VAN TIEM, J. (2000). ELISA and fecal culture for paratuberculosis (Johne's disease): sensitivity and specificity of each method. *Vet. Microbiol*., 77: 387-398.

WHITTINGTON RJ1, WINDSOR PA. (2009). *In utero* infection of cattle with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: a critical review and meta-analysis. *Vet J*. 179:60-69.

WHITTINGTON, R.J,; MARSH, I.; MCALLISTER, S.; TURNER, M.J., MARSHALL, D.J.; FRASER, C.A.; (1999a). Evaluation of modified BACTEC 12B radiometric medium and solid media for culture of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from sheep. *J Clin Microbiol*., 37:1077-1083.

WHITTINGTON, R.J.; EAMENS, G.J.; COUSINS, D.V. (2003a). Specificity of absorbed ELISA and agar gel immuno-diffusion tests for paratuberculosis in goats with observations about use of these tests in infected goats. *Aust. Vet. J*., 81: 71-75.

WHITTINGTON, R.J.; FELL, S.; WALKER, D.; McALLISTER, S.; MARSH, I.; SERGEANT, E.; TARAGEL, C.A.; MARSHALL, D.J.; LINKS, I.J. (2000a). Use of pooled fecal culture for sensitive and economic detection of *mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in flocks of sheep. *J. Clin. Microbiol*., 38: 2550-2556.

WHITTINGTON, R.J.; HOPE, A.F.; MARSHALL, D.J.; TARAGEL, C.A.; MARSH, I. (2000b). Molecular epidemiology of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: IS*900* restriction fragment length polymorphism and IS*1311* polymorphism analyses of isolates from animals and a human in Australia. *J. Clin. Microbiol*., 38: 3240-3248.

WHITTINGTON, R.J.; LLOYD, J.B.; REDDACLIFF, L.A. (2001a). Recovery of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from nematode larvae cultured from the faeces of sheep with Johne's disease. *Vet. Microbiol*., 81: 273-279.

WHITTINGTON, R.J.; MARSH, I.; TURNER, M.J.; McALLISTER, S.; CHOY, E.; EAMENS, G.J.; MARSHALL, D.J.; OTTAWAY, S. (1998). Rapid detection of *Mycobacterium paratuberculosis* in clinical samples from ruminants and in spiked environmental samples by modified BACTEC 12B radiometric culture and direct confirmation by IS*900* PCR. *J. Clin. Microbiol*., 36: 701-707.

WHITTINGTON, R.J.; MARSH, I.B.; REDDACLIFF, L.A. (2005). Survival of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in dam water and sediment. *Appl. Environ. Microbiol*., 71: 5304-5308.

WHITTINGTON, R.J.; MARSH, I.B.; TAYLOR, P.J.; MARSHALL, D.J.; TARAGEL, C.; REDDACLIFF, L.A. (2003b). Isolation of *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* from environmental samples collected from farms before and after destocking sheep with paratuberculosis. *Aust. Vet. J*., 81: 559-563.

WHITTINGTON, R.J.; MARSH, I.B.; WHITLOCK, R.H.(2001b). Typing of IS*1311* polymorphisms confirms that bison (*Bison bison*) with paratuberculosis in Montana are infected with a strain of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* distinct from that occurring in cattle and other domesticated livestock. *Moll. Cell. Probes*., 15: 139-145.

WHITTINGTON, R.J.; MARSHALL, D.J.; NICHOLLS, P.J.; MARSH, I.B.; REDACLIFF, L.A. (2004). Survival and dormancy of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in the environment. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70: 2989-3004.

WHITTINGTON, R.J.; REDDACLIFF, L.; MARSH, I.; SAUNDERS, V. (1999b). Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in formalin-fixed paraffin-embedded intestinal tissue by IS*900* polymerase chain reaction. *Aust. Vet. J.*, 77: 392-397.

WHITTINGTON, R.J.; REDDACLIFF, L.A.; MARSH, I.; MC ALLISTER, S.; SAUNDERS, V. (2000c). Temporal patterns and quantification of excretion of *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* in sheep with Johne's disease. *Aust. Vet. J.*, 78: 34-37.

WHITTINGTON, R.J.; WINDSOR, P.A. (2009). In utero infection of cattle with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: a critical review and meta-analysis. *Vet. J*., 179: 60-69.

WILESMITH, J.W. (1982). Johne's disease: a retrospective study of vaccinated herds in Great Britain. *Br. Vet. J*., 138: 321-331.

WILLEMSEN, P.T.; RUULS, R.; DAMMAN, M; BAKKER, D. (2002). Detection of *Mycobacterium paratuberculosis* infaecal samples using immunomagnetic capture and TaqMan PCR. En: Juste, R.A.; Geijo, M.V.; Garrido, J.M: (Eds.). Proc 7th Int. Coll. PTBC. IAP. Bilbao, Spain. pp.: 293.

WILLEMSEN, P.T.; WESTERVEEN, J.; DINKLA, A.; BAKKER, D.; VAN ZIJDERVELD, F.G.; THOLE, J.E. (2006). Secreted antigens of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* as prominent immune targets. *Vet. Microbiol*., 114: 337-344.

WILLIAMS, E.S.; SNYDER, S.P.; MARTIN, K.L. (1983a). Pathology of spontaneous and experimental infection of North American wild ruminants with *Mycobacterium paratuberculosis. Vet. Pathol.*, 20: 274-291.

WILLIAMS, E.S.; SNYDER, S.P.; MARTIN, K.L. (1983b). Experimental infection of some North American wild ruminants and domestic sheep with *Mycobecterium paratuberculosis*: clinical and bacteriological findings. *J. Wildl. Dis.*, 19: 185-191.

WILSON, D.J.; ROSSITER, C.; HAN, H.R.; SEARS, P.M. (1993). Association of *Mycobacterium paratuberculosis* infection with reduced mastitis, but with decreased milk production and increased cull rate in clinically normal dairy cows. *Am. J. Vet. Res*., 54: 1851-1857.

WILSON, D.J.; ROSSITER, C.; HAN, H.R.; SEARS, P.M. (1997). Financial effects of *Mycobacterium paratuberculosis* on mastitis, culling and milk production in clinically normal dairy cattle. En: Chiodini, R.J.; Hines, M.E.; Collins, M.T. (Eds.). *Proc 5th Int. Coll. PTBC*. IAP. Rehoboth. EEUU. pp. 151-158.

WINDSOR, P.; EPPLESTON, J.; WHITTINGTON, R.; JONES, S.; BRITTON, A.(2002). Efficacy of a killed *Mycobacterium avium* susbp. *Paratuberculosis* vaccine for the control of OJD in Australian sheep flocks. En: Juste, R.A.; Geijo, M.V.; Garrido, J.M: (Eds.). *Proc 7th Int. Coll. PTBC*. IAP. Madison, EEUU. pp. 420-423.

WINDSOR, P.; WHITTINGTON, R.J.(2010). Evidence for age susceptibility to cattle to Johne´s disease. *Vet. J.* 184: 37-44. .

WINDSOR, P.A.; EPPLESTON, J. (2006). Lesions in sheep following administration of a vaccine of a Freund's completeadjuvant nature used in the control of ovine paratuberculosis. *N. Z. Vet. J.*, 54: 237-241.

WINDSOR, P.A.; BUSH, R.; LINKS, I.; EPPLESTON, J. (2005). Injury caused by self-inoculation with a vaccine of a Freund's complete adjuvant nature (Gudair) used for control of ovine paratuberculosis. *Aust Vet J.* 83:216-20.

WINDSOR, P.A.; EPPLESTON, J.; DHAND, N.K.; WHITTINGTON, R.J. (2014). Effectiveness of Gudair™ vaccine for the control of ovine Johne's disease in flocks vaccinating for at least 5 years. *Aust. Vet. J.*, 92: 263-268.

WINTERHOFF, C.; BEYERBACH, M.; HOMUTH, M.; STRUTZBERG, K.; GERLACH, G.F. (2002). Establishment and evaluation of an ELISA for the detection of antibodies in milk against Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis. *Dtsch Tierarztl Wochenschr*., 109:230-234.

WITHERS, F.W.(1959). II. Incidence of the disease. *Vet. Rec.*, 71: 1150-1153.

WITTLER, R.G.; MALIZIA, W.F.; KRAMER, P.E.; TUCKETT, J.D.; PRITCHARD, H.N.; BAKER, H.J. (1960). Isolation of a Corynebacterium and its transitional forms from a case of subacute bacterial endocarditis treated with antibiotics. *J Gen Microbiol*. 23:3153-33.

WOO, S.R.; HEINTZ, J.A.; ALBRECHT, R.; BARLETTA, R.G.; CZUPRYNSKI, C.J. (2007). Life and death in bovine monocytes: the fate of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Microb. Pathog*., 43: 106-113.

WOOD, P.; FIFIS, T.; CORNER, L.; RADFORD, A. (1989). Isolation and characterisation of an immunodominant protein from *Mycobacterium bovis. Acta Leprol.*, 7: 186-187.

WOOD, P.R.; CORNER, L.A.; PLACKETT, P. (1990). Development of a simple, rapid in vitro cellular assay for bovine tuberculosis based on the production of gamma interferon. *Res. Vet. Sci*., 49: 46-49.

WOOD, P.R.; KOPSIDAS, K.; MILNER, A.R.; HILL, J.; GILL, I.; WEBB, R.; MACK, W.N.; COATES, K. (1989). The development of an in vitro cellular assay for Johne´s disease in cattle. En: Milner, A.R.; Wood, P.R. (Eds.). Johne´s disease:current trends in research, diagnosis and management. CSIRO. pp: 164-167.

WOOD, P.R.; ROTHEL, J.S. (1994). *In vitro* immunodiagnostic assays for bovine tuberculosis. *Vet. Microbiol*., 40: 125-135.

WOOD, P.R.; CORNER, L.A.; ROTHEL, J.S.; BALDOCK, C.; JONES, S.L.; COUSINS, D.B.; MCCORMICK, B.S.; FRANCIS, B.R.; CREEPER, J.; TWEDDLE, N.E. (1991). Field comparison of the interferon-gamma assay and the intradermal tuberculin test for the diagnosis of bovine tuberculosis. *Aust. Vet. J*., 68: 286-290.

WOOD, P.R.; CORNER, L.A.; ROTHEL, J.S.; RIPPER, J.L.; FIFIS, T.; MCCORMICK, B.S.; FRANCIS, B.; MELVILLE, L.; SMALL, K.; DE WITTE, K.; TOLSON, J.; RYAN, T.J.; DE LISLE, G.W.; COX, J.C.; JONES, S.L. (1992). A field evaluation of serological and cellular diagnostic tests for bovine tuberculosis. *Vet. Microbiol*., 31: 71-79.

WOODBINE, K.A.; SCHUKKEN, Y.H.; GREEN, L.E.; RAMIREZ-VILLAESCUSA, A.; MASON, S.; MOORE, S.J.; BILBAO, C.; SWANN, N.; MEDLEY, G.F. (2009): Seroprevalence and epidemiological characteristics of Mycobacterium avium subsp. Paratuberculosis on 114 cattle farms in south west England. *Prev Vet Med*. 89: 102-109.

WOODBURY MR1, CHIRINO-TREJO M, MIHAJLOVIC B. (2008). Diagnostic detection methods for Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in white-tailed deer. *Can Vet J*. 49:683-638.

WU, C.W.; LIVESEY, M.; SCMOLLER, S.K.; MANNING, E.J., STEINBERG, H.; DAVIS, W.C.; HAMILTON, M.J.; TALAAT, A.M. (2007). Invasion and persistence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* during early stages of Johne's disease in calves. *Infect. Immun*., 75: 2110-2119.

WU, S.W.; PAO, C.C.; CHAN, J.; YEN, T.S.(1991). Lack of mycobacterial DNA in Crohn's disease tissue. *Lancet*, 337: 174-175.

WYATT, C.R.; MADRUGA, C.; CLUFF, C.; PARISH, S.; HAMILTON, M.J.; GOFF, W.; DAVIS, W.C. (1994). Differential distribution of gamma delta T-cell receptor lymphocyte subpopulations in blood and spleen of young and adult cattle. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 40: 187-199.

XENOS, G.; YLANNATI, A.; DIMARELLI, Z.; MILIANGAS, P.; KOUTSOUKOU, E. (1988). Evaluation of a live paretuberculosis vaccine in sheeo and goats. En: *CEC Workshop Commission of the Economics Comunities.* Creta, Grecia.

XIAO, C.T.; HALBUR, P.G.; OPRIESSNIG, T. (2012). Complete genome sequence of a novel porcine circovirus type 2b variant present in cases ofvaccine failures in the United States. *J Virol*. 2012 86:12469.

YAMAMOTO-FURUSHO, J.K.; KORZENIK, J.R. (2006). Crohn's disease: innate immunodeficiency? *World J. Gastroenterol.*, 12: 6751-5.

YAMAMURA, M.; UVEMURA, K.; DEANS, R.J.; WEINBERG, K.; REA, T.H.; BLOOM, B.R.; MODLIN, R.L. (1991). Defining protective responses to pathogens: cytokine profiles in leprosy lesions. *Science*, 254: 277-279.

YOKOMIZO, Y.; KISHIMA, M.; MORI, Y.; NISHIMORI, K. (1991). Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay in comparison with complement fixation test for the diagnosis of subclinical paratuberculosis in cattle. *J. Vet. Med. Sci*., 53: 577-584.

YOKOMIZO, Y.; YUGI, H.; MERKAL, R.S. (1983). A method of avoiding false positive reactions in an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the diagnosis of bovine paratuberculosis. *Jap. J. Vet. Sci*., 47: 111-119.

YOKOMIZO. Y.; HIRAMUNE, T.; ISAYAMA, Y. (1970). Antibodies produced in a cow naturally infected with Johne's disease. Natl Inst Anim *Health Q (Tokyo).*, 10:137-142.

YOUNG, D.; GARBE, T.; LATHIGRA, R.; ABOUD ZEID, C. (1990). Protein antigens: structure, function and regulation. En: McFadden, J.J. editor. Molecular Biology of the Mycobacteria, pp: 1-35. Academic Press INC. London.

YU, J.L.; ANDERSSON, R.; LJUNGH, A. (1996). Protein adsorption and bacterial adhesion to biliary stent materials. *J. Surg. Res*., 62: 69-73.

ZANETTI, S.; BUA, A.; MOLICOTTI, P.; DELOGU, G.; MURA, A.; ORTU, S.; SECHI, L.A. (2008). Identification of mycobacterial infections in wild boars in Northern Sardinia, Italy. *Acta. Vet. Hung*., 56: 145-152.

ZHAO, B.; COLLINS, M.T.; CZUPRYNSKI, C.J. (1997). Effects of gamma interferon and nitric oxide on the interaction of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* with bovine monocytes. *Infect Immun*., 65:1761-6.

ZIMMER, K.; DRÄGER, K.G.; KLAWONN, W.; HESS, R.G. (1999). Contribution to the diagnosis of Johne´s disease in cattle. Comparative studies on the validity of Ziehl-eelsen staining, faecal culture and a commercially available DNA-probe® Test in detecting *Mycobacterium paratuberculosis* in faeces from cattle. *J. Vet. Med. B*, 46: 137-140.

ZWICK, L.S.; WALSH, T.F.; BARBIERS, R.; COLLINS, M.T.; KINSEL, M.J.; MURNAME, R.D. (2002). Paratuberculosis in a mandrill (*Papio sphinx*). *J. Vet. diagn. Invest*., 14: 326-328.

ZWILLING, B.S.; KUHN, D.E.; WIKOFF, L.; BROWN, D.; LAFUSE, W. (1999). Role of iron in Nramp1-mediated inhibition of mycobacterial growth. *Infect Immun*.,67:1386-1392.

IX. ANEXOS

IX.1. ANEXOS

Tabla IX.1. Resultados del test ELISA indirecto frente a paratuberculosis (continúa)

Animales	0*	15*	30*	45*	60*	90*	105*	120*
Vacunados e infectados (VI)								
3301	205	182	575	761	1044	1149	1123	1266
3303	250	177	293	390	583	711	817	1085
5931	165	170	229	363	852	965	896	946
5953	420	484	761	536	691	1088	1018	1093
7461	157	234	369	454	1009	1125	1189	1247
7930	154	175	268	316	602	483	812	894
9108	290	346	411	429	496	538	376	469
9109	166	247	572	455	457	702	584	638
Media	**225,88**	**251,88**	**434,75**	**463,00**	**716,75**	**845,13**	**851,88**	**954,75**
No vacunados e infectados (NVI)								
3300	313	226	203	206	552	252	302	209
3302	326	179	176	411	336	189	217	517
5933	238	299	152	187	657	187	148	175
5956	149	259	413	302	276	214	256	165
7460	171	171	140	213	260	232	216	136
9107	398	231	129	221	568	635	552	679
Media	**265,84**	**227,50**	**202,17**	**256,67**	**441,50**	**284,84**	**281,84**	**313,50**
Vacunados, no infectados (VNI)								
5954	110	203	147	474	807	900	927	1063
9106	400	354	196	791	769	911	926	1045
Media	**255**	**278,50**	**171,50**	**632,50**	**788,00**	**905,50**	**926,50**	**1054**
No vacunados, no infectados (NVNI)								
5932	233	286	603	536	593	441	428	445
7931	383	240	320	241	347	220	323	349
Media	**308**	**263**	**461,50**	**388,50**	**470**	**330,50**	**375,50**	**397**

Valores de cada animal y media de los diferentes grupos experimentales en los diferentes muestreos. El resultado se obtuvo al dividir el valor medio de la densidad óptica de cada suero problema entre el valor medio de los controles positivos de cada placa de ELISA. *: días post-vacunación

Tabla IX.1. Resultados del test ELISA indirecto frente a paratuberculosis (continuación)

Animales	135*	150*	180*	210*	240*	270*	300*	330*
Vacunados e infectados (VI)								
3301	1007	1069	1026	1150	849	1029	1061	1039
3303	942	1010	913					
5931	1050	1148	1109	1070	1298	1090	1158	1049
5953	1033	1190	1117					
7461	1176	1162	1244	1084	1325			
7930	958	1047	932	762	983	978	857	883
9108	631	624	701					
9109	630	925	909	987	746	933	841	784
Media	**953,38**	**1021,88**	**993,88**	**1010,60**	**1040,20**	**1007,50**	**979,25**	**938,75**
No vacunados e infectados (NVI)								
3300	178	377	262	573	770	499	325	413
3302	173	329	260	243	217	248	453	361
5933	160	325	280					
5956	205	325	314	550	1343	491	378	355
7460	191	374	335					
9107	757	760	752	577	271	580	531	664
Media	**277,34**	**415**	**367,17**	**485,75**	**650,25**	**454,50**	**421,75**	**448,25**
Vacunados, no infectados (VNI)								
5954	1040	1111	1135	1090	1366	1144	1198	1126
9106	1068	1120	1099	1242	1408	1074	1106	1220
Media	**1054**	**1115,50**	**1117**	**1166**	**1387**	**1109**	**1152**	**1173**
No vacunados, no infectados (NVNI)								
5932	493	541	544	300	203	214	312	335
7931	341	550	492	509	330	325	276	324
Media	**417**	**545,50**	**518**	**404,50**	**266,50**	**269,50**	**294**	**329,50**

Valores de cada animal y media de los diferentes grupos experimentales en los diferentes muestreos. El resultado se obtuvo al dividir el valor medio de la densidad óptica de cada suero problema entre el valor medio de los controles positivos de cada placa de ELISA. *: días post-vacunación.

Tabla IX.2. Resultados del test ELISA indirecto frente a tuberculosis (continúa)

Animales	0*	15*	30*	45*	60*	90*	105*	120*
Vacunados e infectados (VI)								
3301	155	214	349	391	1000	801	749	745
3303	185	160	455	422	639	608	487	472
5931	159	158	195	256	588	513	438	480
5953	160	223	242	279	758	788	647	763
7461	146	166	387	225	602	653	577	575
7930	152	176	186	263	482	519	370	495
9108	176	146	329	194	213	273	184	222
9109	171	186	169	190	202	287	218	122
Media	**163**	**178,63**	**289**	**277,50**	**560,50**	**555,25**	**458,75**	**484,25**
No vacunados e infectados (NVI)								
3300	184	190	551	452	581	555	366	426
3302	167	153	163	170	156	206	156	453
5933	160	169	143	181	142	202	229	172
5956	190	169	272	255	178	252	195	238
7460	156	136	146	255	143	328	261	309
9107	192	221	134	200	195	273	263	338
Media	**174,84**	**173**	**234,84**	**252,17**	**232,50**	**302,67**	**245**	**322,67**
Vacunados, no infectados (VNI)								
5954	149	174	174	178	173	305	656	760
9106	192	233	338	489	465	503	496	768
Media	**170,50**	**203,50**	**256**	**333,50**	**319**	**404**	**576**	**764**
No vacunados, no infectados (NVNI)								
5932	189	160	202	233	200	260	266	266
7931	242	194	203	255	206	269	193	224
Media	**215,50**	**177**	**202,50**	**244**	**203**	**264,50**	**229,50**	**245**

Valores de cada animal y media de los diferentes grupos experimentales en los diferentes muestreos. El resultado se obtuvo al dividir el valor medio de la densidad óptica de cada suero problema entre el valor medio de los controles positivos de cada placa de ELISA. *: días post-vacunación.

Tabla IX.2. Resultados del test ELISA indirecto frente a tuberculosis (continuación)

Animales	135*	150*	180*	210*	240*	270*	300*	330*
Vacunados e infectados (VI)								
3301	620	555	762	1243	933	865	980	900
3303	348	388	361					
5931	418	527	520	1008	618	560	734	785
5953	699	825	828					
7461	555	531	625	683	243			
7930	398	339	339	486	335	371	622	606
9108	303	280	264					
9109	327	313	282	588	269	495	534	544
Media	**458,50**	**469,75**	**497,63**	**801,60**	**479,60**	**572,75**	**717,50**	**708,75**
No vacunados e infectados (NVI)								
3300	243	272	243	295	226	270	333	356
3302	218	186	201	164	219	203	267	319
5933	200	170	162					
5956	197	210	176	211	181	177	244	237
7460	247	189	163					
9107	317	269	281	281	234	278	298	350
Media	**237**	**216**	**204,34**	**237,75**	**215**	**232**	**285,50**	**315,50**
Vacunados, no infectados (VNI)								
5954	598	625	641	1308	953	765	859	902
9106	711	586	525	1231	1129	753	779	827
Media	**654,50**	**605,50**	**583**	**1269,50**	**1041**	**759**	**819**	**864,50**
No vacunados, no infectados (NVNI)								
5932	205	202	191	159	256	207	260	289
7931	205	217	215	212	412	213	301	290
Media	**205**	**209,50**	**203**	**185,50**	**334**	**210**	**280,50**	**289,50**

Valores de cada animal y media de los diferentes grupos experimentales en los diferentes muestreos. El resultado se obtuvo al dividir el valor medio de la densidad óptica de cada suero problema entre el valor medio de los controles positivos de cada placa de ELISA. *: días post-vacunación.

Tabla IX.3. Resultados de la prueba de liberación de IFN-γ tras la estimulación de linfocitos sanguíneos con PPD aviar (continúa)

Animales	0*	15*	30*	45*	60*	90*	105*	120*
Vacunados e infectados (VI)								
3301	2,96	3,78	7,01	22,88	31	28,98	51,84	4,78
3303	1,28	1,02	5,34	9,65	13,67	11,09	2,58	53,57
5931	1,46	3,51	5,18	9,09	20,61	9,36	9,20	47,08
5953	1,01	1,22	6,39	15,80	27,20	10,48	51,72	46,67
7461	1,51	2,48	7,87	14,75	28,44	12,98	18,49	43,16
7930	1,61	1,41	2,43	15,14	33,76	4,34	18,49	43,16
9108	1,58	1,18	1,29	9,72	18,75	8,02	29,53	51,28
9109	1,03	2,43	1,91	31,14	27,72	22,7	54,04	61,85
Media	**1,56**	**2,13**	**4,86**	**16,02**	**25,14**	**13,49**	**29,49**	**42,65**
No vacunados e infectados (NVI)								
3300	1,20	6,77	2,82	4,11	2,13	1,49	2,45	15,48
3302	1,44	1,03	1,54	2,54	1,73	2,79	1,39	1,04
5933	1,37	1,15	0,82	1,04	0,82	0,90	1,34	1,49
5956	1,26	1,06	1,41	1,76	1,23	1,05	1,35	23,24
7460	1,40	1,04	1	1,62	2,93	2,9	7,88	23,24
9107	1,11	1,14	0,85	1,90	1,11	1,23	1,32	28,55
Media	**1,30**	**2,03**	**1,41**	**2,16**	**1,66**	**1,73**	**2,62**	**15,54**
Vacunados, no infectados (VNI)								
5954	1,30	0,94	1,03	1,06	8,75	29	32,50	47,62
9106	1,28	0,76	3,73	1,36	23,16	8,07	32,60	52,63
Media	**1,29**	**0,85**	**2,38**	**1,21**	**15,96**	**18,54**	**32,55**	**50,13**
No vacunados, no infectados (NVNI)								
5932	0,95	1,31	1,01	1,30	1,60	1,03	0,30	16,75
7931	1,11	1,14	0,64	2,04	1,69	1,04	1,10	28,60
Media	**1,03**	**1,23**	**0,83**	**1,67**	**1,65**	**1,04**	**0,70**	**22,68**

Valores de cada animal y media de los diferentes grupos experimentales en los diferentes muestreos. El resultado se obtuvo al dividir el valor de la absorbancia de cada plasma estimulado con PPD aviar entre la DO del mismo plasma incubado con PBS. *: días post-vacunación.

Tabla IX.3. Resultados de la prueba de liberación de IFN-γ tras la estimulación de linfocitos sanguíneos con PPD aviar (continuación)

Animales	135*	150*	180*	210*	240*	270*	300*	330*
Vacunados e infectados (VI)								
3301	37,26	49,18	36,14	41,50	33,15	2,10	2,09	20,10
3303	33,15	5,42	42,50					
5931	11,73	22	27	18,8	26,01	1,05	8,63	3,65
5953	14,45	43,16	18,07					
7461	48	50,42	52,63	23,90	40,32			
7930	10,18	38,17	18,48	3,32	6,38	1,43	6,62	8,29
9108	42,85	30,12	43,63					
9109	36,58	49,58	41	15,43	14,03	7,72	3,12	23,62
Media	**29,28**	**36,01**	**34,93**	**20,59**	**23,98**	**3,08**	**5,12**	**13,92**
No vacunados e infectados (NVI)								
3300	5,75	5,77	5,08	3,55	3,71	2,58	24,98	4,09
3302	2,51	12,08	6,89	48,38	18,36	2,81	13,19	7,05
5933	3,27	36,21	25,92					
5956	1,67	4,92	4,50	50	27,90	3,81	7,70	32,08
7460	51,50	25	42,25					
9107	3,29	3,84	3,68	5,69	1,96	1,015	6,10	11,96
Media	**11,33**	**14,64**	**14,72**	**26,91**	**12,98**	**2,55**	**12,99**	**13,80**
Vacunados, no infectados (VNI)								
5954	36,67	21	42,70	6,80	19,26	10,54	5,13	12,18
9106	87,20	50,90	48,78	13,69	12,23	1,22	3,51	7,21
Media	**61,94**	**35,95**	**45,74**	**10,25**	**15,75**	**5,88**	**4,32**	**9,70**
No vacunados, no infectados (NVNI)								
5932	1,53	0,94	1	1,01	1,20	1,05	0,96	2,68
7931	0,71	1,20	1,12	3,35	7,78	0,68	27,06	2,22
Media	**1,12**	**1,07**	**1,06**	**2,18**	**4,49**	**0,87**	**14,01**	**2,45**

Valores de cada animal y media de los diferentes grupos experimentales en los diferentes muestreos. El resultado se obtuvo al dividir el valor de la absorbancia de cada plasma estimulado con PPD aviar entre la DO del mismo plasma incubado con PBS. *: días post-vacunación.

Tabla IX.4. Resultados de la prueba de liberación de IFN-γ tras la estimulación de linfocitos sanguíneos con PPD bovino (continua)

Animales	0*	15*	30*	45*	60*	90*	105*	120*
Vacunados e infectados (VI)								
3301	1,12	7,88	5,56	18,48	35,60	28,98	51,84	4,78
3303	1,15	5,10	2,74	10,00	12,77	8,90	2,58	53,57
5931	2,96	3,57	4,60	4,82	8,43	7,50	3,77	48,38
5953	1,03	1,91	2,12	15,33	26,77	9,29	51,72	49,13
7461	1,98	5,39	6,14	15,20	28,46	9,72	14,98	43,16
7930	2,09	6,71	2,56	14,60	18,73	5,27	15,45	32,78
9108	0,95	1,80	1,31	7,88	13,90	8,28	14,75	51,28
9109	1,00	2,35	1,48	21,98	26,36	15,25	41,72	61,85
Media	**1,54**	**4,34**	**3,31**	**13,54**	**21,38**	**11,65**	**24,60**	**42,12**
No vacunados e infectados (NVI)								
3300	1,18	6,00	3,32	2,76	7,19	1,36	2,23	24,68
3302	1,30	1,46	1,34	3,53	2,54	4,09	1,93	1,30
5933	1,18	1,46	1,25	1,15	1,09	1,66	1,53	1,51
5956	1,65	1,19	2,01	1,18	2,34	1,13	1,87	48,00
7460	1,52	1,22	1,11	1,86	4,89	3,22	8,05	52,75
9107	1,13	1,45	1,03	5,43	2,60	1,35	2,36	46,88
Media	**1,33**	**2,13**	**1,68**	**2,65**	**3,44**	**2,14**	**3,00**	**29,19**
Vacunados, no infectados (VNI)								
5954	1,30	0,95	1,31	1,37	10,35	19,91	29,68	47,62
9106	1,13	0,73	1,85	1,33	31,12	8,07	32,60	52,63
Media	**1,22**	**0,84**	**1,58**	**1,35**	**20,74**	**13,99**	**31,14**	**50,13**
No vacunados, no infectados (NVNI)								
5932	1,13	1,38	1,41	0,75	3,39	1,28	0,60	16,75
7931	1,16	2,11	1,07	1,16	3,19	1,70	1,74	47,76
Media	**1,15**	**1,75**	**1,24**	**0,96**	**3,29**	**1,49**	**1,17**	**32,26**

Valores de cada animal y media de los diferentes grupos experimentales en los diferentes muestreos. El resultado se obtuvo al dividir el valor de la absorbancia de cada plasma estimulado con PPD bovina entre la DO del mismo plasma incubado con PBS. *: días post-vacunación.

Tabla IX.4. Resultados de la prueba de liberación de IFN-γ tras la estimulación de linfocitos sanguíneos con PPD bovino (continuación)

Animales	135*	150*	180*	210*	240*	270*	300*	330*
Vacunados e infectados (VI)								
3301	37,26	49,18	36,14	22,90	13,36	2,10	1,19	19,80
3303	33,15	6,18	42,50					
5931	6,75	8,94	17,56	7,43	6,79	0,99	7,98	1,40
5953	14,45	40,20	18,07					
7461	48,00	50,42	78,00	20,38	52,17			
7930	10,18	26,47	8,13	3,96	2,58	1,43	4,43	5,92
9108	32,00	22,80	32,40					
9109	29,32	37,8	26,76	12,97	6,41	4,72	1,54	20,94
Media	**26,39**	**30,25**	**32,45**	**13,53**	**16,26**	**2,31**	**3,79**	**12,02**
No vacunados e infectados (NVI)								
3300	7,59	6,93	6,63	4,18	2,55	2,37	4,15	2,55
3302	6,81	18,34	19,72	36,30	5,55	2,81	1,88	2,55
5933	2,33	22,09	20,78					
5956	1,83	3,14	4,23	50,00	16,86	3,81	4,89	29,25
7460	7,73	24,35	42,25					
9107	2,95	3,42	2,56	2,47	1,30	1,02	5,83	5,07
Media	**4,87**	**13,05**	**16,03**	**23,24**	**6,57**	**2,50**	**4,19**	**9,86**
Vacunados, no infectados (VNI)								
5954	39,47	16,74	33,40	4,50	6,55	9,39	1,49	11,78
9106	78,40	53,27	48,78	15,76	12,01	1,22	3,23	8,57
Media	**58,94**	**35,01**	**41,09**	**10,13**	**9,28**	**5,31**	**2,36**	**10,38**
No vacunados, no infectados (NVNI)								
5932	1,52	1,13	1,31	1,05	1,18	0,99	0,94	1,88
7931	1,24	1,62	1,16	7,79	7,25	1,67	20,84	2,21
Media	**1,38**	**1,38**	**1,24**	**4,42**	**4,22**	**1,33**	**10,89**	**2,05**

Valores de cada animal y media de los diferentes grupos experimentales en los diferentes muestreos. El resultado se obtuvo al dividir el valor de la absorbancia de cada plasma estimulado con PPD bovina entre la DO del mismo plasma incubado con PBS. *: días post-vacunación.

Tabla IX.5. Resultados de la producción basal inespecífica del IFN-γ_0 tras la estimulación de los linfocitos con PBS (continúa)

Animales	0*	15*	30*	45*	60*	90*	105*	120*
Vacunados e infectados (VI)								
3301	51,50	46,50	136,00	125,00	82,00	103,50	55,50	626,50
3303	81,50	61,50	203,50	163,50	216,00	110,50	1162	56,00
5931	53,00	70,00	130,00	134,50	145,50	277,00	82,00	62,00
5953	65,50	63,50	200,00	163,00	107,50	243,50	58,00	53,50
7461	64,50	88,00	134,00	157,00	99,50	109,00	131,50	69,50
7930	64,00	99,00	251,50	183,50	84,50	5,69	62,00	91,50
9108	56,00	111,00	155,00	101,00	86,50	128,50	56,00	58,50
9109	68,00	133,00	131,50	82,00	103,50	65,50	55,50	48,50
Media	**63,00**	**84,06**	**167,69**	**138,69**	**115,63**	**200,81**	**207,81**	**133,25**
No vacunados e infectados (NVI)								
3300	66,50	53,00	90,50	150,50	77,50	106,50	66,00	59,50
3302	66,00	56,00	157,00	95,50	81,50	222,50	60,00	63,00
5933	102,00	53,00	145,50	151,00	542,50	414,00	63,00	63,00
5956	57,50	56,50	166,00	125,00	96,50	57,00	59,00	51,50
7460	62,00	62,50	133,50	196,50	81,50	68,00	89,00	54,00
9107	68,00	63,50	237,50	81,50	91,50	79,50	74,50	46,00
Media	**70,33**	**57,42**	**155,00**	**133,33**	**161,83**	**157,92**	**68,58**	**56,17**
Vacunados, no infectados (VNI)								
5954	52,00	53,50	129,50	120,50	94,00	62,00	83,00	63,00
9106	62,00	81,50	97,50	169,50	82,00	371,50	92,00	57,00
Media	**57,00**	**67,50**	**113,50**	**145,00**	**88,00**	**216,75**	**87,50**	**60,00**
No vacunados, no infectados (NVNI)								
5932	61,00	1400,00	289,50	134,50	73,00	69,50	2320,50	179,00
7931	59,00	54,50	146,50	112,00	89,00	61,00	53,00	50,00
Media	**60,00**	**727,25**	**218**	**123,25**	**81,00**	**65,25**	**1186,75**	**114,50**

Valores de cada animal y media de los diferentes grupos experimentales en los diferentes muestreos. El nivel del IFN-γ_0 producido de obtuvo de la absorbancia de cada plasma incubado con PBS*: días post-vacunación.

Tabla IX.5. Resultados de la producción basal inespecífica del IFN-γ_0 tras la estimulación de los linfocitos con PBS (continuación)

Animales	135*	150*	180*	210*	240*	270*	300*	330*
Vacunados e infectados (VI)								
3301	80,50	61,00	83,00	67,00	90,50	1422,50	1127,00	133,50
3303	90,50	461,00	71,00					
5931	125,00	71,50	65,50	58,50	58,50	1415,50	150,00	308,50
5953	207,50	69,50	166,00					
7461	62,50	59,50	57,00	68,00	57,50			
7930	294,50	61,50	66,50	64,00	51,50	208,50	432,00	233,00
9108	70,00	56,00	65,50					
9109	82,00	60,50	68,00	68,50	115,00	634,50	961,50	127,00
Media	**126,56**	**112,56**	**80,31**	**65,20**	**74,60**	**1389,38**	**667,63**	**200,50**
No vacunados e infectados (NVI)								
3300	65,50	65,50	61,50	58,00	52,00	464,50	145,00	86,00
3302	56,50	50,50	63,50	62,00	55,00	1066,50	84,50	148,00
5933	53,50	58,50	78,00					
5956	59,50	63,50	62,00	60,00	107,50	786,00	389,50	935,00
7460	65,00	69,00	71,00					
9107	62,00	123,50	96,00	74,00	316,50	2954,00	268,00	192,00
Media	**60,33**	**71,75**	**72,00**	**63,50**	**132,75**	**1317,75**	**221,75**	**340,25**
Vacunados, no infectados (VNI)								
5954	76,00	67,50	61,50	64,50	61,00	164,00	300,50	99,00
9106	514,00	56,00	61,50	112,00	69,50	2443,00	854,50	180,50
Media	**295,00**	**61,75**	**61,50**	**88,25**	**65,25**	**1303,50**	**577,50**	**139,75**
No vacunados, no infectados (NVNI)								
5932	53,00	79,00	60,00	65,00	63,00	133,50	57,00	157,00
7931	96,50	53,30	70,00	57,00	57,00	1794,00	108,50	89,50
Media	**74,75**	**66,15**	**65,00**	**61,00**	**60,00**	**963,75**	**82,75**	**123,25**

Valores de cada animal y media de los diferentes grupos experimentales en los diferentes muestreos. El nivel del IFN-γ_0 producido de obtuvo de la absorbancia de cada plasma incubado con PBS*: días post-vacunación.

Tabla IX.6. Secreción in vitro de IFN-γ por las secciones de tejidos (NLIl, ILD, PPY, NLP) y los linfocitos extraídas de las mismas estimulados con PPD aviar.

Animales	Tejidos				Linfocitos			
	NLIl	ILD	PPY	NLP	NLIl	ILD	PPY	NLP
	Vacunados e infectados (VI)							
3301	3,50	2,10	1,60	1,20	0,90	1,00	2,60	7,90
5931	s.d	2,14	2,30	1,10	s.d	2,00	1,86	1,40
7930	1,30	2,00	1,50	0,90	1,30	1,00	2,30	50,00
9109	4,80	1,20	3,40	1,26	69,60	0,96	4,26	735,20
Media	**3,20**	**1,86**	**2,20**	**1,12**	**23,94**	**1,24**	**2,78**	**198,63**
No vacunados e infectados (NVI)								
3300	1,60	1,60	1,30	28,60	3,60	1,80	1,60	5,12
3302	2,50	2,10	2,10	0,90	6,50	3,20	3,40	1,00
5956	1,30	2,20	2,10	1,30	2,75	2,20	4,73	122,00
9107	1,40	2,70	1,50	1,40	10,30	1,55	1,58	1,70
Media	**1,70**	**2,15**	**1,75**	**8,05**	**5,79**	**2,19**	**2,83**	**32,46**
Vacunados, no infectados (VNI)								
5954	7,90	2,00	1,10	9,70	44,50	1,10	2,00	64,00
9106	2,00	1,10	2,20	1,40	2,45	1,10	2,00	35,20
Media	**4,95**	**1,55**	**1,65**	**5,55**	**23,48**	**1,10**	**2,00**	**49,60**
No vacunados, no infectados (NVNI)								
5932	1,80	1,80	1,50	31,70	1,30	1,30	1,45	230,80
7931	3,30	1,20	1,90	0,90	10,30	1,50	1,80	19,40
Media	**2,55**	**1,50**	**1,70**	**16,30**	**5,80**	**1,40**	**1,63**	**125,10**

Valores de cada animal y media de los diferentes grupos experimentales en los diferentes muestreos, obtenidos mediante el cociente de densidad óptica entre el pocillo estimulado con PPD aviar y el mismo estimulado con PBS, así como el valor promedio de cada grupo experimental en cada sacrificio. NLIl: Nódulo linfático ileal; ILD: íleon distal, PPY: placa de Peyer yeyunal, NLP: Nódulo linfático preescapular.

universidad de león
Departamento de Sanidad Animal