

DEPARTAMENTO DE SANIDAD ANIMAL
FACULTAD DE VETERINARIA
UNIVERSIDAD DE LEÓN



**ESTUDIO DE LA PATOGENIA DE LA
PARATUBERCULOSIS:
RELACIÓN ENTRE LA RESPUESTA INMUNE Y
EL DESARROLLO DE LESIONES EN OVINOS
JÓVENES Y ADULTOS**

Laeticia Delgado Perrier

León, 2010

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
EUROPEO POR LA UNIVERSIDAD DE LEÓN



universidad
de león

INFORME DEL DIRECTOR DE LA TESIS
(Art. 11.3 del R.D. 56/2005)

Los Dres. D. JUAN FRANCISCO GARCÍA MARÍN y D. VALENTÍN PÉREZ PÉREZ, como Directores de la Tesis Doctoral titulada “ESTUDIO DE LA PATOGENIA DE LA PARATUBERCULOSIS: RELACIÓN ENTRE LA RESPUESTA INMUNE Y EL DESARROLLO DE LESIONES EN OVINOS JÓVENES Y ADULTOS” realizada por D^a. LAETICIA DELGADO PERRIER en el Departamento de SANIDAD ANIMAL, informan favorablemente el depósito de la misma, dado que reúne las condiciones necesarias para su defensa.

Lo que firmo, para dar cumplimiento al art. 11.3 del R.D. 56/2005, en León a 21 de
septiembre de 2010

Dr. D. Juan Francisco García Marín

Dr. D. Valentín Pérez Pérez



universidad
de león

**ADMISIÓN A TRÁMITE DEL DEPARTAMENTO
(Art. 11.3 del R.D. 56/2005 y
Norma 7ª de las Complementarias de la ULE)**

El Departamento de SANIDAD ANIMAL, en su reunión celebrada el día ____ de _____ de 2010 ha acordado dar su conformidad a la admisión a trámite de lectura de la Tesis Doctoral titulada “ESTUDIO DE LA PATOGENIA DE LA PARATUBERCULOSIS: RELACIÓN ENTRE LA RESPUESTA INMUNE Y EL DESARROLLO DE LESIONES EN OVINOS JÓVENES Y ADULTOS”, dirigida por el Dr. D. JUAN FRANCISCO GARCÍA MARÍN y el Dr. D. VALENTÍN PÉREZ PÉREZ, elaborada por D^a. LAETICIA DELGADO PERRIER, y cuyo título en inglés es el siguiente “STUDY OF THE PATHOGENESIS OF PARATUBERCULOSIS: ASSOCIATION BETWEEN IMMUNE RESPONSE AND THE DEVELOPMENT OF LESIONS IN YOUNG AND ADULT SHEEP”.

Lo que firmo, para dar cumplimiento al art. 11.3 del R.D. 56/2005, en León a _____ de _____ de 2010.

El Secretario,

Fdo.: _____

Vº Bº

El Director del Departamento,

Fdo.: _____

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

A su vez, la realización de este trabajo ha sido posible gracias a los proyectos de investigación AGL2008-05820-C02-02 del Ministerio de Ciencia y Tecnología, y FP6-2004-FOOD-3B (ParaTBTools) de la Unión Europea.

Todos somos muy ignorantes. Lo que ocurre es que no todos ignoramos las mismas cosas.

- Albert Einstein-

Savoir s' étonner à propos est le premier pas fait sur la route de la découverte.

- Louis Pasteur-



A mis padres,

A mis hermanas,

A Iván

Agradecimientos

En primer lugar, quería agradecer a mis directores de Tesis por haberme dado esta oportunidad, por ayudarme en esta experimental, y por vuestros consejos. A J. Francisco García Marín, por ser quién me animó a entrar en este departamento, y por haberme introducido en el mundo de la Anatomía Patológica, y a Valentín Pérez, por haberme enseñado a valorar mi trabajo, por implicarse tanto en esta tesis y confiar en mi hasta en el último momento, por la paciencia que tuvo conmigo, y por haberme animado siempre a ampliar mi formación, además de por su amistad.

A mis compañeros de departamento, sin vosotros mi estancia aquí no hubiera sido la misma... A María, gracias por haberme ayudado tanto en toda esta experimental, incluso cuando yo no estaba, tanto en lo profesional como en lo personal. A Carlos y Miguel, gracias por convertir los muestreos y días de sacrificio en unas risas a pesar de mis agobios, por haberos involucrado también cuando estuve de estancia, y por todas las bromas y anécdotas que hemos compartido. A Julio, no sólo por haberme enseñado tanto estando en el departamento, sino también por haberse portado tan bien conmigo y haber sido mi “mentor” cuando estuve en el Moredun, sin contar con toda la ayuda con la informática. A Jorge, por haber estado también en muchos muestreos y por estar siempre dispuesto a echarme una mano, hasta el último momento con las fotos y redacción de la tesis, y gracias por haberme animado durante todo este verano. A mi Glori, por los miles de bloques que cortó...y porque “somos iguales”. Soni, muchas gracias también por todos los cortes y las risas en los cafés. A Raquel, por todas las inmunes de esta tesis, y por contagiarme siempre con su alegría. Silvia, gracias por procesar tantas muestras, por toda la ayuda sobre todo lo relacionado con la genómica, y salvarme de más de una con la informática. A Laura, por haberme echado una mano con los sacrificios nada más entrar en el departamento, y a Bea, Claudia, y M^aJosé, por estar dispuestas a echarme un cable cada vez que os lo he pedido. A todos los que han pasado por este departamento en algún momento y me han ayudado de alguna manera con este trabajo, Marta, Oscar, Pablo, Tere... Y por último, quería agradecer a Maica, por el gran apoyo moral, por inculcarme su gran sentido de la responsabilidad y del orden, por todos sus consejos, y por haberme enseñado tanto... Muchas gracias a todos por convertir estos años en este departamento en una etapa inolvidable de mi vida.

También quería agradecer a Ramón Juste, por haber dedicado tanto tiempo al análisis estadístico de este trabajo y por haber contribuido tanto con sus aportaciones en la redacción de

esta tesis. Gracias a Joseba Garrido, por atender a todas mis consultas, siempre con un gran sentido del humor. A Elena y Patricia, por haberme ayudado con los cultivos, y a Lucía, por echarme una mano con los medios. Y cómo no, a Iker, además de la gran ayuda con todas mis muestras, gracias por su gran asesoramiento a lo largo de todos estos años, por aclarar siempre mis dudas, y por esos buenos ratos. También gracias a todas las personas de Neiker que han estado dispuestas siempre a echarme una mano mientras estuve allí.

Gracias a Vicente, “galleguín”, al que también conseguí engañar vilmente para algún muestreo, y sobre todo por las risas que pasamos.

Gracias también a Ana, por proporcionarnos la secuencia de los primers para la PCR, así como el anticuerpo empleado en las tinciones inmunohistoquímicas utilizadas en esta tesis, y por su constante buen humor y palabras de ánimo.

También mi reconocimiento a Jaime, por facilitarme el trabajo en la sala, a todas aquellas personas de la Universidad de León que me han ayudado de alguna manera a lo largo de estos años, a los veterinarios de Anche y a Boni, por haber colaborado en la selección de los animales, y al personal de la Granja de la Universidad, en especial a Antonio.

Thank you to everyone at the CIDC-Lelystad, for teaching me many techniques, and for the good moments that we spent, and my special thanks to Douwe Bakker, for letting me the opportunity to work with the mycobacteria group, and for always encouraging me with this thesis.

I also wanted to thank the entire mycobacteria group from the Moredun Research Institute, for the training in molecular techniques, for considering me as one of your group since the first moment, for the good laughs, and especially thank you to Karen Stevenson, for letting me the opportunity to work with her group, and for being so kind with me. I would also like to thank everyone from the group of Pathology, for helping me with the immunohistochemistries, for all your advices, and for making my stay there so enjoyable. Thank you to Francesca Chianini for giving me the possibility of doing part of my work there.

Je voudrais aussi remercier toutes les personnes du groupe des micobactéries de l'INRA de Nouzilly qui m'ont aidé d'une façon ou d'une autre, et qui ont rendu mon séjour beaucoup plus agréable. Je remercie particulièrement Laurence Guilloteau, pour m'avoir donné l'opportunité d'analyser les échantillons de cette thèse à l'INRA, pour sa constante bonne

humeur et sa patience pour me corriger le matériel et méthode. Merci également à Benjamin Foret, pour sa patience avec les PCR, pour être un si bon professeur...et pour les fous rires.

También quería agradecer a Luis Ernesto, por todas las fotos de ovejas y corderos que me proporcionó de forma desinteresada.

A mis amigos de la uni, las de Padre Isla, y todos en general los que me habéis apoyado desde el principio, os habéis preocupado tanto por mí, y sobre todo por levantarme el ánimo siempre que he estado de bajón. A Juli y Chari, por ser como mis “segundos padres” y haberme animado tanto a lo largo de estos años.

Gracias a mis padres, por todo, por su apoyo incondicional, y su ayuda para la redacción de esta tesis. También a mis hermanas, sin vosotras no lo hubiera conseguido, gracias por todos esos detalles que me ayudaron mucho durante estos años...y por aguantarme, que no es poco. Merci pour tout, je vous dois beaucoup de ce travail.

Finalmente, quiero agradecer a Iván, la persona que siempre ha estado presente a lo largo de todos estos años, en los buenos y malos momentos, quién más me ha apoyado y animado con esta tesis, también quién más me ha soportado, gracias por su cariño, paciencia, y por ser tan buena persona.

Espero no haberme olvidado de nadie, y sobre todo haber sabido expresar con las palabras adecuadas lo mucho que habéis influido cada uno en la realización de esta tesis. Muchas gracias a todos. Merci.



*Índices,
Index*

Índice General / Table of Contents

ÍNDICES	i
INDEX	
ÍNDICE GENERAL	iii
TABLE OF CONTENTS	
ÍNDICE DE TABLAS	ix
LIST OF TABLES	
ÍNDICE DE FIGURAS	xv
LIST OF FIGURES	
ÍNDICE DE GRÁFICOS	xix
LIST OF GRAPHICS	
ABREVIATURAS	xxi
ABBREVIATIONS	
I. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS	1
INTRODUCTION AND OBJECTIVES	
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	9
GENERAL REVIEW	
II.1. Paratuberculosis: aspectos generales	11
II.1.1. Etiología	11
II.1.1.1. Características generales	11
II.1.1.2. Cepas de <i>Map</i>	12
II.1.1.3. Principales antígenos de <i>Map</i>	14
II.1.1.4. Persistencia en el medio	15
II.1.2. Epidemiología	17
II.1.2.1. Rango de hospedadores	17
II.1.2.2. Transmisión	19
II.1.2.3. Distribución y prevalencia	21
II.2. Infecciones experimentales	24
II.2.1. Edad de los animales y resistencia a la infección	25
II.2.2. Tipo de cepa	34
II.2.3. Tipo de inóculo	38
II.2.4. Dosis del inóculo	41
II.2.5. Uso de animales de laboratorio y otras especies	45
II.3. Patogenia	49
II.3.1. Entrada de <i>Map</i> en el hospedador	49
II.3.2. Mecanismos de supervivencia de <i>Map</i>	53
II.3.3. Establecimiento y progresión lesional de la infección	58
II.3.4. Respuesta inmune del hospedador	61
II.3.4.1. Respuesta inmune innata	61
II.3.4.2. Respuesta inmune adaptativa	67
II.3.4.2.1. Respuesta inmune celular	68
II.3.4.2.2. Respuesta inmune humoral	74
II.3.4.3. Espectro inmunopatológico	77
II.4. Signos clínicos	81

II.5. Lesiones	83
II.5.1. Lesiones macroscópicas.....	83
II.5.2. Lesiones microscópicas	86
II.5.3. Clasificaciones lesionales	90
II.5.3.1. Especie ovina	91
II.5.3.2. Especie bovina	97
II.5.3.3. Especie caprina	99
II.5.3.4. Animales silvestres	100
II.6. Diagnóstico	101
II.6.1. Diagnóstico clínico-epidemiológico	102
II.6.2. Diagnóstico anatomopatológico	102
II.6.3. Diagnóstico bacteriológico	106
II.6.3.1. Identificación microscópica en frotis.....	106
II.6.3.2. Aislamiento mediante cultivo	106
II.6.3.3. Detección del ADN bacteriano	108
II.6.4. Diagnóstico basado en la respuesta inmune del animal.....	111
II.6.4.1. Técnicas basadas en la detección de la respuesta inmune celular	112
II.6.4.1.1. Test de intradermorreacción (IDR).....	112
II.6.4.1.2. Prueba de liberación del Interferón-gamma (IFN- γ)	114
II.6.4.1.3. Otras pruebas	116
II.6.4.2. Técnicas basadas en la inmunidad humoral.....	117
II.6.4.2.1. Test de fijación del complemento (FC)	117
II.6.4.2.2. Prueba de Inmunodifusión en gel de Agar (IDGA).....	118
II.6.4.2.3. Test de ELISA.....	119
II.7. Impacto económico y medidas de control	121
II.7.1. Importancia económica	122
II.7.2. Tratamiento	126
II.7.3. Control mediante vacunación	127
II.7.4. Otras estrategias de control.....	130
II.7.4.1. Detección y eliminación de los animales infectados	131
II.7.4.2. Medidas higiénico-sanitarias	132
II.8. Implicaciones en la salud pública	133
II.8.1. Enfermedad de Crohn	133
II.8.2. <i>Map</i> en la cadena alimentaria	139
III. MATERIAL Y MÉTODOS	143
MATERIAL AND METHODS	
III.1. Animales estudiados	145
III.1.1. Selección de animales.....	145
III.1.1.1. Ovejas adultas.....	145
III.1.1.2. Corderos	146
III.1.2. Período de aclimatación	146
III.2. Protocolo de infección	147
III.2.1. Inóculo empleado	147
III.2.1.1. Obtención del inóculo.....	147
III.2.1.2. Cuantificación del inóculo.....	149
III.2.1.3. Caracterización del inóculo	150
III.2.1.3.1. Especificidad del inóculo.....	150
III.2.1.3.2. Tipificación del inóculo.....	151

III.2.2. Grupos y tratamientos experimentales	151
III.2.2.1. Ovejas adultas.....	151
III.2.2.2. Corderos	153
III.2.3. Pautas de infección	153
III.3. Período de estudio y toma de muestras “in vivo”	154
III.4. Estudios realizados	155
III.4.1. Estudios <i>in vivo</i>	155
III.4.1.1. Estudios de la respuesta inmune periférica.....	155
III.4.1.1.1. Determinación de la respuesta inmune humoral mediante ELISA	155
III.4.1.1.2. Determinación de la respuesta inmune celular	159
III.4.1.1.2.1. Prueba de liberación de Interferón gamma (IFN- γ).....	159
III.4.1.1.2.2. Prueba de intradermorreacción (IDR) comparada.....	162
III.4.1.2. Detección de <i>Map</i> mediante cultivo bacteriológico de heces.....	163
III.4.1.2.1. Preparación del medio de cultivo	163
III.4.1.2.2. Protocolo de cultivo.....	165
III.4.2. Estudios post-mortem	167
III.4.2.1. Estudios anatomopatológicos	167
III.4.2.1.1. Examen macroscópico y toma de muestras.....	167
III.4.2.1.2. Procesado y tinciones histológicas	169
III.4.2.1.3. Estudios histopatológicos	171
III.4.2.1.3.1. Clasificación de los tipos de lesiones	171
III.4.2.1.3.2. Recuento de granulomas.....	172
III.4.2.1.3.3. Valoración de la presencia de <i>Map</i> mediante Ziehl-Neelsen (ZN)...	172
III.4.2.1.4. Estudios inmunohistoquímicos.....	173
III.4.2.2. Estudios bacteriológicos.....	176
III.4.2.2.1. Detección de <i>Map</i> mediante PCR.....	176
III.4.2.2.1.1. Procesamiento de las muestras	176
a) Muestras de tejido fresco	176
b) Muestras de tejido incluido en parafina	177
III.4.2.2.1.2. Lisis y extracción de ADN	178
III.4.2.2.1.3. Amplificación del ADN micobacteriano.....	180
a) PCR convencional.....	180
b) PCR anidada.....	182
III.4.2.2.1.4. Identificación del segmento amplificado.....	184
III.4.2.2.2. Detección de <i>Map</i> mediante cultivo bacteriológico	186
III.4.2.2.2.1. Toma de muestras.....	187
III.4.2.2.2.2. Preparación de los medios y protocolo de cultivo.....	187
III.4.2.3. Estudios inmunológicos en muestras de tejido.....	188
III.4.2.3.1. Secreción in vitro del Interferón gamma (IFN- γ).....	188
III.4.2.3.1.1. Toma de muestras.....	189
III.4.2.3.1.2. Extracción de linfocitos	189
III.4.2.3.1.3. Siembra e incubación de linfocitos y tejidos.....	190
III.4.2.3.1.4. Valoración de la producción del Interferón gamma (IFN- γ).....	191
III.4.2.3.2. Determinación de la expresión de citoquinas y otros mediadores de la respuesta inmune mediante qPCR a tiempo real	191
III.4.2.3.2.1. Toma y selección de muestras	191
III.4.2.3.2.2. Extracción de ARN.....	193
III.4.2.3.2.3. Síntesis de ADNc	195
III.4.2.3.2.4. PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR).....	196

III.5. Material óptico, fotográfico e informático	200
III.6. Análisis estadístico	201
IV. RESULTADOS	203
RESULTS	
IV.1. Determinación de la respuesta inmune periférica	205
IV.1.1. Respuesta inmune humoral	205
IV.1.2. Respuesta inmune celular.....	207
IV.1.2.1. Resultados de la prueba del Interferón gamma (IFN- γ).....	207
IV.1.2.2. Resultados de la prueba de IDR	212
IV.2. Resultados anatomopatológicos	215
IV.2.1. Hallazgos macroscópicos	215
IV.2.2. Hallazgos histológicos	217
IV.2.2.1. Lesiones asociadas a paratuberculosis	218
IV.2.2.1.1. Corderos	218
IV.2.2.1.2. Ovejas.....	219
IV.2.2.2. Recuento y distribución de los granulomas.....	220
IV.2.2.3. Clasificación de lesiones asociadas a paratuberculosis.....	229
IV.2.2.4. Otras lesiones no asociadas a paratuberculosis	234
IV.2.3. Detección de <i>Map</i> en tejidos	236
IV.2.3.1. Tinción de Ziehl-Neelsen.....	236
IV.2.3.2. Técnica inmunohistoquímica	238
IV.3. Resultados del estudio de la respuesta inmune local	241
IV.3.1. Producción <i>in vitro</i> local del Interferón gamma (IFN- γ)	241
IV.3.2. Determinación del nivel de expresión génica de diversos mediadores de la respuesta inmune mediante PCR a tiempo real	244
IV.4. Resultados en las pruebas de detección de <i>Map</i>	249
IV.4.1. Cultivo.....	249
IV.4.1.1. Detección en heces	249
IV.4.1.2. Detección en muestras de tejido.....	249
IV.4.2. PCR	250
IV.4.2.1. Detección en tejido fresco	250
IV.4.2.2. Detección en tejido incluido en parafina.....	256
IV.4.2.2.1. PCR convencional.....	256
IV.4.2.2.2. PCR anidada.....	262
IV.5. Relación entre la respuesta a las técnicas de detección de <i>Map</i> y el tipo lesional	267
IV.5.1. Estudio comparativo en muestras de tejido fresco	267
IV.5.2. Estudio comparativo en muestras de tejido incluido en parafina.....	271
IV.5.3. Resumen general	279
IV.6. Relación entre la respuesta a las técnicas de detección de la inmunidad periférica frente a <i>Map</i> y el tipo lesional	283
IV.6.1. Estudio comparativo entre las pruebas basadas en la detección de la respuesta inmune	283
IV.6.2. Resumen general	287

V. DISCUSIÓN	291
DISCUSSION	
V.1. Hallazgos lesionales	293
V.2. Respuesta inmune periférica	308
V.3. Respuesta inmune local	319
V.4. Estudio comparativo entre métodos de detección del agente etiológico	328
V.4.1. Detección en tejido fresco y heces	328
V.4.2. Detección en tejido incluido en parafina	333
VI. CONCLUSIONES, CONCLUSIONS	337
VII. RESUMEN, SUMMARY, RÉSUMÉ	345
VII.1. Resumen	347
VII.2. Summary	351
VII.3. Résumé	355
VIII. BIBLIOGRAFÍA	361
REFERENCES	
IX. ICONOGRAFÍA	401
ICONOGRAPHY	
X. ANEXOS	423
APPENDIX	

Índice de Tablas / List of Tables

II. Revisión bibliográfica

Tabla II.1. Resumen de las propiedades bacteriológicas de <i>Map</i>	12
Tabla II.2. Resumen de las prevalencias aparentes (P.A.) de paratuberculosis en los rebaños bovinos en Europa.....	23
Tabla II.3. Resumen de las prevalencias aparentes (P.A.) de paratuberculosis en los rebaños ovinos y caprinos en Europa	24
Tabla II.4. Principales infecciones experimentales llevadas a cabo con el fin de estudiar la susceptibilidad a <i>Map</i> con la edad en la especie bovina, ovina, caprina y en cérvidos	32
Tabla II.5. Resumen de los mecanismos de supervivencia de <i>Map</i> frente a la respuesta antimicrobiana de los macrófagos	55
Tabla II.6. Resumen de las formas inmunopatológicas propuestas por Geijo, (2007) en la patogenia de la paratuberculosis bovina	80
Tabla II.7. Pérdidas económicas directas generadas por la paratuberculosis.....	123
Tabla II.8. Resumen de los argumentos tratados en este apartado a favor y en contra del papel etiológico de <i>Map</i> en la enfermedad de Crohn	135

III. Material y Métodos

Tabla III.1. Procedencia, edad e identificación de las ovejas adultas seleccionadas para la infección experimental.....	145
Tabla III.2. Purificación y extracción de micobacterias a partir de mucosa intestinal. Técnica modificada de Ratnamohan y Spencer (1986).....	148
Tabla III.3. Método de ZN para tinción de micobacterias en las extensiones obtenidas.....	149
Tabla III.4. Distribución e identificación de cada oveja dentro de su respectivo grupo experimental.....	152
Tabla III.5. Distribución e identificación de cada cordero dentro de su respectivo grupo experimental	153
Tabla III.6. Infección experimental: pautas y dosis de infección.....	154
Tabla III.7. Diseño experimental: distribución y protocolo de sacrificio de los diferentes grupos experimentales	154
Tabla III.8. Preparación de los reactivos utilizados en la técnica de ELISA indirecto	156
Tabla III.9. Componentes del kit “BOVIGAM [®] <i>Mycobacterium bovis</i> Gamma Interferon Test Kit for cattle” (Prionics AG, Suiza).....	160
Tabla III.10. Reactivos empleados en la elaboración de los medios de cultivo para el aislamiento de micobacterias.....	164
Tabla III.11. Reactivos y protocolo de la tinción de ZN en frío para las extensiones de cultivos de <i>Map</i>	167
Tabla III.12. Identificación de las muestras del intestino y tejido linfoide asociado tomadas en la necropsia de cada animal para el estudio microscópico (histopatológico e inmunohistoquímico).....	168
Tabla III.13. Protocolo de realización de la tinción de Hematoxilina-Eosina (HE).....	170

Tabla III.14. Protocolo de realización de la tinción de ZN para secciones de tejido incluidos en parafina.....	171
Tabla III.15. Reactivos empleados para la tinción inmunohistoquímica frente a <i>Map</i>	175
Tabla III.16. Componentes del kit comercial Speedtools Tissue DNA extraction kit para la extracción y purificación de ADN.....	179
Tabla III.17. Reactivos empleados en la amplificación de PCR convencional de la secuencia de inserción IS900 de <i>Map</i>	181
Tabla III.18. Programa de amplificación de la reacción de PCR convencional de la secuencia de inserción IS900 propia de <i>Map</i>	181
Tabla III.19. Reactivos empleados en la amplificación de PCR anidada de la secuencia de inserción IS900 de <i>Map</i> tanto para la ronda 1 como para la 2.....	183
Tabla III.20. Programas de las rondas 1 y 2 de las reacciones de PCR anidada para la amplificación de la secuencia de inserción IS900 propia de <i>Map</i>	184
Tabla III.21. Reactivos y protocolo de preparación del gel de agarosa para la visualización de los fragmentos de ADN amplificados.....	185
Tabla III.22. Material y reactivos empleados para la valoración de la secreción <i>in vitro</i> de IFN- γ por los linfocitos tisulares y tejidos	188
Tabla III.23. Muestras e individuos seleccionados en función del tipo de lesión para el estudio de la variación de expresión génica de diversas citoquinas y receptores de respuesta inmune innata	192
Tabla III.24. Reactivos y sus concentraciones correspondientes empleados en la digestión del ARN extraído con ADNasas.....	194
Tabla III.25. Reactivos empleados en la amplificación mediante PCR del gen control GAPDH para la confirmación de la eliminación total de ADN contaminante.....	195
Tabla III.26. Programa de amplificación de la reacción control de PCR del gen GAPDH	195
Tabla III.27. Lista de los cebadores empleados en este estudio de qPCR con sus respectivas secuencias, tamaño y temperatura de hibridación	198

IV-Resultados

Tabla IV.1. Diseño experimental. Identificación de los animales de cada grupo experimental sacrificados a los 100-120 dpi y 210-220 dpi.....	215
Tabla IV.2. Media del número de placas de Peyer yeyunales (PPY) encontradas durante la necropsia de cada animal sacrificado, tanto a nivel distal (PPYd), medio (PPYm) o proximal (PPYp), así como sumando los tres niveles (total de PPYs), en las ovejas adultas y en los corderos.....	216
Tabla IV.3. Número medio de granulomas por sección en los diferentes compartimentos intestinales estudiados en los corderos y ovejas infectados con “dosis alta” de <i>Map</i> sacrificados a los 100-120 dpi (1er sacrificio) y 210-220 dpi (2º sacrificio)	223
Tabla IV.4. Número medio de granulomas por sección en las diferentes localizaciones estudiadas del intestino de los corderos y ovejas infectados con “dosis alta” de <i>Map</i> sacrificados a los 100-120 dpi (1er sacrificio).....	226
Tabla IV.5. Número medio de granulomas por sección en las diferentes localizaciones estudiadas del intestino de los corderos y ovejas infectados con “dosis alta” de <i>Map</i> sacrificados a los 210-220 dpi (2º sacrificio).	227
Tabla IV.6. Número medio de granulomas por sección de tejido en los diferentes nódulos linfáticos estudiados de los corderos y ovejas infectados con “dosis	

alta” de <i>Map</i> , sacrificados a los 100-120 dpi (1er sacrificio) y 210-220 dpi (2° sacrificio).....	229
Tabla IV.7. Clasificación de las lesiones observadas en las diferentes localizaciones del intestino y nódulos linfáticos asociados de cada cordero infectado con “dosis alta” de <i>Map</i>	232
Tabla IV.8. Clasificación de las lesiones observadas en las diferentes localizaciones del intestino y nódulos linfáticos asociados de cada oveja infectada con “dosis alta” de <i>Map</i>	233
Tabla IV.9. Distribución y cantidad de BAAR detectados mediante tinción ZN en secciones de intestino (tejido linfoide/mucosa) de cada cordero.	237
Tabla IV.10. Distribución y cantidad de BAAR detectados mediante tinción ZN en secciones de intestino (tejido linfoide/mucosa) de cada oveja.	238
Tabla IV.11. Distribución e intensidad de la inmunotinción frente a <i>Map</i> , mediante técnicas inmunohistoquímicas (anticuerpo policlonal anti- <i>Map</i>) en secciones de intestino (tejido linfoide/mucosa) de cada cordero.....	240
Tabla IV.12. Distribución e intensidad de la inmunotinción frente a <i>Map</i> , mediante técnicas inmunohistoquímicas (anticuerpo policlonal anti- <i>Map</i>) en secciones de intestino (tejido linfoide/mucosa) de cada oveja.	240
Tabla IV.13. Número de muestras de cada tejido de los corderos y ovejas infectadas así como corderos controles, analizados mediante qPCR para valorar la expresión génica de diversas citoquinas, factor de transcripción y receptor de respuesta inmune innata, según el tipo lesional.....	244
Tabla IV.14. Resultado de las muestras cultivadas en medio sólido Middlebrook 7H11 en el grupo de corderos infectados con “dosis alta” de <i>Map</i> , en el momento del sacrificio	250
Tabla IV.15. Resultados de la técnica de la PCR anidada en tejido fresco en el grupo de corderos infectados con “dosis alta” de <i>Map</i>	252
Tabla IV.16. Resultados de la técnica de la PCR anidada en tejido fresco en el grupo de corderos infectados con “dosis baja” de <i>Map</i>	252
Tabla IV.17. Resultados de la técnica de la PCR anidada en tejido fresco en el grupo de ovejas infectadas con “dosis alta” de <i>Map</i>	253
Tabla IV.18. Resultados de la técnica de la PCR anidada en tejido fresco en el grupo de ovejas infectadas con “dosis baja” de <i>Map</i>	254
Tabla IV.19. Resultados de la técnica de la PCR convencional en tejido incluido en parafina en el grupo de corderos infectados con “dosis alta” de <i>Map</i>	257
Tabla IV.20. Resultados de la técnica de la PCR convencional en tejido incluido en parafina en el grupo de corderos infectados con “dosis baja” de <i>Map</i>	258
Tabla IV.21. Resultados de la técnica de la PCR convencional en tejido incluido en parafina en el grupo de ovejas infectados con “dosis alta” de <i>Map</i>	259
Tabla IV.22. Resultados de la técnica de la PCR convencional en tejido incluido en parafina en el grupo de ovejas infectadas con “dosis baja” de <i>Map</i>	259
Tabla IV.23. Resultados de la técnica de la PCR anidada en tejido incluido en parafina en el grupo de corderos infectados con “dosis alta” de <i>Map</i>	263
Tabla IV.24. Resultados de la técnica de la PCR anidada en tejido incluido en parafina en el grupo de corderos infectados con “dosis baja” de <i>Map</i>	263
Tabla IV.25. Resultados de la técnica de la PCR anidada en tejido incluido en parafina en el grupo de ovejas infectadas con “dosis alta” de <i>Map</i>	264
Tabla IV.26. Resultados de la técnica de la PCR anidada en tejido incluido en parafina en el grupo de ovejas infectadas con “dosis baja” de <i>Map</i>	265

Tabla IV.27. Número de corderos detectados como positivos mediante cultivo y PCR anidada a partir de muestras de tejido fresco con respecto al número total de corderos infectados (porcentaje), incluyendo todos los del grupo de “dosis alta” y “baja” de <i>Map</i> , según el tipo lesional.	268
Tabla IV.28. Número de ovejas detectadas como positivas mediante cultivo y PCR anidada a partir de muestras de tejido fresco con respecto al número total de ovejas infectadas (porcentaje), incluyendo todas las del grupo de “dosis alta” y “baja” de <i>Map</i> , según el tipo lesional.	268
Tabla IV.29. Número de corderos y ovejas juntos detectados como positivos mediante cultivo y PCR anidada a partir de muestras de tejido fresco, con respecto al número total de ovinos infectados (porcentaje), incluyendo todos los del grupo de “dosis alta” y “baja” de <i>Map</i> , según el tipo lesional.	268
Tabla IV.30. Distribución de las secciones de tejido incluido en parafina estudiadas en ovejas y corderos para la detección del agente etiológico ZN, IHQ, PCR anidada y convencional en función del tipo lesional.	271
Tabla IV.31. Número de secciones de tejido incluido en parafina de los corderos infectados, detectadas como positivas mediante ZN, IHQ, PCR convencional o anidada, con respecto al número total de secciones estudiadas (porcentaje), según el tipo lesional.	272
Tabla IV.32. Número de secciones de tejido incluido en parafina de las ovejas infectadas, detectadas como positivas mediante ZN, IHQ, PCR convencional o anidada, con respecto al número total de secciones estudiadas (porcentaje), según el tipo lesional.	272
Tabla IV.33. Número de secciones de tejido incluido en parafina de los corderos y ovejas infectados, detectadas como positivas mediante ZN, IHQ, PCR convencional o anidada con respecto al número total de secciones estudiadas (porcentaje), según el tipo lesional.	273
Tabla IV.34. Resumen de los resultados obtenidos en los corderos (A) y ovejas (B) infectados con “dosis alta” en las pruebas de detección de <i>Map</i> en tejido y heces así como su relación con las lesiones.	281
Tabla IV.35. Resumen de los resultados obtenidos en los corderos (A) y ovejas (B) infectados con “dosis baja” en las pruebas de detección de <i>Map</i> en tejido y heces así como su relación con las lesiones.	282
Tabla IV.36. Número de corderos detectados como positivos mediante el test ELISA, la prueba de liberación de IFN- γ , o la prueba de IDR (intradermorreacción), con respecto al número total de corderos infectados (porcentaje), según el tipo lesional.	284
Tabla IV.37. Número de ovejas detectadas como positivas mediante el test ELISA, la prueba de liberación de IFN- γ , o la prueba de IDR (intradermorreacción), con respecto al número total de ovejas infectados (porcentaje), según el tipo lesional.	284
Tabla IV.38. Número de corderos y ovejas detectadas como positivas mediante el test ELISA, la prueba de liberación de IFN- γ , o la prueba de IDR (intradermorreacción), con respecto al número total de animales infectados (porcentaje), según el tipo lesional.	284
Tabla IV.39. Resumen de los resultados obtenidos en los corderos (A) y ovejas (B) infectados con “dosis alta” en el análisis de la respuesta inmune periférica humoral y celular frente a <i>Map</i> , evaluadas mediante el test ELISA, la prueba de liberación de IFN- γ , así como la prueba de intradermorreacción (IDR), y su relación con las lesiones.	289

Tabla IV.40. Resumen de los resultados obtenidos en los corderos (A) y ovejas (B) infectados con “dosis baja” en el análisis de la respuesta inmune periférica humoral y celular frente a <i>Map</i> , evaluadas mediante el test ELISA, la prueba de liberación de IFN- γ , así como la prueba de intradermorreacción (IDR), y su relación con las lesiones	290
---	-----

X-Anexos

Tabla X.1. Resultados del test ELISA en las ovejas adultas. Valores de cada animal y media de los diferentes grupos experimentales en los diferentes muestreos.....	425
Tabla X.2. Resultados del test ELISA en los corderos. Valores de cada animal y media de los diferentes grupos experimentales en los diferentes muestreos.....	427
Tabla X.3. Resultados de la prueba de liberación del IFN- γ en las ovejas adultas. Valores de cada animal y media de los diferentes grupos experimentales en los diferentes muestreos	429
Tabla X.4. Resultados de la prueba de liberación del IFN- γ en los corderos. Valores de cada animal y media de los diferentes grupos experimentales en los diferentes muestreos	431
Tabla X.5. Resultados de la producción basal inespecífica del IFN- γ_0 en las ovejas adultas. Valores de cada animal y media de los diferentes grupos experimentales en los diferentes muestreos.....	433
Tabla X.6. Resultados de la producción basal inespecífica del IFN- γ_0 en los corderos. Valores de cada animal y media de los diferentes grupos experimentales en los diferentes muestreos.....	435
Tabla X.7. Resultados de la secreción específica bruta del IFN- γ en las ovejas adultas. Valores de cada animal y media de los diferentes grupos experimentales en los diferentes muestreos.....	437
Tabla X.8. Resultados de la secreción específica bruta del IFN- γ en los corderos. Valores de cada animal y media de los diferentes grupos experimentales en los diferentes muestreos	439
Tabla X.9. Test de IDR comparada en ovejas a los 90 y 195 dpi. Valores del incremento de grosor (en mm) del pliegue anocaudal a las 72 horas de la inoculación con PPD aviar y PPD bovina, respectivamente, y promedio de cada grupo experimental	441
Tabla X.10. Test de IDR comparada en corderos a los 90 y 195 dpi. Valores del incremento de grosor (en mm) del pliegue anocaudal a las 72 horas de la inoculación con PPD aviar y PPD bovina, respectivamente, y promedio de cada grupo experimental	442
Tabla X.11. Secreción <i>in vitro</i> de IFN- γ por los linfocitos y tejidos propio de VIC, PPY y NLMC de los corderos	443
Tabla X.12. Secreción <i>in vitro</i> de IFN- γ por los linfocitos y tejidos propio de VIC, PPY y NLMC de las ovejas	444
Tabla X.13. Valor individual neto del nivel de expresión génica de cada muestra en cada gen, tras su cuantificación mediante qPCR, normalización con los genes de referencia GAPDH, HPRT y HK5.1 y posterior análisis mediante el programa Qbaseplus.....	445
Tabla X.14. Media geométrica de los valores netos del nivel de expresión génica de cada grupo estudiado, en cada gen, tras su cuantificación mediante qPCR, normalización con los genes de referencia GAPDH, HPRT y HK5.1 y posterior análisis mediante el programa Qbaseplus.....	447

Tabla X.15. Media geométrica de los valores netos del nivel de expresión génica de cada grupo estudiado en el Ileon distal, en cada gen, tras su cuantificación mediante qPCR, normalización con los genes de referencia GAPDH, HPRT y HK5.1 y posterior análisis mediante el programa Qbaseplus.....	447
Tabla X.16. Media geométrica de los valores netos del nivel de expresión génica de cada grupo estudiado en la placa de Peyer yeyunal, en cada gen, tras su cuantificación mediante qPCR, normalización con los genes de referencia GAPDH, HPRT y HK5.1 y posterior análisis mediante el programa Qbaseplus...	447
Tabla X.17. Media geométrica de los valores netos del nivel de expresión génica de cada grupo estudiado en el nódulo linfático mesentérico caudal, en cada gen, tras su cuantificación mediante qPCR, normalización con los genes de referencia GAPDH, HPRT y HK5.1 y posterior análisis mediante el programa Qbaseplus.....	448

Índice de Figuras / List of Figures

II. Revisión bibliográfica

Figura II.1. Resumen esquematizado de los acontecimientos inmunológicos que suceden en el hospedador en respuesta a la infección por <i>Map</i>	76
Figura II.2. Esquema del espectro inmunopatológico de la paratuberculosis	78
Figura II.3. Localización de las lesiones granulomatosas y su secuencia de propagación en el intestino	96

III. Material y Métodos

Figura III.1. Disposición de los sueros problema y controles en la placa de ELISA ...	157
Figura III.2. Disposición de los plasmas problema y controles en una microplaca de BOVIGAM®	161
Figura III.3. Secreción <i>in vitro</i> del IFN- γ producido por linfocitos tisulares (L) y tejidos propios (T)	190
Figura III.4. Ejemplo de las curvas de disociación (representación logarítmica) obtenidas tras la amplificación del gen GAPDH mediante qPCR a través del programa MJ Opticon Monitor 3™ Analysis Software	199
Figura III.5. Ejemplo de recta patrón obtenida para el gen GAPDH tras la amplificación mediante qPCR de una serie de diluciones de ADNc control previamente estimulado	199

IV. Resultados

Figura IV.1. Análisis del grado de concordancia entre las pruebas diagnósticas del cultivo y de la PCR anidada a partir de muestras de tejido fresco en todos los ovinos adultos y corderos infectados en este estudio, según el tipo lesional.	270
Figura IV.2. Análisis del grado de concordancia entre las pruebas diagnósticas realizadas a partir de secciones de tejido incluido en parafina en todos los ovinos adultos y corderos infectados, según el tipo lesional, y tomando el ZN como referencia	277
Figura IV.3. Análisis del grado de concordancia entre las pruebas diagnósticas realizadas a partir de secciones de tejido incluido en parafina en todos los ovinos adultos y corderos infectados, según el tipo lesional, y tomando la IHQ como referencia	278
Figura IV.4. Análisis del grado de concordancia entre las pruebas diagnósticas realizadas a partir de secciones de tejido incluido en parafina en todos los ovinos adultos y corderos infectados, según el tipo lesional, y tomando la PCR convencional como referencia	279
Figura IV.5. Análisis del grado de concordancia entre las pruebas diagnósticas basadas en la respuesta inmune humoral y celular periférica frente a <i>Map</i> en todos los ovinos adultos y corderos infectados, según el tipo lesional, tomando el test ELISA como referencia.....	286
Figura IV.6. Análisis del grado de concordancia entre las pruebas diagnósticas basadas en la respuesta inmune celular periférica frente a <i>Map</i> en todos los ovinos adultos y corderos infectados, según el tipo lesional, tomando la prueba de liberación de IFN- γ como referencia	287

X-Iconografía

Figura IX.1. Imagen donde se muestra la realización de la prueba de intradermorreacción (IDR).	403
Figura IX.2. Aislamiento positivo de <i>Map</i> . Colonias de morfología compatible con una cepa ovina, cultivadas en medio Middlebrook 7H11	403
Figura IX.3. Localización de las muestras de intestino y nódulos linfáticos seleccionadas para los diferentes estudios.	404
Figura IX.4. Revelado de PCR anidada en un gel de agarosa con muestras positivas a la secuencia de inserción IS900 de <i>Map</i>	404
Figura IX.5. Examen visual de la calidad e integridad del ARN total extraído de muestras de NLMC de varios corderos en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio.	405
Figura IX.6. Incremento marcado de grosor del pliegue anocaudal del lado derecho del operador, evidenciable mediante palpación a las 72 horas posinoculación, relacionado con una respuesta más intensa a la PPD aviar que a la PPD bovina... 406	406
Figura IX.7. Incremento de grosor del pliegue anocaudal del lado derecho del operador medido con la ayuda de un cutímetro a las 72 horas posinoculación e indicando una respuesta más intensa a la PPD aviar que a la PPD bovina	406
Figura IX.8. Secciones cutáneas de la zona de tuberculinización con la PPD aviar... 407	407
Figura IX.9. Placa de Peyer ileal continua de uno de los corderos tras el 2° sacrificio, a los 100-120 dpi (5 meses de edad).	408
Figura IX.10. Placas de Peyer yeyunales de una oveja adulta de 8 años de edad (A) y de un cordero de 5 meses (B).	408
Figura IX.11. Lesión <i>focal</i> . Cordero infectado con “dosis alta” de <i>Map</i> . Granulomas de pequeño tamaño, con distribución focal, situados exclusivamente en el espacio interfolicular del tejido linfoide de la placa de Peyer yeyunal.	409
Figura IX.12. Lesión <i>focal</i> . Cordero infectado con “dosis alta” de <i>Map</i> . Detalle de la imagen anterior.	409
Figura IX.13. Lesión <i>focal</i> . Cordero infectado con “dosis alta” de <i>Map</i> . Presencia de varios granulomas, que confluyen en el tejido linfoide de la zona interfolicular de la placa de Peyer yeyunal, desde su zona basal hasta la apical, sin llegar a afectar a la lámina propia.	410
Figura IX.14. Lesión multifocal <i>a</i> . Cordero infectado con “dosis alta” de <i>Map</i> . Los granulomas, de mayor tamaño, confluyen y ocupan un espacio mayor de tejido, llegando a alcanzar el extremo de la lámina propia asociada.	410
Figura IX.15. Lesión <i>multifocal a</i> . Cordero infectado con “dosis alta” de <i>Map</i> . Se observa una lesión granulomatosa grave en el tejido linfoide, con abundantes granulomas ocupando la mayor parte de las zonas interfoliculares	411
Figura IX.16. Lesión <i>multifocal a</i> . Cordero infectado con “dosis alta” de <i>Map</i> . Presencia de granulomas en lámina propia asociada al tejido linfoide, provocando el engrosamiento de la vellosidad.	411
Figura IX.17. Lesión <i>multifocal b</i> . Cordero infectado con “dosis alta” de <i>Map</i> . Presencia de lesiones granulomatosas en la lámina propia no relacionada con el tejido linfoide.	412
Figura IX.18. Lesión <i>multifocal b</i> . Cordero infectado con “dosis alta” de <i>Map</i> . La lesión está formada por numerosos granulomas, que se extienden por la lámina propia, causando su ensanchamiento y alterando su estructura histológica.	412

Figura IX.19. Lesión <i>multifocal b</i> . Cordero infectado con “dosis alta” de <i>Map</i> . Infiltrado inflamatorio, formado principalmente por macrófagos y localizado mayoritariamente en el ápice de las vellosidades, ocasionando su engrosamiento focal.....	413
Figura IX.20. Lesión de distribución <i>multifocal</i> en nódulo linfático mesentérico caudal. Cordero infectado con “dosis alta” de <i>Map</i> . Los granulomas confluyen y se extienden por el área interfolicular de la zona cortical y la paracortical.....	413
Figura IX.21. Nódulo linfático mesentérico caudal. Cordero infectado con “dosis alta” de <i>Map</i> . Detalle de los granulomas, donde se observa que están formados por macrófagos de abundante citoplasma eosinófilo y algunos linfocitos dispersos entre ellos.....	414
Figura IX.22. Nódulo linfático yeyunal. Cordero infectado con “dosis alta” de <i>Map</i> . Presencia de escasos granulomas, de pequeño tamaño, en el espacio interfolicular de la zona cortical.....	414
Figura IX.23. Lesión <i>focal</i> . Oveja infectada con “dosis alta” de <i>Map</i> . Presencia de varios granulomas de pequeño tamaño, bien definidos y localizados exclusivamente en el espacio interfolicular del tejido linfoide de la placa de Peyer ileocecal.....	415
Figura IX.24. Lesión <i>focal</i> . Oveja infectada con “dosis alta” de <i>Map</i> . Granulomas de pequeño tamaño, formados por macrófagos y escasos linfocitos, localizados en el tejido linfoide.....	415
Figura IX.25. Lesión <i>focal</i> . Oveja infectada con “dosis alta” de <i>Map</i> . Granuloma de tipo regresivo.....	416
Figura IX.26. Lesión de distribución <i>focal</i> en nódulo linfático ileocecal. Oveja infectada con “dosis alta” de <i>Map</i> . Escasos granulomas, bien delimitados, formados por 5-10 células macrofágicas, dispersos en la zona paracortical.....	416
Figura IX.27. Lesión <i>multifocal a</i> . Oveja 28 infectada con “dosis alta” de <i>Map</i> . Varios granulomas de gran tamaño, que se observan tanto en el tejido linfoide de la placa de Peyer como en la lámina propia asociada.....	417
Figura IX.28. Lesión <i>multifocal a</i> . Oveja 28 infectada con “dosis alta” de <i>Map</i> . Linfangitis granulomatosa en la capa muscular de la válvula ileocecal.....	417
Figura IX.29. Lesión <i>multifocal a</i> . Oveja 28 infectada con “dosis alta” de <i>Map</i> . Detalle de la linfangitis granulomatosa formada por abundantes linfocitos, algunos macrófagos y células gigantes, en la serosa de la válvula ileocecal.....	418
Figura IX.30. Oveja adulta. Granuloma inespecífico de “cuerpo extraño”, formado por unas 5-6 células macrofágicas y con presencia de pigmento parduzco en su citoplasma.....	418
Figura IX.31. Oveja adulta. Granuloma parasitario localizado en lámina propia de una placa de Peyer yeyunal media.....	419
Figura IX.32. Oveja adulta. Forma parasitaria, compatible con un esquizonte de protozoos del género <i>Eimeria</i> , localizado en la lámina propia del yeyuno distal. .	419
Figura IX.33. Oveja adulta. Forma parasitaria compatible con <i>Linguatula serrata</i> en el nódulo linfático yeyunal.....	420
Figura IX.34. Cordero “dosis alta”. Escasa cantidad (+) de BAAR en el citoplasma de macrófagos localizados en la lámina propia del íleon medio.....	420
Figura IX.35. Cordero “dosis alta”. Presencia de abundantes BAAR (+++) en lesiones de tipo <i>multifocal b</i> , ocupando la casi totalidad del citoplasma de los macrófagos.....	421

Figura IX.36. Cordero “dosis alta”. Presencia de inmunotinción positiva (++) en el citoplasma de macrófagos localizados en el ápice de una vellosidad del íleon proximal.....	421
Figura IX.37. Colonias de morfología característica de una cepa ovina de <i>Map</i> crecidas sobre la superficie de un medio de cultivo sólido Middlebrook 7H11, procedente de una muestra de heces del cordero 53 infectado con “dosis alta” de <i>Map</i>	422
Figura IX.38. Resultados de la PCR anidada a la secuencia de inserción IS900 de <i>Map</i> en muestras de tejido fresco de los corderos 47 y 52, y de las ovejas 20, 21 y 24.....	422

Índice de Gráficos / List of Graphics

IV-Resultados

Gráfico IV.1. Evolución de los resultados del ELISA frente a <i>Map</i> a lo largo del estudio según cada grupo experimental, tanto en los corderos como en las ovejas adultas.....	205
Gráfico IV.2. Evolución de la producción de IFN- γ a lo largo del estudio según cada grupo experimental, tanto en los corderos como en las ovejas adultas.....	207
Gráfico IV.3. Evolución del IFN- γ_0 a lo largo del estudio en cada grupo experimental, tanto en los corderos como en las ovejas adultas	209
Gráfico IV.4. Evolución del IFN- γ específico bruto a lo largo del estudio en cada grupo experimental, tanto en los corderos como en las ovejas adultas	210
Gráfico IV.5. Resultados de la prueba de la IDR comparada realizada a los 90 y 195 dpi en los corderos, expresados como el valor medio del incremento del grosor cutáneo en mm, del pliegue anocaudal a las 72 horas de la inoculación con PPD aviar y con PPD bovina, respectivamente	214
Gráfico IV.6. Resultados de la prueba de la IDR comparada realizada a los 90 y 195 dpi en las ovejas adultas, expresados como el valor medio del incremento de grosor cutáneo en mm, del pliegue anocaudal a las 72 horas de la inoculación con PPD aviar y con PPD bovina, respectivamente	214
Gráfico IV.7. Número de granulomas según su distribución en los diferentes compartimentos intestinales de cada cordero y oveja infectados con “dosis alta” de <i>Map</i> , tanto en el primer como en el segundo sacrificio	222
Gráfico IV.8. Valor medio del número de granulomas según su distribución en los diferentes compartimentos intestinales de los corderos y ovejas infectados con “dosis alta” de <i>Map</i> , tanto en el primer como en el segundo sacrificio	223
Gráfico IV.9. Valor medio del número de granulomas según su distribución en las diferentes localizaciones estudiadas del intestino de los corderos y ovejas infectados con “dosis alta” de <i>Map</i> , tanto en el primer como en el segundo sacrificio	225
Gráfico IV.10. Valor medio del número de granulomas según su distribución en las diferentes localizaciones estudiadas del intestino de todos los corderos y ovejas infectados con “dosis alta” de <i>Map</i> , sumando los del primer y segundo sacrificio.....	226
Gráfico IV.11. Número medio de granulomas por sección de tejido contados en los nódulos linfáticos asociados al intestino de los corderos y ovejas infectados con “dosis alta” de <i>Map</i> en cada sacrificio.....	228
Gráfico IV.12. Número medio de granulomas por sección de tejido contados en los nódulos linfáticos asociados al intestino de todos los corderos y ovejas infectados con “dosis alta” de <i>Map</i> , sumando los del primer con los del segundo sacrificio	228
Gráfico IV.13. Distribución del tipo lesional de las ovejas y corderos infectados con “dosis alta” de <i>Map</i>	234
Gráfico IV.14. Resultados de los valores medios de la producción de IFN- γ secretado <i>in vitro</i> por los tejidos o linfocitos de ILd, PPY y NLMC de los corderos, tanto en el 1er sacrificio (100-120 dpi) como en el 2º sacrificio (210-220 dpi), tras estimulación con PPDa e incubación 24 horas	242

Gráfico IV.15. Resultados de los valores medios de la producción de IFN- γ secretado <i>in vitro</i> por los tejidos o linfocitos de ILd, PPY y NLMC de las ovejas, tanto en el 1er sacrificio (100-120 dpi) como en el 2º sacrificio (210-220 dpi), tras estimulación con PPDa e incubación 24 horas	243
Gráfico IV.16. Niveles de expresión génica de IL-6, IL-12 e IFN- γ entre los diferentes grupos lesionales, obtenidos mediante qPCR, tras su normalización con los genes de referencia.....	246
Gráfico IV.17. Niveles de expresión génica de diversos mediadores entre los diferentes grupos lesionales en el Ileon distal (ILd), placa de Peyer yeyunal (PPY) y nódulo linfático mesentérico caudal (NLMC) obtenidos mediante qPCR, tras su normalización con los genes de referencia	248
Gráfico IV.18. Porcentaje de animales detectados como positivos a la presencia de la secuencia de inserción IS900 mediante PCR anidada en muestras de tejido fresco, en cada sacrificio así como en el conjunto del experimento (total).....	255
Gráfico IV.19. Porcentaje de animales detectados como positivos a la presencia de la secuencia de inserción IS900 mediante PCR anidada en muestras de tejido fresco, según la localización estudiada en cada grupo de animales infectados.....	256
Gráfico IV.20. Porcentaje de animales detectados como positivos a la presencia de la secuencia de inserción IS900 mediante PCR convencional en muestras de tejido incluido en parafina, según el momento de sacrificio así como en el conjunto del experimento (total).....	261
Gráfico IV.21. Porcentaje de animales detectados como positivos a la presencia de la secuencia de inserción IS900 mediante PCR convencional en muestras de tejido incluido en parafina, según la localización en cada grupo de animales infectados.....	261
Gráfico IV.22. Porcentaje de animales detectados como positivos a la presencia de la secuencia de inserción IS900 mediante PCR anidada en muestras de tejido incluido en parafina, en función del sacrificio así como en el conjunto del experimento (total)	266
Gráfico IV.23. Porcentaje de animales detectados como positivos a la presencia de la secuencia de inserción IS900 mediante PCR anidada en muestras de tejido incluido en parafina, según la localización estudiada en cada grupo de animales infectados.....	267
Gráfico IV.24. Porcentaje de animales infectados detectados como positivos mediante cultivo y PCR anidada a partir de muestras de tejido fresco, incluyendo tanto ovejas como corderos, según el tipo lesional.....	269
Gráfico IV.25. Porcentaje de animales infectados detectados como positivos mediante ZN, IHQ, PCR convencional o anidada a partir de muestras de tejido incluido en parafina, incluyendo tanto ovejas como corderos, según el tipo lesional.....	273
Gráfico IV.26. Porcentaje de animales infectados detectados como positivos mediante ZN, IHQ, PCR convencional o anidada en cada localización a partir de secciones de tejido incluido en parafina, incluyendo tanto ovejas como corderos, según el tipo lesional	275
Gráfico IV.27. Porcentaje de animales infectados detectados como positivos mediante el test ELISA, la prueba de liberación de IFN- γ , o la prueba de IDR (intrademorreacción), incluyendo tanto ovejas como corderos, según el tipo lesional.....	285

Abreviaturas empleadas / Abbreviations

ADNc: ADN complementario	NLY: Nódulo Linfático Yeyunal
ARNm: ARN mensajero	NO: Óxido nítrico
BAAR: Bacilos ácido-alcohol resistentes	Nramp1: Proteína macrofágica 1 asociada a la resistencia natural
CPA: Células presentadoras de antígenos	PAMP: Patrones moleculares asociados al patógeno
DAB: Diaminobenzidina	Pb: Pares de bases.
DO: Densidad óptica	PBMC: Células mononucleares de sangre periférica
dpi: Días posinfección	PBS : Tampón fosfato salino
ELISA: Enzyme Linked Immunosorbent Assay	PBS-TG : Tampón fosfato salino con Tween
HE: Hematoxilina-Eosina	PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa
HPC: Cloruro de hexadecil piridinio	PPD : Derivado Protéico Purificado
IBD: <i>Inflammatory Bowel Disease</i> (Enfermedad inflamatoria intestinal)	PPI: Placa de Peyer Ileal
IDR: Intradermorreacción	PPIC: Placa de Peyer Ileocecal
IFN-γ: Interferón gamma	PPY: Placa de Peyer Yeyunal
IHQ: Inmunohistoquímica	PPYd: Placa de Peyer Yeyunal distal
IL-: Interleuquina	PPYm: Placa de Peyer Yeyunal media
IL: Íleon	PPYp: Placa de Peyer Yeyunal proximal
ILd: Íleon distal	PRR: Receptores del patrón de reconocimiento
ILm: Íleon medio	PTB: Paratuberculosis
ILp: Íleon proximal	qPCR: PCR cuantitativa a tiempo real.
IS: Secuencia de inserción	Rpm: Revoluciones por minuto
kDa: KiloDalton	SNP: Polimorfismos de un solo nucleótido
LJ: Löwenstein-Jensen	Th: Linfocito T colaborador
LP: Lámina propia	TLR: Receptores “Toll-like”
Maa: <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>avium</i>	Treg: Célula T reguladora
Map: <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i>	UFC: Unidades Formadoras de Colonias
MHC: Complejo Mayor de Histocompatibilidad	YY: Yeyuno
M. phlei: <i>Mycobacterium phlei</i>	YYd: Yeyuno distal
MJ: Micobactina J	YYm: Yeyuno medio
NLIC: Nódulo Linfático Ileocecales	YYp: Yeyuno proximal
NLMC: Nódulo Linfático Mesentérico Caudal	VIC: Válvula Ileocecal
NLR: Receptores “NOD-like”	ZN: Ziehl-Neelsen



I. Introducción y Objetivos, Introduction and Objectives

La paratuberculosis, o enfermedad de Johne, es una enfermedad infecciosa crónica causada por *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* (*Map*), que afecta tanto a rumiantes domésticos como silvestres, en los que provoca una enteritis y linfadenitis granulomatosa. Se asume tradicionalmente que los animales se infectan en edades tempranas, y no llegan a desarrollar la enfermedad hasta la edad adulta, cuando se observa un adelgazamiento progresivo, diarrea, y finalmente la muerte de los individuos afectados (Chiodini *et al.*, 1984a; Clarke, 1997).

La principal vía de transmisión entre animales es la fecal-oral, a través de la ingestión de bacilos en el agua, leche o cualquier alimento contaminado por las heces de los animales infectados (Chiodini *et al.*, 1984a; Juste y Adúriz, 1990a; Clarke, 1997), aunque también se ha comprobado el riesgo de contagio vertical, por vía transplacentaria (Kopecky *et al.*, 1967; Whittington y Windsor, 2009).

La paratuberculosis, con una amplia distribución mundial, tiene un elevado impacto socio-económico sobre el sector ganadero, especialmente en la cabaña de alta producción lechera (Merkal *et al.*, 1975; Kennedy y Benedictus, 2001). Las pérdidas económicas que puede ocasionar suponen un alto coste para el ganadero, que a menudo resulta muy difícil de cuantificar, debido a la existencia de un gran número de animales infectados subclínicamente, que pueden pasar desapercibidos. Éstas pérdidas engloban tanto las de tipo directo, por mortalidad o sacrificio prematuro de los animales adultos en plena edad productiva (2-5 años), como indirecto, por disminución en la producción lechera, descenso del valor de la canal en mataderos, problemas de infertilidad, mamitis (Merkal *et al.*, 1975; Buergelt y Duncan, 1978; Benedictus *et al.*, 1987; Stabel, 1998; Kennedy y Benedictus, 2001), o la pérdida de potencial genético (Buergelt y Duncan, 1978; Adúriz *et al.*, 2000).

A todo ello se le debe añadir la cada vez mayor preocupación a nivel mundial que suscita la posible implicación de *Map* como agente etiológico de la enfermedad de Crohn en humanos, proceso caracterizado también por una enteritis granulomatosa crónica (Chiodini, 1989; Greenstein, 2003). Aunque la relación entre *Map* y la patogenia de la enfermedad del Crohn no ha sido definitivamente comprobada, el

aislamiento de dicho bacilo a partir de sangre y tejidos de pacientes con esta enfermedad (Naser *et al.*, 2004; Sechi *et al.*, 2005; Juste *et al.*, 2009b) ha suscitado aún más interés sobre el posible papel zoonótico de esta micobacteria, y ha abierto un controvertido debate en estas dos últimas décadas, especialmente por las consecuencias que pudiera tener en el ámbito de la seguridad alimentaria.

El grave impacto económico que la paratuberculosis ocasiona en el sector ganadero de los rumiantes, y las posibles implicaciones de *Map* en la salud pública, han renovado el interés por la paratuberculosis en toda Europa, habiendo llevado incluso la Unión Europea a crear una Comisión de estudio para elevar un informe que contemple todos los conocimientos acerca de la paratuberculosis, de la enfermedad de Crohn, y de sus posibles relaciones. Además, de todas estas preocupaciones nació también el proyecto europeo “ParaTBTools”, del que nuestro grupo investigador formó parte, entre otros grupos científicos especializados en paratuberculosis, para tratar de optimizar los métodos de detección de *Map* en el ganado y en los alimentos, así como evaluar el riesgo de una posible transmisión del agente a los humanos.

Por todo lo expuesto anteriormente, numerosos países han desarrollado en los últimos años programas de control con el fin de reducir el impacto económico de esta enfermedad e incrementar la rentabilidad de las explotaciones afectadas (Stabel, 1998; Bakker *et al.*, 2000; Olsen *et al.*, 2002), y sobre todo reducir la tasa de infección dentro de los rebaños afectados (Merkal *et al.*, 1975; Sherman, 1985; Collins *et al.*, 1994; Goodger *et al.*, 1996; Kennedy y Benedictus, 2001; Windsor y Whittington, 2010). Las principales estrategias de control se han basado en la detección y el sacrificio de los animales infectados, el establecimiento de medidas higiénico-sanitarias o la vacunación. Sin embargo, los programas basados en la identificación de animales infectados se han visto limitados por la inexistencia de pruebas de diagnóstico capaces de detectar todos los individuos con esta condición (Chiodini *et al.*, 1984a; Olsen *et al.*, 2002).

Se asume tradicionalmente que los animales se infectan de jóvenes (Chiodini *et al.*, 1984a; Clarke, 1997), por lo que las principales medidas sanitarias se han basado en la separación de los recién nacidos de sus madres durante los primeros meses de vida para limitar la transmisión de *Map* entre los animales (Chiodini *et al.*, 1984a; Windsor y Whittington, 2010). Por estas razones, en los últimos años ha cobrado gran interés el

concepto de resistencia a la infección asociada con la edad. Además, a ello también ha contribuido el hallazgo común en rebaños con paratuberculosis de individuos con lesiones focales, caracterizadas por la presencia de pequeños granulomas asociados al tejido linfoide intestinal o los nódulos linfáticos mesentéricos, semejantes a los que aparecen en las fases iniciales de la infección por *Map*, lo que ha planteado la duda de si éstas pudieran tratarse de lesiones latentes en un animal infectado hace tiempo, o bien pudieran estar relacionadas con animales adultos recién infectados (García Marín *et al.*, 1992c; Pérez *et al.*, 1996; Corpa *et al.*, 2000a; González *et al.*, 2005).

Se han llevado a cabo estudios para evaluar la posible resistencia de los animales a ser infectados por *Map* en función de su edad en la especie bovina (Hagan, 1938; Doyle, 1953; Taylor, 1953a; Payne y Rankin, 1961; Larsen *et al.*, 1975; Windsor y Whittington, 2010) y recientemente en ciervos (Mackintosh *et al.*, 2010), mientras que este fenómeno ha sido muy poco estudiado en otras especies (Hines II *et al.*, 2007), entre ellas la ovina. En cualquier caso, aún quedan muchos aspectos por ser aclarados, siendo los resultados de los ensayos llevados a cabo hasta el momento muy dispares. Aunque la mayor parte de los estudios reflejan que los individuos se hacen más resistentes a la infección con la edad (Meyer, 1913; M'Fadyean y Sheather, 1916; Hagan, 1938; Taylor, 1953a, Rankin, 1958a, 1961a, 1961b, 1962), para unos autores el límite de edad a partir del cual los animales no se infectan serían los seis meses (Taylor, 1953a), mientras que otros autores han encontrado signos de infección incluso en vacas adultas (Doyle, 1953; Rankin, 1958a, 1961a, 1961b, 1962; Payne y Rankin, 1961a; Larsen *et al.*, 1975a).

La hipótesis general de este trabajo surge de todas estas observaciones previas, tanto en casos naturales como experimentales, que sugieren que existen diferentes factores que influyen sobre la patogenia de la paratuberculosis, entre los cuales se encontraría la edad de los animales.

Por ello, esta tesis doctoral se planteó como **objetivo general el contribuir a un mejor conocimiento de la patogenia de la paratuberculosis, especialmente en cuanto a las modificaciones que pudieran observarse tras la infección experimental por *Map* de animales jóvenes y adultos.**

Como **primer objetivo concreto** de este trabajo, nos hemos propuesto **estudiar las diferencias existentes en la evolución lesional de la paratuberculosis en función de la edad, tras la infección experimental por *Map* de corderos jóvenes y ovinos adultos.**

El desenlace de la infección paratuberculosa viene determinado por la interacción entre el hospedador y *Map* a través de diversos mecanismos patogénicos extremadamente complejos en los que intervienen tanto la respuesta inmune innata como la adaptativa (Stabel, 2006). Inicialmente, se desencadenaría una respuesta inmune celular, de tipo Th1, que sería capaz de contener la multiplicación de los bacilos, hasta que en un momento determinado, la inmunidad celular se debilitaría y la respuesta cambiaría a una de tipo Th2, que conllevaría a la progresión de las lesiones y la enfermedad clínica (Chiodini *et al.*, 1984a; Clarke, 1997; García-Marín *et al.*, 2000; Stabel, 2000a; Coussens, 2001; Stabel, 2006). Para tratar de ampliar los conocimientos sobre estos mecanismos inmunopatogénicos, el **segundo objetivo** de este trabajo ha sido el **conocer y comparar la respuesta inmune periférica específica, tanto celular como humoral, desencadenada en corderos jóvenes y ovinos adultos tras la infección experimental por *Map*.** Como un **objetivo secundario** de éste, se planteó también **determinar el papel que la inmunidad innata, evaluada mediante la producción basal de interferón gamma (IFN- γ), pudiera jugar en la patogenia de la paratuberculosis.**

Por otra parte, la interacción entre diversas citoquinas es compleja y su papel en la regulación de la infección paratuberculosa no se conoce claramente (Alzuherri *et al.*, 1996; Lee *et al.*, 2001; Tanaka *et al.*, 2005; Stabel, 2006; Smeed *et al.*, 2007), especialmente en la respuesta inmune local, que tiene lugar en el intestino y tejido linfoide asociado, donde tienen lugar la entrada de *Map*, las lesiones iniciales, y su posible progresión a formas más avanzadas (Nisbet *et al.*, 1962; Van Kruiningen *et al.*, 1986; Juste *et al.*, 1994; Pérez *et al.*, 1996; Sigurdardóttir *et al.*, 1999; Corpa *et al.*, 2000a; García-Marín *et al.*, 2000; Kurade *et al.*, 2004; González *et al.*, 2005). Recientemente, se han desarrollado y puesto a punto nuevas técnicas de biología molecular como la PCR a tiempo real, basada en el análisis del ARNm, que proporciona un análisis simple y rápido de la expresión génica de citoquinas, y permite su cuantificación (Smeed *et al.*, 2007; Nalubamba *et al.*, 2008; Gillan *et al.*, 2010). Por

ello, nos planteamos como **tercer objetivo**, relacionado con el anterior, el **analizar la respuesta inmune local del animal infectado mediante la valoración de la producción de IFN- γ y los niveles de expresión génica de diversas citoquinas y mediadores de la respuesta inflamatoria e inmunológica.**

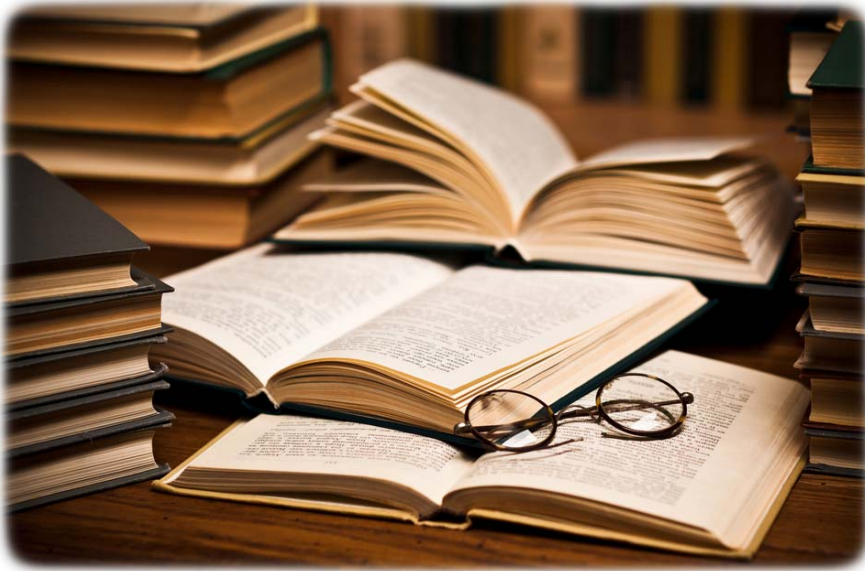
Se ha descrito un espectro de formas lesionales que varía según el estatus inmunitario del animal y la cantidad de *Map* presente tanto en ovino, caprino como bovino (Pérez *et al.*, 1996; Corpa *et al.*, 2000a; González *et al.*, 2005). Recientemente, se ha sugerido un nuevo modelo inmunopatogénico, basado en la respuesta inmune del hospedador y la presencia de *Map* en sangre en condiciones naturales, por el que existiría una asociación entre una respuesta inmune innata intensa y descontrolada, y el desarrollo de lesiones intestinales graves (Geijo, 2007; Juste *et al.*, 2009). El **cuarto objetivo** de este trabajo consiste en **conocer la relación entre las diferentes formas lesionales que aparecen en las fases iniciales de la infección por *Map*, tanto con la respuesta inmune periférica como local.**

Un aspecto ampliamente discutido en las infecciones experimentales con *Map* es la dosis óptima del inóculo infectante, ya que ésta ha de ser lo suficientemente elevada como para reproducir la infección en los animales del experimento de manera fiable, pero no tan excesiva que pudiera llegar a alterar los mecanismos inmunes naturales desencadenados por la vacunación o cualquiera otra intervención que se quiera estudiar (Hines II *et al.*, 2007). En la especie ovina, las dosis utilizadas han variado considerablemente entre los diferentes diseños experimentales llevados a cabo hasta hoy, originando resultados muy dispares, habiéndose logrado el establecimiento de infecciones con dosis desde 10^3 (Brotherston *et al.*, 1961a; Nisbet *et al.*, 1962) hasta 10^{10} UFC de *Map* (Kurade *et al.*, 2004; Reyes, 2007). En la presente tesis doctoral, como **quinto objetivo**, nos propusimos **determinar el papel que la dosis infectante juega en la génesis y evolución de las lesiones, y en el desencadenamiento de una respuesta inmune asociada.**

Otro factor que contribuye ampliamente al éxito de un programa de control de paratuberculosis es la capacidad de detección de los animales infectados. La identificación de los animales con la enfermedad avanzada resulta relativamente sencilla, basándose en la detección de los signos clínicos del individuo afectado, así

como la puesta en evidencia de BAAR en las heces; sin embargo la mayor dificultad radica en la distinción de los animales subclínicos, que no presentan signos clínicos, no excretan la micobacteria en las heces y sin embargo forman la gran mayoría de los individuos afectados en un rebaño con paratuberculosis, siendo su identificación esencial en los programas de control, al representar estos animales un posible foco de infección capaz de transmitir el bacilo al resto de los animales de la explotación (Garrido *et al.*, 2000a; Olsen *et al.*, 2002). En cuanto al diagnóstico anatomopatológico, en los animales que presentan lesiones granulomatosas focales compatibles con paratuberculosis, suele ser muy difícil detectar BAAR o sus antígenos mediante métodos de tinción convencionales. En estos casos, es de gran interés poder emplear técnicas más sensibles que permitan el diagnóstico etiológico en individuos con lesiones sospechosas de paratuberculosis. Por ello, **el sexto objetivo ha sido valorar la eficacia y el rendimiento de diferentes técnicas de diagnóstico para identificar el agente causal en tejidos con varios tipos lesionales que presentan diferente cantidad de bacilos, en ovinos infectados experimentalmente.**

Por último, un objetivo esencial que nos propusimos alcanzar durante la realización de esta Tesis Doctoral, ha sido aprovechar la estancia en este departamento a lo largo de estos años para iniciar y desarrollar una formación en el campo de la sanidad animal, y más en concreto de la Anatomía Patológica Veterinaria, así como en el ámbito de la investigación científica, tanto a través de la experiencia adquirida en el propio departamento, como participando en diversos congresos y cursos de especialización. También se ha aprovechado la oportunidad de completar la formación mediante la realización de varias estancias de investigación en centros tanto nacionales como extranjeros, que han permitido el aprendizaje de nuevos métodos, la adquisición de una formación más amplia en el ámbito de la investigación científica en salud animal en general, y en el estudio de la patogenia de la paratuberculosis en concreto.



II. Revisión Bibliográfica *General Review*

II.1. PARATUBERCULOSIS: ASPECTOS GENERALES.

II.1.1. ETIOLOGÍA.

II. 1.1.1. Características generales.

La paratuberculosis, o enfermedad de Johne, está causada por *Mycobacterium avium* subespecies *paratuberculosis* (“Map”). Este microorganismo está incluido dentro del género *Mycobacterium*, propuesto por Lehman y Newman en 1896 para incluir los agentes de la tuberculosis (*M. tuberculosis*) y de la lepra (*M. leprae*). Johne y Frothingam fueron los primeros en describir la enfermedad, en 1895, tras demostrar la presencia de bacilos ácido-alcohol resistentes (BAAR) en el tejido intestinal infectado de bovinos (Johne y Frothingam, 1895). A pesar de denominarse inicialmente como *M. paratuberculosis* y *M. johnei* durante largo tiempo, fueron Thorel *et al.*, (1990) quienes revisaron la clasificación taxonómica y establecieron oficialmente el nombre por el que se conoce actualmente a esta micobacteria, al poner en evidencia la gran similitud que presentaba con la especie *M. avium*.

Desde el punto de vista taxonómico, *Map* está incluido dentro del Orden de los Actinomicetales, que a su vez engloba a la Familia Mycobacteriaceae, muy próxima a las Familias que incluyen los géneros *Nocardia* y *Corynebacterium* (Stackebrandt *et al.*, 1997; Juste *et al.*, 2000a). Actualmente, el género *Mycobacterium* comprende numerosas especies y subespecies, que incluyen tanto agentes patógenos estrictos como saprófitos. *Map* se ubica dentro del Complejo *M. avium*, al igual que las subespecies *M. avium* subsp *avium* (*Maa*) y *M. avium* subsp *silvaticum* (Thorel *et al.*, 1990).

Las propiedades de esta micobacteria vienen resumidas a continuación en la tabla II.1.

Propiedades bacteriológicas de <i>Map</i>	Referencias
<ul style="list-style-type: none"> - Bacilo ácido-alcohol resistente de 0,5-1,5 µm - Gram positivo facultativo - Microorganismo aerobio e inmóvil - Micobacteria de crecimiento lento - 61-71% de contenido Guanina y Citosina (G+C) en su ADN - Pared celular de alto contenido lipídico - Crece en medios de cultivo a base de huevo y medios sintéticos - La mayoría de cepas requiere micobactina para su crecimiento - Período de incubación en cultivo desde 8-16 semanas, hasta 6 meses en algunas cepas para formar colonias visibles - Relativamente inactiva bioquímicamente - Su identificación se basa en: <ul style="list-style-type: none"> ▪ La dependencia a la micobactina en crecimientos <i>in vitro</i> en medios con huevo ▪ La detección de la secuencia de inserción IS900 	<p>Merkal y Curran, 1974; Merkal <i>et al.</i>, 1981 ; Barclay y Ratledge, 1983; Chiodini <i>et al.</i>, 1984a ; Wayne y Kubica, 1986; Collins <i>et al.</i>, 1989; Green <i>et al.</i>, 1989; Grange <i>et al.</i>, 1990 ; Juste <i>et al.</i>, 1991b ; Juste <i>et al.</i>, 2000a</p>

Tabla II.1. Resumen de las propiedades bacteriológicas de *Map*.

Cuando crecen sobre medios artificiales, las colonias de *Map* son normalmente de reducido tamaño (1-5 mm), blancas, firmes, brillantes, convexas y de aspecto liso (Merkal y Curran, 1974). En medios de cultivo a base de huevo como el Löwenstein-Jensen, existe una clara dependencia de micobactina. Sin embargo Adúriz *et al.*, (1995) comprobaron que algunas cepas ovinas de *Map* podían crecer en el medio de cultivo sintético Middlebrook 7H11/OADC sin la necesidad de aportar micobactina externa. También se ha descrito otro tipo de cepas denominadas “pigmentadas”, por el pigmento amarillo-anaranjado que producen en cultivo. Estas últimas cepas se han aislado principalmente de ovinos (Taylor, 1957), pero también de bovinos (Watt, 1954; Stuart, 1965a).

II. 1.1.2. Cepas de *Map*.

Los avances en biología molecular en las últimas décadas han permitido distinguir diversas cepas de *Map* y clasificarlas en tipos y subtipos mediante varias técnicas de tipificación. Entre ellas, se encuentran las siguientes:

- **Polimorfismo de la longitud de fragmentos de restricción (RFLP)**, basado en la separación de fragmentos del genoma de *Map* por electroforesis en función de su tamaño (Collins *et al.*, 1990; Pavlik *et al.*, 1995, 2000; Cousins *et al.*, 2000; Saunders *et al.*, 2003).
- **Reacción en cadena de la polimerasa - análisis con endonucleasas de restricción (PCR-REA)**, basado en el polimorfismo de la secuencia IS1311, presente en *Map* y en las demás subespecies de *M. avium*, y que permite discriminar entre las cepas ovinas, bovinas y de bisonte de *Map*, así como del resto de miembros del complejo (Marsh *et al.*, 1998; Whittington *et al.*, 2000b; Sevilla *et al.*, 2005).
- **Electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE)**, otra técnica más sofisticada capaz de proporcionar comparaciones entre aislados de *Map*, utilizando dos campos eléctricos alternativos que se cruzan en el plano del gel para separar con mayor eficacia los fragmentos del genoma de *Map* (Feizabadi *et al.*, 1997; Stevenson *et al.*, 2002; de Juan *et al.*, 2005; Sevilla *et al.*, 2007, 2008).

En base a estas técnicas, se han identificado hasta ahora dos genotipos principales de *Map* denominados “S” (**Sheep**) para las cepas de tipo ovino, y “C” (**Cattle**) para las de tipo bovino (Collins *et al.*, 1990; Whittington *et al.*, 2000b), debido a su aparente predominancia en esas especies hospedadoras, a pesar de no ser estrictamente específicas, así como un tercer genotipo “B” (**Bison**), aislado de bisontes americanos y cabras de la India (Whittington *et al.*, 2001b; Sevilla *et al.*, 2007). Collins *et al.*, (1990) también añadieron otro tipo de cepa que denominaron “I” (**intermedio**), aislada de dos ovejas procedentes de Canadá. Según estos autores, las cepas I, con patrones de hibridación intermedios entre los de las cepas C y S, tendrían sin embargo un patrón de restricción más similar al de las cepas S (Collins *et al.*, 1990).

Más adelante, Stevenson *et al.*, (2002) emplearon la técnica de PFGE para llevar a cabo la caracterización molecular de 5 aislamientos de tipo pigmentado (todos con el perfil de tipo S según los resultados de la PCR-REA) y 88 del tipo no pigmentado (18 ovinos y las demás procedentes de vacas, conejos, cabras, ciervos, y otras especies

silvestres). Los autores llevaron a cabo la restricción enzimática mediante las enzimas *Sna*BI y *Spe*I, obteniendo finalmente distintos perfiles que agruparon en dos grandes grupos o tipos de cepas; el **tipo I**, comparable al tipo ovino o S, y el **tipo II**, semejante al tipo bovino o C (Stevenson *et al.*, 2002). Posteriormente, se aisló un nuevo perfil mediante esta misma técnica en dos cabras españolas, que, al diferir de aquellos comprendidos en los Tipos I y II, fue denominado como **Tipo III** (de Juan *et al.*, 2005), un tipo intermedio considerado más cercano al tipo I, y que sería comparable a las cepas Intermedias descritas por Collins *et al.*, (1990). Generalmente, las cepas de Tipo I son de crecimiento más lento, con una fuerte preferencia de hospedador por las ovejas, y aparentemente más virulentas para este tipo de hospedadores. En cambio, las cepas de tipo II son de crecimiento más rápido, y han sido aisladas de un amplio rango de hospedadores (Stevenson *et al.*, 2002). Por último, las cepas de tipo III son de crecimiento lento, pero sin embargo presentan un rango de hospedadores más amplio que las de tipo I (de Juan *et al.*, 2005).

II. 1.1.3. Principales antígenos de *Map*.

Actualmente, uno de los mayores esfuerzos en la investigación de la paratuberculosis se está dedicando a la identificación y caracterización de nuevos componentes inmunogénicos de *Map*. Muchos estudios se han enfocado a la búsqueda de antígenos que puedan ser empleados eficazmente para las pruebas diagnósticas basadas en la respuesta inmune humoral y celular del animal. Para ello, se requiere un antígeno que sea únicamente específico de *Map*, y que tenga la capacidad de inducir una fuerte respuesta inmune, para poder detectar a los animales infectados en cualquier estadio de la enfermedad (Olsen *et al.*, 2002). Sin embargo, la búsqueda de este antígeno “ideal” es una tarea muy compleja, debido principalmente al hecho de que *Map* comparte la mayoría de sus antígenos con otras micobacterias. De hecho, presenta una homología de más del 98% con *M. avium* subsp *avium* en algunas regiones de su secuencia genética (Bannantine *et al.*, 2002). Hasta el momento, se han caracterizado ya varios componentes de *Map* como posibles antígenos candidatos para utilizar en pruebas diagnósticas, como el lipoarabinomanano (LAM) (Sugden *et al.*, 1997), la Johnina (Johnson, 1944), el antígeno protoplasmático purificado (PPA-3) (Bech-Nielsen *et al.*, 1985; Pérez *et al.*, 1997), las proteínas de choque térmico (heat shock proteins) (Koets *et al.*, 1999), así como otras proteínas denominadas en base a su tamaño en

kilodaltons (kDa) (Stevenson *et al.*, 1992; Burrells *et al.*, 1995; Bannantine *et al.*, 2003; Willemsen *et al.*, 2006), sin que ninguno de ellos haya sido considerado como el ideal.

II. 1.1.4. Persistencia en el medio

En cuanto a su capacidad de resistencia, *Map* puede sobrevivir en el medio ambiente durante largos períodos de tiempo. Así, su viabilidad ha sido estimada en 163 días en ríos, 9 meses en aguas cenagosas, 11 meses en heces bovinas y hasta 1 año en pastos, pero únicamente 7 días en orina (Lovell *et al.*, 1944; Larsen *et al.*, 1956; Hole, 1958; Jorgensen, 1977; Juste, 1984; Eamens *et al.*, 2001). También se ha comprobado su resistencia a -14°C durante al menos un año (Hole, 1958; Richards y Thoen, 1977). Sin embargo, recientemente, se ha demostrado que, tras almacenar durante una semana a -20°C muestras de heces procedentes de 11 vacas con paratuberculosis, la viabilidad de *Map* en dichas muestras se vió reducida (Khare *et al.*, 2008). Larsen *et al.*, (1956) llevaron a cabo una serie de experimentos para estudiar la capacidad de resistencia de *Map* bajo diversas condiciones, y encontraron que el bacilo tenía una viabilidad moderada frente a la luz solar directa, mientras que podía permanecer durante mucho tiempo en la oscuridad. El elevado grado de resistencia que presenta este bacilo, se explica en parte por la gruesa capa cérica que le rodea, lo que le permite soportar condiciones físico-químicas que no suelen aguantar otras especies, y por otro lado por la posibilidad de ralentizar su metabolismo en determinadas condiciones (Juste *et al.*, 2000a). En cambio, debido a los efectos bacteriostáticos y bactericidas de las heces y orina, respectivamente (Larsen *et al.*, 1956), una mezcla de ambos, como ocurre en las explotaciones, se convierte en un medio más hostil para la micobacteria (Chiodini *et al.*, 1984a; Whittington *et al.*, 2003b).

En un estudio epidemiológico realizado en 7 rebaños vacunos de Michigan, Pillars *et al.*, (2009) comprobaron que en aquellas explotaciones con una prevalencia de paratuberculosis superior al 2%, *Map* podía aislarse mediante cultivo hasta en el 75% de los muestreos, en suelos de las salas de ordeño y/o en las áreas de almacenamiento del abono. Recientemente, también se ha señalado la presencia de *Map* viable en los suelos, cubículos e incluso en el polvo depositado en varios establos, tras la introducción de vacas excretoras de esta micobacteria, a pesar de las estrictas medidas

de higiene aplicadas, advirtiendo del riesgo de diseminación del agente en el ambiente que supone la entrada de un animal excretor en un rebaño (Eisenberg *et al.*, 2010).

Por otro lado, *Map* también dispone de una enorme capacidad para soportar los desinfectantes que funcionan para la mayor parte de los agentes biológicos. Se han realizado algunos estudios para conocer aquellos capaces de eliminar el bacilo de superficies externas, encontrando que tanto el hipoclorito sódico (lejía comercial), el formol al 5%, los cresoles al 3%, el fenol al 2,5%, el bicloruro de mercurio al 0,1% así como el hipocloruro cálcico al 2%, eran eficaces para matar al bacilo en menos de 10 minutos en condiciones adecuadas, con mayor eficacia si actúan en soluciones acuosas (Vardaman, 1954; Hole, 1958). Por otro lado, se ha comprobado el efecto bactericida del cloro, desinfectante usado en el tratamiento del agua, sobre cepas bovinas y humanas de *Map* (Whan *et al.*, 2001), si bien posteriormente, los mismo autores encontraron que esta micobacteria podía adquirir una mayor capacidad de resistencia al cloro cuando era ingerida por el protozoo *Acanthamoeba* spp., lo que debería de tenerse en cuenta en los procesos de cloración del agua para el consumo humano (Whan *et al.*, 2006).

Por las posibles implicaciones de *Map* en la salud pública, se han llevado a cabo diferentes estudios para conocer el efecto de la pasteurización de la leche o los procesos de fabricación y curación del queso sobre la viabilidad de esta bacteria. En efecto, se ha detectado la presencia del bacilo en leche cruda y pasteurizada de vacas, ovejas y cabras, así como en quesos de venta al por menor en diferentes países, lo que indica que los humanos podrían estar expuestos a *Map* a través del consumo de estos productos de origen animal (Grant, 2003; Ikonopoulou *et al.*, 2005; Eltholth *et al.*, 2009). Por ello, se han llevado a cabo numerosos estudios para investigar el efecto de diferentes combinaciones de temperaturas y tiempos para inactivar *Map*. Se ha estimado que el someter la leche cruda a una temperatura de 72°C durante 15 s sería suficiente para la eliminación total del microorganismo (Stabel *et al.*, 1997; McDonald *et al.*, 2005; Rademaker *et al.*, 2007). Sung y Collins (2000) no encontraron apenas relación entre el efecto de la adición de cloruro sódico y la inactivación de *Map* en quesos; en cambio, comprobaron que la disminución del pH contribuía significativamente a reducir su presencia.

II.1.2. EPIDEMIOLOGÍA.

II.1.2.1. Rango de hospedadores.

A pesar de que la paratuberculosis es tradicionalmente conocida por afectar a bovinos, ovinos y caprinos, en realidad esta enfermedad tiene un rango de hospedadores mucho más amplio, incluyendo también rumiantes salvajes. Además, *Map* también ha sido aislado en varias especies monogástricas, aunque de forma esporádica (Chiodini *et al.*, 1984a; Beard *et al.*, 2001a; Kennedy y Benedictus, 2001; Olsen *et al.*, 2002).

Dentro de los rumiantes, la paratuberculosis ha sido más ampliamente estudiada en la vaca (*Bos taurus*), la oveja (*Ovis aries*) y la cabra (*Capra hircus*), por ser las especies de mayor interés productivo. No obstante, también se han confirmado infecciones por *Map* en los siguientes rumiantes salvajes, siendo los más estudiados en los últimos años todos aquellos pertenecientes a la familia de los cérvidos (familia Cervidae):

- **Ciervos (*Cervus elaphus*)** (De Lisle *et al.*, 1993 ; Godfroid *et al.*, 2000; Mackintosh *et al.*, 2005; O'Brien *et al.*, 2006 ; Mackintosh *et al.*, 2007 ; Robinson *et al.*, 2008 ; Clark *et al.*, 2010; Mackintosh *et al.*, 2010 ; Robinson *et al.*, 2010)
- **Gamos (*Dama dama*)** (Temple *et al.*, 1979 ; Pavlik *et al.*, 2000; Marco *et al.*, 2002; Alvarez *et al.*, 2005; Balseiro *et al.*, 2008)
- **Corzos (*Capreolus capreolus*)** (Pavlik *et al.*, 2000 ; Tryland *et al.*, 2004)
- **Muflones (*Ovis musimon*)** (Pavlik *et al.*, 2000)
- **Bisontes (*Bison bison*)** (Burgelt *et al.*, 2000 ; Leid *et al.*, 2002 ; Ellingson *et al.*, 2005 ; Huntley *et al.*, 2005 ; Sibley *et al.*, 2007)
- **Búfalos (*Bubalus bubalis*)** (Sivakumar *et al.*, 2006 ; Khan *et al.*, 2010)
- **Llamas (*Lama glama*)** (Blood *et al.*, 1989; Miller *et al.*, 2000)
- **Alpacas (*Lama pacos*)** (Ridge *et al.*, 1995 ; Miller *et al.*, 2000; Fecteau *et al.*, 2009)
- **Camellos (*Camelus bactrianus*)** (Stehman, 1996; Kramsky *et al.*, 2000)
- **Antílopes (*Saiga tatarica*)** (Dukes *et al.*, 1992)

Además, *Map* se ha aislado de especies monogástricas, en ocasiones causando lesiones y enfermedad clínica. A continuación, se señalan las especies de animales monogástricos de las que se ha conseguido el aislamiento de *Map* en casos naturales:

- **Conejos (*Oryctolagus cuniculus*)** (Angus, 1990 ; Greig *et al.*, 1997 ; Beard *et al.*, 2001a, 2001b ; Daniels *et al.*, 2003a, 2003b ; Raizman *et al.*, 2005 ; Judge *et al.*, 2006)
- **Liebres (*Lepus europaeus*)** (Beard *et al.*, 2001a)
- **Cerdos (*Sus scrofa*)** (Jorgensen, 1969 ; Larsen *et al.*, 1971)
- **Jabalíes (*Sus scrofa*)** (Alvarez *et al.*, 2005; Zanetti *et al.*, 2008)
- **Caballos (*Equus caballus*)** (Larsen *et al.*, 1972)
- **Burros (*Equus asinus*)** (Dierckins *et al.*, 1990)
- **Comadrijas (*Mustela nivalis*)** (Beard *et al.*, 2001a)
- **Tejones (*Meles meles*)** (Beard *et al.*, 2001a)
- **Lobos (*Canis lupus*)** (Beard *et al.*, 2001a)
- **Coyotes (*Canis latrans*)** (Anderson *et al.*, 2007)
- **Zorros (*Vulpes vulpes*)** (Beard *et al.*, 2001a)
- **Osos pardos (*Urdus arctos*)** (Kopečna *et al.*, 2006)
- **Mandriles (*Papio sphinx*)** (Zwick *et al.*, 2002).
- **Diferentes especies de aves** (Beard *et al.*, 2001a ; Daniels *et al.*, 2003a, 2003b)
- **Roedores** (Beard *et al.*, 2001a ; Daniels *et al.*, 2003a, 2003b)

Estos aislamientos podrían tener importancia desde el punto de vista epidemiológico, ya que estos animales podrían actuar como reservorios de *Map* y contribuir a la difusión de la paratuberculosis, pudiendo incluso participar como fuentes de infección para el ganado doméstico. En este sentido, Beard *et al.*, (2001c) pusieron en evidencia la capacidad de una cepa de *Map* aislada en conejos para reproducir experimentalmente la enfermedad en ganado vacuno. Además, recientemente, en un estudio llevado a cabo en Grecia en rebaños ovinos y caprinos infectados de paratuberculosis, Florou *et al.*, (2008) encontraron que la cepa de *Map* aislada más frecuentemente entre estos animales coincidía con aquella aislada de cuatro diferentes especies salvajes monogástricas que coexistían con estos rebaños (ratas, ratones, zorros y liebres). Por ello, los autores avisan del riesgo de transmisión interespecie de *Map*, sobre todo en zonas de pastos donde el ganado puede entrar fácilmente en contacto con

animales silvestres y/o sus heces. Coincidiendo con estos resultados, en el Reino Unido se encontró una relación significativa entre diferentes áreas de Escocia con problemas de paratuberculosis bovina y la detección de *Map* en conejos silvestres compartiendo los mismos terrenos y pastos, sugiriendo que una misma cepa podría estar afectando ambas especies (Greig *et al.*, 1999). En un estudio a gran escala realizado recientemente en colaboración entre diversos grupos europeos de investigación en paratuberculosis, se identificaron mediante diversas técnicas moleculares los mismos genotipos de *Map* entre diferentes hospedadores silvestres y domésticos conviviendo en el mismo hábitat, apoyando sólidamente la teoría de transmisión interespecie (Stevenson *et al.*, 2009)

Por otro lado, también debe considerarse el riesgo de transmisión que existe entre los rumiantes salvajes y el ganado doméstico. En este sentido, de Lisle *et al.*, (1993) aislaron cepas ovinas y bovinas a partir de tejidos intestinales de ciervos en Nueva Zelanda. También se detectó la presencia de *Map* en ciervos silvestres que estaban en contacto con el ganado en Europa (Pavlik *et al.*, 1999a) y EEUU (Riemann *et al.*, 1979). En cambio, Whittington *et al.*, (2001b) demostraron mediante técnicas moleculares que las cepas que infectaban al ganado vacuno y a los bisontes eran diferentes. Por ello, aún se requieren más estudios para estimar el impacto y riesgo epidemiológico real que suponen estas especies para el ganado bovino, ovino y caprino (Kennedy y Benedictus, 2001; Florou *et al.*, 2008).

Por otro lado, a pesar de que los casos de infección natural de paratuberculosis parecen haberse descrito con mayor frecuencia en determinadas razas (Withers, 1959; Julian, 1975), otros autores opinan que en realidad no existe mayor o menor resistencia a esta enfermedad entre las diferentes razas, sino más bien un manejo diferente según el tipo de explotación, que puede favorecer en mayor o menor medida la diseminación y la transmisión de *Map* entre los animales (Chiodini *et al.*, 1984a; Kennedy y Benedictus, 2001)

II.1.2.2. Transmisión.

La principal vía de contagio entre animales es la fecal-oral, a través de la ingestión de bacilos en el agua, leche o cualquier alimento contaminado por las heces de los animales infectados. Por ello, la infección tiene lugar predominantemente en

animales lactantes, en sus primeros días de vida, cuando maman de las ubres manchadas por las heces infectadas de su propia madre o de otras (Chiodini *et al.*, 1984a; Juste y Adúriz, 1990a; Clarke, 1997; Barkema *et al.*, 2009). Además, las crías también pueden contagiarse a través de la ingestión de calostro contaminado con *Map* (Lambeth *et al.*, 2004). La leche secretada por una madre clínicamente enferma también puede ser una fuente de infección por sí sola, debido a que se ha descrito la excreción del bacilo por esta vía en varias ocasiones (Hole, 1958; Taylor *et al.*, 1981). Obviamente, la contaminación fecal de dicha leche aumentaría el riesgo de infección (Julian, 1975)

Esta vía de transmisión fecal-oral adquiere especial importancia en aquellas explotaciones con mala higiene en las instalaciones ganaderas o con una alta prevalencia de paratuberculosis, teniendo en cuenta que la cantidad de bacilos excretados es particularmente elevada en los casos clínicos, pudiendo alcanzar los 5.10^{12} micobacterias eliminadas por día (Chiodini *et al.*, 1984a). Además, cualquier terreno, pasto o suelo contaminados con *Map* también se pueden convertir en posibles fuentes de transmisión del bacilo (Taylor *et al.*, 1981; Chiodini *et al.*, 1984a).

A pesar de que la transmisión horizontal fecal-oral sea la más frecuente, también existe el riesgo de transmisión vertical por vía transplacentaria, al haberse aislado *Map* en tejidos del tracto reproductor así como en fetos de animales enfermos clínicos de paratuberculosis (Kopecky *et al.*, 1967; Larsen y Kopecky, 1970; Seitz *et al.*, 1989; Whittington y Windsor, 2009). Se estima que aproximadamente del 10% de las vacas infectadas subclínicamente nacen fetos infectados, porcentaje que se incrementa hasta casi el 50% en el caso de animales enfermos clínicos (Sweeney, 1996; Kennedy y Benedictus, 2001)

A la hora de establecer las medidas de manejo higiénico-sanitarias en las explotaciones, también cabe considerar otras posibles vías de contagio, si bien no se les atribuye una importancia tan grande como las mencionadas anteriormente. Entre ellas, se encuentran el semen de toros infectados clínica o subclínicamente (Larsen *et al.*, 1981; Ayele *et al.*, 2004), infecciones concomitantes con parásitos gastrointestinales (Whittington *et al.*, 2001a) o por diversas especies de moscas (Fisher *et al.*, 2001), larvas de cucarachas (Fisher *et al.*, 2003) o escarabajos (Fisher *et al.*, 2004).

II.1.2.3. Distribución y prevalencia.

A pesar de ser una enfermedad de distribución mundial, la prevalencia de la paratuberculosis varía de un país a otro (Chiodini *et al.*, 1984a). Las grandes diferencias en las metodologías empleadas para llevar a cabo las encuestas de prevalencias de esta enfermedad en las diferentes regiones, han complicado enormemente la posibilidad de realizar un seguimiento de la extensión real de la paratuberculosis en el mundo. Recientemente, Nielsen y Toft (2009) elaboraron una revisión de los trabajos realizados desde 1990 hasta el momento para estimar la prevalencia de la paratuberculosis bovina, ovina y caprina en Europa, cuyos resultados vienen detallados en las tablas II.2 y II.3. Para calcular la prevalencia aparente, los autores consideraron el número de rebaños detectados como positivos del total de rebaños analizados para cada país, teniendo en cuenta que la prueba de diagnóstico de referencia para considerar un rebaño “positivo” podía variar desde un ELISA, cultivo de heces y de tejidos, o PCR, según el estudio. En el ganado vacuno, la mayoría de los países europeos analizados presentaron más del 50% de rebaños afectados de paratuberculosis (Tabla II.2). En pequeños rumiantes, dicha prevalencia superó el 20% en países como España y Suiza (Tabla II.3). No obstante, los autores no pudieron sacar conclusiones en cuanto a la incidencia real de esta enfermedad en Europa, al recordar que los estudios de prevalencia descritos en la literatura han sido muy escasos y difíciles de comparar (Nielsen y Toft, 2009).

En España, la enfermedad parece estar ampliamente distribuida en el ganado vacuno (Corpa *et al.*, 1998); no obstante, son escasas las citas bibliográficas referentes al diagnóstico de esta enfermedad en todo el país. Juste *et al.*, (2000b) encontraron una prevalencia individual del 30% en 201 vacas sacrificadas en mataderos de la Comunidad Autónoma del País Vasco. En este caso, se empleó una combinación de varias pruebas diagnósticas para detectar los animales positivos, incluyendo cultivo de válvula ileocecal, nódulos ileocecales y heces, histopatología, ELISA y PCR a partir de muestras de tejido. Posteriormente, Sevilla *et al.*, (2002) realizaron una encuesta para determinar la prevalencia de esta enfermedad mediante PCR en muestras de leche procedentes de ganado vacuno de toda España, así como un segundo estudio a partir de muestras remitidas únicamente del Norte de España, incluyendo explotaciones de Galicia, Asturias, Cantabria, País Vasco así como de Navarra. La prevalencia a nivel

nacional fue del 10%, mientras que considerando únicamente las comunidades del Norte, ésta fue del 8%. Sin embargo, según los autores, estos resultados podrían estar subestimados debido al limitado tamaño de la muestra y la sensibilidad de la técnica (Sevilla *et al.*, 2002). Por otro lado, recientemente, se estimó que cerca del 50% de los rebaños vacunos de la montaña leonesa presentaban al menos un animal infectado con paratuberculosis, en un estudio llevado a cabo en animales sacrificados en matadero entre 2001 y 2008, basándose en el estudio histopatológico, los resultados de la tinción de ZN, la técnica inmunohistoquímica frente a *Map*, y la PCR a partir de tejidos incluidos en parafina (Pérez *et al.*, 2009). En Asturias, una encuesta realizada sobre 134 vacas sacrificadas en matadero arrojó una prevalencia del 28,35% mediante las mismas pruebas diagnósticas (Balseiro *et al.*, 2003). Las grandes diferencias encontradas en función de la metodología empleada se reflejan también en el estudio de Vázquez *et al.*, (2009), quienes encontraron una prevalencia del 8,3%, 18,7% y 20% en una encuesta llevada a cabo entre 2007-2008 en vacas sacrificadas en 2 mataderos del País Vasco, empleando como pruebas diagnósticas el ELISA, el cultivo de tejido y la PCR a tiempo real, respectivamente.

En cuanto al ganado ovino, se encontró que un 46,7% de los más de 150 rebaños ovinos estudiados estaban infectados de paratuberculosis en Aragón, tal y como se diagnosticó mediante la combinación de técnicas bacteriológicas, anatomopatológicas y serológicas (Juste *et al.*, 1991a). Además, entre 1981 y 1993, se detectaron prevalencias del 10,8% y 25,5% en animales remitidos a un servicio de diagnóstico, por cualquier causa, procedentes de 638 rebaños ovinos y 86 caprinos, respectivamente, procedentes principalmente de Aragón, pero también en menor medida de Soria, La Rioja, Álava, Navarra, Castellón, Tarragona y Barcelona (García-Marín *et al.*, 1994). Por otro lado, en la provincia de León se detectó un 24,3% de ovinos de desecho con lesiones compatibles con paratuberculosis (González, 1998). En el ganado caprino, mediante ELISA y empleando dos antígenos diferentes, se detectaron prevalencias individuales del 42%, 13% y 0,5%, respectivamente, en Huelva, Córdoba y las Islas Canarias (Molina *et al.*, 1991).

País	Región	Años	P.A.	Referencias
Alemania	Sajonia	2002-2004	42%	Donat <i>et al.</i> , 2005
Bélgica	todas	1997-1998	18%	Boelaert <i>et al.</i> , 2000
Dinamarca	todas	1998	55%	Nielsen <i>et al.</i> , 2000
Eslovenia	todas	1997-2001	3-12%	Ocepek <i>et al.</i> , 1999, 2002
España	todas	Desconocido	10%	Sevilla <i>et al.</i> , 2002
España	Norte	Desconocido	8%	Sevilla <i>et al.</i> , 2002
Francia	Yonne	1998-1999	68%	Petit (2001)
Holanda	todas	1998	54%	Muskens <i>et al.</i> , 2000
Italia	Lazio	Desconocido	42%	Lillini <i>et al.</i> , 2005
Italia	Veneto	2000-2001	65%	Robbi <i>et al.</i> , 2002
Italia	Verona	1997-1998	7%	Vicenzoni <i>et al.</i> , 1999
Noruega	todas	2002	10%	Mork <i>et al.</i> , 2003
Reino-Unido	Inglaterra y áreas cercanas a Gales	1995	17%	Cetinkaya <i>et al.</i> , 1998
República de Irlanda	todas	2000-2001	13%	O'Reilly <i>et al.</i> , 2004
Suecia	todas	2000-2001	0%	Sternberg y Viske, 2003
Suiza	Noreste, Centro y Noroeste	2000-2001	22%	Stephan <i>et al.</i> , 2002
Suiza	todas	1993-2001	8-20%	Stärk <i>et al.</i> , 1997; Corti y Stephan, 2002
Suiza	Desconocida	2005	3%	Bosshard <i>et al.</i> , 2006
Turquía	Desconocida	Desconocido	38%	Atala y Akcay, 2001

Tabla II.2. Resumen de las prevalencias aparentes (P.A.) de paratuberculosis en los rebaños bovinos en Europa. Tomado de Nielsen y Toft (2009).

Especie	País	Región	Años	P.A.	Referencias
Cabra	España	Ávila	1996	52%	Reviriego <i>et al.</i> , 2000
Cabra	Grecia	Islas Espóradadas	Desconocido	0%	Minas <i>et al.</i> , 1994
Cabra	Reino- Unido	Inglaterra, Gales, Irlanda del Norte	1998	1%	Grant <i>et al.</i> , 2001
Cabra	Suiza	todas	2002	23%	Muehlherr <i>et al.</i> , 2003
Rebaño mixto ovejas y cabras	Eslovenia	todas	2000-2001	12%	Ocepek <i>et al.</i> , 2002
Rebaño mixto ovejas y cabras	Portugal	Lisboa	Desconocido	27%	Mendes <i>et al.</i> , 2004
Oveja	España	Ávila	1996	29	Reviriego <i>et al.</i> , 2000
Oveja	Grecia	Islas Espóradadas	Desconocido	0%	Minas <i>et al.</i> , 1994
Oveja	Reino- Unido	Inglaterra, Gales, Irlanda del Norte	1998	0%	Grant <i>et al.</i> , 2001
Oveja	Suiza	todas	2002	24%	Muehlherr <i>et al.</i> , 2003

Tabla II.3. Resumen de las prevalencias aparentes (P.A.) de paratuberculosis en los rebaños ovinos y caprinos en Europa. Tomado de Nielsen y Toft (2009).

II.2 INFECCIONES EXPERIMENTALES

La realización de infecciones experimentales con *Map* ha sido uno de los procedimientos más utilizados por diferentes grupos de investigación para el estudio de la paratuberculosis, especialmente la patogenia, respuesta inmune, diagnóstico y ensayos de eficacia vacunal. Las infecciones naturales no permiten determinar el momento exacto en el que los animales entran en contacto con *Map*, ni tampoco controlar la cantidad de micobacterias ingeridas capaz de causarles la enfermedad. El estudio de la administración experimental de *Map* permite vigilar estos aspectos. No obstante, las infecciones experimentales con *Map* también tienen grandes inconvenientes, como son el largo período de incubación hasta que el animal empieza a desarrollar la enfermedad (Chiodini *et al.*, 1984a), haciendo que cada experiencia tenga

que ser de larga duración si se quieren estudiar las fases clínicas, pero sobre todo la enorme variabilidad que existe hoy en día en los modelos experimentales. Esta falta de estandarización impide comparar de manera objetiva los datos obtenidos entre experimentos, y explica de alguna manera los resultados tan dispares conseguidos en determinados estudios experimentales, con tasas de éxito en la infección variando desde el 0% (Thorel *et al.*, 1992; Reddacliff y Whittington, 2003; Begg *et al.*, 2005) hasta el 100% (Rankin, 1961b; Van Kruiningen *et al.*, 1986; Sweeney *et al.*, 2006; Reyes, 2007; Verna *et al.*, 2007).

Hay numerosos factores críticos que influyen en lograr el éxito de una infección experimental, entre ellos el tipo de inóculo a emplear, el método de cuantificación de dicho inóculo, la ruta de administración y la dosis óptima, así como la selección adecuada de los animales. Por ello, en el 2007, un comité internacional constituido por diversos grupos expertos en paratuberculosis se reunió para tratar de establecer una “guía estándar” sobre el desarrollo de infecciones experimentales con *Map* que pudiera generalizarse a nivel internacional, sugiriendo algunos de los parámetros esenciales para el correcto diseño de modelos experimentales tanto en bovinos, caprinos, ovinos, cérvidos y animales de laboratorio (Hines II *et al.*, 2007). Un año más tarde, Begg y Whittington también hicieron un repaso de los diferentes modelos experimentales empleados por diversos grupos en estas mismas especies, coincidiendo con el estudio anterior en la necesidad de encontrar un modelo que pueda reproducirse de manera fiable (Begg y Whittington, 2008). A continuación se revisarán los conocimientos que existen sobre algunos de los principales parámetros que influyen en el desarrollo de una infección experimental con *Map*, como la edad de los animales o el tipo y dosis del inóculo infectante, con especial atención a la especie ovina.

II.2.1. EDAD DE LOS ANIMALES Y RESISTENCIA A LA INFECCIÓN

Uno de los factores claves para el establecimiento de la infección por *Map* en un experimento es la **edad de los animales** en el momento de entrar en contacto con *Map* (Doyle, 1956; Rankin, 1959; Bendixen, 1978; Hines II *et al.*, 2007; Begg y Whittington, 2008). Por ello, se realizaron varios trabajos sobre la **resistencia a la infección paratuberculosa con la edad** en la especie bovina, si bien sólo fueron llevados a cabo

escasos estudios a lo largo de un período de 40 años, (Hagan, 1938; Taylor, 1953a; Doyle, 1953, 1956; Rankin, 1959, 1961a, 1962; Larsen *et al.*, 1975a), y desde entonces, muy pocos trabajos han vuelto a realizarse en esta especie para ampliar los conocimientos acerca de este aspecto de la patogenia (Sweeney *et al.*, 1992; Sweeney, 1996; Helgerson *et al.*, 2006), no esclarecido por completo a pesar de constituir una gran preocupación en la actualidad, al estar directamente relacionado con medidas de control de la paratuberculosis basadas en la separación de animales jóvenes de adultos, en rebaños con paratuberculosis. La resistencia a la infección paratuberculosa ha sido poco estudiada en otras especies (Hines II *et al.*, 2007), entre ellas la ovina, lo que constituye uno de los objetivos principales de esta Tesis Doctoral. Por ello este apartado de la revisión bibliográfica se centrará principalmente en esta cuestión. Las principales infecciones experimentales mencionadas a continuación en este apartado y asociadas a la sensibilidad al contagio por *Map* con la edad aparecen resumidas en la tabla II.4, basándose en los esquemas realizados por Hines *et al.*, 2007; Begg y Whittington, 2008 y Windsor y Whittington, 2010.

Tradicionalmente, se asume que los animales se infectan en edades tempranas, sin embargo, debido al curso crónico de la paratuberculosis, los signos clínicos no aparecen hasta transcurrido un largo período de incubación, cuando el animal infectado ya es adulto (Chiodini *et al.*, 1984a; Clarke, 1997). No obstante, la posibilidad de que el propio animal adulto pueda infectarse, sin haber tenido contacto previo con *Map*, ya ha sido debatida en la literatura a principios del siglo XX en la paratuberculosis bovina. Así, Meyer (1913) y M'Fadyean y Sheather (1916) fueron los primeros en mencionar el concepto de “resistencia” y relacionarlo con la “edad avanzada”, al sugerir que los terneros más jóvenes eran más sensibles a la infección por *Map* que otros mayores. Coincidiendo con estos autores, Hagan (1938), en un rebaño experimental con paratuberculosis mantenido y controlado durante 11 años, observó que ningún ternero introducido en el rebaño con más de 4 meses de edad había contraído la infección de forma natural. Además, ninguna de las vacas adultas mayores de 2 años infectadas experimentalmente con elevadas dosis de inóculo intestinal en este mismo estudio llegó a presentar lesiones compatibles con *Map*, contrariamente a los terneros infectados de la misma manera con menos de un año de edad (Tabla II.4). Estos resultados pusieron en evidencia un fenómeno de tolerancia conforme incrementaba la edad del animal. En otro estudio experimental, Taylor (1953a) llegó a la conclusión, tras infectar 12 terneros

de diferentes edades con un inóculo de 100 mg de una cepa de *Map*, que el período de mayor susceptibilidad al padecimiento de la infección en esta especie estaba comprendido dentro de los 3 primeros meses de vida, observando una mayor resistencia en los 4 terneros infectados con 6 meses de edad, tanto por vía oral como intravenosa. El autor llegó a esta conclusión tras comprobar que ninguno de estos 4 animales mantenidos en el experimento durante 2 a 3 años presentó signos de infección en base al estudio histológico y bacteriológico, salvo uno de ellos en el que se aislaron dos colonias de *Map* en el cultivo del nódulo linfático mesentérico. En cambio, 7 de los 8 terneros infectados al nacimiento y con 3 meses de edad mostraron lesiones macroscópicas, 4 de ellos incluso presentando signos clínicos (Tabla II.4). En base a estos resultados, Taylor sugirió que los terneros mayores de 6 meses de edad eran resistentes a la infección. Posteriormente, con el fin de comprobar estos resultados en un mayor número de animales, Rankin llevó a cabo una serie de cuatro experimentos en los que demostró, por un lado, que vacas de 3 años de edad inoculadas por vía endovenosa con una cepa aislada de un caso clínico del estudio de Taylor (1953a), tenían una mayor probabilidad de supervivencia que 6 terneros infectados con un mes de edad mediante la misma cepa. En efecto, Rankin comprobó que tras 4 años de experimento, una sola vaca de las 6 infectadas presentó un leve engrosamiento del íleon, con presencia de alguna célula gigante y epitelioides en el examen microscópico, frente a 4 de los 6 terneros con lesiones macroscópicas e histológicas compatibles con paratuberculosis. No obstante, se aisló *Map* de al menos un tejido de cada vaca mediante cultivo, si bien la detección fue mayor y más frecuente en el tejido intestinal y nódulos linfáticos de los terneros (Rankin, 1958a, 1961a) (Tabla II.4). Por otro lado, tras exponer 9 terneros de edades comprendidas entre 1 semana y 6 meses así como 7 vacas adultas en un rebaño en el que se fue manteniendo la infección mediante la introducción constante de animales infectados a lo largo de 4 años, el mismo autor observó igualmente que los animales adultos fueron más resistentes a *Map*, con una sola vaca presentando lesiones leves de paratuberculosis, frente a 6 de los 9 terneros, 4 de ellos convirtiéndose en casos clínicos. Sin embargo, nuevamente, se pudo demostrar la colonización de *Map* del sistema linfático de los animales adultos mediante cultivo, a pesar de no haberse detectado lesiones en el estudio histológico. No obstante, se aisló un mayor número de colonias de *Map* en tejidos de los terneros y de la vaca infectada histológicamente (Rankin, 1961b, 1962). Otro hallazgo interesante de este estudio consistió en que precisamente 2 de los animales con signos clínicos fueron terneros expuestos a *Map* con 6 meses de edad,

contradiendo la teoría de Taylor por la que bovinos de esta edad no podían enfermar de paratuberculosis.

Otros ensayos experimentales proporcionaron diferentes resultados a la hora de inocular *Map* en animales adultos, cuestionando la hipótesis previamente sugerida por la que el ganado vacuno adulto se volvía resistente a *Map* cuando la infección tenía lugar después de los 4 meses de edad. Así, se demostró que bovinos inoculados por vía oral con más de 5 años de edad también podían llegar a contraer la infección (Doyle, 1953; Larsen *et al.*, 1975a) (Tabla II.4). Sin embargo, en ambos estudios los animales recibieron dosis elevadas de *Map* (20 mg de raspados de mucosa intestinal, obtenidos a partir de 6 animales clínicamente afectados de paratuberculosis, así como 180 mg de peso húmedo de una cepa de *Map* recientemente aislada, respectivamente). Además, según Doyle (1953), las 2 vacas mayores de 5 años de edad detectadas como infectadas por *Map* mediante frotis intestinales, cultivo de tejido intestinal y estudio histopatológico, probablemente no hubieran llegado a convertirse en casos clínicos en el caso de alargarse el experimento más de los 26 meses, sino que se hubieran recuperado de la infección, basándose en el buen estado de ambos animales.

Para tratar de explicar esta mayor capacidad de recuperación que parecen demostrar los animales adultos así como la mayor eficacia para reaccionar frente a *Map*, Payne y Rankin (1961a), y posteriormente Larsen *et al.*, (1975a), compararon los diferentes mecanismos patogénicos implicados en la infección por *Map* en bovinos adultos frente a animales jóvenes (Tabla II.4). De esta manera, el grupo de investigación de Payne y Rankin demostró histológica y bacteriológicamente que *Map* era capaz de penetrar en el tejido de vacas inoculadas oralmente con 3 años de edad, al observar lesiones en 7 de 8 animales, caracterizadas por la presencia de células gigantes y epitelioides en tonsilas, mucosa intestinal y en nódulos linfáticos ileocecales, así como la detección de escasos BAAR. Además, aislaron el agente mediante cultivo en el nódulo retrofaríngeo de una de las vacas a los 4 meses posinfección. Por otro lado, los autores llegaron a la conclusión de que las vacas adultas tenían la capacidad de controlar el progreso de la infección con el tiempo, al observar que sus lesiones se iban haciendo cada vez más leves y difíciles de detectar a lo largo del experimento, mientras que las de los 8 terneros menores de 3 meses infectados de la misma manera se volvían más difusas y severas. Así, las lesiones en las vacas a los 4 y 6 meses posinfección fueron

escasas, muy delimitadas del tejido adyacente, en ocasiones caracterizadas por la mera presencia de alguna célula gigante degenerada, y con ausencia de BAAR, mientras que en los terneros el infiltrado inflamatorio formaba agregados difusos en la mucosa intestinal, los nódulos linfáticos mesentéricos o retrofaríngeos, con algunos bacilos en relación con estas lesiones. Payne y Rankin consideraron en este estudio que tales diferencias en cuanto a la sensibilidad a *Map* entre adultos y jóvenes podían estar ocasionadas por una respuesta inmune celular diferente (Payne y Rankin, 1961a). De la misma manera, tras infectar por vía oral 2 terneros de 1 mes de edad, 4 de 9 meses así como 4 vacas de entre 5 y 11 años y sacrificarlos a los 150 dpi, Larsen *et al.*, (1975a) observaron que, si bien los animales adultos no fueron capaces de destruir todos los bacilos, al encontrarse lesiones granulomatosas y detectarse colonias de *Map* mediante cultivo en intestino y nódulos linfáticos mesentéricos de 2 de las 4 vacas, éstas sí fueron más resistentes a la infección que los terneros (Tabla II.4), tras observar que, transcurrido el mismo intervalo de tiempo (150 dpi), las lesiones fueron menos extensas y los bacilos más escasos en los animales expuestos con 9 meses y adultos que en los más jóvenes, resultados similares a los señalados por los trabajos de Payne y Rankin (1961a).

En los últimos años, otros estudios proporcionaron nuevos indicios de que los animales se volvían más resistentes a infecciones por *Map* conforme incrementaba su edad. Así, se comprobó que bovinos de 2 años de edad podían convertirse en excretores pasivos de *Map* tras la ingesta artificial de diferentes cantidades de heces procedentes de 2 vacas infectadas, sin llegar a mostrar evidencias histológicas de infección, mientras que 5 de 6 terneros mantenidos en este mismo ambiente desarrollaron paratuberculosis clínica (Sweeney *et al.*, 1992; Sweeney, 1996). Para estos autores, la excreción de *Map* por parte de los animales adultos era pasiva, basándose en el hecho de que no encontraron lesiones tras su estudio histológico, aunque sí aislaron la micobacteria de la mucosa ileal de cada animal mediante cultivo, por lo que no puede descartarse que estos animales adultos llegaran a infectarse por la ingesta de heces contaminadas. Por otro lado, Helgerson *et al.*, (2006) comprobaron la capacidad de 10 novillas de 2 años de tolerar la exposición a *Map*, tras ser introducidas en un rebaño con paratuberculosis y finalmente aislarse el agente mediante cultivo en tan solo uno de los animales después de 36 meses.

Recientemente, en un intento de determinar el momento crítico en el que se podía considerar un animal “fuera” del período de mayor riesgo de transmisión de *Map*, Windsor y Whittington (2010) establecieron 3 diferentes rangos de edades en los que varios bovinos habían sido expuestos experimentalmente a *Map*, basándose en los diferentes estudios repasados en este apartado, encontrando que el 75% de los terneros infectados con menos de 6 meses de edad habían acabado con lesiones compatibles con una infección por *Map*, frente al 50% de los terneros expuestos entre los 6 y 12 meses, y menos del 20% de aquellos infectados con más de un año de edad. Teniendo en cuenta estos resultados, estos autores recomiendan, para el control de la infección, reducir la exposición al agente al menos durante el primer año de vida. Este análisis confirma por un lado que los bovinos adultos pueden infectarse por *Map*, sin bien, también afianza la teoría por la que éstos adquieren una mayor capacidad de defensa y resistencia con la edad. No obstante, los autores reconocen que aún queda por determinar cuales son los factores de riesgo o los mecanismos inmunes responsables de que una simple exposición a *Map* pueda resultar tanto en una infección, enfermedad, como en la propia recuperación del animal y regresión de sus lesiones.

Se han llevado a cabo muy pocos estudios para comprobar la mayor resistencia o sensibilidad a infecciones por *Map* con la edad en otras especies. McEwen (1939) y Levi (1948) fueron los primeros en constatar que tanto ovejas adultas como cabras de 12-18 meses, respectivamente, eran menos propensas a infectarse por *Map* que individuos más jóvenes (Tabla II.4). Ambas infecciones experimentales fueron realizadas a partir de inóculos procedentes de intestinos infectados, administrados por vía oral. Sin embargo, en ambos ensayos, el número de animales estudiado quizás no fue lo suficientemente representativo, tratándose únicamente de 8 ovejas en el caso de Mc Ewen (1939), y tan sólo 6 cabras, 4 de ellas infectadas y 2 controles, en el caso de Levi (1948). Además, no se especificó la edad de las ovejas adultas, y las cabras empleadas en el estudio no alcanzaron los 2 años de edad en el momento de la infección, por lo que no se pudo comprobar si animales mayores podían infectarse. Por otro lado, a pesar de que ninguna de las ovejas contrajo la infección, ni tampoco las 2 cabras mantenidas hasta el final del experimento (14 meses) se convirtieron en casos clínicos, los autores no especifican si se llegó a aislar el agente mediante alguna técnica, ni tampoco si se observó alguna lesión macroscópica o histológica compatible con una infección por *Map*. Desde entonces, muy poca información ha vuelto a publicarse en

estas especies. Rast y Whittington (2005), recientemente, pusieron en evidencia la mayor resistencia asociada a la edad, al comprobar que ovejas adultas expuestas constantemente a *Map* en un rebaño infectado de paratuberculosis, no excretaron el agente en heces a lo largo del estudio, mientras que animales introducidos al rebaño y expuestos con menos de un año de edad sí se convirtieron en excretores de *Map* desde los 5 años de vida. Sin embargo, los mecanismos responsables de esa resistencia en adultos, así como el tipo de lesiones que podrían originarse en ovinos o caprinos adultos no ha sido estudiado hasta el momento y sigue siendo una incógnita (Hines *et al.*, 2007).

El estudio más reciente y detallado sobre este tema, donde se utilizó un amplio número de animales y en el que se trató de relacionar los tipos de lesiones inducidas con la respuesta inmune celular y humoral, así como con la detección de *Map* en heces y tejidos, ha sido llevado a cabo en cérvidos (Mackintosh *et al.*, 2010). Tras infectar 30 ciervos de 3 meses de edad, 20 de 15 meses y otros 20 adultos de entre 10-12 años mediante la administración por vía oral de 10^9 UFC de una cepa bovina de *Map*, los autores constataron una clara relación entre la edad de infección y la susceptibilidad a esta bacteria, encontrando casos clínicos de paratuberculosis únicamente dentro del grupo de los animales infectados con 3 meses de edad (Tabla II.4). Además, el resultado del aislamiento de *Map* en heces a las 24 semanas posinfección fue significativamente diferente entre los 3 grupos de edades, con un ratio de 13:6:1 para los ciervos infectados con 3, 15 meses y adultos, respectivamente. Así mismo, el hallazgo de lesiones en los animales infectados subclínicamente siguió la misma tendencia en los 3 grupos. No obstante, es de destacar en este estudio que 2 de los ciervos infectados con 10-12 años desarrollaron lesiones leves de paratuberculosis, y además se aisló *Map* mediante cultivo en los nódulos linfáticos ileocecales y yeyunales de 18 de los 20 animales adultos a las 50 semanas posinfección, confirmando por tanto la posibilidad de ciervos adultos de infectarse con *Map*.

Diseño experimental:							Resultados del experimento:				
Referencia	Edad en la inoculación	Nº de animales	Ruta de infección	Inóculo empleado	Dosis	Duración del estudio	Signos clínicos	Cultivo heces	Cultivo tejidos	Histopatología	Respuesta inmune
Hagan (1938)	< 1 año	9	Oral	Mucosa intestinal	20 mg, 3 veces	4 mpi-5 años	5/9	NE	NE	7/9	IDR +
	1-2 años	3	Oral	Mucosa intestinal	20 mg, 3 veces	NI	3/3	NE	NE	3/3	IDR +
	> 2 años	3	Oral	Mucosa intestinal	20 mg, 3 veces	12 mpi o más	0/3	NE	NE	0/3	IDR +
Taylor (1953a)	Nacimiento	4	Oral e iv	Cultivo	100 mg	2-3 años	3/4	4/4	4/4	4/4	IDR +
	3 meses	4	Oral e iv	Cultivo	100 mg	2-3 años	1/4	4/4	4/4	3/4	IDR +
	6 meses	4	Oral e iv	Cultivo	100 mg	2-3 años	0/4	1/4	1/4	0/4	IDR +
Doyle (1953)	17 meses - 6 años	6	Oral	Mucosa intestinal	20 gr, 3 veces	26 mpi	6/12	NE	3/12	4/12	NE
Rankin (1958a)	1 mes	6	iv	Cultivo	100 mg	4 años	4/6	6/6	6/6	4/6	NE
Rankin (1961a)	3 años	6	iv	Cultivo	100 mg	4 años	0/5	0/5	5/5	1/5	NE
Payne y Rankin (1961a)	< 3 meses	8	Oral	Cultivo	200 mg	Hasta 6 mpi	0/8	NE	6/8	7/8, lesiones más severas al final del estudio	NE
	3 años	8	Oral	Cultivo	200 mg	Hasta 6 mpi	0/8	NE	1/8	7/8, lesiones más precoces y leves	NE

Tabla II.4. Principales infecciones experimentales llevadas a cabo con el fin de estudiar la susceptibilidad a *Map* con la edad en la especie bovina^a, caprina^b y en cérvidos^c. Nº: número; iv: intravenosa; UFC: Unidad formadora de colonias; mpi: meses posinfección; spi: semanas posinfección; dpi: días posinfección; IDR: prueba de intradermorreacción; IDGA: Inmunodifusión en gel de Agar; +: Positivo; -: negativo; NI: No indicado; NE: No estudiado. Basado en Hines *et al.*, 2007; Begg y Whittington, 2008; Windsor y Whittington (2010). (continúa).

Diseño experimental:							Resultados del experimento:				
Referencia	Edad en la inoculación	Nº de animales	Ruta de infección	Inóculo empleado	Dosis	Duración del estudio	Signos clínicos	Cultivo heces	Cultivo tejidos	Histopatología	Respuesta inmune
Larsen <i>et al.</i> , 1975a	1 mes	2	Oral	Cultivo	180 mg	150 dpi	0/2	2/2	2/2	2/2, con > n° y tamaño de granulomas	IDR + (1/2 muy débil)
	9 meses	4	Oral	Cultivo	180 mg	150 dpi	0/4	3/4	1/4	3/4	IDR +
	5-11 años	4	Oral	Cultivo	180 mg	150 dpi	0/4	0/4	2/4	2/4	IDR +, (2/4 muy débil)
Sweeney <i>et al.</i> , 1992	2 años	6	Oral	Heces	Variable, desde 10 ⁶ hasta 10 ⁸ UFC	28 dpi	0/6	6/6	6/6	0/6	IDR, ELISA y IDGA -
Mc Ewen (1939) ^a	Adultos (NI)	8	Oral	Mucosa intestinal	NI	NI	0/8	NI	NI	NI	NI
Levi (1948) ^b	12-18 meses	4	Oral	Mucosa intestinal	NI	14 mpi	0/2	NI	NI	NI	NI
Mackintosh <i>et al.</i> , 2010 ^c	3 meses	30	Oral	Cultivo (cepa bovina)	10 ⁹ UFC	50 spi	10/27	13/27 (50 spi)	16/17	21/27	24/28 ELISA+ IDR +
	15 meses	20	Oral	Cultivo (cepa bovina)	10 ⁹ UFC	50 spi	0/19	4/19 (50 spi)	19/19	10/19	17/19 ELISA+ IDR +
	10-12 años	20	Oral	Cultivo (cepa bovina)	10 ⁹ UFC	50 spi	0/20	1/20 (50 spi)	18/20	2/20	4/20 ELISA+ IDR +

Tabla II.4. Principales infecciones experimentales llevadas a cabo con el fin de estudiar la susceptibilidad a *Map* con la edad en la especie bovina, ovina^a, caprina^b y en cérvidos^c. Nº: número; iv: intravenosa; UFC: Unidad formadora de colonias; mpi: meses posinfección; spi: semanas posinfección; dpi: días posinfección; IDR: prueba de intradermorreacción; IDGA: Inmunodifusión en gel de Agar; +: Positivo; -: negativo; NI: No indicado; NE: No estudiado. Basado en Hines *et al.*, 2007; Begg y Whittington, 2008; Windsor y Whittington (2010) (continuación).

II.2.2. TIPO DE CEPA.

Por otro lado, el **origen de la cepa de *Map*** empleada en los diseños experimentales también parece contribuir al desenlace de la infección. Se han realizado varios experimentos con corderos infectados con cepas aisladas de bovinos (Brotherston *et al.*, 1961a; Kluge *et al.*, 1968; Juste *et al.*, 1994; Stewart *et al.*, 2004; Verna *et al.*, 2007), ciervos (Burrells *et al.*, 1995; Begara-McGorum *et al.*, 1997, 1998; Beard *et al.*, 2000) o propios ovinos (Gwozdz *et al.*, 2000a, 2001; Gwozdz y Thompson, 2002; Reddacliff y Whittington, 2003; Kurade *et al.*, 2004; Stewart *et al.*, 2004; Verna *et al.*, 2007; Kurade y Tripathi, 2008), algunos de ellos resultando en el establecimiento de la infección con éxito, pero otros en los que la tasa de animales infectados se vio reducida. Sin embargo, la mayoría de estos estudios no especifican el genotipo específico de la cepa empleada en el experimento, dificultando el análisis de la mayor susceptibilidad de un hospedador a un tipo u otro.

En los últimos años, los avances en biología molecular han facilitado la distinción entre cepas de *Map* de tipo ovino, bovino o de bisonte (Marsh *et al.*, 1998; Whittington *et al.*, 2000b, 2001a; Sevilla *et al.*, 2005), lo que ha permitido a algunos grupos de investigación comparar el efecto de estas cepas (principalmente las bovinas y ovinas) tanto en ovinos (Stewart *et al.*, 2004; Verna *et al.*, 2007), bovinos (Stewart *et al.*, 2007), caprinos (Stewart *et al.*, 2006), o incluso cérvidos (O'Brien *et al.*, 2006; Mackintosh *et al.*, 2007). Así, Stewart *et al.*, (2004, 2006 y 2007) demostraron en una serie de tres experimentos que tanto ovinos, caprinos como bovinos podían infectarse con cepas caracterizadas como “ovinas” y “bovinas” de *Map*, si bien el efecto de dichas cepas era diferente según el hospedador. De esta manera, tras infectar 5 vacas Holstein-Friesian, 5 ovejas Merinas y 5 cabras Angora con las mismas cepas cultivadas en laboratorio aisladas de la válvula ileocecal de un caso clínico ovino y otro bovino, posteriormente tipadas como cepas “ovina” (S) y “bovina” (C), respectivamente, y otros 5 animales de cada especie con cepas procedentes de raspados de mucosa intestinal de casos clínicos de ovejas y vacas con paratuberculosis, también tipificadas posteriormente como cepas “S” y “C”, respectivamente, los autores confirmaron que las tres especies eran susceptibles a ambas cepas, al haberse evidenciado signos de infección en los tres casos, si bien las vacas fueron más resistentes que las ovejas, y las

cabras resultaron las más sensibles (Stewart *et al.*, 2004, 2006 y 2007). Ninguna vaca se convirtió en caso clínico durante la duración del experimento (35-54 meses), mientras que 2 ovejas (infectadas con las cepa S y C) y 7 cabras (6 infectadas con la cepa C, y 1 con la cepa S) desarrollaron la enfermedad clínica. Además, se aisló *Map* mediante cultivo de tejidos en 5 de las 10 cabras (3 infectadas con la cepa C y 2 con la cepa S), mientras que no se detectó su presencia en ninguna vaca u oveja. Analizando en detalle el tipo concreto de cepa, la “C” resultó ser más patogénica que la “S” en las tres especies estudiadas, especialmente en cabras, independientemente del origen del inóculo. Este hallazgo se evidenció en la mayor proporción de casos clínicos, individuos excretando *Map* en heces, o la mayor respuesta inmune celular y humoral que originó la cepa bovina a diferencia de la ovina. Esta serie de estudios, sin embargo, no incluye información acerca de las lesiones inducidas por cada cepa. En cambio, Verna *et al.*, (2007) estudiaron este aspecto más detalladamente, encontrando que las lesiones ocasionadas en corderos infectados por cepas ovinas eran más graves que aquellas observadas en los grupos de animales expuestos a cepas bovinas. Según Verna *et al.*, (2007) las lesiones causadas por la cepa S se localizaron principalmente en el intestino, con una distribución multifocal o más a menudo infiltrando la mucosa de manera difusa, con un infiltrado inflamatorio predominantemente macrofágico y adundantes BAAR detectables mediante ZN o IHQ. En cambio, las lesiones inducidas por las diferentes cepas bovinas empleadas en este estudio fueron más bien de tipo focal y caracterizadas por la presencia de pequeños granulomas y gran cantidad de células gigantes, recordando las lesiones descritas en infecciones naturales de paratuberculosis bovina y sugiriendo por tanto que el factor responsable del establecimiento de un tipo de lesión o otro sería en este caso la propia cepa más que el hospedador.

Otros estudios también experimentaron el efecto de una cepa caracterizada como “ovina” en un hospedador ovino, reafirmando su capacidad infectiva al aislar el agente mediante cultivos y detectar una respuesta inmune celular en respuesta a la exposición a *Map*, aunque no se observaron lesiones compatibles con paratuberculosis en los animales expuestos a dosis de 10^7 UFC de *Map* o dosis menores, si bien éstos fueron sacrificados de manera precoz, a las 14 semanas posinfección (Reddacliff y Whittington, 2003). De la misma manera, Begg *et al.*, (2005) tampoco encontraron lesiones en los corderos infectados con dosis mayores de una cepa de *Map* tipificada como ovina (10^9 UFC) a los 6 meses posinfección, aunque sí 3 y 4 meses más tarde.

Estos autores sugieren que quizás la utilización de una cepa aislada de un hospedador bovino hubiera resultado en lesiones de manera más precoz, tal y como ha sido descrito ya en otros estudios (Nisbet *et al.*, 1962; Juste *et al.*, 1994).

Se ha descrito que los cérvidos son igual de sensibles a infecciones por cepas bovinas como ovinas de *Map* (de Lisle *et al.*, 1993; Collins *et al.*, 2002; de Lisle, 2002). Sin embargo, en un experimento llevado a cabo en esta especie para determinar las características de la infección inducida por ambas cepas, se observó una mayor respuesta inmune, así como mayor tasa de detección del agente en tejido y heces de aquellos ciervos infectados con la cepa bovina que la ovina. De la misma manera, tras ser administrada la misma dosis de ambos inóculos, se apreciaron lesiones compatibles con paratuberculosis en 14 de los 16 animales infectados con la cepa bovina, frente a tan sólo 7 de los 16 expuestos a la cepa ovina (O'Brien *et al.*, 2006; Mackintosh *et al.*, 2007). Por tanto, estos resultados sugieren una mayor sensibilidad de los ciervos a cepas bovinas, lo que explicaría el aislamiento tan frecuente de dichas cepas en ciervos en granjas con casos naturales de paratuberculosis (O'Brien *et al.*, 2006) o en mataderos (de Lisle *et al.*, 2006) en Nueva Zelanda.

La mayoría de estudios experimentales realizados en la especie bovina han empleado cepas procedentes de esta misma especie (Payne y Rankin, 1961a; Larsen *et al.*, 1975a; Waters *et al.*, 2003; Muñoz *et al.*, 2006; Stabel *et al.*, 2009) y muy pocos intentos han sido llevados a cabo con cepas de distinto origen. Beard *et al.*, (2001c) describieron los efectos de una cepa de *Map* aislada en conejo silvestre e inoculada en terneros de 1-5 días, encontrando cambios histopatológicos comparables a aquellos observados en otros terneros infectados con una cepa bovina aislada de la misma granja y presentando el mismo genotipo (Greig *et al.*, 1999), con lesiones localizadas principalmente en la válvula ileocecal así como los nódulos linfáticos asociados en ambos casos. De la misma manera, también se confirmó la infección de 6 de 10 terneros inoculados con una cepa de *Map* procedente de un caso ovino (Gilmour y Angus, 1976), aunque en este caso tampoco se especificó el tipado molecular de dicha cepa. Así mismo, se comprobó la susceptibilidad de bovinos a cepas aisladas de bisonte, en un experimento en el que se infectaron tanto bisontes como terneros con cepas procedentes de ambas especies, encontrando lesiones leves en ambos grupos, aunque la colonización de tejidos fue mayor en los bisontes infectados con cepas bovinas, y en los terneros

infectados con la cepa aislada de bisontes (Stabel *et al.*, 2003). De la misma manera, la respuesta inmune celular desencadenada fue diferente en ambas especies, con una mayor producción de IFN- γ en terneros, mientras que la respuesta al test de linfoproliferación fue más elevada en los bisontes. En cualquier caso, los aislados fueron analizados mediante RFLP y resultaron ser cepas idénticas (BC-1), sugiriendo una transmisión inter-especie.

En caprinos, salvo la excepción del experimento de Stewart *et al.*, (2006) comentado anteriormente en este capítulo, en el que se comprobó la mayor patogenicidad de las cepas bovinas frente a las ovinas en esta especie, la mayoría de infecciones experimentales han utilizado cepas aisladas de la propia especie caprina (Sigurdardóttir *et al.*, 1999, 2001; Storset *et al.*, 2001), si bien los inóculos en estos estudios no fueron previamente tipados, por lo que se desconoce la mayor virulencia de una cepa u otra en cabras. Mientras que en numerosas áreas se consideran que las cepas C tienen una mayor prevalencia en la especie caprina frente a las cepas S (Thoresen y Olsaker, 1994; de Juan *et al.*, 2005; Djonne *et al.*, 2005), el grupo de investigación de Neiker en cambio encontraron una mayor extensión de estas últimas, con cerca del 74% de cepas ovinas aisladas en las cabras estudiadas en la Península Ibérica (Sevilla *et al.*, 2005, 2007). Van Kruiningen *et al.*, (1986) infectaron 4 cabras con la cepa Linda, aislada del ileon distal de un caso humano con enfermedad de Crohn, encontrando lesiones compatibles con paratuberculosis en todos los animales afectados tan pronto como a los 3 meses posinfección y comprobando así la susceptibilidad de esta especie a cepas de *Map* aisladas de humanos. No obstante, en este experimento tampoco se analizó el genotipo del inóculo, dificultando la comparación con otros experimentos.

El conjunto de estos hallazgos ponen en evidencia la variación de patogenicidad entre cepas de diferente origen en un mismo hospedador, así como la diferente virulencia que puede tener una cepa concreta de *Map* en una especie animal u otra. Todo esto tendría repercusiones en el control de la enfermedad, debiendo considerarse la importancia que pudiera tener la introducción de animales de diferentes procedencias en un mismo rebaño o la repercusión en los sistemas de rotación de pastoreo en áreas previamente contaminadas con heces procedentes de diferentes especies.

II.2.3. TIPO DE INÓCULO.

Otro de los factores que influye en el establecimiento de la infección por *Map* es el **tipo de inóculo** empleado. Los diversos estudios experimentales llevados a cabo hasta el momento han utilizado como inóculos desde heces procedentes de animales infectados (Sweeney *et al.*, 1992; Koets *et al.*, 2006), raspados de mucosa intestinal -cepas *in vivo*- (Doyle, 1953; Kluge *et al.*, 1968; Chávez, 1993; Gwozdz *et al.*, 2000a; Kurade *et al.*, 2004; Stewart *et al.*, 2004; Munjal *et al.*, 2005; Muñoz *et al.*, 2006; Stewart *et al.*, 2006; Reyes, 2007; Stewart *et al.*, 2007; Verna *et al.*, 2007; Kurade y Tripathi, 2008; de Silva *et al.*, 2010), homogeneizados de nódulos linfáticos (Begg *et al.*, 2005; O'Brien *et al.*, 2006; Mackintosh *et al.*, 2007) o más comúnmente cepas cultivadas en laboratorio -cepas *in vitro*- (Taylor, 1953a; Brotherston *et al.*, 1961a; Gilmour y Brotherston, 1962; Larsen *et al.*, 1975a; Juste, 1990; Chávez, 1993; Juste *et al.*, 1994; Begara-McGorum *et al.*, 1998; Storset *et al.*, 2001; Stewart *et al.*, 2004; Stewart *et al.*, 2006; Stewart *et al.*, 2007; Verna *et al.*, 2007; Begg *et al.*, 2009; Stabel *et al.*, 2009; Watkins *et al.*, 2010). Estas últimas son las recomendadas por Hines II *et al.*, (2007), al tratarse de cepas estandarizadas, pudiendo almacenarse suficiente cantidad y conservarse durante el tiempo necesario para poder repetir numerosos experimentos, contrariamente a los efectos desconocidos que puede tener un almacenamiento demasiado largo sobre los inóculos de tejido intestinal, así como la dificultad añadida del recuento exacto y fiable de las unidades viables de *Map* presentes en dichos inóculos (Hines II *et al.*, 2007; Begg y Whittington, 2008). Sin embargo, la virulencia de las cepas *in vitro* de *Map* pueden llegar a disminuir tras numerosos pases en cultivo. En efecto, un estudio reciente ha demostrado diferencias significativas en cuanto al perfil de expresión protéica que presentaron por un lado la cepa bovina K10, adaptada en laboratorio tras 16 sucesivos pases y por otro lado una cepa recientemente aislada del íleon de una vaca con paratuberculosis clínica tras tan sólo 5 pases. Las proteínas relacionadas con la virulencia de *Map* se expresaron en mayores cantidades en la cepa recién aislada que en la K10, sugiriendo que continuos pases de cultivo en laboratorio de una cepa de *Map* podrían afectar su capacidad infectiva (Radosevich *et al.*, 2007).

La mayor patogenicidad de los inóculos procedentes de raspados de mucosa intestinal frente a aquellas cepas de laboratorio ya ha sido descrita tanto en la especie bovina (Stewart *et al.*, 2007; Stabel *et al.*, 2009), ovina (Chávez, 1993; Stewart *et al.*,

2004; Begg *et al.*, 2005, 2009) como en la caprina (Stewart *et al.*, 2006). En la serie de experimentos llevados a cabo por el grupo de investigación de Stewart *et al.*, (2004, 2006 y 2007), los animales infectados con raspados intestinales mostraron signos de infección más graves, con un mayor número de bovinos, ovinos y caprinos excretando *Map* en heces y convirtiéndose en casos clínicos (ovinos y caprinos solamente), que aquellos infectados con dosis altas de *Map* cultivadas *in vitro* (un total de $4-8 \cdot 10^{10}$ UFC repartidas en 4 tomas, frente a 60-80 g de raspados intestinales). En el caso de las cabras, además, la seroconversión fue más precoz en aquellos animales que habían recibido el inóculo de mucosa intestinal que de cepa de laboratorio (Stewart *et al.*, 2006). Sin embargo, en estos estudios, las cepas *in vivo* no fueron aisladas del mismo rebaño que aquellas cultivadas en laboratorio, lo cual podría haber influido en la diferente virulencia observada. Además, los autores recuerdan la falta de fiabilidad del recuento en los raspados intestinales, atribuyendo así las diferencias observadas a una posible mayor dosis neta de estos últimos. Begg *et al.*, (2009), en cambio, no encontraron diferencias significativas en la proporción de corderos que mostraron enfermedad clínica o excretaron el agente en heces tras la infección, entre el grupo de animales infectados con el homogeneizado intestinal y aquellos expuestos a un cultivo puro de *Map*. No obstante, observaron que estos primeros manifestaron los signos clínicos de manera mucho más precoz, al igual que sucedió con la excreción en heces. Además, el patrón de respuesta al IFN- γ también fue diferente en ambos grupos, con un pico a los 4 meses posinfección y posterior disminución de la respuesta hasta el momento del sacrificio en los corderos expuestos al inóculo de mucosa intestinal, frente a una mayor producción de esta citoquina a los 8 meses posinfección y disminución más paulatina en el otro grupo (Begg *et al.*, 2009). En un estudio anterior, este mismo grupo de investigación también había encontrado un mayor número de corderos con lesiones compatibles con paratuberculosis y colonizados con *Map* en aquellos infectados con un homogeneizado de tejido intestinal que en el grupo de corderos que habían recibido dosis 20 veces superiores de una cepa ovina de *Map* cultivada en laboratorio (Begg *et al.*, 2005). En cambio, en este caso la respuesta inmune celular de los animales de este último grupo fue mucho más acusada y precoz que la de aquellos corderos infectados con el homogeneizado intestinal, mostrando una elevada respuesta al IFN- γ y al ensayo linfoproliferativo en las PBMC desde el mes posinfección.

De la misma manera, en terneros, se demostró la mayor eficacia de un inóculo de *Map* procedente de un raspado de mucosa intestinal frente a la cepa de laboratorio K10 en cuanto al establecimiento de la infección, al detectarse mayor cantidad de tejidos colonizados, así como al observar la excreción del agente en heces durante un periodo más prolongado en aquellos terneros infectados con la cepa de campo que la K10 (Stabel *et al.*, 2009). Curiosamente, sin embargo, este grupo de terneros no presentaron las lesiones microscópicas más graves, al observarse tan sólo lesiones limitadas a zonas de íleon y válvula ileocecal, así como pequeños focos de agregados de células epitelioides y escasas células gigantes en algunos nódulos linfáticos de uno de los 3 terneros infectados oralmente con la cepa de campo, mientras que uno de los 4 terneros infectados por la misma ruta con la cepa K10 presentó lesiones más avanzadas, expandiéndose hasta el yeyuno y ciego.

No obstante, tanto el grupo de Stewart *et al.*, (2004, 2006 y 2007) como el de Begg *et al.*, (2005, 2009) reconocen, a la hora de interpretar los resultados obtenidos, el hecho de que los inóculos aislados a partir de raspados de mucosa intestinal podrían contener asimismo un amplio rango de microorganismos intestinales influyendo en el transcurso de la infección. Además, también existe la posibilidad de que el inóculo *in vivo* empleado esté compuesto por más de una cepa de *Map*, sugiriendo entonces la presencia de infecciones mixtas en el rebaño de procedencia del aislado (Stabel *et al.*, 2009).

A diferencia de estos estudios, también se han descrito cepas de laboratorio con mayor virulencia que otras administradas como raspados de mucosa intestinal. Así, Verna *et al.*, (2007), tras infectar corderos con cepas bovinas de diferente procedencia, tanto cepas cultivadas en laboratorio aisladas en Argentina y en España como otra cepa bovina de campo, observaron lesiones en todos los animales, si bien las cepas argentinas fueron mucho más virulentas que las españolas, induciendo lesiones más graves así como una respuesta inmune más vigorosa, independientemente de que la cepa española fuera administrada *in vitro* o como raspado intestinal. Aún así, en este experimento, las lesiones más avanzadas se observaron en otro grupo de corderos, infectados con raspados de mucosa intestinal, si bien en este caso la cepa era de tipo ovino, por lo que no se puede afirmar si la mayor virulencia observada en dicho grupo se debe al hecho de tratarse de una cepa *in vivo*, o bien por el efecto de una cepa S en un hospedador ovino.

Otro hallazgo destacable en este estudio consiste en la localización predominante de las lesiones en el intestino cuando el inóculo bovino utilizado provenía de raspados de mucosa intestinal, mientras que éstas se ubicaron principalmente en los nódulos linfáticos mesentéricos cuando la cepa bovina era de laboratorio, poniendo en evidencia la influencia que tiene el tipo de inóculo sobre la reacción del hospedador.

II.2.4. DOSIS DEL INÓCULO.

Otro de los aspectos ampliamente discutido en infecciones experimentales con *Map* ha sido la **dosis óptima del inóculo**. Ésta ha de ser lo suficientemente elevada como para reproducir la infección en los animales del experimento de manera fiable, pero no demasiado excesiva, ya que podría llegar a alterar los mecanismos inmunes naturales desencadenados por la vacunación o cualquiera otra intervención que se quiera estudiar (Hines II *et al.*, 2007).

En ovinos, las dosis utilizadas han variado considerablemente entre los diferentes diseños experimentales llevados a cabo hasta hoy, originando resultados muy dispares, con el establecimiento exitoso de infecciones utilizando dosis desde 10^3 (Brotherston *et al.*, 1961a; Nisbet *et al.*, 1962) hasta 10^{10} UFC de *Map* (Kurade *et al.*, 2004; Reyes, 2007), e incluso algún estudio con dosis superiores, del orden de 10^{12} UFC (Chávez, 1993). Así, en la especie ovina, el grupo de Brotherston y Nisbet del Moredun Research Institute (Brotherston *et al.*, 1961a; Nisbet *et al.*, 1962) realizó un experimento en el que infectaron 3 grupos de corderos de 3 semanas con dosis crecientes de 10^3 , 10^6 y 10^9 UFC de una cepa bovina de *Map*, administradas en 10 tomas orales repartidas a lo largo de 10 semanas. Detectaron signos de infección por métodos bacteriológicos desde el primer mes tras la última toma en los 3 grupos, si bien el grupo infectado con la dosis mayor fue el que desarrolló la enfermedad con mayor gravedad, con un recuento de colonias viables superior tanto en nódulo linfático mesentérico como en mucosa intestinal, e incluso con dos corderos convirtiéndose en casos clínicos, tras uno y 8-9 meses posinfección, respectivamente. Otro hallazgo destacable de este estudio fue observar que el incremento de la dosis de infección de 10^3 hasta 10^6 UFC no resultó en una mayor concentración de *Map* en el tejido, obteniéndose resultados muy similares en ambos grupos (Brotherston *et al.*, 1961a). Coincidiendo con las conclusiones bacteriológicas y completando el estudio, Nisbet *et al.*, (1962) también encontraron los

mismos resultados histopatológicos, es decir, las 3 dosis empleadas en este experimento fueron capaces de inducir algún tipo de lesión, si bien éstas fueron mucho más graves en el grupo infectado con la dosis mayor (10^9 UFC), con predominio de células gigantes y extensos infiltrados macrofágicos desde el mes posinfección, frente a pequeños focos de células epitelioides en aquellos infectados con 10^3 y 10^6 UFC. Nuevamente, no se encontraron diferencias en las lesiones inducidas entre estos dos últimos grupos. Esta serie de estudios puso en evidencia por primera vez una relación entre la dosis del inóculo y la gravedad de la infección inducida. Además, se establece que una dosis tan baja como 10^3 UFC, administrada en 10 tomas, es capaz de provocar infección en el 50% de los animales (Nisbet *et al.*, 1962), si bien no es suficiente para que aparezcan casos clínicos.

Contrariamente a estos estudios, también se obtuvieron resultados diferentes al utilizar diseños experimentales muy similares. Tal fue el caso de Reddacliff y Whittington (2003), quienes, tras inocular por vía oral 3 grupos de corderos con dosis del orden de 10^2 , 10^4 y 10^8 UFC (equivalentes a dosis de 10^1 , 10^3 y 10^7 UFC, tras el recuento retrospectivo del cultivo del inóculo) bien una vez a la semana durante 3 semanas o bien durante 10 semanas, llegaron a la conclusión de que dosis inferiores a 10^4 UFC eran incapaces de inducir una infección detectable en ovinos de raza Merina. Así, únicamente aislaron *Map* en tejidos de aquellos animales infectados con la dosis más elevada. Sin embargo, en este caso no encontraron cambios histológicos compatibles con paratuberculosis en ninguno de los animales del experimento, ni siquiera en aquellos infectados con 10^8 UFC. A pesar de que este ensayo fue de duración relativamente corta (hasta 14 semanas posinfección), los autores atribuyeron esta ausencia de lesiones a otros factores independientes de la dosis empleada, como el uso de una cepa ovina de *Map*, y la raza afectada, tratándose en este caso de ovejas merinas, posiblemente más resistentes que otras razas. Posteriormente, Begg *et al.*, (2009), en uno de los 6 experimentos que llevaron a cabo, infectaron 9 corderos merinos por vía oral mediante un gradiente creciente de dosis de *Map*. Sin embargo, en este caso, tras inocular dosis de 10^4 , 10^5 y 10^7 UFC, ninguno de los 9 corderos mostró signo alguno de infección a las 15 semanas posinoculación. En este caso, una de las hipótesis sugeridas por los autores para interpretar estos resultados fue que la cepa ovina empleada, un cultivo clonado y reconstituido a partir de un stock original liofilizado,

tuviera menos virulencia que aquella empleada en el estudio de Reddacliff y Whittington (2003).

Se ha estimado que la eliminación fecal de micobacterias en ovinos clínicamente infectados puede alcanzar los $1,09 \times 10^8$ microorganismos por gramo de heces (Whittington *et al.*, 2000c), dosis 10 veces superior que la dosis más elevada empleada en los dos últimos estudios mencionados anteriormente (Reddacliff y Whittington, 2003; Begg *et al.*, 2009), por lo que éstas estarían dentro del rango de cantidades de micobacterias que pudieran ser transmitidas en una exposición natural. En contraste, la mayoría de infecciones experimentales en ovinos han empleado dosis mayores de 10^8 , e incluso mayores de 10^9 (Kluge *et al.*, 1968; Chávez, 1993; Begara-McGorum *et al.*, 1998; Gwozdz *et al.*, 2001, Gwozdz y Thompson, 2002; Kurade *et al.*, 2004; Stewart *et al.*, 2004, 2006, 2007; Begg *et al.*, 2005; Reyes, 2007; Verna *et al.*, 2007; Begg *et al.*, 2009). Con estas dosis, se ha conseguido el éxito en la infección experimental de la mayoría de los ovinos inoculados, muchos incluso convirtiéndose rápidamente en casos clínicos de paratuberculosis, lo que contrasta con los largos períodos de incubación de esta enfermedad observados en infecciones naturales (Chiodini *et al.*, 1984a), lo que sugeriría que las ovejas se infectan de forma natural con dosis menores. No obstante, el Comité Internacional reunido para crear una guía estándar sobre el correcto diseño de un modelo experimental de paratuberculosis, recomendaron en ovino el uso de 3 tomas orales de 10^9 micobacterias administradas 3 veces en 3 días consecutivos (aproximadamente 100 mg de peso húmedo/dosis, es decir un total de 300 mg) para el correcto establecimiento de una infección de larga duración (Hines II *et al.*, 2007).

En el caso de bovinos, el rango de dosis estudiado en los diversos experimentos ha sido menos amplio que en ovinos, siendo 10^6 UFC la dosis más baja descrita hasta el momento capaz de inducir una infección en 3 semanas (Sweeney *et al.*, 2006). Así, tras administrar por vía oral dos dosis consecutivas del orden de 10^6 , 10^8 y 10^9 UFC en cada grupo de una cepa bovina cultivada en laboratorio de *Map*, se comprobó la presencia del agente mediante cultivo en al menos un tejido de cada ternero infectado en los 3 grupos, si bien las colonias detectadas en el de menor dosis fueron tan escasas que los autores dedujeron que dosis menores no resultarían en una infección reproducible de manera fiable en esta especie. Por otro lado, tal y como ha sido demostrado en ovinos, el aislamiento de *Map* en tejidos fue mayor cuanto más elevada fue la dosis administrada,

siendo algunos tejidos tales como los nódulos linfáticos ileocecales, ciego y colon colonizados por la bacteria únicamente en aquellos terneros infectados con 10^9 UFC. En este caso, Hines II *et al.*, (2007), tras repasar en la literatura los modelos experimentales en los que las infecciones experimentales bovinas se desarrollaron con la mayor fiabilidad y reproducibilidad, recomendaron el uso de aproximadamente 10^9 UFC/dosis (100 mg de peso húmedo) administrados en 2 días consecutivos.

En caprinos, el rango de dosis empleado en infecciones experimentales estaba entre las 10^7 UFC (Van Kruiningen *et al.*, 1986) hasta las 10^{10} UFC de *Map* (Munjaj *et al.*, 2005; Stewart *et al.*, 2006) y desde 2,365 mg de inóculo directamente administrado en la luz intestinal (Sigurdardóttir *et al.*, 2001) hasta aproximadamente 250 mg de peso húmedo de micobacterias administrados por vía oral (Storset *et al.*, 2001; Valheim *et al.*, 2002) si bien no se ha estudiado el efecto de diferentes dosis de una cepa en un mismo experimento, tal y como se ha intentado en otras especies. Los diseños experimentales llevados a cabo en esta especie suelen concluir la mayoría de las veces en altas tasas de infección. Así, tras administrar dosis del orden de 10^7 UFC de *Map* por vía oral, Van Kruiningen *et al.*, (1986) encontraron cambios histopatológicos compatibles con paratuberculosis en todas las cabras infectadas, con lesiones aparentes ya desde los 3 meses posinfección.

Recientemente, en Nueva Zelanda se ha llevado a cabo un estudio experimental para probar la eficacia de diferentes dosis administradas por vía oral en ciervos (O'Brien *et al.*, 2006; Mackintosh *et al.*, 2007). Para ello, el diseño experimental consistió en infectar 3 grupos de 16 ciervos mediante dosis totales de 10^9 , 10^7 , y 10^3 UFC de una cepa bovina de *Map* respectivamente, así como otro grupo con 10^7 UFC de una cepa ovina, ambas administradas en 4 tomas en 4 días consecutivos y aisladas a partir de nódulos linfáticos yeyunales de un caso clínico de paratuberculosis en un ciervo y oveja, respectivamente. A la necropsia encontraron cambios histológicos en los 3 grupos infectados con la cepa bovina, si bien la gravedad de éstos fue directamente proporcional a las dosis crecientes de *Map* empleadas, con 5 animales del grupo infectado con la mayor dosis convirtiéndose en casos clínicos a los 5-9 meses posinfección y el 100% de los animales de dicho grupo con lesiones de paratuberculosis. Sin embargo, las lesiones del grupo de menor dosis fueron las más leves, afectando únicamente al 50% de los animales (Mackintosh *et al.*, 2007). Estos

resultados fueron similares en cuanto al aislamiento de *Map* en tejido de estos animales (O'Brien *et al.*, 2006) así como en la respuesta inmune celular o humoral, con el mayor número de animales seropositivos pertenecientes al grupo infectado con la mayor dosis (O'Brien *et al.*, 2006; Mackintosh *et al.*, 2007). Esta relación directa entre el grado avanzado de la infección establecida y las mayores dosis inoculadas se corresponden con lo observado en otros estudios en la especie bovina (Sweeney *et al.*, 2006) y ovina (Brotherston *et al.*, 1961a; Nisbet *et al.*, 1962). Otro hallazgo interesante fue observar que los animales infectados con la cepa ovina presentaron lesiones más leves que aquellos infectados con la misma dosis de la cepa bovina, confirmando la importancia y la influencia que tiene el tipo de cepa de *Map* para el establecimiento de una infección.

II.2.5. USO DE ANIMALES DE LABORATORIO Y OTRAS ESPECIES

Se han empleado numerosas especies de animales de laboratorio con el fin de estudiar su idoneidad en infecciones experimentales con *Map*, entre ellas los conejos (Francis, 1943; Hirsch, 1956; Collins *et al.*, 1983; Mokresh *et al.*, 1989; Mokresh y Butler, 1990; Vaughan *et al.*, 2005), ratas (Chandler, 1961a; Koets *et al.*, 2000), hamsters (Francis, 1943; Hirsch, 1956; Gilmour *et al.*, 1963; Larsen *et al.*, 1975b; Larsen y Miller, 1978), jerbos (Larsen *et al.*, 1976), cobayas (Francis, 1943; Merkal *et al.*, 1982; Collins *et al.*, 1983; Steadham *et al.*, 2002), 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 estos últimos los más utilizados, aunque no se consideran los más adecuados, al no reproducirse la enfermedad de la misma manera que lo hace en los rumiantes (Rankin, 1959; Stevenson, 2006; Begg y Whittington, 2008). No obstante, el uso de estos animales sigue siendo de interés, por su facilidad de manejo, el bajo coste de su mantenimiento, el desarrollo más rápido de la infección -acortando así la duración de los experimentos-, las características inmunológicas similares a la de los rumiantes, y, en el caso de ratones, la posibilidad de disponer de ellos con modificaciones genéticas (ratones mutantes), permitiendo así estudiar diversos aspectos de la interacción hospedador-*Map* a nivel molecular (Stevenson, 2006; Hines II *et al.*, 2007; Begg y Whittington, 2008). Por ello, el modelo experimental murino es uno de los más empleados para el desarrollo de vacunas (Scandurra *et al.*, 2010) o para analizar la implicación de determinados

genes en la mayor o menor resistencia a la infección (Tanaka *et al.*, 2000; Shin *et al.*, 2006).

Se han infectado experimentalmente estirpes de ratones mutantes, utilizando cepas de *Map* aisladas de casos bovinos de paratuberculosis (Francis *et al.*, 1943; Chandler, 1961a, 1961b; Mutwiri *et al.*, 1992, 2001; Scandurra *et al.*, 2010) o cepas de *Map* de origen humano -cepa Linda- (Hamilton *et al.*, 1989, 1991; Adams *et al.*, 1993). Las lesiones inducidas en estos animales son muy similares a aquellas observadas en la paratuberculosis bovina, con un predominio de macrófagos, células epitelioides, células gigantes y linfocitos (Lominski *et al.*, 1956; Hamilton *et al.*, 1991; Tanaka *et al.*, 1994), incluso con signos clínicos típicos de la enfermedad como la pérdida de peso (Mutwiri *et al.*, 1992). Sin embargo una de las características de la infección en ratones, contrariamente a lo que sucede en rumiantes, es la capacidad que desarrolla *Map* para multiplicarse en hígado y bazo antes que en intestino (Francis, 1943; Mutwiri *et al.*, 1992). Tras infectar grupos de 20 ratones mediante dosis bajas (4×10^6 UFC por animal) y elevadas (4×10^9 UFC por animal) de *Map*, Tanaka *et al.*, (2000) establecieron una relación directa entre la dosis administrada y el mayor número y tamaño de los granulomas, constituidos principalmente por macrófagos, células epitelioides, y escasas células gigantes en hígado desde las 6 semanas posinfección. Otros autores utilizaron dosis menores ($1-2 \times 10^5$ 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.

Así mismo, se ha comprobado la existencia de cepas de ratones genéticamente resistentes o sensibles a *Map* (Frelier *et al.*, 1990), de forma que las diferentes cepas de ratones empleadas en el modelo experimental influyen 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, se ha descrito una mayor resistencia en otras cepas de ratones tales como las C3H (Frelier *et al.*, 1990; Tanaka *et al.*, 1994; Veazey *et al.*, 1995a,) o la “Swiss white” (Chandler, 1961b).

De la misma manera, también se han observado diferencias en cuanto a la tolerancia a infecciones por *Map* en otros animales de laboratorio. Rankin describió la susceptibilidad de los conejos a la enfermedad, tras infectar 8 animales y encontrar lesiones de paratuberculosis en 5 de ellos, si bien constató que el período de incubación era largo, de alrededor de un año (Rankin, 1958b). Hirsch (1956), en una serie de experimentos, aisló *Map* en hígado, nódulo linfático mesentérico, bazo y, de manera más tardía y escasa, en intestino de conejos infectados tanto por vía oral, intraperitoneal como endovenosa. Sin embargo, dicha bacteria se multiplicó con mayor velocidad en el tejido de los hámsters estudiados en este mismo experimento. Estos últimos animales, por tanto, fueron más sensibles a la infección con *Map*. Este hallazgo coincide con los resultados de otros experimentos llevados a cabo por Francis (1943), quien concluyó que tanto los conejos como los cobayas eran más resistentes a *Map* que los ratones o hámsters. También se ha comprobado la resistencia de las ratas a la infección oral con *Map*, en un estudio en el que no se formaron lesiones de paratuberculosis a lo largo de los 9 meses del experimento en ninguna de las 28 ratas inoculadas, resultando esta especie muy poco adecuada como modelo para estudiar la patogenia de esta enfermedad (Koets *et al.*, 2000).

En conejos, se ha comprobado que las lesiones inducidas tras la infección por vía endovenosa, intraperitoneal y subcutánea se localizaban principalmente en órganos extradigestivos tales como el hígado y bazo (Francis, 1943; Hirsch, 1956; Rankin, 1958b). Sin embargo, otros grupos de investigación comprobaron que la administración oral de *Map* originaba lesiones restringidas al tracto intestinal, caracterizadas por una enteritis granulomatosa, con focos inflamatorios de tamaño variable, constituidos por macrófagos, escasos linfocitos y en algunas ocasiones células gigantes, de manera similar a las lesiones observadas en rumiantes. Además, los conejos más afectados en estos estudios presentaron diarrea y emaciación (Mokresh *et al.*, 1989; Mokresh y Butler, 1990; Vaughan *et al.*, 2005). También se infectaron por vía oral conejos adultos y jóvenes con una cepa bovina de campo, y se estudió el progreso de la enfermedad durante 36 meses. Sin embargo, tal y como sucedió en estudios anteriores, no se consiguió reproducir la infección con gran éxito, al detectarse la bacteria mediante cultivo en tan solo 2 de los 4 conejos adultos y 3 de los 16 jóvenes. Además, tras realizar la necropsia, únicamente se observaron lesiones moderadas en 4 de los animales infectados, dos jóvenes y dos adultos (Vaughan *et al.*, 2005).

Otra especie empleada como modelo de infección experimental con *Map* ha sido el pollo (Larsen y Moon, 1972; Collins *et al.*, 1983; Van Kruiningen *et al.*, 1991; Valente *et al.*, 1997). Tras administrar 10^7 unidades de una cepa humana de *Map* a 17 pollos de 24 días, se formaron granulomas en 2 de los 6 animales infectados por vía oral, en los 6 inoculados por vía intraperitoneal y en 3 de 5 por la vía intracardíaca (Van Kruiningen *et al.*, 1991). Dichas lesiones estaban formadas por pequeños agregados de 6-12 macrófagos rodeados de algunos linfocitos, así como grupos de células epitelioides en diferentes localizaciones (ciego, bolsa de Fabricio, pulmones, hígado o pericardio), si bien los 2 pollos infectados mediante vía oral fueron los que más frecuentemente presentaron granulomas asociados al 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). Estos hallazgos confirman la posibilidad de utilizar esta especie como modelo de infección experimental.

Finalmente, también se emplearon otras especies animales monogástricas con el fin de comprobar su susceptibilidad a la infección paratuberculosa, tales como los caballos (Larsen *et al.*, 1972) o los cerdos (Jorgensen, 1969; Larsen *et al.*, 1971). En el primer caso, se infectaron experimentalmente 5 potros por vía endovenosa y oral con una cepa de *Map* de origen bovino, encontrándose lesiones compatibles con paratuberculosis en todos ellos, siendo las de mayor gravedad las de los 2 potros infectados por vía endovenosa, que presentaron una enteritis y linfadenitis granulomatosa difusa, así como engrosamiento de la porción distal del intestino delgado y nódulo linfático mesentérico adyacente. Además, estos 2 animales manifestaron signos clínicos típicos de esta enfermedad, con diarreas y pérdidas de peso desde los 35 y 84 dpi, respectivamente (Larsen *et al.*, 1972). También se demostró la infección experimental con *Map* en el ganado porcino, tanto a partir de inóculo intestinal, como de heces procedentes de un caso clínico bovino (Larsen *et al.*, 1971), con la formación de granulomas fundamentalmente en intestino delgado y nódulos linfáticos asociados, así como la excreción de *Map* en heces de cerdos infectados tanto por vía oral como endovenosa. Jorgensen (1969), además, describió en esta especie la presencia de cambios histológicos asociados a las placas de Peyer del íleon, con numerosos granulomas de diferentes tamaños, junto con células epitelioides y células gigantes, así como la presencia de algunos BAAR intracelulares en la mucosa ileal, tras infectar por

vía oral 61 cerdos con un inóculo intestinal bovino así como cepas *in vitro* de origen bovino y porcino.

II.3. PATOGENIA

Al estudio de la patogenia de la paratuberculosis se han dedicado muchos esfuerzos desde hace años, siendo todavía muchos los interrogantes que existen sin responder. Su estudio, engloba tanto los diferentes mecanismos empleados por el propio patógeno –*Map*– para penetrar y persistir en el animal, como la respuesta desencadenada por el hospedador para defenderse frente a dicho agente y tratar de eliminarlo lo más rápido y eficazmente posible. El desenlace de la infección viene determinado fundamentalmente por la interacción entre ambos organismos. Sin embargo, los largos períodos de incubación que caracterizan esta enfermedad, el lento crecimiento de *Map* en cultivos, así como la dificultad de reproducir la infección de forma experimental, son algunos de los obstáculos que limitan los avances en este campo (Chiodini *et al.*, 1984a). No obstante, el desarrollo de nuevos modelos animales así como la puesta a punto de nuevas metodologías de investigación, han permitido esclarecer algunos aspectos de la patogenia de esta enfermedad.

En este capítulo se revisarán, por un lado, los mecanismos de entrada de las micobacterias en el animal, los sistemas empleados por dicho agente para sobrevivir intracelularmente y evadir la respuesta inmune del hospedador, el establecimiento de la lesión en el hospedador, y finalmente se repasarán los complejos mecanismos de defensa desencadenados por el propio animal frente a la presencia de *Map*.

II.3.1. ENTRADA DE *MAP* EN EL HOSPEDADOR.

Se puso en evidencia el importante papel del tejido linfóide intestinal en la entrada de *Map* desde la década de los sesenta del pasado siglo, donde varios estudios llevados a cabo por el grupo del Moredun Research Institute en bovinos y ovinos evidenciaron la colonización de esta micobacteria en el tracto intestinal, y concretamente la presencia de lesiones primarias asociadas al tejido linfóide de dicho tejido tras realizar una serie de infecciones experimentales con *Map* (Brotherston *et al.*, 1961a, 1961b; Gilmour y Brotherston, 1962; Nisbet *et al.*, 1962; Gilmour *et al.*, 1965b). Estos autores comprobaron que la infección inicial tras la inoculación oral se instauraba

en primer lugar en el tejido linfoide intestinal, y a continuación se diseminaba hacia la mucosa y nódulos linfáticos mesentéricos, contrariamente a la primera hipótesis sugerida por este grupo por la que la “puerta de entrada” de *Map* se localizaba en las tonsilas y ganglios retrofaríngeos. Esta colonización primaria se confirmó posteriormente en numerosas infecciones experimentales, al observar una clara asociación entre el establecimiento de lesiones iniciales y las placas de Peyer (Kluge *et al.*, 1968; García Marín *et al.*, 1988, 1995a, 2000; Juste *et al.*, 1994; Pérez *et al.*, 1996; Sigurdardóttir *et al.*, 1999, 2001; Valheim *et al.*, 2002; Kurade *et al.*, 2004). El importante papel jugado por el tejido linfoide en la entrada de *Map* podría explicar la mayor susceptibilidad de los animales jóvenes al establecimiento de la infección. En este sentido, la placa de Peyer ileal, tras el nacimiento, constituye alrededor del 90% de la masa total de placas de Peyer en corderos, si bien empieza a involucionar a las 12 semanas de vida del animal, habiendo regresado en su casi totalidad alrededor de los 15-18 meses de vida, quedando restringida tan sólo a escasos folículos linfoides en íleon (Reynolds y Morris, 1983), lo que limitaría la implantación de microorganismos. De manera similar, la mayor cantidad de tejido linfoide organizado en animales jóvenes, así como las características de la placa de Peyer ileal en estos individuos ya han sido relacionados con una mayor susceptibilidad a infecciones orales en el caso de Encefalopatías Espongiformes Transmisibles ovinas, bovinas y humanas (St Rose *et al.*, 2006, 2007). Sin embargo, en paratuberculosis, en algunos ensayos experimentales en la especie caprina, se ha descrito que el mayor número de lesiones granulomatosas aparece en el tejido linfoide yeyunal, el cual persiste en los animales adultos (Sigurdardóttir *et al.*, 1999; Corpa *et al.*, 2000a; Storset *et al.*, 2001). Estos hallazgos indicarían que la mayor resistencia a la infección por *Map* en adultos no estaría relacionada únicamente con la involución del tejido linfoide intestinal con la edad, sino que también habría otros factores implicados.

Las células M son células epiteliales especializadas localizadas en el denominado “epitelio asociado a folículos” que tapiza las placas de Peyer intestinales, y cuya función principal consiste en el transporte por endocitosis transcelular de diversos microorganismos desde la luz intestinal hacia el tejido linfoide subyacente, encargado de desencadenar una respuesta inmune frente a dichos agentes (Corr *et al.*, 2008). Se ha comprobado que estas células especializadas son precisamente la principal vía de penetración de *Map* hacia las capas subyacentes, donde el bacilo es fagocitado por los

macrófagos subepiteliales, en placas de Peyer ileales de terneros (Momotani *et al.*, 1988), corderos (García Marín *et al.*, 1992a) o cabritos (Sigurdardóttir *et al.*, 2001). Además, la captación y transporte del bacilo por estas células transcurre de manera muy rápida. Así, tras la inoculación directa en la luz de segmentos de intestino delgado de cabras, la mayor parte de las bacterias atravesaron las células M en menos de una hora (Sigurdardóttir *et al.*, 2001). De la misma manera, Wu *et al.*, (2007) demostraron que el bacilo era capaz de cruzar la barrera intestinal y alcanzar los nódulos linfáticos mesentéricos en una hora tras la inoculación intestinal de terneros con *Map*, mientras que en el experimento de Momotani *et al.*, (1988), el microorganismo tardó entre 5 y 20 horas en atravesar la barrera intestinal. La rápida captación del microorganismo también se comprobó *in vitro*, al aislar un número significativo de *Map* en células epiteliales tan sólo 30 minutos después de haber añadido micobacterias en el cultivo celular (Pott *et al.*, 2009).

Sin embargo, también se ha sugerido la existencia de otra vía de entrada en la que estarían implicados los enterocitos en vez de las células M, tras haber comprobado en un experimento en ratones que el número de *Mycobacterium avium* detectadas en segmentos de tejido intestinal con placas de Peyer era 100 veces menor que la cantidad observada en áreas sin tejido linfoide tras la inoculación directa intraluminal de los bacilos (Sangari *et al.*, 2001). Recientemente, Sigurdardóttir *et al.*, (2005) desarrollaron un modelo de infección experimental en el que utilizaron el método de “manga evertida” *in vitro*, que consistió en evertir varios tramos de mucosa intestinal hacia el exterior, con y sin placa de Peyer, e incubarlos en presencia de *Map* durante una hora. Transcurrido este tiempo, los bacilos habían penetrado tanto en los tramos de placa de Peyer ileal y yeyunal, como en las secciones de yeyuno sin placa, sugiriendo que la vía de entrada de *Map* no era exclusiva de las células M, sino que también dependía de los enterocitos. Además, esta teoría explicaría la detección de escasos bacilos en el epitelio de las vellosidades cercanas a las cúpulas de las placas de Peyer tras la inoculación intestinal de *Map* en otros estudios anteriores (Momotani *et al.*, 1988; García Marín *et al.*, 1992a; Sigurdardóttir *et al.*, 2001).

Una vez en la luz intestinal, y previamente a su entrada, *Map* debe adherirse a las células de la mucosa intestinal. Los mecanismos implicados en este proceso aún no están claros. No obstante, se han identificado recientemente proteínas micobacterianas

implicadas en la invasión (Secott *et al.*, 2002; Bannantine *et al.*, 2003). Las “proteínas de acoplamiento a la fibronectina” (FAP), ubicadas en la superficie de *Map*, parecen conferir al bacilo la capacidad de unirse con la fibronectina, proteína de la matriz extracelular de las células epiteliales. Se ha descrito que la interacción entre ambas proteínas favorecería el proceso de captación de *Map* (Schorey *et al.*, 1996; Secott *et al.*, 2001, 2002, 2004; Lee *et al.*, 2009). Así, Secott *et al.*, (2002) comprobaron que la menor expresión de FAP disminuía la capacidad de adhesión y captación del bacilo por las células Caco-2 (células epiteliales intestinales humanas). La formación del puente de unión entre FAP y la fibronectina se ve favorecido en presencia de un pH ácido de alrededor de 3 (Secott *et al.*, 2001). Por ello se sospecha que este proceso en infecciones naturales no tendría lugar directamente a nivel de íleon, sino que requeriría un paso previo de activación que sucede cuando *Map* atraviesa el medio ácido del abomaso de los rumiantes, uniéndose posteriormente a la fibronectina secretada en el duodeno, donde el pH se acerca a 4,5, y el complejo penetraría entonces las células M en el íleon (Yu *et al.*, 1996; Secott *et al.*, 2001, 2004). Recientemente, también se ha resaltado el papel crítico de FAP en la activación de las células presentadores de antígeno y consecuente desencadenamiento de una respuesta inmune protectora por parte del hospedador, convirtiendo estas proteínas en posibles candidatos para el desarrollo de vacunas frente a *Map* (Lee *et al.*, 2009).

Las células M presentan en su zona apical integrinas $\beta 1$, que son los receptores del puente de unión FAP-fibronectina (Secott *et al.*, 2002, 2004). Esto explicaría la predilección de *Map* por entrar a través de estas células (Momotani *et al.*, 1988; García Marín *et al.*, 1992a; Sigurdardóttir *et al.*, 2001). En cambio, se ha comprobado que la invasión del bacilo a través de los enterocitos tendría lugar independientemente de estar previamente adherido a la fibronectina o no, por lo que la entrada en estas células podría depender de otros mecanismos (Secott *et al.*, 2004). De la misma manera, Schlegel *et al.*, (2005) observaron que la unión del microorganismo con la fibronectina incrementaba la adhesión a las células epiteliales bovinas en algunas cepas de *Map*, pero se veía reducida en presencia de otras cepas diferentes, sugiriendo entonces la existencia de otros mecanismos de adhesión de *Map* independientes de la unión FAP-fibronectina.

Por otro lado, la entrada de *Map* en el organismo parece depender también de la expresión de la proteína de membrana de 35 kDa de la bacteria, caracterizada por el

grupo de Bannantine *et al.*, (2003), en una serie de experimentos *in vitro* en el que comprobaron el papel de esta proteína en la invasión de células epiteliales bovinas.

Map podría expresar otros factores de virulencia en su membrana, desconocidos hasta ahora, capaces de intervenir en los procesos de penetración e invasión de las células M o enterocitos. El descubrimiento y estudio de estos mecanismos patogénicos podría tener importancia en la prevención de la infección, ya que permitiría diseñar adhesinas o receptores análogos que pudieran añadirse en la leche o la alimentación de los animales, bloqueando así de manera competitiva la adhesión de *Map* al hospedador. Estas estrategias ya se han estudiado en otros modelos animales para prevenir enfermedades infecciosas en las superficies mucosas humanas (Kelly y Younson, 2000).

II.3.2. MECANISMOS DE SUPERVIVENCIA DE *MAP*.

Una vez cruzada la barrera del epitelio intestinal, el bacilo es transportado por endocitosis dentro de vacuolas y posteriormente fagocitado por macrófagos sub- e intraepiteliales adyacentes (Momotani *et al.*, 1988; Valentin-Weigand y Goethe, 1999; Sigurdardóttir *et al.*, 1999, 2001; Coussens, 2001; Tessema *et al.*, 2001). A continuación, *Map* es transportado hacia las zonas interfoliculares del tejido linfoide, donde sus antígenos son presentados a los linfocitos T y desencadenan una respuesta inmune (Momotani *et al.*, 1988; García Marín *et al.*, 1992a; Stabel, 2000a). A partir de este momento, el porvenir de *Map* en el hospedador dependerá de tres mecanismos patogénicos generales, que serán revisados a continuación (Tessema *et al.*, 2001):

- 1) La vía de entrada que utilice la micobacteria al ser fagocitada, de tal manera que no desencadene respuesta antimicrobiana por parte del macrófago.
- 2) La modificación del medio interno de los fagosomas conteniendo los bacilos.
- 3) La modulación de la colaboración entre respuesta inmune innata e adaptativa.
Esta parte será detallada en el apartado II.3.4, que trata de la respuesta inmune frente a *Map*.

Los macrófagos, células diana en la infección paratuberculosa, están dotados de diversos receptores implicados en la fagocitosis de las micobacterias, incluyendo los receptores del complemento CR1, CR3 y CR4, los receptores a inmunoglobulinas (FcR), receptores de manosa, el receptor CD14 de unión a los liposacáridos, receptores de transferrina, “scavenger receptors” y el receptor de la proteína surfactante A. La entrada a través de estos receptores específicos permite a las micobacterias ser fagocitadas sin sufrir los mecanismos antimicrobianos normales, y por tanto la interacción entre *Map* y estos receptores es crucial para el destino intracelular del bacilo (Bermudez *et al.*, 1991; Pugin *et al.*, 1994; Schlesinger, 1996; Ernst, 1998; Aderem y Underhill, 1999; Astarie-Dequeker *et al.*, 1999; Cheville, 2001; Underhill y Ozinsky, 2002; Shorey y Cooper, 2003; Souza *et al.*, 2007; Schäfer *et al.*, 2009). De esta manera, se ha demostrado que la fagocitosis de micobacterias patogénicas o no-patogénicas a través de los receptores de manosa no desencadena la formación de radicales libres mediante el enzima NADPH oxidasa ni tampoco induce la fusión de los fagosomas, por lo que esta vía constituye una puerta de entrada relativamente segura para *Map* dentro del macrófago (Astarie-Dequeker *et al.*, 1999). También se ha comprobado la menor fagocitosis de *M. avium* tras la adición de anticuerpos anti-CR3 en un cultivo macrofágico (Bermudez *et al.*, 1991).

Una vez dentro de estas células, *Map* dispone de diversas estrategias para asegurar su supervivencia, poder replicarse y así diseminarse por el organismo. En la mayoría de los casos, los fagocitos mononucleares son activados rápidamente y reaccionan eficazmente mediante mecanismos antimicrobianos capaces de eliminar la infección, si bien otras veces, la micobacteria es capaz de evadir esta reacción defensiva, estableciéndose entonces una infección latente. Para ello, este grupo de microorganismos ha desarrollado varias estrategias para evitar su degradación, modificando el medio interno de los fagosomas (Tessema *et al.*, 2001; Tooker *et al.*, 2002; Sigurdardóttir *et al.*, 2004; Stabel, 2006; Stevenson, 2006; Sohal *et al.*, 2008; Weiss y Souza, 2008; Woo y Czuprynski, 2008). Los diferentes mecanismos de los que dispone *Map* para asegurar su supervivencia intracelular vienen resumidos a continuación en la tabla II.5.

Mecanismos de supervivencia intracelular de <i>Map</i>	Referencias
1- Inhibición de la maduración del fagosoma.	Hostetter <i>et al.</i> , 2002, 2003
2- Inhibición de la fusión del fagosoma con el lisosoma	Astarie-Dequeker <i>et al.</i> , 1999; Hostetter <i>et al.</i> , 2003; Malik <i>et al.</i> , 2003; Kusner, 2005; Thompson <i>et al.</i> , 2005; Woo <i>et al.</i> , 2007
3- Inhibición de la acidificación del fagolisosoma.	Cheville <i>et al.</i> , 2001; Kuehnel <i>et al.</i> , 2001; Hostetter <i>et al.</i> , 2002; Weiss <i>et al.</i> , 2004, 2005; Souza <i>et al.</i> , 2008
4- Capacidad de inhibición de los sistemas oxidativos y de la producción de NO e iNOS en los macrófagos.	Chan <i>et al.</i> , 1991; Clarke, 1997; Astarie-Dequeker <i>et al.</i> , 1999; Miller <i>et al.</i> , 2004 ; Pakhomova <i>et al.</i> , 2009
5- Inhibición del fenómeno de apoptosis de los macrófagos.	Weiss <i>et al.</i> , 2004
6- Capacidad de presentarse bajo la forma de esferoplastos, reduciendo así la expresión de antígenos inmunogénicos.	Hulten <i>et al.</i> , 2000a; El-Zaatari <i>et al.</i> , 2003; Hines II y Styer, 2003

Tabla II.5. Resumen de los mecanismos de supervivencia de *Map* frente a la respuesta antimicrobiana de los macrófagos.

Por un lado, las micobacterias tienen la capacidad de inhibir la maduración del fagosoma y consecuente formación del fagolisosoma, proporcionándoles una manera de eludir la actividad antimicrobiana directa de la respuesta inmune innata, así como de evitar la presentación de sus antígenos a linfocitos T y posterior desencadenamiento de una respuesta inmune adaptativa (Tooker *et al.*, 2002; Stabel, 2006). Algunos de los mecanismos empleados para este fin incluyen la reducción de la actividad de la esfingosina quinasa, enzima macrofágica implicada en la captación del Ca^{2+} citosólico necesario para la fusión del fagosoma con el lisosoma (Malik *et al.*, 2003; Kusner, 2005; Thompson *et al.*, 2005), o la interacción del lipoarabinomano revestido de manosa (ManLAM) de la pared celular micobacteriana con los receptores de manosa del macrófago, provocando el retraso en la maduración del fagosoma (Kang *et al.*, 2005; Sweet *et al.*, 2010), si bien estos dos últimos procesos han sido estudiados mayoritariamente en tuberculosis. El papel de *Map* en la inhibición de la fusión fagosoma-lisosoma fue evidenciado por el grupo de Hostetter *et al.*, (2003), quienes

comprobaron la mayor cantidad de marcadores de maduración precoz del fagosoma (receptores de transferinas –TFR-) junto con la menor presencia de marcadores de maduración tardía (proteína de membrana 1 asociada al lisosoma –Lamp-1) en las células macrofágicas murinas infectadas con cepas vivas de *Map* frente a aquellas incubadas con cepas inactivadas por calor o con *M. segmatis*. De manera similar, se demostró que la adición de cepas inactivadas de *Map* en cultivos de fagocitos mononucleares bovinos se asociaba con una mayor fusión entre fagosomas y lisosomas que la infección con cepas vivas de *Map* (Woo *et al.*, 2007). Por otro lado, la activación previa de cultivos macrofágicos mediante la adición de IFN- γ o de LPS restauró la capacidad de acidificación y maduración funcional de los fagosomas infectados con *Map* (Hostetter *et al.*, 2002). Estos resultados sugieren que el grado de activación de los macrófagos juega un papel determinante en el destino de *Map* tras su ingreso en el organismo.

Por otro lado, también se ha relacionado la presencia de *Map* con la inhibición de la acidificación del fagosoma, con la consecuente creación de un medio protector en el que la bacteria puede replicarse y persistir (Cheville *et al.*, 2001; Kuehnel *et al.*, 2001; Hostetter *et al.*, 2002; Weiss *et al.*, 2004, 2005; Souza *et al.*, 2008). Así, se ha comprobado la capacidad de cepas vivas de *Map* de inhibir la acidificación de los fagosomas en cultivos celulares macrofágicos murinos J774, mientras que las micobacterias inactivadas en este mismo estudio no tuvieron este efecto (Kuehnel *et al.*, 2001).

Los macrófagos, una vez activados por la presencia de *Map*, producen moléculas biológicamente activas como el óxido nítrico (NO), radicales libres u otros reactivos nitrogenados intermediarios, altamente tóxicos para las micobacterias intracelulares, y cuya producción está regulada por citoquinas proinflamatorias (Denis, 1991; Chan *et al.*, 1992; Hostetter *et al.*, 2005; Simutis *et al.*, 2007; Khalifeh *et al.*, 2009). Así, la evaluación *in vitro* de la producción de NO en las células mononucleares de sangre periférica (*peripheral blood mononuclear cells*, PBMC) procedentes de vacas sanas e infectadas fue más elevada en aquellas infectadas subclínicamente que en los casos clínicos o los animales no infectados. Además, la secreción de NO se incrementó cuando las células se incubaron en presencia conjunta de *Map* y de IFN- γ . Estos resultados evidencian la función antimicrobiana del NO, más efectiva en las fases

subclínicas de la enfermedad, cuando las citoquinas proinflamatorias son capaces de activar los macrófagos y detener la replicación de *Map* (Khalifeh *et al.*, 2009). Estos resultados coinciden con el estudio de la presencia *in situ* de una mayor expresión del enzima sintetasa inducible del óxido nítrico (iNOS), responsable de la formación de NO, evidenciada mediante métodos inmunohistoquímicos, en los macrófagos de ovinos y bovinos con lesiones focales, caracterizadas por una elevada expresión de IFN- γ , frente a una tinción nula o muy débil en animales con lesiones difusas de tipo lepromatoso (Hostetter *et al.*, 2005; Muñoz *et al.*, 2009).

No obstante, para protegerse frente a estos reactivos, las micobacterias dispondrían de propiedades tales como la producción de sulfatos, glicolípidos o la actividad de los enzimas superóxido-dismutasa y catalasas, los cuales inhibirían el sistema oxidativo y producción de óxido nítrico de los macrófagos (Chan *et al.*, 1991; Clarke, 1997; Pakhomova *et al.*, 2009). Estos bacilos también tienen la capacidad de inhibir el reclutamiento del iNOS hacia los fagosomas infectados (Miller *et al.*, 2004).

La apoptosis es otro de los mecanismos empleado por los macrófagos para limitar la diseminación de las micobacterias, al secuestrar los patógenos en el interior de cuerpos apoptóticos (Fratazzi *et al.*, 1999). Sin embargo, al analizar los diferentes patrones de expresión génica de macrófagos bovinos incubados *in vitro* con *Map* y *Maa*, el grupo de Weiss *et al.*, (2004) observaron que un gen inhibidor de la apoptosis era sobreexpresado, mientras que otros dos genes activadores de la apoptosis se expresaron en menor cantidad en aquellos macrófagos infectados con *Map* frente al otro grupo. Además, el porcentaje de apoptosis de los macrófagos fue la mitad en aquellos infectados con *Map* que con *Maa*, sugiriendo una cierta capacidad de inhibición de este proceso por parte de la micobacteria causante de la paratuberculosis.

Finalmente, también existen diversas hipótesis respecto a la morfología bajo la cual se mantiene la micobacteria dentro de los macrófagos, al haberse presentado varios casos de animales con lesiones focales subclínicas sin poder llegar a demostrar la presencia del bacilo en secciones de tejido. Una de las teorías sugiere la posibilidad de que *Map* pueda presentarse bajo formas defectivas en su pared celular (esferoplastos), no expresando muchos de sus antígenos inmunogénicos propios, lo que ayudaría dicha bacteria a evadir la respuesta del hospedador (Hulten *et al.*, 2000a; El-Zaatari *et al.*,

2003; Hines II y Styer, 2003). Estas formas especiales de *Map* fueron aisladas por primera vez en tejidos humanos de pacientes con enfermedad de Crohn y sarcoidosis (Chiodini *et al.*, 1984b, 1986; Wall *et al.*, 1993; El-Zaatari *et al.*, 1996), y su papel en la patogenia micobacteriana aún está por esclarecer.

II.3.3. ESTABLECIMIENTO Y PROGRESIÓN LESIONAL DE LA INFECCIÓN

Tras la infección de los macrófagos, comienzan a formarse granulomas en los espacios interfoliculares de las placas de Peyer. Si la actividad antimicrobiana es inadecuada, o si los mecanismos de resistencia de *Map* son más eficientes, la infección paratuberculosa se asienta en los tejidos del animal, que desarrollará la enfermedad clínica, o bien permanecerá con una infección latente (García-Marín *et al.*, 2000).

Está establecido que la progresión y diseminación de la infección depende de la capacidad del hospedador de limitar la proliferación micobacteriana a través de la formación efectiva de granulomas. En efecto, estas agrupaciones de células constituyen el almacén en el que los linfocitos T (productores de citoquinas) y los macrófagos (activados en un estadio bacteriostático) son capaces de mantener la interacción necesaria para resultar en una activación macrofágica efectiva. Además, estos granulomas sirven para delimitar y contener el medio tóxico requerido para matar las micobacterias intracelulares, de tal manera que el tejido adyacente quede protegido. Finalmente, una tercera función crucial de estas acumulaciones macrofágicas consiste en limitar la diseminación de la infección (Saunders y Cooper, 2000).

De manera general, se han descrito dos tipos de granulomas asociados a la infección paratuberculosa. El primero estaría asociado a lesiones iniciales, de tipo “tuberculoide”, y caracterizados por la presencia de escasas células epitelioides, un pequeño número de células macrofágicas (a veces una sola célula gigante, en bovino), y escasos linfocitos, en los que la presencia de bacilos es casi nula, y asociados a una fuerte respuesta inmune de tipo celular. La formación de este tipo de granulomas se relaciona con el control de la replicación del patógeno. En el otro extremo estarían los granulomas de tipo “lepromatoso”, menos organizados que los anteriores, y generalmente asociados a fases terminales de la infección, compuestos principalmente

por numerosos macrófagos y células epitelioides repletos de abundantes bacilos, y normalmente asociados a una fuerte respuesta inmune humoral frente a una respuesta celular débil (García Marín *et al.*, 1992c, 1995a, 1999, 2000; Chiodini, 1996; Pérez *et al.*, 1996, 1997, 1999; Burrells *et al.*, 1998; Tanaka *et al.*, 2005).

En la formación de estas lesiones, influyen distintos factores, entre los que destacan los mediadores químicos de la inflamación producidos por diferentes tipos celulares. Tras el establecimiento de la infección, la persistencia del agente micobacteriano induce tanto a los macrófagos como a las células dendríticas a producir un arsenal de citoquinas para estimular el reclutamiento progresivo de células inmunes. El factor de necrosis tumoral α (TNF- α), producido por linfocitos T y células presentadoras de antígenos (CPA), es una de las citoquinas críticas para la correcta formación y persistencia de los granulomas (Saunders y Cooper, 2000). Este papel ha sido demostrado principalmente en ratones, donde varios estudios han mostrado que los animales deficientes en TNF- α eran más susceptibles a la infección por *M. tuberculosis* o *M. avium*, tardaban más tiempo en eliminar la infección y en activar el reclutamiento de macrófagos, y en los que la formación de granulomas era deficiente (Ehlers *et al.*, 2000; Roach *et al.*, 2002). A pesar de que elevadas concentraciones de esta citoquina pueden producir daño tisular, su presencia en moderadas cantidades dentro de los granulomas es necesaria para controlar a *Map* al inducir un constante reclutamiento de nuevos macrófagos (Sohal *et al.*, 2008).

Las subpoblaciones de células T $\gamma\delta$ también parecen tener cierto papel en el desarrollo y persistencia de granulomas en las fases iniciales de la tuberculosis en bovinos (Wangoo *et al.*, 2005; Palmer *et al.*, 2007). Otros experimentos con ratones manipulados genéticamente mostraron que las células $\gamma\delta$ eran requeridas para la formación de granulomas y el control de la diseminación de *Map* hacia otros órganos (Tanaka *et al.*, 2000). Las células T $\gamma\delta$ bovinas poseen un receptor WC1, del que se han caracterizado diferentes isoformas (Rogers *et al.*, 2005). Recientemente, Plattner *et al.*, (2009) evidenciaron el diferente reclutamiento de estas células dependiendo del grado de organización del granuloma en bovinos infectados subcutáneamente con *Map*, con un predominio de células T $\gamma\delta$ WC1+ en las fases iniciales y WC1- en fases tardías de la infección, en aquellas lesiones que progresaron hacia granulomas organizados, y con el patrón inverso en aquellos granulomas que evolucionaron hacia una estructura

desorganizada. Estos resultados sugieren que el cambio en el predominio de células WC1+ a WC1- en el tiempo llevaría a la formación de un granuloma de tipo “tuberculoide”, capacitado para limitar la multiplicación micobacteriana, si bien esta teoría aún requiere más estudios para ser confirmada.

En el caso de animales con un sistema inmune eficiente, los pequeños granulomas organizados y restringidos a zonas locales del tejido linfoide de las placas de Peyer (*formas focales*), que aparecen en las fases iniciales, pueden persistir de forma latente desde algunas semanas hasta incluso varios años (García Marín *et al.*, 1995a, 2000). El hallazgo de este tipo de lesiones focales en animales adultos, por tanto, tendría dos tipos de interpretaciones: por un lado podrían ser consideradas como lesiones en estado de latencia de animales previamente infectados siendo jóvenes, o bien por otro lado podrían tratarse de lesiones iniciales en animales adultos recientemente infectados (García Marín *et al.*, 1992c; Pérez *et al.*, 1996; Corpa *et al.*, 2000a; González *et al.*, 2005).

Si la respuesta inmune protectora resultara insuficiente, la lesión podría llegar a reactivarse y progresar hacia la lámina propia (LP) adyacente e incluso extenderse hacia zonas intestinales desprovistas de tejido linfoide, con granulomas distribuidos de manera multifocal (*formas multifocales*), y con propagación hacia los nódulos linfáticos asociados, principalmente el mesentérico caudal y los ileocecales (Nisbet *et al.*, 1962; Juste *et al.*, 1994; García Marín *et al.*, 1995a, 2000; Clarke, 1997; Kurade *et al.*, 2004). Desde los momentos iniciales y durante esta fase subclínica, algunos animales son capaces de recuperarse completamente de la infección mediante la regresión de sus lesiones, dependiendo de la intensidad de la respuesta del hospedador, y de la virulencia y cantidad de las micobacterias (Chiodini *et al.*, 1984a; García Marín *et al.*, 2000; Storset *et al.*, 2001). Finalmente, el daño tisular puede llegar a ampliarse por toda la mucosa ileal y yeyunal de forma difusa, provocando el engrosamiento macroscópico de la pared intestinal debido a la distribución difusa de las lesiones granulomatosas (*formas difusas*), estableciéndose entonces las formas clínicas de la enfermedad (Pérez *et al.*, 1996; Corpa *et al.*, 2000a; García Marín *et al.*, 2000; González *et al.*, 2005). En los casos más avanzados, también se ha descrito la diseminación de la infección hacia órganos y tejidos extraintestinales tales como riñones, pulmones, hígado y nódulos linfáticos sistémicos, y se ha detectado la presencia de *Map* en PBMC y fluidos

tisulares, por lo que se ha sugerido la diseminación de la infección por vía linfática o sanguínea (Hines *et al.*, 1987; Koenig *et al.*, 1993; Van der Giesson *et al.*, 1994; Juste *et al.*, 2005). En este momento, los animales afectados son incapaces de absorber los nutrientes a través de la mucosa intestinal de manera adecuada, con la consecuente pérdida de condición corporal y aparición de diarreas severas, emaciación y finalmente la muerte o el sacrificio del animal (Julian, 1975; Clarke, 1997; García Marín *et al.*, 2000).

En cualquier caso, se estima que la mayoría de los animales expuestos a la infección por *Map* no llegan a desarrollar la enfermedad, sino que serían capaces de haber podido controlar el desarrollo de lesiones menores (García Marín *et al.*, 1992c; Pérez *et al.*, 1996; Clarke *et al.*, 1997). El curso de la infección paratuberculosa dependerá de varios factores, entre otros, la dosis ingerida del patógeno, la ruta de infección, la virulencia de la cepa de *Map*, el estado inmunitario del hospedador, la especie y raza, la edad del animal (tema revisado más ampliamente en el apartado II.2.1 de esta revisión bibliográfica), así como diversos factores ambientales (Julian, 1975; Clarke *et al.*, 1997). Otras circunstancias que predisponen al padecimiento de la infección y favorecerían el desarrollo de la enfermedad clínica incluyen la desnutrición, condiciones de pobre higiene en granjas y establos, infecciones concurrentes (parasitosis), así como cualquier tipo de estrés fisiológico que pueda afectar al animal como el parto (Julian, 1975).

II.3.4. RESPUESTA INMUNE DEL HOSPEDADOR.

II.3.4.1. Respuesta inmune innata

La respuesta inmune adaptativa, mediada a través de linfocitos T y B, requiere tiempo para activarse y eliminar los microorganismos invasores, al estar implicados procesos de proliferación celular, activación génica y síntesis de proteínas. Por ello, el hospedador requiere la colaboración de un mecanismo de actuación más rápido, aunque menos específico. Así, el **sistema inmune innato** constituye la primera barrera defensiva del hospedador frente a los patógenos microbianos. Se trata de un mecanismo protector evolutivamente antiguo cuya activación se inicia con el reconocimiento de moléculas altamente conservadas presentes en la mayoría de los microorganismos, los

denominados “patrones moleculares asociados al patógeno” (PAMP). Los PAMPs son estructuras esenciales para la supervivencia microbiana, ausentes en el hospedador, que pueden ser lipopolisacáridos de la pared celular, lipoproteínas, proteínas o ácidos nucleicos (Uematsu y Akira, 2006). Las células del sistema inmune innato son capaces de reconocer los PAMPs del patógeno para poder fagocitarlo de manera rápida. Para ello, disponen de un limitado número de receptores codificados genéticamente, los “receptores del patrón de reconocimiento” (PRR) (Uematsu y Akira, 2006; Kawai y Akira, 2007).

Los receptores “toll-like” (TLR), expresados por CPAs tales como las células dendríticas y los macrófagos, son algunos de los PRRs claves en las infecciones micobacterianas. La interacción entre diversas proteínas y lípidos de las micobacterias y los TLRs de las células hospedadoras, produce la activación de una vía de señales intracelulares que induce rápidamente la producción de citoquinas así como de reactivos nitrogenados y oxidativos intermediarios, iniciando así una respuesta inmune innata antimicrobiana protectora. Por otro lado, los TLRs también están implicados en la coordinación con la respuesta inmune adaptativa frente a los microorganismos (Jo *et al.*, 2007; Kawai y Akira, 2007). Se han descrito 13 TLRs en vertebrados hasta el momento, si bien sólo 10 están presentes en vacuno y ovino (Werling *et al.*, 2006; Nalubamba *et al.*, 2008), cada uno con una localización diferente. Así, los TLR 1, 2, 4, 5 y 6 suelen encontrarse en la superficie celular, mientras que los TLR 3, 7, 8 y 9 se suelen ubicar intracelularmente en las membranas de los endosomas (Kawai y Akira, 2007).

El perfil de expresión de los TLRs estaría relacionado con el desarrollo de las diferentes formas patológicas de la infección paratuberculosa. Así, los ovinos infectados o enfermos de paratuberculosis expresarían una mayor cantidad de TLRs en el íleon, yeyuno, y los nódulos linfáticos asociados en comparación con animales controles procedentes de explotaciones libres de *Map*. Según Nalubamba *et al.*, (2008), este incremento en la expresión de dichos PRRs sería la consecuencia de la infección paratuberculosa, y no la causa. Por otro lado, la cantidad de TLR2 analizada mediante PCR a tiempo real en ovinos procedentes de rebaños con paratuberculosis se ha visto incrementada de manera más acusada en animales con lesiones multibacilares frente a los paucibacilares o en los animales controles procedentes de rebaños no expuestos a *Map* (Nalubamba *et al.*, 2008; Taylor *et al.*, 2008).

Los TLR2 parecen desempeñar un papel muy importante en el reconocimiento innato de las micobacterias, aunque sus funciones resultan controvertidas. Por un lado, algunos autores indican que la interacción de micobacterias patógenas con el TLR2 inhibe la respuesta macrofágica antimicrobiana y la presentación de antígenos, favoreciendo la replicación de *Map* (Noss *et al.*, 2001; Álvarez *et al.*, 2003; Banaiee *et al.*, 2006). En este sentido, Weiss *et al.*, (2008) comprobaron que el bloqueo de los TLR2 mediante anticuerpos resultaba en una mayor acidificación de los fagosomas, mayor fusión de éstos con los lisosomas y por tanto favorecía los mecanismos antimicrobianos en macrófagos bovinos infectados con *Map*, lo que no sucedió en aquellos infectados con *Maa*. En cambio, otros experimentos dieron lugar a resultados contradictorios, en los que se evidenciaba el efecto micobactericida mediado por los TLR2, al observar que la lipoproteína de 19 kDa de *M. tuberculosis* activaba los macrófagos murinos y humanos a través de dichos PRRs, con la consecuente puesta en marcha de los mecanismos antibacterianos intracelulares como la secreción de TNF y NO, la maduración de las células dendríticas, la inducción de apoptosis o la mayor secreción de IL-12, citoquina inductora de respuestas protectoras Th1 (Thoma-Uszynski *et al.*, 2000; Stenger y Modlin, 2002). En una amplia revisión sobre el papel de los TLRs en la respuesta inmune frente a las micobacterias, Quesniaux *et al.*, (2004) también resaltaron la función protectora que inducía la interacción de TLR2 y TLR4 con diversos componentes micobacterianos tanto *in vivo* como *in vitro*. De la misma manera se ha comprobado que la activación de las células dendríticas a través de los TLRs incrementaría la cantidad de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) en su superficie, lo que favorecería la capacidad de activación de las células T (Iwasaki y Medzhitov, 2004).

Una hipótesis para explicar estos efectos contradictorios de los TLRs en infecciones micobacterianas fue sugerida por Noss *et al.*, (2001), quienes opinaron que determinados PAMPs, como por ejemplo la lipoproteína de 19 kDa de *M. tuberculosis*, activarían inicialmente mecanismos antimicrobianos y una respuesta inmune innata proinflamatoria a través del TLR2 (con la consecuente modulación de respuesta específica) pero en casos avanzados, causarían la inhibición de determinados procesos como por ejemplo del procesamiento de antígenos a través de los MHC de tipo II, lo

que reduciría la activación de las células CD4 y permitiría así la diseminación de bacilos en infecciones tuberculosas crónicas.

Se ha descrito una mayor expresión de TLR9 en el tejido intestinal de ovejas “asintomáticas” (aquellas consideradas como infectadas en base a los resultados de PCR, cultivo y seropositividad frente a *Map*, pero en las que no se aprecian lesiones de paratuberculosis), pero no en aquellas enfermas sintomáticas procedentes del mismo rebaño con paratuberculosis, destacando el papel protector de la señal TLR9 en la respuesta antibacteriana de la mucosa del hospedador (Nalubamba *et al.*, 2008). El TLR9, implicado en el reconocimiento del DNA bacteriano, se ha relacionado en tuberculosis con el control de la secreción de IL-12 por las células dendríticas, participando así en las respuestas de tipo Th1 y contribuyendo en el enlace entre la respuesta inmune innata y adaptativa (Pompei *et al.*, 2007).

En los últimos años, el estudio de diferentes polimorfismos en algunos de los genes que codifican para los PRRs ha sugerido posibles asociaciones entre el genotipo y la sensibilidad a diferentes micobacteriosis, surgiendo así una lista de genes candidatos de gran interés para el control de estas enfermedades, principalmente en el caso de la paratuberculosis. De esta manera, se podrían establecer determinados marcadores de resistencia e implantarlos como criterios de selección en los programas de cría. Sin embargo, los resultados obtenidos en rumiantes muchas veces resultan controvertidos de un trabajo a otro, por lo que aún se requieren más estudios para poder ser confirmados.

Determinadas mutaciones en los genes del TLR2 y TLR4 parecen incrementar los riesgos de infección de tuberculosis humana (Ben-Ali *et al.*, 2004; Thuong *et al.*, 2007) o de lepra (Kang y Chae, 2001; Bochud *et al.*, 2003). En paratuberculosis, se han identificado recientemente asociaciones entre vacas y ovejas infectadas con *Map* y mutaciones en los genes de TLR1, TLR2 y TLR4 (Bhide *et al.*, 2009; Mucha *et al.*, 2009; Koets *et al.*, 2010). Sin embargo, otros autores no encontraron asociación entre polimorfismos en el gen TLR4 y una mayor sensibilidad a la paratuberculosis bovina (Pinedo *et al.*, 2009a), indicando que el concepto de resistencia genética a *Map* actualmente está aún por esclarecer.

Los receptores “NOD-like” (NLR) también están implicados en el reconocimiento micobacteriano innato (Delbridge y O’Riordan, 2007). Entre ellos, el gen CARD15/NOD2 también ha sido ampliamente estudiado en humanos y se ha comprobado que la sensibilidad a la enfermedad de Crohn tendría un cierto componente genético, al haberse encontrado una variante de este gen con mayor frecuencia en los individuos afectados de esta dolencia (Hugot *et al.*, 2001; Ogura *et al.*, 2001a). De la misma manera, recientemente, se ha encontrado una relación significativa entre la presencia de un polimorfismo en el gen CARD15/NOD2 y la sensibilidad a la paratuberculosis en vacas infectadas de forma natural (Pinedo *et al.*, 2009b; Ruiz-Larrañaga *et al.*, 2010a). El producto de este gen es una proteína intracelular implicada en el reconocimiento de peptidoglicanos de la pared celular bacteriana presente en los monocitos, macrófagos, células dendríticas y células epiteliales intestinales (Ogura *et al.*, 2001b). Las consecuencias de una mutación en el gen CARD15/NOD2 se asociarían por tanto con una menor respuesta al peptidoglicano de *Map*, y la consecuente menor capacidad defensora en las células epiteliales por parte del hospedador (Strober *et al.*, 2006). No obstante, otros estudios no han encontrado asociaciones significativas entre la presencia de mutaciones en este gen y la mayor o menor resistencia a la paratuberculosis (Taylor *et al.*, 2006). Nalumbamba *et al.*, (2008) analizaron las secuencias del exon 2 del TLR2 y del exon 11 del gen CARD15/NOD2 de 40 ovejas infectadas de forma natural de paratuberculosis sin encontrar relación alguna entre los “polimorfismos de un solo nucleótido” (Single Nucleotide Polymorphism, *SNP*) y las diferentes formas patológicas estudiadas. Sin embargo, los autores no descartan la posibilidad de que otros polimorfismos no analizados en este experimento pudieran estar implicados (Nalumbamba *et al.*, 2008).

Otro de los genes que participa en la inmunidad innata frente a micobacterias y cuya mutación podría estar relacionada con una mayor sensibilidad a la paratuberculosis es el que codifica para la “proteína macrofágica asociada a la resistencia natural” (Natural-resistance-associated macrophage protein 1, *Nramp 1*). Tras la fagocitosis de *Map*, *Nramp 1* es reclutada hacia la membrana del fagosoma en los macrófagos y neutrófilos para impedir el retraso de su maduración que induciría la micobacteria (Frehel *et al.*, 2002). Se ha vinculado la expresión de determinados alelos del gen SLC11A1 (nombre actual del gen que codifica para *Nramp1*) con la mayor sensibilidad a paratuberculosis en ovinos con signos clínicos y lesiones multibacilares (Reddacliff *et*

al., 2005) y en bovinos infectados con *Map* (Pinedo *et al.*, 2009a). Recientemente, el grupo de investigación de Ruiz-Larrañaga *et al.*, (2010b) relacionó la detección de dos SNPs del gen en el exon 11 y el intron 11-12 con la mayor sensibilidad a la infección en un estudio con 267 vacas Holstein-Friesian infectadas de paratuberculosis procedentes de rebaños españoles y holandeses.

Las células T $\gamma\delta$ también parecen tener un papel importante en las fases iniciales de infecciones por *Map* (Chávez, 1993; Pollock y Welsh, 2002; Sohal *et al.*, 2008). Su función en la organización de granulomas ya ha sido comentada anteriormente en el apartado II.3.3. Se ha comprobado el mayor porcentaje de estas células circulando en sangre de rumiantes comparado con los humanos o murinos, y también se ha demostrado su menor presencia en bovinos y ovinos adultos (alrededor del 10-15% de PBMC) frente a terneros o corderos jóvenes (hasta el 60%) (Hein y Mackay, 1991; Wyatt *et al.*, 1994). Varias teorías han sido propuestas para explicar las elevadas proporciones de estas células en rumiantes jóvenes. Por un lado, las células $\gamma\delta$, al acumularse principalmente en los tejidos epiteliales, actuarían como primera línea de defensa frente a los microorganismos (Hein y Mackay, 1991; Hayday, 2000; Corpa *et al.*, 2001). En este sentido, el subtipo WC1+ de las células $\gamma\delta$, capaz de reconocer antígenos sin que éstos estén asociados a moléculas MHC, parece estar implicado en la respuesta inmune innata (Machugh *et al.*, 1997; Hayday, 2000). Además, se ha comprobado que las células $\gamma\delta$ expresan PRRs y responden directamente a los PAMPs (Hedges *et al.*, 2005). Por lo tanto, estas propiedades confieren varias ventajas a dichas células para luchar frente a los antígenos que circulan por el intestino de los rumiantes neonatos y jóvenes, al poder desencadenar una respuesta inmune protectora a nivel de mucosa intestinal de manera rápida, en una fase crítica de la vida en la que las células T $\alpha\beta$ aún no han alcanzado la madurez necesaria para desarrollar una respuesta más específica (Hein y Mackay, 1991; Hein *et al.*, 1991). Por otro lado, se ha sugerido que altas concentraciones de células $\gamma\delta$ WC1+ ofrecen a los terneros la capacidad de producir citoquinas de tipo Th1 como la IL-12, TNF- α o IFN- γ , protectoras frente a patógenos entéricos como *Map*, favoreciendo así la aparición de una respuesta inmune celular en las fases iniciales de la infección (Brown *et al.*, 1994; Baldwin *et al.*, 2000). Sin embargo, otros autores han evidenciado funciones totalmente opuestas de las células T $\gamma\delta$, al adjudicarlas un papel inmunoregulador y una actividad citotóxica frente a las células T CD4+, contribuyendo a una menor respuesta inmune celular (Chiodini y

Davis, 1992). Esta teoría fue respaldada por Koets *et al.*, (2002), quienes asociaron la pérdida de células T CD4 en las fases finales de la infección paratuberculosa crónica bovina con un incremento de las células T $\gamma\delta$ WC1+, asumiéndose por tanto que en determinadas condiciones, las funciones inmunoreguladoras de estas células parecen prevalecer sobre su papel inmunoprotector (Koets, 2006).

II.3.4.2. Respuesta inmune adaptativa

Los macrófagos, células dendríticas y otras CPAs constituyen la primera línea de defensa frente a los patógenos intracelulares mediante una serie de mecanismos propios de la *respuesta inmune innata*, los cuales han sido resumidos en el apartado anterior. Sin embargo, en el momento en el que una infección intracelular se establece y asienta en un hospedador, se empieza a activar la *respuesta inmune adaptativa o adquirida*, mediada principalmente por los linfocitos T y B, y caracterizada fundamentalmente por su especificidad para reconocer un número amplio de antígenos, así como por su capacidad de “memoria” de larga duración (Medzhitov y Janeway, 1997; Stabel, 2006). Durante varios años, se ha pensado que ambas respuestas desarrollaban sus funciones de manera totalmente separada e independiente, y la inmunidad innata incluso estaba considerada como secundaria o de menor importancia en la defensa del hospedador (Medzhitov y Janeway, 1997). Sin embargo, últimamente, se ha ido demostrando que no solamente ambas respuestas pueden solaparse sino que también interactúan entre sí en un objetivo común de lucha antimicrobiana, como en el caso de las micobacteriosis (Medzhitov y Janeway, 1997; Orme, 2004; Sohal *et al.*, 2008).

Tras la fagocitosis de *Map* por los macrófagos, el primer acontecimiento en la respuesta inmune adaptativa consiste en la presentación de antígenos a los linfocitos T para activarlos, lo que induce una cascada de secreción de citoquinas, que a su vez capacitan a los macrófagos para limitar el crecimiento micobacteriano o estimulan la proliferación de más linfocitos T para detener la infección (Stabel, 2000a; Coussens, 2001, 2004). Las células T se clasifican en linfocitos T colaboradores (T *helper*, Th) y citotóxicos (Tc). Los primeros presentan el marcador CD4+ en su superficie, y su principal función consiste en amplificar la respuesta inmune mediante la secreción de numerosas citoquinas. Dichas células reconocen los antígenos que son previamente degradados en pequeños polipéptidos en los compartimentos endosómicos de las CPA y

presentados por las mismas junto con moléculas del MHC de clase II. En cambio los antígenos asociados a las moléculas del MHC de clase I son presentados a los linfocitos Tc, que presentan el marcador CD8 en su superficie (Kaufmann, 1991). Las células Th CD4⁺ presentan dos perfiles distintos de producción de citoquinas: Th1 y Th2 (Stabel, 2006). Así, la población linfocitaria **Th1** se caracteriza principalmente por la secreción de IFN- γ , IL-2 así como de TNF- α , citoquinas implicadas en la respuesta inmune de tipo **celular** frente a microorganismos intracelulares, y cuya secreción parece estar regulada por la IL-12. En cambio, los linfocitos **Th2** producen IL-4, IL-5, e IL-10 de forma notable, e inducen la producción de distintas inmunoglobulinas en las células B, siendo las responsables de la respuesta inmune **humoral** (Stabel, 2000a; Coussens, 2001; Kidd, 2003; Stabel, 2006). Tradicionalmente, las células Th1 se asocian con respuestas inmunes proinflamatorias y citotóxicas mediadas por células, mientras que las Th2 son potentes estimuladores de la producción de anticuerpos (Stabel, 2000a; Coussens, 2001; Kidd, 2003). Por ello, clásicamente, la respuesta inmune adaptativa se ha dividido en dos tipos: la mediada fundamentalmente por células, y la mediada por anticuerpos o humoral. Ambos tipos serán detallados a continuación en los apartados II.3.4.2.1 y II.3.4.2.2.

II.3.4.2.1. Respuesta inmune celular

Una vez fagocitado por los macrófagos y puestos en marcha los mecanismos de respuesta inmune innata, *Map* es procesado y presentado a las células T, activándose entonces la respuesta inmune celular. Los complejos acontecimientos inmunológicos que serán revisados a continuación vienen representados de forma resumida y esquematizada al final de este apartado de la respuesta inmune adaptativa en la figura II.1.

Begara-McGorum *et al.*, (1998) encontraron un predominio de células T CD4⁺ y $\gamma\delta$ ⁺ en los nódulos linfáticos mesentéricos y placas de Peyer ileales, así como de linfocitos T CD8⁺ en las placas yeyunales de corderos infectados experimentalmente con *Map* en fases iniciales, mientras que las células B fueron mucho más escasas en estas dos primeras localizaciones, coincidiendo con el modelo convencional propuesto en paratuberculosis de respuesta inmune celular precoz junto con niveles bajos de anticuerpos (Chiodini *et al.*, 1984a), en el que las células CD4⁺ y CD8⁺ serían las

primeras en ofrecer protección contra patógenos intracelulares (Kaufmann, 1991). Confirmando estos resultados, Weiss *et al.*, (2006) encontraron un ratio de células T/B de 5,8:1 en el íleon de vacas infectadas, frente al 0,7:1 en animales no infectados por *Map*. Interesantemente, en el estudio de Begara-McGorum *et al.*, (1998) no se observaron los mismos cambios en las poblaciones linfocitarias de la sangre periférica en comparación con la de los tejidos, sugiriendo por tanto que la respuesta periférica no reflejaría siempre de forma adecuada la respuesta inmune que se desarrolla en el tejido linfoide intestinal, y de ahí la importancia de estudiar los cambios inmunológicos *in situ*.

Otras evidencias de los cambio fenotípicos inducidos en las células inmunes por la infección con *Map* incluyen la menor expresión de las moléculas MHC de clase I y II en la superficie de macrófagos y linfocitos bovinos infectados con esta micobacteria (Weiss *et al.*, 2001, 2006). Valheim *et al.*, (2004) también comprobaron *in situ* la menor inmunotinción de células expresando MHC I y II en granulomas de cabras infectadas experimentalmente por *Map* en fases subclínicas. Como consecuencia, la falta de expresión de estas moléculas alteraría la presentación de antígenos a las células inmunes efectoras, inhibiendo así la activación de la respuesta inmune adaptativa específica.

El IFN- γ es la principal citoquina efectora de tipo Th1, y desempeña un papel muy importante en la diferenciación de las células que intervienen en este tipo de respuesta, así como en la inducción de la activación de los macrófagos (Stabel, 2000a, 2006). Por lo tanto, la producción de citoquinas implicadas en su secreción tales como la IL-12 también es crucial para el control de infecciones micobacterianas. En efecto, varios estudios llevados a cabo en un modelo murino con *M. tuberculosis* comprobaron *in vivo* e *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 T CD4⁺. En cambio, el bloqueo mediante anticuerpos anti-IL-12 resultó en un mayor crecimiento micobacteriano al reducir la expresión de IFN- γ (Cooper *et al.*, 1995, 1997). La interacción inicial de la micobacteria con el hospedador induce la secreción innata de IFN- γ , que a su vez estimula la producción de IL-12 por los macrófagos y células dendríticas para que dichas CPAs favorezcan la diferenciación de los linfocitos T CD4⁺ en células productoras de IFN- γ específicas del antígeno (Cooper *et al.*, 1997). Numerosos trabajos han reflejado la mayor secreción de IFN- γ en animales con

infección subclínica paratuberculosa. En cambio, en cuanto la infección progresa a una fase clínica, la producción periférica y local de esta citoquina disminuye (Stabel, 1996; Sweeney *et al.*, 1998; Stabel, 2000b). Coincidiendo con estos resultados, la elevada secreción de IFN- γ en fases iniciales de la infección paratuberculosa sugiere que esta citoquina es esencial para el control de la enfermedad (Storset *et al.*, 2001; Begg *et al.*, 2009). Por ello, su producción en sangre periférica en respuesta a antígenos de *Map* se ha convertido en uno de los métodos de diagnóstico más frecuentemente utilizado para detectar animales infectados subclínicamente (Stabel, 1996; Pérez *et al.*, 1999; Gwodzdz, 2000b).

Otras citoquinas tales como la IL-1 β , IL-6 y el TNF- α tienen importantes propiedades proinflamatorias como la de estimular las células T (Alzuherri *et al.*, 1996; Dinarello, 1996; Coussens, 2001). El TNF- α se considera una de las citoquinas básicas en las fases subclínicas de la paratuberculosis, estando estrechamente implicado en la formación de granulomas, tal y como se ha comentado en el apartado II.3.3. 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). El grupo de investigación de Coussens *et al.*, (2004) evidenció mediante PCR cuantitativa a tiempo real un cambio en el perfil de citoquinas en vacas infectadas subclínica y clínicamente por *Map* frente a los animales controles, tras detectar una mayor expresión génica de las citoquinas proinflamatorias IFN- γ , IL-1 α , IL-1 β , IL-6 e IL-8 en el íleon de las vacas infectadas en comparación con los animales controles no infectados. Lee *et al.*, (2001) encontraron patrones similares mediante hibridación *in situ*, al poner en evidencia la sobreexpresión de las mismas citoquinas (IFN- γ , IL-1 α , IL-1 β e IL-6) en secciones de íleon de vacas infectadas frente a animales sanos. Por otro lado, se ha demostrado que la IL-18, citoquina producida por macrófagos y células epiteliales intestinales, tiene la capacidad de estimular la producción de IFN- γ en ratones infectados con *M. tuberculosis* (Sugawara *et al.*, 1999).

Aunque la secreción de citoquinas proinflamatorias es necesaria para controlar la infección inicial, su producción excesiva o demasiado prolongada también puede llegar a ser perjudicial a nivel local debido al riesgo de causar excesivo daño tisular (Clarke, 1997; Stabel, 2006). Para ello, las citoquinas de tipo Th2 desempeñan un papel fundamental en contener las respuestas desmesuradas de tipo Th1, fundamentalmente la

IL-4 e IL-10. En efecto, Ito *et al.*, (1999), evidenciaron la función inmunosupresora que la IL-10 es capaz de ejercer indirectamente sobre el IFN- γ , al inhibir el gen IP-10, esencial para su secreción. También se ha descrito el papel supresor de la IL-4 sobre el IFN- γ (Peleman *et al.*, 1989). Sin embargo, al estar inhibido el IFN- γ por estas citoquinas Th2, los nuevos macrófagos reclutados en el lugar de la infección se vuelven incapaces en controlar la invasión de los bacilos, por lo que sería la propia alteración de la respuesta inmune del hospedador la que resultaría perjudicial, permitiendo finalmente la diseminación de las micobacterias en fases avanzadas. Confirmando estos resultados, Khalifeh y Stabel (2004a) demostraron que la expresión de IL-10 y TGF- β era mayor en íleon y nódulos linfáticos asociados de vacas que manifestaban un estado más avanzado de la enfermedad, con lesiones multifocales y elevado número de micobacterias, comparado con vacas sanas o en fase iniciales de la enfermedad. Además, también se evidenció 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* (Tanaka *et al.*, 2005). Por otro lado, la IL-13 (citoquina de tipo Th2), junto con la IL-4, son capaces de suprimir las respuestas de tipo Th1 al inducir una inadecuada vía alternativa de activación de los macrófagos (Rook, 2007).

El TGF- β es otra de las citoquinas conocida por sus efectos inmunomoduladores en la paratuberculosis. Tiene la capacidad de suprimir la secreción de IL-2, pero también se ha comprobado la inhibición que ejerce sobre los receptores del IFN- γ y del MHC-II y el bloqueo de la activación macrofágica, además de favorecer la secreción de la IL-10 (Maeda *et al.*, 1995; Letterio y Roberts, 1998). Khalifeh y Stabel (2004b) observaron que la adición exógena de TGF- β sólo o junto con IL-10 daba lugar a una disminución significativa en la secreción de IFN- γ en cultivos de PBMC de vacas infectadas por *Map*. Apoyando estos resultados, Muñoz *et al.*, (2008) comprobaron *in situ* en íleon y nódulos linfáticos asociados de bovinos y ovinos infectados natural y experimentalmente, que el TGF- β se expresaba abundantemente en los macrófagos y células gigantes repletos de *Map* en los animales con lesiones difusas multibacilares y negativos al test del IFN- γ , mientras que su presencia era escasa o nula en aquellos con lesiones focales, multifocales o difusas paucibacilares, con escasos bacilos y positivos al IFN- γ . Estos resultados indican que la secreción de esta citoquina se asociaría con la incapacidad de los macrófagos de contener la diseminación de *Map*, probablemente a través de la inhibición del IFN- γ (Muñoz *et al.*, 2008).

Recientemente, el desarrollo de nuevas tecnologías como la PCR a tiempo real ha permitido analizar la variación de expresión de numerosas citoquinas tanto en sangre periférica como a nivel local en muestras de intestino y nódulos linfáticos asociados en las diferentes formas inmunopatológicas de paratuberculosis. Algunos estudios se centraron principalmente en las dos formas, tuberculoides y lepromatosas, tanto en ovino como en vacuno (Tanaka *et al.*, 2005; Rossi *et al.*, 2009), y recientemente otros autores añadieron un tercer grupo de ovinos “asintomáticos”, es decir, considerados como infectados 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 (Smeed *et al.*, 2007; Gillan *et al.*, 2010). De esta manera, Smeed *et al.*, (2007) estudiaron el perfil de citoquinas en íleon de ovejas con las tres formas patológicas de paratuberculosis, y observaron que el TNF- α estaba incrementado mientras que la IL-18 se expresó en menor cantidad en los ovinos asintomáticos frente a los no infectados, indicando que estos animales también experimentaron un cambio inmunológico en respuesta a la exposición a *Map* a pesar de no formarse lesiones granulomatosas. También detectaron una mayor expresión de IL-1 β e IL-6 en animales paucibacilares frente a los asintomáticos (Smeed *et al.*, 2007). Otros autores encontraron elevadas expresiones de TGF- β , IL-10, IL-1 β y TNF- α en lesiones lepromatosas de ovejas, en comparación con la mayor expresión de IFN- γ e IL-12 en las tuberculoides (Rossi *et al.*, 2009). Estas diferencias observadas en las diferentes formas patológicas de 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).

Para contener el daño tisular causado por un exceso de citoquinas proinflamatorias a nivel local, el hospedador parece disponer de una subpoblación de células T con funciones inmunosupresoras denominadas células *T reguladoras* (Treg). Estas células se caracterizan por expresar los marcadores de superficie CD4⁺ y CD25⁺, además del factor de transcripción “forkead box P3” (FoxP3) (Hori *et al.*, 2003). Las células CD4⁺ inducidas a diferenciarse en Treg tras la exposición de antígenos producen principalmente IL-10 (en tal caso se denominan “células Tr1”) o TGF- β (en este caso se hablaría de “células Th3”) (Beissert *et al.*, 2006). Sin embargo, el

mecanismo de acción de estas células en la patogenia de la paratuberculosis es una cuestión que queda aún por aclarar (De Almeida *et al.*, 2008). Tras aislar leucocitos mononucleares de la LP del íleon de vacas infectadas subclínicamente y otras no infectadas, Weiss *et al.*, (2006) encontraron un mayor porcentaje de células CD4+CD25+ en los animales infectados (21%) en comparación con los controles (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). Coincidiendo con estos resultados, otros estudios detectaron mediante tinción inmunohistoquímica la presencia de una mayor población de linfocitos expresando FoxP3, y también se confirmó la mayor expresión del gen FoxP3 mediante PCR a tiempo real en íleon de vacas con infección subclínica en comparación con vacas sanas o con paratuberculosis clínica (De Almeida *et al.*, 2008). Estos resultados sugieren que la población de Treg parece proliferar en respuesta a la infección por *Map* en animales en fases subclínicas de la infección, y en consecuencia dichas células actuarían inhibiendo la respuesta inmune de la mucosa, lo que contribuiría a un estado de latencia, o bien a la progresión de la enfermedad (Stabel, 2006; Weiss *et al.*, 2006; Sohal *et al.*, 2008).

Recientemente, se ha descrito un tercer subtipo de células T CD4+, independientes de las Th1 y Th2, denominadas las Th17. Estas células estarían implicadas en la inmunidad protectora del hospedador frente a patógenos intracelulares, aunque con menor eficacia que las Th1 (Curtis y Way, 2009). En infecciones micobacterianas, la producción de la citoquina proinflamatoria IL-17 y la respuesta de células Th17 dependen ampliamente de la IL-23. Ambas citoquinas han sido estudiadas en tuberculosis, destacando su papel en la inducción y mantenimiento de la respuesta protectora frente a la micobacteria, en asociación con las citoquinas IL-12, IFN- γ y TNF- α (Khader y Cooper, 2008). Babu *et al.*, (2010), en un estudio reciente, analizaron el papel de las 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. Interesantemente, esta menor expresión se asoció con la mayor expresión del gen FoxP3, indicando un incremento de células Treg. Además, la depleción de estas células CD4+CD25+ revirtió la inhibición de células Th17 en estos pacientes con tuberculosis latente. Estos resultados demostraron 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.3.4.2.2. Respuesta inmune humoral

Tradicionalmente, la respuesta inmune humoral en paratuberculosis se ha asociado con las fases avanzadas de la enfermedad y con animales presentando lesiones difusas de tipo multibacilares que se manifiestan con signos clínicos y la excreción de bacilos en las heces (Clarke, 1997; Pérez *et al.*, 1997; Corpa, 1999; García-Marín *et al.*, 2000; Storset *et al.*, 2001; González, 2003). 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). Además, se asume que durante estas fases clínicas de la paratuberculosis se produce el cambio hacia una inmunidad mediada por células Th2, con la consecuente secreción de citoquinas de tipo 2, junto con la inhibición de las respuestas Th1, tal y como se comentó anteriormente (Stabel, 2000a, 2006). 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.

La cantidad de células B en las PBMC de vacas infectadas por *Map* de forma natural fue superior en los animales presentando signos clínicos frente a aquellos sanos o subclínicos (Waters *et al.*, 1999; Stabel y Khalifeh, 2008). Estos resultados coinciden con otros autores, quienes comprobaron en infecciones naturales y experimentales que en cuanto progresaba la infección hacia fases clínicas, se detectaban títulos más elevados de anticuerpos en el suero de los animales infectados (Pérez *et al.*, 1997; Burrells *et al.*, 1998; Storset *et al.*, 2001; Begg *et al.*, 2009). Interesantemente, en el estudio de Waters *et al.*, (1999), los linfocitos B aislados de las vacas clínicas no

proliferaron en respuesta a varios antígenos de *Map*, a pesar de la proliferación observada en respuesta a la estimulación con concanavalina A (ConA, que induce división celular en los linfocitos T). En cambio, la respuesta proliferativa de las células B fue más elevada en aquellas vacas con la infección subclínica. Por ello, una de las hipótesis propuestas para explicar la progresión de la infección hacia lesiones crónicas junto con la pérdida del control del patógeno, implicarían por un lado la alteración del fenotipo de los linfocitos B, y por otro lado 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).

El momento exacto en el que se produce el paso a la respuesta inmune humoral tras la exposición inicial a *Map* depende, entre otros factores, de la vía de entrada y de la dosis de *Map* (Waters *et al.*, 2003). En efecto, se ha comprobado en los últimos años que este cambio no tiene necesariamente porqué suceder en las fases avanzadas de la paratuberculosis. Precisamente, el grupo de investigación de Waters *et al.*, (2003) observaron que la infección con elevadas dosis de *Map* parecía acelerar la producción de anticuerpos, encontrando vacas positivas mediante ELISA frente al antígeno *lipoarabinomanano* (LAM) de la micobacteria desde los 134 días tras la infección experimental por vía intratonsilar con *Map*, adelantando incluso a la respuesta inmune celular. En otro estudio en cabras infectadas experimentalmente de paratuberculosis encontraron una respuesta inmune humoral desde los 180 dpi (Munjaj *et al.*, 2005). Sin embargo, estos resultados dependen de los antígenos de *Map* empleados para la detección de anticuerpos, así como del isotipo de anticuerpo utilizado para analizar la respuesta inmune (Koets *et al.*, 2001; Bannantine *et al.*, 2008). Así, otros experimentos observaron el perfil clásico de elevada respuesta inmune humoral en vacas con infección clínica empleando el antígeno PPD de *Map* y el subtipo IgG1, mientras que, tras analizar el nivel de anticuerpos con otros antígenos de la micobacteria y subtipos de IgG, el patrón de respuesta fue diferente y no se observó el tradicional paso hacia la respuesta humoral entre las vacas infectadas asintomáticas y aquellas con paratuberculosis clínica (Koets *et al.*, 2001).

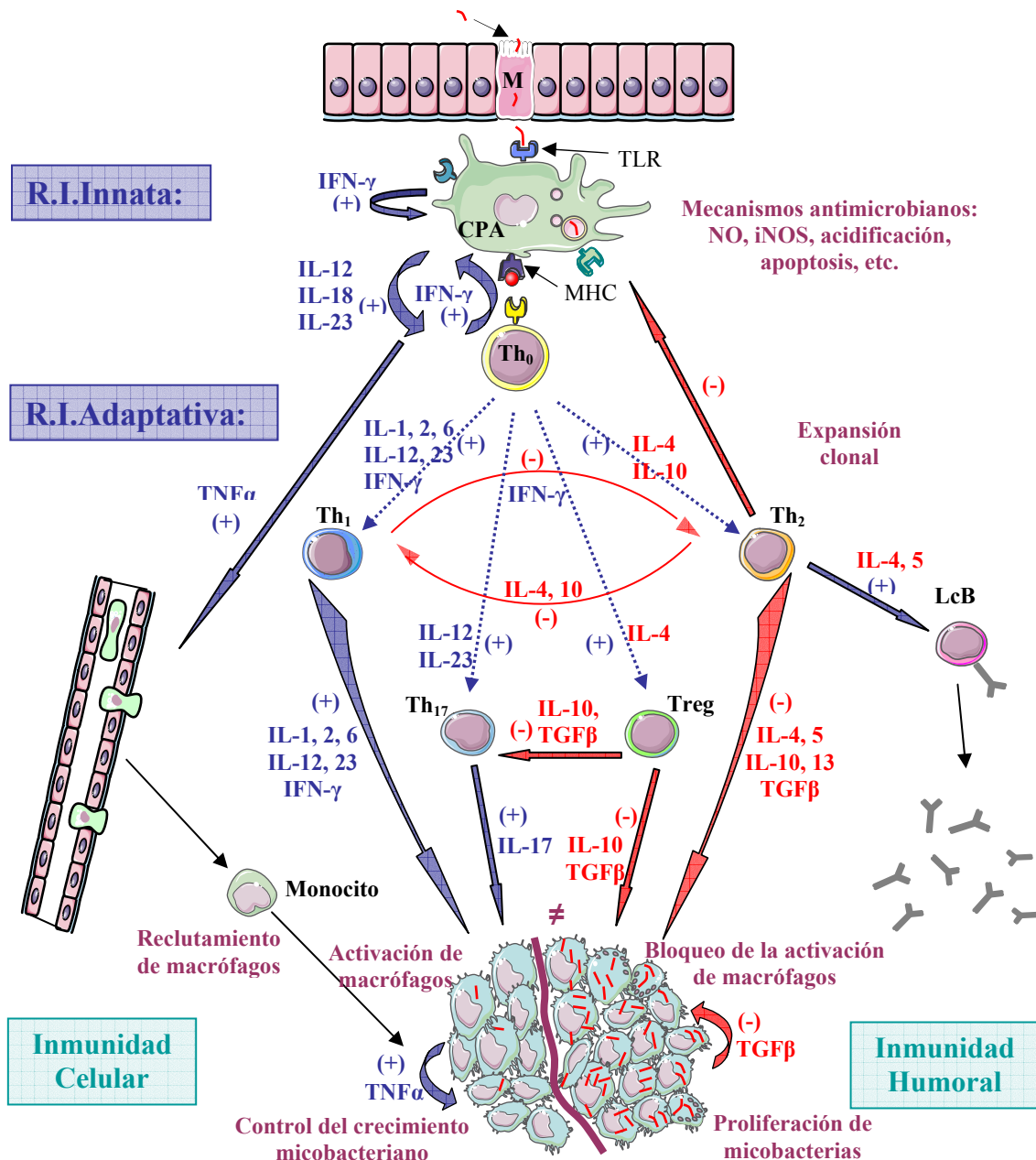


Figura II.1. Resumen esquematizado de los acontecimientos inmunológicos que suceden en el hospedador en respuesta a la infección por *Map*. Las citoquinas representadas en azul son las consideradas tradicionalmente de tipo Th1, y las rojas de tipo Th2. Las flechas azules acompañadas de la señal (+) indican un efecto de “estimulación”, y las rojas, junto con la señal (-), un efecto “inhibidor”. Al penetrar *Map* por las células M del intestino, es captado por las células presentadoras de antígenos (CPA) y se activan los mecanismos de la respuesta inmune innata. Al entrar en contacto con los antígenos de *Map* a través del MHC de tipo II, los linfocitos inmaduros Th0 se diferencian en diversos subtipos según el predominio de citoquinas en el medio, entrando en acción la respuesta inmune adaptativa. En un principio, tanto las CPA como las células Th1 producen citoquinas Th1 protectoras, entre ellas el TNF- α , que induce la salida de monocitos de los vasos sanguíneos, y estimulan el reclutamiento de macrófagos para contener el crecimiento micobacteriano. Las demás citoquinas Th1 contribuyen a la expansión clonal de linfocitos Th1, la activación macrofágica, así como la inhibición de las células Th2. Las células Th17 actúan de forma sinérgica con las Th1. En cambio, cuando se produce un fallo en esta respuesta inmune protectora o cuando la producción de las citoquinas Th1 resulta excesiva y puede provocar un cierto daño tisular, empiezan a predominar los linfocitos Th2, quienes, con la ayuda de las células T reguladoras, inhiben la actividad Th1 y contribuyen a la inhibición de la activación macrofágica, con la consecuente multiplicación de *Map*. Además, en este momento, se estimula la producción de anticuerpos específicos frente a la micobacteria por los linfocitos B (Lc B).

II.3.4.3. Espectro inmunopatológico

En la paratuberculosis, al igual que sucede en otras micobacteriosis como la tuberculosis o la lepra, se ha descrito un espectro de lesiones intestinales estrechamente relacionadas con la polarización de la respuesta inmune del hospedador (Ridley y Jopling, 1962, 1966; Ridley, 1983; Yamamura *et al.*, 1991; Orme *et al.*, 1993). En base a ello, se ha establecido un modelo patogénico seguido y estudiado por numerosos autores (Bendixen, 1978; Chiodini *et al.*, 1984a; Chiodini, 1996; Clarke, 1997; García-Marín *et al.*, 2000), esquematizado en la figura II.2. De manera muy simplista, las respuestas inmunes de tipo Th1 (inmunidad celular), con el 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 (**formas tuberculoides**) (Figura II.2). Sin embargo, a la vez que la infección progresa hacia fases clínicas más avanzadas (**formas intermedias**), si los mecanismos inmunes celulares iniciales fallan en detener la infección, las micobacterias tienen ya la posibilidad de proliferar y la respuesta Th1 decae, hasta verse superada por la Th2 (inmunidad humoral), que se asocia con la progresión de las lesiones de manera difusa hasta desarrollarse la enteritis crónica granulomatosa típica de las formas multibacilares, acompañadas de una elevada carga micobacteriana en el intestino (**formas intermedias-lepromatosas**) (Figura II.2). En cambio, si se mantiene 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 (**formas intermedias-tuberculoides**) (Chiodini *et al.*, 1984a; Clarke, 1997; García-Marín *et al.*, 2000; Stabel, 2000a; Coussens, 2001) (Figura II.2).

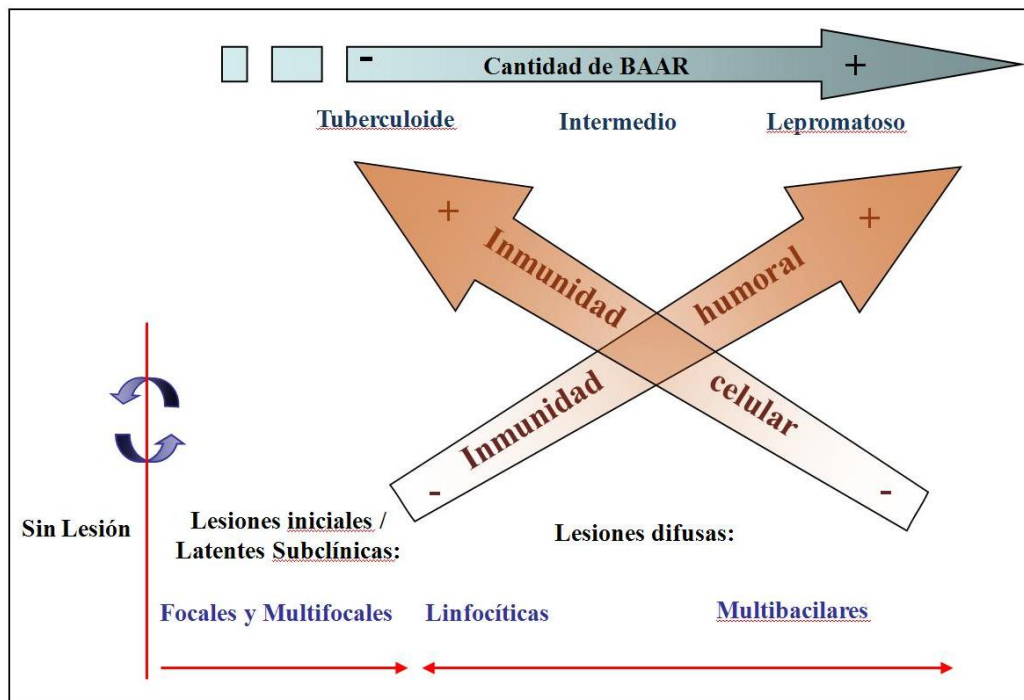


Figura II.2. Esquema del espectro inmunopatológico de la paratuberculosis. Las formas “lepromatosas” propias no han sido descritas en paratuberculosis (García-Marín *et al.*, 2000). Tomado de García-Marín *et al.*, (2000).

Confirmando esta hipótesis, numerosos estudios han relacionado la formación 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) o caprino (Corpa, 1999; Storset *et al.*, 2001). También se ha comprobado que dentro de los animales clínicos afectados de paratuberculosis, aquellos con lesiones linfocíticas / paucibacilares (de tipo *intermedio-tuberculoides*) presentaban una fuerte respuesta celular, mientras que aquellos con lesiones multibacilares (tipo *intermedio-lepromatosas*) manifestaban una respuesta inmune humoral (Burrells *et al.*, 1998). Otros grupos de investigación se centraron en los acontecimientos inmunológicos durante las fases iniciales de la infección por *Map*, observando un predominio de células CD4⁺ y una mayor respuesta al test linfoproliferativo 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).

No obstante, la respuesta del hospedador frente a *Map in vivo* resulta más compleja aún, 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 en realidad ambos subtipos se llegan a solapar 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), tal y como se comentó anteriormente.

Por otro lado, cabe señalar que según algunos autores, el espectro inmunopatológico sería distinto en la paratuberculosis bovina, donde las formas paucibacilares representarían las formas iniciales de la enfermedad que progresarían a formas más severas multibacilares, mientras que en ovino, ambos espectros representarían dos manifestaciones opuestas de las fases más avanzadas de la enfermedad (Smeed *et al.*, 2007; Gillan *et al.*, 2010). Dichas formas patológicas serán estudiadas más ampliamente en el capítulo de cuadro lesional (apartado II.5).

Recientemente, el grupo de investigación de Geijo (2007) y Juste *et al.*, (2009b) han propuesto un nuevo modelo de patogenia de las infecciones por *Map*, diferenciado cuatro estadios o formas inmunopatológicas en función de la respuesta inmune y de la detección de *Map* en sangre. Este modelo ha sido sugerido tanto en pacientes de enfermedad inflamatoria intestinal (IBD), para tratar de elucidar el papel etiológico de *Map* en la enfermedad de Crohn (Juste *et al.*, 2009b), como en la paratuberculosis bovina (Geijo, 2007). De manera resumida, se distinguen los siguientes estadios inmunopatológicos, resumidos en la tabla II.6 (Geijo, 2007):

- **Formas apatogénicas:** se corresponderían con individuos “sanos”, que se caracterizan por tener una respuesta inmune innata local relativamente baja con respecto a los casos clínicos, con valores de IFN- γ_0 (niveles basales de IFN- γ en respuesta al PBS) similares entre sí. A su vez, éstas se dividen en formas bacteriémicas (positivos a la presencia de *Map* en sangre mediante PCR) y no bacteriémicas. Ambas desarrollarían una respuesta inmune adaptativa específica eficiente, si bien los individuos con bacteriemia tendrían una respuesta celular (IFN- γ frente a PPD aviar) y humoral más elevada. Por lo tanto, en este caso la respuesta inmune celular actúa de forma adecuada,

siendo capaz de contener la infección, lo que explica la ausencia de daño tisular y de inflamación en estos individuos. Según Geijo (2007), los animales que manifiestan las formas apatogénicas bacteriémicas tendrían una cierta resistencia natural a la paratuberculosis y tendrían la capacidad de superar una infección.

- **Formas patogénicas:** estas formas engloban a los individuos enfermos, y que manifiestan una respuesta inmune innata inespecífica elevada e incontrolada, así como una respuesta adaptativa también alta y alterada. La persistencia de la reacción innata local atrae a más células *in situ* y acaba por provocar el daño tisular y la inflamación. Este acontecimiento se explicaría por un fallo en la transición entre la respuesta inmune innata y la adaptativa. A su vez, se distinguen nuevamente los animales abacteriémicos de los bacteriémicos. Los primeros manifiestan una fuerte respuesta inmune celular capaz de contener la diseminación de las micobacterias en niveles paucibacilares, pero induciendo a la vez procesos inflamatorios. En cambio la respuesta inmune celular en los animales bacteriémicos, inferior a la de los abacteriémicos, les impide detener el crecimiento de *Map*, lo que supone un estímulo para la mayor producción de anticuerpos, coincidiendo con una respuesta humoral elevada. Esta fase se asemeja al paso de la respuesta Th1 a Th2 descrito en el modelo patogénico tradicional comentado anteriormente.

	PCR sangre	Lesiones	Respuesta Inmune	Forma
Animal "sano" (no enfermo)	Sin bacteriemia	Abacilares	-R.I.I. baja -R.I.A. eficiente	Apatogénica / Abacteriémica
	Con bacteriemia	Bacilares	-R.I.I. baja -R.I.A. moderada pero eficiente	Apatogénica / Bacteriémica
Animal enfermo clínico	Sin bacteriemia	Paucibacilares	-R.I.I. intensa y persistente -R.I.A.inadecuada: > R.Celular	Patogénica / Abacteriémica
	Con bacteriemia	Multibacilares	-R.I.I. intensa y persistente -R.I.A.inadecuada: > R.Humoral	Patogénica / Bacteriémica

Tabla II.6. Resumen de las formas inmunopatológicas propuestas por Geijo (2007) en la patogenia de la paratuberculosis bovina. R.I.I: Respuesta inmune innata; R.I.A: Respuesta Inmune Adaptativa. Extraído de Geijo (2007).

Tanto Geijo (2007) como Juste *et al.*, (2009b) sugieren que los elevados niveles de IFN- γ basales observados en los individuos con formas patogénicas 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, bien de origen genético.

II.4. SIGNOS CLÍNICOS

Debido al carácter crónico de la paratuberculosis y a pesar de infectarse en las primeras semanas de vida, los animales no empiezan a manifestar signos clínicos hasta la edad adulta, tras un largo período de incubación, apareciendo los síntomas con mayor frecuencia entre los dos y cinco años, frecuentemente tras el parto, durante la primera o la segunda lactación (Chiodini *et al.*, 1984a; Pérez *et al.*, 2000).

Sin embargo, en una explotación en la que los animales están en contacto continuo con *Map*, aquellos que desarrollan la enfermedad clínica constituyen una minoría (la punta del iceberg), siendo mucho más elevado el porcentaje de animales subclínicos, que permanecen infectados de forma latente pero sin llegar a progresar hacia la forma clínica de la paratuberculosis (Pérez *et al.*, 2000). La enfermedad clínica se considera, por tanto, la fase terminal de una infección crónica subclínica, y el paso de una forma a otra puede estar desencadenado por numerosas situaciones causantes de estrés, tales como la gestación, el parto, un manejo inadecuado, una mayor exigencia productiva de leche, la desnutrición, infecciones parasitarias, o el pastoreo en suelos secos y deficientes en minerales (Chiodini *et al.*, 1984a; Blood *et al.*, 1989). No obstante, no se conocen con certeza todos los factores y mecanismos implicados en el establecimiento de la fase clínica.

El signo clásico y más característico de la paratuberculosis en rumiantes es la progresiva pérdida de peso y condición corporal, a pesar de que los animales siguen manteniendo el apetito y reciben una alimentación adecuada (Chiodini *et al.*, 1984a; García-Marín *et al.*, 1994; Whitlock y Buergelt, 1996; Clarke, 1997; Pérez *et al.*, 2000). Esta pérdida de peso sería consecuencia de la malabsorción y pérdida de proteínas asociados a la inflamación del intestino (Allen *et al.*, 1974). Otro de los signos clínicos que se pueden encontrar es el edema hipoproteínémico en las partes declives, siendo

muy típico el edema submandibular, que suele preceder incluso los demás síntomas (Chiodini *et al.*, 1984a; Blood *et al.*, 1989). Los animales enfermos no presentan fiebre, beben y comen mucho, pero sin embargo siguen adelgazando de forma progresiva hasta llegar en los casos más avanzados a un estado de caquexia, debilitamiento general, con atrofia muscular, mal estado del pelo, fragilidad o caída de la lana en el caso de ovinos, palidez de las mucosas, emaciación, postración y finalmente la muerte (Juste *et al.*, 1983; Blood *et al.*, 1989; García-Marín *et al.*, 1994; Clarke, 1997; Corpa *et al.*, 1998; Pérez *et al.*, 2000). En este sentido, la mortalidad anual en un rebaño puede variar entre el 3 y el 10% de los animales adultos (Chiodini *et al.*, 1984a).

En el ganado bovino, es muy frecuente que esta pérdida de peso se acompañe de una profusa diarrea líquida, no sanguinolenta, en ocasiones maloliente, que no responde eficazmente a tratamientos con antibióticos o cambios de alimentación. Estos episodios de diarrea pueden ser crónicos, pero también es frecuente que se presenten de forma intermitente, con períodos de remisión de semanas o incluso meses, para volver a reaparecer de forma más grave, generalmente tras el parto (Chiodini *et al.*, 1984a; Blood *et al.*, 1989; Corpa *et al.*, 1998; Pérez *et al.*, 2000).

En cambio, la diarrea no es un signo característico de la paratuberculosis en las especies ovina y caprina, en las que a menudo el único signo clínico observado es la pérdida de peso progresiva, que suele manifestarse generalmente después del parto (García-Marín *et al.*, 1994; Valentin-Weigand y Goethe, 1999). No obstante, la diarrea puede aparecer, o, más frecuentemente, se puede notar un reblandecimiento de las heces, que puede observarse de manera intermitente (McEwen, 1939; Levi, 1948; Stamp y Watt, 1954; Badiola *et al.*, 1979; Chiodini *et al.*, 1984a; García-Marín *et al.*, 1994). Por ello, en ovino, se puede observar la presencia de heces adheridas a la lana, manchando la zona de la cola, del periné y del tercio posterior (García-Marín *et al.*, 1994; Valentin-Weigand y Goethe, 1999). Por otro lado, mientras el curso clínico de la enfermedad puede durar de 3 a 6 meses o incluso prolongarse durante más tiempo en el ganado vacuno, éste suele ser mucho más corto en los pequeños rumiantes (Stamp y Watt, 1954; Chiodini *et al.*, 1984a).

Otro de los signos relacionados con esta enfermedad es la marcada disminución de la producción láctea, de especial importancia en el ganado lechero de alto

rendimiento, y que ya suele presentarse en las fases subclínicas de la paratuberculosis, antes de que se hayan detectado los primeros síntomas (Aduriz *et al.*, 1994; Stabel, 1998; Losinger, 2005; Raizman *et al.*, 2009). En la fase subclínica, los animales también pueden presentar otros signos inespecíficos, principalmente relacionados con problemas de carácter reproductivo como infertilidad, además de una mayor sensibilidad a padecer problemas de mamitis (Merkal *et al.*, 1975; Corpa *et al.*, 1998; Stabel, 1998). Por ello, no es extraño que muchos animales no lleguen a desarrollar signos clínicos claros de paratuberculosis, sino que suelen ser enviados al matadero de forma prematura a causa del bajo rendimiento productivo, de la pérdida de peso o de las diarreas intermitentes, que el ganadero o veterinario suelen confundir con otros problemas digestivos no infecciosos (Badiola *et al.*, 1979; Whitlock y Buergelt, 1996; Pérez *et al.*, 2000).

II.5. LESIONES

II.5.1. LESIONES MACROSCÓPICAS

Los primeros hallazgos encontrados al realizar la necropsia de un animal clínicamente afectado de paratuberculosis son comunes a cualquier proceso caquetizante, pudiendo apreciarse desde emaciación, atrofia muscular y pérdida de la grasa mesentérica, hasta la presencia de edemas en los tejidos subcutáneos de las zonas más declives, destacando el edema submandibular. También es frecuente 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). Sin embargo, las lesiones más características de esta enfermedad se localizan en el intestino delgado y sistema linfático dependiente (Chiodini *et al.*, 1984a; Pérez *et al.*, 2000; Brown *et al.*, 2007).

Macroscópicamente, las lesiones específicas de paratuberculosis se asientan principalmente en los tramos finales del intestino delgado, fundamentalmente en válvula ileocecal, íleon, y las porciones más distales del yeyuno, pudiendo verse afectados igualmente el ciego y los primeros tramos de colon. No obstante, en casos

avanzados, las lesiones pueden extenderse de forma difusa desde el duodeno hasta el recto (Chiodini *et al.*, 1984a; Blood *et al.*, 1989). La pared intestinal aparece muy engrosada, doblando o triplicando su espesor normal, haciendo que externamente tenga el aspecto de un “tubo de goma” (Pérez *et al.*, 2000). Al abrir los tramos afectados, la mucosa y submucosa aparecen tumefactas, muy engrosadas y forman pliegues muy característicos hacia la luz que se asemejan a las circunvoluciones del cerebro. Dichos pliegues no desaparecen al estirar el intestino, y, en ocasiones, presentan en sus ápices un color enrojecido por la congestión e incluso pequeñas erosiones, en contraste con la coloración pálida del resto de la pared intestinal (Buergelt *et al.*, 1978; Juste *et al.*, 1983; Chiodini *et al.*, 1984a; Carrigan y Seaman, 1990; Corpa *et al.*, 1998; Pérez *et al.*, 2000; Brown *et al.*, 2007).

Otro hallazgo característico y constante de la paratuberculosis, especialmente en ovinos y caprinos, es la presencia de linfangitis y linfangiectasias en los tramos afectados (Pérez *et al.*, 2000; Brown *et al.*, 2007). En estas lesiones, los vasos linfáticos intestinales aparecen como cordones blanquecinos o transparentes que discurren de forma tortuosa haciendo prominencia sobre la serosa intestinal, y en casos extremos pueden verse en su recorrido hacia los nódulos linfáticos mesentéricos a través del mesenterio (Buergelt *et al.*, 1978; Badiola *et al.*, 1979; Blood *et al.*, 1989; García-Marín *et al.*, 1994; Pérez *et al.*, 2000; Kurade *et al.*, 2004; Brown *et al.*, 2007). En la especie bovina, estas linfangiectasias no son tan frecuentes, y suelen ser focales y menos aparentes (Buergelt *et al.*, 1978; Pérez *et al.*, 2000).

Los nódulos linfáticos mesentéricos yeyunales e ileocecales aparecen tumefactos y edematosos. A la sección presentan una coloración muy pálida, observándose áreas aclaradas entre la cortical y medular. Otras veces, la medular puede adquirir un tono marrónáceo-verduzco (Paliwal y Rajya, 1982; Chiodini *et al.*, 1984a; Carrigan y Seaman, 1990; Brown *et al.*, 2007). En ovinos, y especialmente en el ganado caprino, también se ha señalado la aparición de focos de necrosis caseosa y calcificación en los nódulos linfáticos mesentéricos y también, aunque menos frecuentemente, en la mucosa, submucosa, serosa o vasos linfáticos (Rajya y Singh, 1961; García-Marín *et al.*, 1994; Clarke, 1997; Tafti y Rashidi, 2000; Valheim *et al.*, 2002).

En el ganado ovino y caprino, la formación de pliegues en el intestino puede no ser tan evidente como en la especie bovina, y el incremento de grosor de la pared puede ser moderado-leve, incluso a veces muy sutil, 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 cabras, se ha señalado que el engrosamiento suele ser más evidente en yeyuno que en íleon (Corpa *et al.*, 2000a). En pequeños rumiantes, en ocasiones, la linfangitis es el único cambio macroscópico apreciable que sirve para el diagnóstico presuntivo de paratuberculosis (Brown *et al.*, 2007). Además, en ovinos, se ha descrito la coloración amarillenta o anaranjada de la mucosa intestinal en casos de infecciones por cepas pigmentadas de *Map* (Taylor, 1951a, 1953b; Stamp y Watt, 1954; Clarke y Little, 1996; Brown *et al.*, 2007).

Cabe mencionar que el grado de lesión macroscópica intestinal no se corresponde necesariamente con los signos clínicos observados. Este hecho se ha descrito principalmente en el ganado ovino y caprino, aunque también puede darse en la especie bovina. Así, no es infrecuente encontrarse con lesiones macroscópicas mínimas en animales que sin embargo presentaban signos clínicos graves o a la inversa (Blood *et al.*, 1989; Clarke y Little, 1996; Clarke, 1997; Brady *et al.*, 2008). Por otro lado, no se suelen apreciar cambios evidentes en el intestino o nódulos linfáticos asociados de animales infectados en fase subclínica; no obstante, 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).

En vacas con paratuberculosis clínica muy avanzada y diarreas, también se ha descrito la formación de focos de mineralización y fibrosis en las arterias aorta y mesentérica, visibles macroscópicamente en forma de placas rugosas haciendo prominencia sobre la luz arterial (Simpson, 1966; Paliwal y Rajya, 1982; Pérez *et al.*, 2000; Brown *et al.*, 2007).

II.5.2. LESIONES MICROSCÓPICAS

Las lesiones microscópicas propias de paratuberculosis se corresponden con una **enteritis y linfadenitis** de tipo **granulomatoso**, caracterizadas por un infiltrado focal o difuso de macrófagos homogéneos y células epitelioides, con un núcleo claro y abundante citoplasma de aspecto espumoso, agrupándose y formando los denominados *granulomas* que caracterizan esta enfermedad (Pérez *et al.*, 2000; Brown *et al.*, 2007).

Las lesiones en los animales infectados subclínicamente son de tipo focal, formadas por pequeños granulomas en el espacio interfolicular del tejido linfoide de las placas de Peyer, pero a medida que progresa la infección, el infiltrado inflamatorio se va haciendo más extenso y progresa hacia la mucosa (Stamp y Watt, 1954; Buergelt *et al.*, 1978; Pérez *et al.*, 1996; García-Marín *et al.*, 2000; Valheim *et al.*, 2002), de forma que los animales con la enfermedad clínica avanzada suelen mostrar lesiones graves difusas, frecuentemente del tipo multibacilar, con la presencia de abundantes BAAR, siendo la válvula íleocecal, el íleon y el yeyuno distal los tramos intestinales más comúnmente afectados (Buergelt *et al.*, 1978; Carrigan y Seaman, 1990; Corpa *et al.*, 1998; Pérez *et al.*, 2000; Brady *et al.*, 2008). En estos animales, el marcado incremento de grosor de la pared intestinal visible macroscópicamente se debe a la presencia de un abundante infiltrado inflamatorio, que se extiende por toda la LP, desde la submucosa hasta la mucosa, llegando a alterar la estructura normal del intestino. Dicho componente celular, además de los macrófagos y células epitelioides, puede estar constituido también por células gigantes multinucleadas de Langhans, observadas con mayor frecuencia en el ganado bovino, junto con un número variable de linfocitos, células plasmáticas y eosinófilos (Buergelt *et al.*, 1978; Juste *et al.*, 1983; Pérez *et al.*, 2000; González *et al.*, 2005; Brown *et al.*, 2007). El exudado inflamatorio se extiende por las vellosidades, provocando su ensanchamiento y aplanamiento, y la fusión en los casos más graves. El mosaico de células epitelioides en la mucosa provoca la compresión de las criptas de Lieberkühn, cuya luz aparece dilatada y obliterada por la presencia de abundante material necrótico y células inflamatorias en su interior. Además, es frecuente observar la dilatación de los vasos linfáticos de la LP (Buergelt *et al.*, 1978; Badiola *et al.*, 1979; Chiodini *et al.*, 1984a; Pérez *et al.*, 1996; Corpa *et al.*, 1998, 2000a; Pérez *et al.*, 2000; González *et al.*, 2005; Brown *et al.*, 2007). En casos graves, los macrófagos pueden infiltrar la submucosa y penetrar en las capas musculares

adyacentes, si bien esta última alteración es más inconstante (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). Los bacilos en este tipo de lesiones multibacilares son fácilmente detectables en el citoplasma de macrófagos y células gigantes mediante la tinción de 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).

Algunos animales con signos clínicos y lesiones macroscópicas, presentan las denominadas formas paucibacilares o linfocíticas, que pueden resultar más difíciles de diagnosticar que las multibacilares, al observarse histológicamente escasas células epitelioides o gigantes, mientras que la LP está 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 aún más el diagnóstico de esta enfermedad (Chiodini *et al.*, 1984a; Carrigan y Seaman, 1990; Pérez *et al.*, 1996; Brown *et al.*, 2007).

La linfangitis constituye otro de los cambios histológicos más constante en paratuberculosis. Se caracteriza por una dilatación de los vasos linfáticos, que se encuentran rodeados de un infiltrado linfoplasmocitario, así como de algunas células epitelioides. En casos avanzados, se pueden formar granulomas en la pared de estos vasos, que penetran hacia la luz y acaban obliterándola, desarrollándose entonces endolinfangitis trombóticas, en cuyos trombos se pueden detectar algunas micobacterias (Seaman *et al.*, 1981; Carrigan y Seaman, 1990; García-Marín *et al.*, 1994; González, 1998; Pérez *et al.*, 2000; Brown *et al.*, 2007).

En los nódulos linfáticos mesentéricos, principalmente el yeyunal caudal y los ileocecales, las lesiones son muy semejantes a aquellas observadas en el intestino, y consisten inicialmente en un infiltrado granulomatoso, formado por macrófagos y algunas células gigantes, a veces aisladas, en la zona cortical y paracortical, entre los folículos linfoides y en los senos peritrabeculares. A medida que progresa la infección, estas células se van acumulando y forman agregados macrofágicos extendiéndose por toda la corteza de forma difusa, alterando la estructura normal y llegando a infiltrar la

zona medular (Rajya y Singh, 1961; Buergelt *et al.*, 1978; Chiodini *et al.*, 1984a; Van Kruiningen *et al.*, 1986; González *et al.*, 2005; Brown *et al.*, 2007).

En la especie ovina, y principalmente la caprina, es frecuente encontrar focos de necrosis caseosa y calcificación en los granulomas, incluso en ocasiones con encapsulamiento fibroso, tanto en la mucosa, submucosa, serosa intestinal como en los vasos, y especialmente en los nódulos linfáticos mesentéricos. En cambio, estos hallazgos son muy raros en el ganado bovino (Levi, 1948; Stamp y Watt, 1954; Rajya y Singh, 1961; Buergelt *et al.*, 1978; Chiodini *et al.*, 1984a; Clarke, 1997; Corpa *et al.*, 2000a; Valheim *et al.*, 2002; Brown *et al.*, 2007). En ciervos, también es frecuente observar 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 un cambio similar a una lesión tuberculosa o causada por otras subespecies de *M. avium* (Brown *et al.*, 2007).

Respecto a las lesiones iniciales, de carácter focal tal y como se ha señalado, suelen localizarse en el tejido linfoide de las placas de Peyer (Nisbet *et al.*, 1962; Gilmour *et al.*, 1965b; Kluge *et al.*, 1968; Juste *et al.*, 1994; Pérez *et al.*, 1996; Sigurdardóttir *et al.*, 1999; García Marín *et al.*, 2000; Valheim *et al.*, 2002; Kurade *et al.*, 2004), habiéndose observado diferencias en cuanto a la presencia de lesiones entre los diferentes tramos intestinales. Valheim *et al.*, (2002), tras infectar experimentalmente cabras con *Map* y analizar la extensión de las lesiones en la fase subclínica, encontraron que la mayoría de ellas se localizaban en relación con el tejido linfoide persistente de las placas de Peyer ileocecal (PPIC) y yeyunal media (PPYm), atribuyendo la ausencia de lesiones en yeyuno distal e íleon proximal a la involución gradual que experimenta la placa de Peyer ileal (PPI) con la edad. Además, respaldando estos resultados, detectaron una gran similitud morfológica precisamente entre el tejido linfoide organizado de PPIC y PPY en comparación con la PPI, en cabras sanas de 5 semanas de vida (Valheim *et al.*, 2002). En esta misma especie, otros estudios también señalaron la mayor presencia de lesiones focales en relación con la válvula ileocecal, frente a una mayor proporción de lesiones graves en el yeyuno (Sigurdardóttir *et al.*, 1999; Corpa *et al.*, 2000a; Storset *et al.*, 2001). Por lo contrario, tanto en caprino como ovino, otros autores han encontrado las lesiones paratuberculosas de mayor gravedad en el íleon, único tramo afectado en el que el tejido linfoide involuciona con la edad (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 asociadas a la infección por *Map* se iniciarían y permanecerían de forma latente en las PPIC y PPY, en las que el tejido linfoide persiste en los animales adultos, mientras que en fases clínicas más avanzadas, los granulomas también aparecerían en los tramos de intestino desprovistos de dicho tejido, fundamentalmente el íleon, aunque también en el yeyuno (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).

En el ganado bovino, el íleon también ha sido señalado como el tramo de intestino más gravemente afectado en casos clínicos de paratuberculosis (Buergelt *et al.*, 1978; Clarke, 1997; González *et al.*, 2005). En cambio, a diferencia de los pequeños rumiantes, 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). De la misma manera, Balseiro *et al.*, (2008) analizaron la distribución y naturaleza de las lesiones causadas por *Map* en gamos adultos, encontrando que la mayoría de las lesiones latentes subclínicas se localizaron fundamentalmente en dichos nódulos linfáticos. Más recientemente, Clark *et al.*, (2010) también comprobaron en cérvidos que las lesiones paratuberculosas más leves se asentaban preferentemente en los nódulos linfáticos mesentéricos antes que en el intestino.

En casos clínicos avanzados y graves, también se han citado lesiones extraintestinales relacionadas con esta enfermedad, entre las cuales la formación de granulomas focales en el intersticio del hígado, sin llegar a originar cambios macroscópicos (Nakamatsu *et al.*, 1968; Buergelt *et al.*, 1978; Chiodini *et al.*, 1984a; Clarke y Little, 1996; Clarke *et al.*, 1997; Corpa *et al.*, 1998; Brown *et al.*, 2007), y la presencia de áreas de degeneración y fibrosis con depósitos de sales de calcio afectando la capa íntima y media de la arteria aorta y el endocardio auricular en ganado bovino (Simpson, 1966; Majeed y Goudswaard, 1971; Paliwal y Rajya, 1982; Chiodini *et al.*, 1984a; Brown *et al.*, 2007) son las más frecuentes. Además, algunos autores han descrito la presencia de lesiones granulomatosas focales en los riñones o pulmones y nódulos linfáticos regionales (Harding, 1957; Hines *et al.*, 1987; Clarke y Little, 1996).

Así mismo, se ha señalado la degeneración axonal de los nervios braquiales y ciáticos en cabras (Chiodini *et al.*, 1984a; Brown *et al.*, 2007). En esta última especie, también se han descrito depósitos de fibrina y de sustancia amiloide en los capilares de los nódulos linfáticos, adrenales, glándula mamaria, y especialmente en los glomérulos renales (Nakamatsu *et al.*, 1968; Paliwal y Rajya, 1982).

II.5.3. CLASIFICACIONES LESIONALES

Tras observar que las lesiones paratuberculosas eran muy variables en las distintas especies de rumiantes, varios trabajos han tratado de agruparlas proponiendo diversas clasificaciones atendiendo a distintos criterios, sobre todo su gravedad, extensión, tipos celulares presentes y la cantidad de micobacterias presentes. Aunque no se ha llegado a establecer una clasificación general común para todas las especies, sí se han sugerido diversas comparaciones entre las formas lesionales de ovinos, caprinos y bovinos (Clarke y Little, 1996; Pérez *et al.*, 1996; Corpa *et al.*, 2000a; González *et al.*, 2005).

Durante la década de los sesenta, Ridley y Jopling (1962, 1966) propusieron una clasificación de las lesiones de la lepra humana, basada en la hipótesis de que las manifestaciones histológicas y clínicas de esta infección crónica seguían un espectro que dependía estrechamente de la respuesta inmune del paciente. Posteriormente, Ridley (1983) extendió este esquema de “espectro lesional” a otras micobacteriosis. Según esta teoría, las formas *tuberculoides*, caracterizadas por una fuerte respuesta inmune celular capaz de contener el crecimiento micobacteriano, y cuyas lesiones serían pequeños granulomas focales, se encontrarían en un extremo del espectro. En cambio, en el extremo opuesto, se encontrarían las formas *lepromatosas*, en las que la fuerte respuesta inmune humoral no puede impedir la multiplicación de micobacterias en el citoplasma de macrófagos. Entre ambos polos estarían las formas *intermedias*, asociadas a un cuadro clínico grave (Buergelt *et al.*, 1978; Chiodini *et al.*, 1984a; Pérez *et al.*, 1996; García-Marín *et al.*, 2000).

II.5.3.1. Especie ovina

La especie ovina es donde más clasificaciones histopatológicas se han propuesto a lo largo de los años. El primer intento de clasificación fue llevado a cabo por Stamp y Watt (1954), quienes atribuyeron las diversas formas lesionales de paratuberculosis observadas en esta especie a la patogenicidad de la cepa de *Map* implicada, encontrando variaciones según si se trata de una cepa pigmentada o no pigmentada. Estos autores, en un estudio sobre 51 ovejas clínicamente afectadas, establecieron cuatro grupos de lesiones en base al tipo celular predominante y a la cantidad de *Map* presentes:

- **Lesiones de grupo I:** Se atribuyen a infecciones por cepas pigmentadas, que confieren una intensa coloración amarillenta a la mucosa intestinal. Histológicamente la LP se encuentra ampliamente infiltrada por células epitelioides repletas de abundantes BAAR.

- **Lesiones de grupo II:** Las lesiones son similares a las del grupo anterior, pero menos intensas, y el intestino no aparece pigmentado.

- **Lesiones de grupo III:** Se caracterizan por pequeños focos de células epitelioides y células gigantes de Langhans en la mucosa y submucosa, con la presencia de escasos BAAR.

- **Lesiones de grupo IV:** Se corresponden con lesiones tuberculoides circunscritas, siendo frecuente el hallazgo de focos de necrosis y calcificación, con ausencia de BAAR.

Posteriormente, Rajya y Singh (1961) establecieron otra clasificación histológica siguiendo criterios similares a la mencionada anteriormente, distinguiendo tres grupos diferentes:

- **Lesiones de grupo I:** Se observa un predominio de macrófagos, células epitelioides y células gigantes, cuyo citoplasma se encuentra repleto de BAAR.

- **Lesiones de grupo II:** En este caso, el infiltrado inflamatorio está constituido principalmente por linfocitos, junto con células plasmáticas, macrófagos y eosinófilos, con escasos BAAR.

- **Lesiones de grupo III:** Se caracterizan por agregados focales de macrófagos, junto con células plasmáticas y linfocitos, con ausencia de BAAR.

Carrigan y Seaman (1990), en un estudio con 60 ovinos presentando signos clínicos, 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 presentes; por un lado estarían aquellas lesiones caracterizadas por un predominio de células epitelioides infiltrando la mucosa y submucosa, con abundantes BAAR en su citoplasma, y por otro lado se encontrarían aquellos animales cuyas alteraciones histopatológicas se distinguen por un infiltrado de linfocitos, junto con la presencia de una cantidad moderada de células epitelioides y escasos BAAR.

Posteriormente, García-Marín *et al.*, (1992c), en un estudio realizado a partir de ovinos desechados de rebaños con paratuberculosis, propusieron una nueva clasificación en la que también tuvieron en consideración los animales con lesiones focales, asociadas a infecciones subclínicas. Así, encontraron tres diferentes tipos:

- **Lesiones de tipo I:** Se corresponden con pequeños granulomas formados por macrófagos y células epitelioides, localizados exclusivamente en el espacio interfolicular de la placa de Peyer ileocecal, sin BAAR en su citoplasma.

- **Lesiones de tipo II:** Similares a las anteriores, salvo por la extensión de los granulomas hacia la LP relacionada con la placa de Peyer.

- **Lesiones de tipo III:** En este grupo la inflamación granulomatosa afecta de manera grave y difusa toda la mucosa, y la cantidad de BAAR detectables mediante la tinción de ZN es elevada. Este tipo recuerda las lesiones descritas por diversos autores anteriormente.

Clarke y Little (1996) establecieron dos formas opuestas de cambios histológicos en función del grado de colonización micobacteriana y del infiltrado celular en un estudio con 45 ovejas, todas ellas clínicamente enfermas:

- **Lesiones multibacilares:** Caracterizadas por presentar un infiltrado macrofágico, junto con escasos linfocitos, neutrófilos y células gigantes, invadiendo la mucosa y submucosa. Estas células provocan el engrosamiento y atrofia de las vellosidades así como el desplazamiento de las criptas de Lieberkhün hacia zonas más basales. Se aprecia la dilatación de los vasos linfáticos, y los nódulos linfáticos mesentéricos e ileocecales suelen estar afectados por granulomas multifocales en la

cortical. Se detectan abundantes BAAR mediante ZN, especialmente cuando se trata de lesiones pigmentadas.

- **Lesiones paucibacilares:** Como su nombre indica, se distinguen por la presencia de escasas micobacterias. Además, la mucosa suele estar infiltrada principalmente por linfocitos, células gigantes de Langhans y macrófagos, aislados o formando granulomas multifocales alrededor del infiltrado linfocitario. Se aprecia atrofia de las vellosidades. Los nódulos linfáticos también presentan granulomas multifocales en la zona cortical.

En este mismo año, Pérez *et al.*, (1996) estudiaron las lesiones encontradas en 166 ovejas adultas con y sin clínica de paratuberculosis desechadas por diversos motivos de 4 explotaciones, ampliando así la clasificación de García-Marín *et al.*, (1992c). En este caso, los autores consideraron un amplio número de criterios para agrupar las lesiones en diferentes categorías:

- Presencia de lesiones granulomatosas
- Localización de los granulomas en los diferentes compartimentos asociados al tejido linfoide intestinal: placa de Peyer, mucosa adyacente a ésta, o difusión de la lesión hacia la mucosa no relacionada con dicha placa de Peyer.
- Intensidad y extensión de las lesiones.
- Componente celular predominante en el infiltrado inflamatorio.
- Presencia y cantidad de micobacterias en las lesiones.

Basándose en estos parámetros, establecieron tres tipos de lesiones principales:

- **Lesiones de tipo 1:** Se corresponden con la presencia de pequeños granulomas focales, bien definidos y diferenciados del resto de estructuras tisulares, localizados exclusivamente en el espacio interfolicular del tejido linfoide de la placa de Peyer ileocecal, principalmente en su zona basal, pudiendo extenderse en los casos más intensos hacia la corona de los folículos. Dichos granulomas están constituidos por células macrofágicas de núcleo claro y nucleolo evidente, con abundante citoplasma poco teñido, entre las que se aprecian escasos linfocitos. Ocasionalmente, se pueden encontrar lesiones parecidas en la zona subcapsular o peritrabecular de los nódulos linfáticos yeyunal caudal o menos frecuentemente en el ileocecal. No se suelen

encontrar BAAR mediante la técnica de ZN, aunque estas micobacterias sí se aíslan mediante cultivo en aproximadamente la mitad de los casos.

- **Lesiones de tipo 2:** Se trataría de una progresión de las formas anteriores, y se corresponden con lesiones de características morfológicas muy similares a los anteriores en el tejido linfoide la placa de Peyer, con la diferencia de que éstas progresan también hacia la LP adyacente a dicho tejido, donde los granulomas aparecen en número variable, pero nunca de forma difusa, desde su zona más basal hasta las vellosidades. En este tipo de lesiones se empieza a detectar un número escaso de micobacterias en la LP. Sin embargo, éstas se aíslan en la mayoría de los casos mediante cultivo.

- **Lesiones de tipo 3:** Éstas a su vez se agrupan en tres subtipos, cuya característica común consiste en la afectación tanto de zonas de mucosa asociada a la placa de Peyer como de zonas desprovistas de la misma. Además, *Map* se aísla mediante cultivo en todos los casos.

- **Subtipo 3a:** Se caracterizan por la presencia de granulomas multifocales en la mucosa intestinal relacionada o no con la placa de Peyer del íleon y en ocasiones del yeyuno. Las lesiones son similares a las del grupo anterior, salvo que los granulomas de la LP son de mayor tamaño y afectan a más vellosidades, causando su engrosamiento, pero sin llegar a alterar su morfología. En la submucosa y serosa, pueden aparecer infiltrados perivasculares de linfocitos o macrófagos de carácter focal. También se aprecian lesiones granulomatosas en el nódulo linfático mesentérico caudal, y menos frecuentemente, en el ileocecal. Se detecta un número moderado de BAAR mediante ZN en la LP, y de manera más esporádica, en los granulomas asociados a las placas de Peyer.

- **Subtipo 3b:** Las lesiones se corresponden con una enteritis granulomatosa difusa que afecta a la mucosa relacionada o no a la placa de Peyer, caracterizada por la presencia de abundantes células epitelioides que confieren a la misma un aspecto de “mosaico”. En este subtipo, la estructura normal de la mucosa intestinal se ve gravemente alterada desde su zona basal hasta las vellosidades, que incrementan de grosor y pueden fusionarse en los tramos más afectados. El infiltrado celular predominante en la mucosa consiste en macrófagos de tipo epitelioides, así como escasos linfocitos, y esporádicamente alguna célula gigante con 2-3 núcleos. En la submucosa, estos macrófagos se disponen en granulomas que llegan a alterar la estructura histológica normal de la placa de Peyer. También es de destacar el infiltrado linfoplasmocitario perivascular, que puede alcanzar la capa muscular en

los casos más avanzados. Es frecuente la formación de trombos compuestos por abundantes macrófagos dentro de los vasos linfáticos dilatados. Este tipo de linfangitis y linfangiectasias pueden aparecer también en la serosa. Las lesiones se localizan principalmente en la válvula ileocecal, íleon, y con menor frecuencia, en el yeyuno. También se observa una linfadenitis granulomatosa difusa o multifocal en los nódulos linfáticos mesentéricos caudales e ileocecales, con pérdida de la arquitectura histológica normal. Estas lesiones se caracterizan también por presentar abundantes BAAR detectables mediante ZN.

- **Subtipo 3c:** De manera similar al subtipo anterior, estas lesiones se presentan como enteritis difusas que afectan tanto la mucosa asociada o no a la placa de Peyer, si bien en este caso el infiltrado celular predominante está constituido por linfocitos. En el tejido linfoide organizado, aunque las lesiones son parecidas a las anteriores, destaca la presencia de un mayor número de células gigantes formando los granulomas. En la mucosa, los linfocitos infiltran la LP desde su zona basal hasta el ápice de las vellosidades junto con un escaso número de células plasmáticas, aunque también aparecen macrófagos formando pequeños granulomas bien delimitados del tejido adyacente, así como células gigantes de Langhans esporádicas. Las lesiones en la submucosa y serosa son similares a las anteriores, destacando el infiltrado linfoplasmocitario y la aparición de edema en la submucosa. El hallazgo más frecuente en los nódulos linfáticos es la presencia de células gigantes de Langhans necrosadas, originando pequeños focos de necrosis con o sin calcificación. La presencia de micobacterias en este tipo de lesiones es esporádica.

Según Pérez *et al.*, (1996), esta clasificación estaría relacionada con el espectro inmunopatológico de las micobacteriosis mencionado anteriormente y detallado en el capítulo de II.3.4.3 de la patogenia. De esta manera, las lesiones de tipo 1 y 2, asociadas al tejido linfoide, se localizarían en el extremo *tuberculoide* del espectro, las de tipo 3c se encuadrarían dentro de las *intermedio-tuberculoideas*, las de tipo 3b dentro de las *intermedio-lepromatosas*, y finalmente las de tipo 3a serían una forma inicial de las dos anteriores. Sin embargo, no se encuentran formas lesionales que se puedan ubicar en el extremo *lepromatoso puro* de este espectro.

Posteriormente, García-Marín *et al.*, (1999) denominaron a las lesiones de tipo 1 de la clasificación anterior como *focales*, relacionadas con formas iniciales o latentes de

la enfermedad, a las de tipo 2 y 3a como *multifocales*, las de tipo 3b como *difusas multibacilares* y finalmente las 3c como *difusas paucibacilares*, en acuerdo con la clasificación de Clarke y Little (1996). En la figura II.3 aparece esquematizada la localización de las lesiones y su progresión en el intestino en función de la fase de infección.

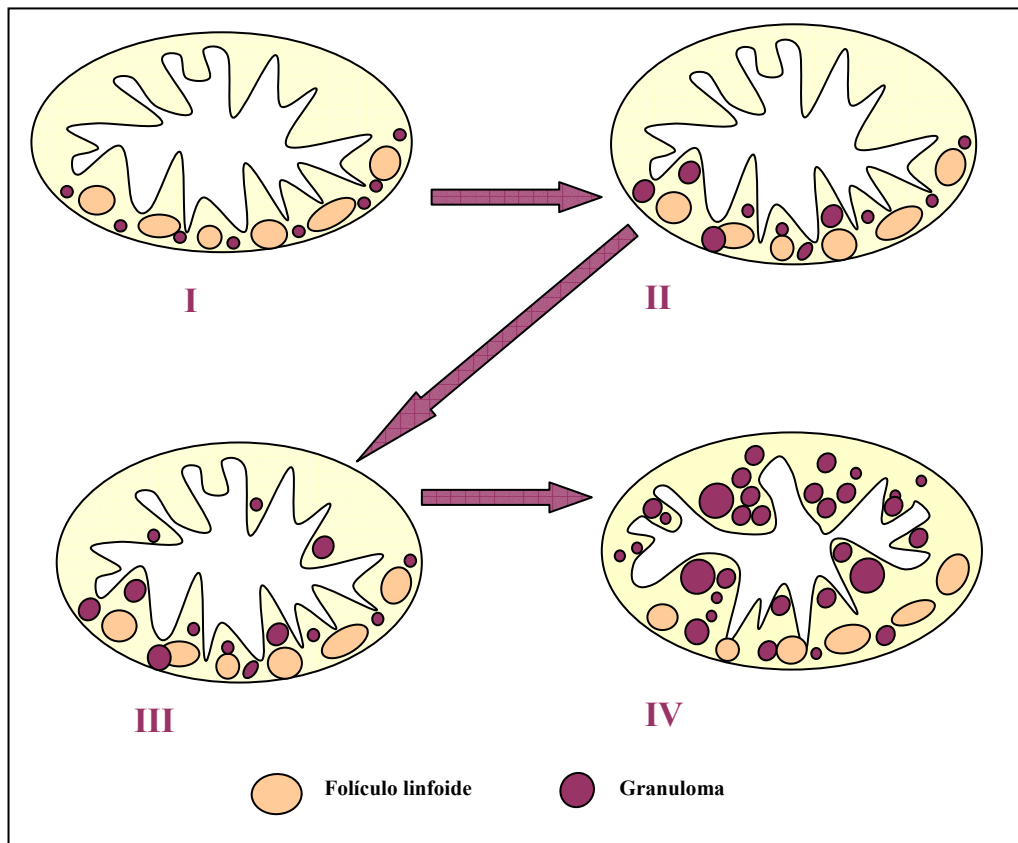


Figura II.3. Localización de las lesiones granulomatosas y su secuencia de propagación en el intestino. Cada dibujo representa una sección de intestino con placa de Peyer. **I.-Forma focal.** Pequeños granulomas localizados en el espacio interfolicular del tejido linfoide de la placa de Peyer, asociados a formas iniciales o latentes. **II.-Inicio de forma multifocal.** Progresión de los granulomas hacia la LP adyacente al tejido linfoide. **III.- Forma multifocal e inicio de formas difusas.** Los granulomas incrementan de tamaño y alcanzan la LP no relacionada a tejido linfoide. **IV.- Formas difusas multibacilares o linfocíticas.** Alteración de la estructura histológica normal de la mucosa y submucosa, pudiendo predominar células epitelioides o linfocitos entre los granulomas. Tomado de García-Marín *et al.*, (2000).

Más recientemente, Kurade *et al.*, (2004) establecieron otra clasificación de cuatro grados en ovinos infectados experimentalmente con *Map*, similar a la propuesta por Pérez *et al.*, (1996), donde compararon las lesiones de grado I con las de tipo 1 y las de grado II con aquellas de tipo 2. Por otro lado, los autores establecieron una asociación entre las lesiones denominadas como de grado III con aquellas descritas

como de tipo 3a según Pérez *et al.*, (1996) y *paucibacilares* según Clarke y Little (1996) en infecciones naturales, sugiriendo entonces que para ellos, 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).

Por último, Kheirandish *et al.*, (2008) distribuyeron las lesiones encontradas en 29 ovejas sospechosas de padecer paratuberculosis de manera muy similar a la clasificación propuesta por Pérez *et al.*, (1996) y García-Marín *et al.*, (1999), con la diferencia de que describieron en tres animales 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. Según los autores, este grupo de lesiones compartiría características comunes con las formas multi y paucibacilares.

II.5.3.2. Especie bovina

En esta especie no se han llevado a cabo demasiados estudios histopatológicos para agrupar las lesiones en categorías. No obstante, destacan las clasificaciones propuestas por Buergelt *et al.*, (1978), y más recientemente por González *et al.*, (2005), que serán resumidas de forma breve en este apartado.

Los primeros autores realizaron un estudio en 51 vacas infectadas por *Map* y desechadas de 2 explotaciones, tomando muestras del tracto intestinal y de varios nódulos linfáticos (Buergelt *et al.*, 1978). En el estudio histológico distinguieron tres grados de lesiones desde leves, hasta severas.

- **Lesiones leves:** Presencia de células gigantes de Langhans aisladas en la LP de las vellosidades intestinales o dispersas en la paracortical de los nódulos linfáticos. Escasa o nula presencia de BAAR.

- **Lesiones moderadas:** Pequeños agregados de macrófagos junto con varias células gigantes de Langhans en la LP y submucosa, senos subcapsulares o paracortical de los nódulos linfáticos. Cantidad de BAAR variable, de nula a moderada.

- **Lesiones graves:** Abundantes macrófagos y células gigantes infiltrando todas las capas de varios tramos del intestino delgado, desde la mucosa hasta la serosa, alterando la estructura histológica normal de las vellosidades y dispersando las criptas de Lieberkühn. También están afectados los nódulos mesentéricos. Los macrófagos están repletos de BAAR.

El grupo de investigación de González *et al.*, (2005), más recientemente, propusieron una nueva clasificación más amplia a partir de 116 animales infectados con y sin signos clínicos, siguiendo los criterios de Pérez *et al.*, (1996), en la que también incluyen animales infectados subclínicamente. Distinguieron tres grupos principales: lesiones **focales**, **multifocales** y **difusas**, que coinciden en su mayoría con los de Pérez *et al.*, (1996) en ovinos, salvo algunas excepciones detalladas a continuación:

- **Lesiones focales:** En esta especie, es frecuente la aparición de alguna célula gigante asociada a los granulomas o aisladas, principalmente en el tejido linfoide íleocecal, tal y como se ha descrito previamente en infecciones experimentales bovinas por varios autores (Payne y Rankin, 1961a, 1961b; Gilmour *et al.*, 1965b). Sin embargo, en estas formas las lesiones en los nódulos linfáticos mesentéricos son más frecuentes que en los ovinos.

- **Lesiones multifocales:** Éstas englobarían las de tipo 2 y 3a descritas por Pérez *et al.*, (1996), o las *leves y moderadas* según Buergelt *et al.*, (1978).

- **Lesiones difusas:** En este caso, la diferencia con la clasificación en ovinos radica en la aparición de un subtipo de **lesiones intermedias**, semejantes a aquellas descritas posteriormente por Kheirandish *et al.*, (2008). Estas lesiones fueron las lesiones difusas más frecuentemente halladas en el estudio de González *et al.*, (2005), y comparten características comunes con las formas **multibacilares** y **linfocíticas**, por lo que se consideran un subtipo mixto. En ellas el infiltrado es una mezcla de linfocitos, células plasmáticas, macrófagos formando pequeños granulomas, así como células gigantes en número variable. Este infiltrado inflamatorio altera la estructura histológica normal de la mucosa intestinal y puede diseminarse hacia la submucosa en los casos más graves, donde aparece rodeando vasos conteniendo trombos. La serosa presenta una linfangitis y serositis marcada, de distinta gravedad según el tramo. Los nódulos linfáticos también están afectados, principalmente el mesentérico caudal. Se detecta un número elevado de BAAR en este tipo de lesiones mediante ZN o tinción inmunohistoquímica, aunque siempre en cantidad inferior a las formas multibacilares.

Según los autores, este tipo de lesiones difusas intermedias estarían consideradas como una fase previa en la transición hacia las formas *intermedio-tuberculoides* o *intermedio-lepromatosas* del espectro inmunopatológico mencionado anteriormente.

Por otro lado, en un intento de encajar cada tipo lesional dentro de un mecanismo patogénico determinado, Geijo (2007) estableció comparaciones entre las lesiones *focales*, *multifocales*, *multibacilares* e *intermedias* descritas por González *et al.*, (2005) en paratuberculosis bovina con las formas **patogénicas bacteriémicas** señaladas anteriormente en el apartado II.3.4.3 de la patogenia. Por otro lado, las lesiones *difusas linfocíticas* se corresponderían con las **patogénicas abacteriémicas**.

II.5.3.3. Especie caprina

En esta especie también se han propuesto diversas clasificaciones, algunas muy similares a las mencionadas anteriormente en la especie ovina.

Paliwal y Rajya (1982) fueron los primeros en establecer una clasificación en caprinos, diferenciando cuatro grupos:

- **Lesiones del grupo 1:** Animales con hiperplasia folicular en los nódulos linfáticos yeyunales a causa de una infección reciente.

- **Lesiones del grupo 2:** Animales subclínicos. El ápice y la LP de las vellosidades se encuentran infiltrados por linfocitos, células plasmáticas, macrófagos con BAAR, junto con algunas células epitelioides. Los nódulos linfáticos presentan una hiperplasia de los folículos linfoides, además de un infiltrado de macrófagos y células gigantes en las zonas cortical y paracortical.

- **Lesiones del grupo 3:** Animales con síntomas clínicos. Histológicamente las vellosidades se encuentran engrosadas a causa de un infiltrado de macrófagos repletos de numerosos BAAR. Los nódulos linfáticos presentan el mismo infiltrado granulomatoso en la cortical, paracortical e incluso en la medular.

- **Lesiones del grupo 4:** Animales con lesiones similares a las anteriores, pero más graves y extensas.

Posteriormente, García-Marín *et al.*, (1992b) analizaron la válvula ileocecal, íleon y yeyuno de 42 cabras procedentes de 2 rebaños con paratuberculosis. En este

estudio encontraron tres tipos de lesiones que coinciden con los tres sugeridos por los mismos autores en la especie ovina, cuya clasificación ya fue señalada anteriormente (García-Marín *et al.*, 1992c). Las lesiones del grupo I y II fueron consideradas como formas latentes o subclínicas, mientras que las del grupo III se asociaron con formas clínicas de la enfermedad.

Corpa *et al.*, (2000a) profundizaron esta última clasificación en un estudio con 68 cabras infectadas con y sin paratuberculosis clínica, utilizando los mismos criterios propuestos por Pérez *et al.*, (1996), centrándose por tanto en el tejido linfoide intestinal. Establecieron cuatro tipos lesionales similares a los propuestos por Pérez *et al.*, (1996) y González *et al.*, (2005) en las especies ovinas y bovinas, respectivamente: por un lado las lesiones **focales**, y por otro lado, dentro de las difusas, las **multibacilares**, **linfocíticas** y un grupo de formas **intermedias** entre estas dos últimas. En este estudio, las formas 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 intermedias 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.

II.5.3.4. Animales silvestres

En los últimos años, se han empezado a estudiar también las lesiones causadas por *Map* y proponer clasificaciones en algunas especies de rumiantes silvestres. Así, Balseiro *et al.*, (2008), en un estudio llevado a cabo en 95 gamos (*Dama dama*) procedentes de la zona de Asturias, valoraron las lesiones granulomatosas encontradas en muestras intestinales y de nódulos linfáticos mesentéricos, y agruparon los cambios histopatológicos basándose en su localización, el componente inflamatorio predominante, así como la cantidad de micobacterias presentes. Determinaron cuatro grupos, que coincidieron histopatológicamente en su mayoría con las clasificaciones propuestas por Pérez *et al.*, (1996), Corpa *et al.*, (2000a) y González *et al.*, (2005) en las

especie ovina, caprina y bovina, respectivamente. De esta manera, encontraron lesiones *focales*, *multifocales*, lesiones *difusas multibacilares*, y *difusas intermedias* (lesiones multibacilares-linfocíticas), por lo que el espectro de lesiones en esta especie parece encajar con el descrito en los rumiantes domésticos. Al igual que en bovinos, las lesiones focales en gamos fueron más frecuentes en los nódulos linfáticos. Asimismo, los autores señalan como característico de esta especie la presencia de una gran proporción de células gigantes multinucleadas de Langhans. Por otro lado, en este estudio, los autores no encontraron lesiones linfocíticas propias, si bien no descartan la posibilidad de que hubieran aparecido en algún animal en el caso de haberse muestreado un mayor número de gamos.

II.6. DIAGNÓSTICO

El diagnóstico de la paratuberculosis está dificultado por la falta de técnicas que sean específicas y sensibles al 100%, con el consecuente riesgo de obtener resultados falsos-positivos o falsos-negativos. El método de diagnóstico “ideal” tendría que cumplir diversas funciones. Por un lado, la rapidez y sensibilidad, que permita a los ganaderos distinguir de manera rápida dentro de su explotación los animales que estén excretando la micobacteria, posibles focos de infección para el resto de animales, aquellos que pueden llegar a desarrollar la enfermedad clínica, o que les permita asegurarse de que los animales que compran para introducir en su rebaño están libres de la infección. Además, dicho test “ideal” debe ser específico de *Map*, para evitar posibles reacciones cruzadas con otras micobacterias, principalmente en el caso de *M. bovis* en el ganado vacuno. Por todo ello, el constante estudio, desarrollo y puesta a punto de métodos de diagnóstico constituye un pilar básico en la lucha contra la paratuberculosis (Chiodini *et al.*, 1984a; Merkal, 1984; Olsen *et al.*, 2002). La identificación de los animales clínicamente enfermos resulta relativamente sencilla, basándose en los síntomas característicos así como la identificación de BAAR en las heces; sin embargo la dificultad radica en la distinción de los animales subclínicos, que no suelen mostrar aún signos clínicos, apenas excretan pequeñas cantidades de *Map* en las heces de forma intermitente, y no obstante constituyen uno de los principales factores de riesgo en las explotaciones en cuanto a la posibilidad de propagar la infección (Olsen *et al.*, 2002). En este capítulo se hará una breve revisión de las diferentes pruebas disponibles para

llevar a cabo el diagnóstico de esta enfermedad, tanto en el animal vivo como en el cadáver.

II.6.1. DIAGNÓSTICO CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICO.

La clínica de un animal infectado por *Map* puede orientar hacia una sospecha de paratuberculosis, pero a menudo resulta insuficiente, debido al carácter inespecífico de los síntomas, previamente resumidos en el anterior capítulo de “signos clínicos”. Por ello, el diagnóstico clínico individual se tiene que completar siempre con un estudio epidemiológico dentro del rebaño. Así, la persistencia de bajas a lo largo del tiempo, junto con la observación de varios casos con cuadro de adelgazamiento progresivo, caquexia y diarreas intermitentes o continuas, afectando generalmente animales de entre 2 y 4 años de edad, fundamentalmente hembras inmediatamente después del parto, son los datos más característicos e indicativos de la presencia de paratuberculosis en un rebaño (Juste y Aduriz, 1990b; Garrido *et al.*, 2000a; Pérez *et al.*, 2000). Sin embargo, estos criterios por sí solos no pueden garantizar con certeza el diagnóstico de esta enfermedad, siendo necesaria la confirmación posterior en el laboratorio en la mayoría de los casos (Juste y Aduriz, 1990b). Además, 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.*, 1975; Corpa *et al.*, 1998; Stabel, 1998).

II.6.2. DIAGNÓSTICO ANATOMOPATOLÓGICO.

Las **lesiones macroscópicas** previamente detalladas en el capítulo correspondiente (apartado II.5.1) son altamente específicas y su hallazgo permite diagnosticar la enfermedad con elevada fiabilidad (Juste y Aduriz, 1990b; Garrido *et al.*, 2000a). Sin embargo, su ausencia tampoco es suficiente para descartar una infección por *Map*, al haberse descrito casos en los que las lesiones macro y microscópicas eran muy leves a pesar de la presencia de signos clínicos graves orientativos de paratuberculosis (Blood *et al.*, 1989; Clarke y Little, 1996; Clarke, 1997; Brady *et al.*, 2008). Además,

los animales recientemente infectados o con lesiones subclínicas no suelen presentar aún cambios macroscópicos que puedan sugerir una infección paratuberculosa (Fodstad y Gunnarsson, 1979).

El **estudio histológico** de los últimos tramos del intestino delgado y primeros del grueso, especialmente de la válvula ileocecal (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, constituye un método de diagnóstico de la paratuberculosis altamente sensible y específico (Whitlock, 1992; Garrido *et al.*, 2000a; Olsen *et al.*, 2002), ya que permite 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). La presencia de granulomas y células gigantes relacionados con la inflamación paratuberculosa se identifican fácilmente mediante técnicas histológicas convencionales, como la tinción de hematoxilina-eosina (HE) (Garrido *et al.*, 2000a). 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).

En cambio, el mayor inconveniente del diagnóstico anatomopatológico consiste en que se trata de un examen postmortem, que por tanto requiere el sacrificio de los animales sospechosos de padecer la infección por *Map* (Garrido *et al.*, 2000a). Además, el examen histológico de las secciones de intestino puede llegar a ser muy laborioso 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 (Payne y Rankin, 1961a, 1961b; Buergelt *et al.*, 1978; Chiodini *et al.*, 1984a; Pérez *et al.*, 1996; González *et al.*, 2005). Por todo ello, la toma de muestras del tracto gastrointestinal debe ser lo más completa posible, y la inspección histológica requiere el examen minucioso de numerosas secciones de tejido por parte de personal experimentado antes de poder descartar una infección por *Map* (Condrón *et al.*, 1994;

Garrido *et al.*, 2000a). 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).

Se ha estudiado la posibilidad de realizar la **biopsia** del nódulo linfático ileocecal en bovinos, aunque esta práctica no parece resultar rentable por lo que se utilización se limita a animales de alto valor económico o a estudios experimentales (Benedictus y Bosma, 1985; Benedictus y Haagsma, 1986; Brumbaugh *et al.*, 2000).

El estudio de las lesiones histológicas características de una infección por *Map* se suele completar con una **tinción de Ziehl-Neelsen (ZN)** para la detección de los BAAR en el citoplasma de las células que forman los granulomas (Stamp y Watt, 1954; Garrido *et al.*, 2000a; Olsen *et al.*, 2002). De esta manera, la demostración de bacterias positivas a dicha tinción, más numerosas en lesiones granulomatosas multibacilares, constituye un hallazgo que permite asegurar el diagnóstico de manera más fiable (Garrido *et al.*, 2000a; Brown *et al.*, 2007). Esta técnica únicamente puede teñir aquellos BAAR que posean la pared celular intacta, por lo que una tinción de ZN negativa en lesiones sospechosas de una infección por *Map* podría relacionarse con la presencia de bacilos con la pared celular defectuosa (Condrón *et al.*, 1994; Coetsier *et al.*, 1998) o con la ausencia de BAAR en la sección histológica, como puede ocurrir en las lesiones focales, multifocales, así como las 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). Otro inconveniente de la tinción de ZN consiste en que no es 100% específica, al no distinguir entre las diversas especies de micobacterias, o al teñir igualmente otras bacterias tales como *Nocardia* spp. o *Corynebacterium* spp., pudiendo dar lugar a resultados falsos-positivos (Shinnick y Good, 1994; Thoresen *et al.*, 1994; Brees *et al.*, 2000).

Otra alternativa comúnmente empleada y complementaria del ZN para la detección y visualización de *Map* en tejido incluido en parafina es la **técnica inmunohistoquímica (IHQ)**, basada en la utilización de anticuerpos monoclonales o policlonales específicos frente a *Map*, que ponen en evidencia antígenos de la micobacteria (Olsen *et al.*, 2002). La mayoría de los trabajos consideran este método de

diagnóstico más sensible y específico que el ZN, sobre todo en lesiones focales y difusas linfocíticas o cuando los bacilos están presentes de forma degradada, es decir, previamente digerida o fagocitada por CPAs, tanto en ovino, caprino o bovino (Pérez *et al.*, 1990; García-Marín *et al.*, 1992a; Thoresen *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). Estas diferencias se explican por el hecho de que, mientras el ZN requiere que el bacilo se encuentre de forma íntegra en el tejido, la tinción IHQ 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). Sin embargo, algunos de los autores también mencionan el riesgo de considerar resultados falsos positivos mediante esta técnica, al encontrar que los antisueros disponibles empleados podrían producir reacciones cruzadas con otras micobacterias, principalmente con *M.bovis*, por lo que este método tampoco sería completamente específico (Thoresen *et al.*, 1994; Coetsier *et al.*, 1998; Brees *et al.*, 2000).

Otra técnica de diagnóstico caracterizada por combinar los métodos histopatológicos con la detección de ADN micobacteriano es la **hibridación *in situ* (HIS)**. Esta técnica emplea una sonda de ADN cuya secuencia es específica de *Map*, concretamente un fragmento de la secuencia IS900 biotinilado, que hibrida con el material micobacteriano en secciones de tejido incluido en parafina, una vez desparafinadas y tratadas con proteinasa K. De esta manera, esta técnica permite detectar con elevada especificidad los ácidos nucleicos de las formas de *Map* de pared defectiva o *esferoplastos*, pero no de aquellos que presentan la pared celular íntegra (Hulten *et al.*, 2000a, 2000b; Delgado *et al.*, 2009). Por esta razón, su empleo se ha orientado fundamentalmente hacia los estudios de detección de esferoplastos en pacientes con la enfermedad de Crohn (Hulten *et al.*, 2001; Sechi *et al.*, 2001, 2004; Roholl *et al.*, 2002; Romero *et al.*, 2005), aunque también se ha utilizado en experimentos con bovinos enfermos de paratuberculosis (El-Zaatari *et al.*, 2003; Delgado *et al.*, 2009). A pesar de obtener la misma sensibilidad al comparar la detección de *Map* en tejido bovino mediante IHQ e HIS, Delgado *et al.*, (2009) encontraron que la visualización de los resultados resultaba más sencilla empleando técnicas IHQ, al obtener una tinción más intensa que con la HIS.

II.6.3. DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO.

Estos métodos de diagnóstico se basan en la identificación del agente etiológico, y pueden llevarse a cabo a partir de tres técnicas diferentes, que serán resumidas a continuación.

II.6.3.1. Identificación microscópica en frotis.

La visualización de BAAR en extensiones teñidas mediante ZN a partir de muestras de heces, mucosa intestinal o nódulo linfático, es una técnica sencilla, rápida y barata, muy útil para confirmar el diagnóstico de paratuberculosis en animales en fases clínicas, donde 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). Sin embargo, se trata de una técnica de baja sensibilidad para la detección de animales subclínicos, en los que la cantidad de BAAR excretados es menor, lo que, añadido a la reducida muestra que se observa al microscopio, dificulta aún más la posibilidad de visualizar alguna micobacteria (Taylor, 1951b; Merkal, 1970; Zimmer *et al.*, 1999; Garrido *et al.*, 2000a) Por tanto, un resultado negativo a esta prueba no debe de tomarse como definitivo (Juste, 1987). Por otro lado, la especificidad de esta prueba tampoco es muy elevada, debido a que es frecuente encontrar en las heces BAAR que den lugar a confusión por sus características muy similares a *Map*, con la única diferencia de que éstos no forman agregados, pudiendo inducir resultados falsos positivos (Merkal *et al.*, 1968; Juste, 1987; Garrido *et al.*, 2000a).

II.6.3.2. Aislamiento mediante cultivo.

Este método es de los más empleados en el diagnóstico de la paratuberculosis, y se considera la prueba de referencia (el “gold standard”). Se trata de una técnica altamente específica, capaz de proporcionar el diagnóstico definitivo de esta enfermedad y que ha sido establecida como base para el establecimiento de programas de control (Chiodini *et al.*, 1984a; Merkal, 1984; Brown *et al.*, 2007). La ventaja de este método radica en la posibilidad de realizarse en el animal vivo a partir de muestras de heces. No obstante, únicamente identifica a los animales en fases clínicas avanzadas de

la enfermedad, pudiendo alcanzar en estos casos una sensibilidad del 100%, mientras que sólo detectaría unos pocos animales en los estadios iniciales, donde los animales eliminan muy pocas micobacterias y lo hacen de forma intermitente (Merkal, 1984; Thoen y Baum, 1988; Whitlock *et al.*, 1992, 2000; Whittington *et al.*, 2000a). 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). También debe tenerse en cuenta la posibilidad de que la micobacteria aislada por cultivo fecal simplemente pueda haber sido ingerida y haber transitado por el tracto digestivo, siendo eliminada por las heces sin haber provocado infección (Sweeney *et al.*, 1992; Whittington *et al.*, 2000a). La excreción de *Map* en heces de animales infectados suele detectarse uno o dos años antes de la presentación de los signos clínicos (Merkal, 1973; Whitlock, 1999).

Respecto al cultivo a partir de tejidos, a pesar de que permite obtener un diagnóstico de manera fiable, presenta unas limitaciones obvias, al tener que realizarse, en el animal sospechoso, *post-mortem*. No obstante, también existe la posibilidad de llevarse a cabo a partir de biopsia del nódulo linfático ileocecal, si bien esta alternativa únicamente se vería justificada económicamente en animales de especial valor (Garrido *et al.*, 2000a).

Tanto las muestras fecales como las de intestino delgado y, en menor medida, las de nódulos linfáticos, constituyen un material altamente contaminado, por lo que en su procesado, deben someterse a complejos tratamientos previos de descontaminación antes de sembrarse en medios de cultivo especializados (Merkal y Larsen, 1962; Garrido *et al.*, 2000a; Olsen *et al.*, 2002; Reddacliff *et al.*, 2003b). A lo largo de los años se han ido desarrollando diversas técnicas de cultivo con diferentes métodos de descontaminación de las muestras y medios de cultivo (Whipple *et al.*, 1991; Kalis *et al.*, 1999). El agente descontaminante más comúnmente empleado en los últimos años es el cloruro de hexadecil piridinio al 0,75% (HPC) (Merkal *et al.*, 1964; Juste *et al.*, 1991b). Por otro lado, entre los medios de cultivo más utilizados destacan aquellos a base de huevo como el de Herrold, más eficaz en muestras de ganado bovino, y el de Löwestein-Jensen (Merkal *et al.*, 1964; Juste *et al.*, 1991b; Pavlik *et al.*, 1999b; Whittington *et al.*, 2000a). En ambos medios se requiere la adición de micobactina para lograr un adecuado crecimiento de la micobacteria, aunque Adúriz *et al.*, (1995)

comprobaron que el aislamiento de cepas de *Map* de pequeños rumiantes se conseguía sin la adición de este compuesto al medio de cultivo sintético Middlebrook 7H11/OADC.

En la especie ovina, el rendimiento del cultivo es especialmente inferior debido a las dificultades de aislamiento de este tipo de cepas (Taylor, 1945; Juste *et al.*, 1988; Carrigan y Seaman, 1990; Collins *et al.*, 1990; Juste *et al.*, 1991b; Huchzermeyer y Bastianello, 1992; Shulaw *et al.*, 1993; Machackova *et al.*, 2003; Brown *et al.*, 2007). La sensibilidad se puede incrementar utilizando el medio Löwenstein-Jensen sin piruvato sódico y con la adición de micobactina (Juste *et al.*, 1991b). De esta manera, Pérez *et al.*, (1996) consiguieron aislar *Map* hasta en el 47,5% de las ovejas con lesiones focales.

Sin embargo, la principal desventaja que presenta el cultivo, aparte de su elevado coste económico (Collins *et al.*, 1988), es sobre todo el largo período de incubación que requiere hasta la obtención de colonias visibles en el medio, debido al crecimiento lento característico de *Map* (Gunnarsson y Fodstad, 1979; Whittington *et al.*, 2000a; Olsen *et al.*, 2002; Huda y Jensen, 2003; Muskens *et al.*, 2003b).

La introducción del **cultivo radiométrico**, basado en la detección del isótopo CO_2^{14} , liberado como consecuencia del metabolismo bacteriano, ha permitido acortar los tiempos de incubación y mejorar la sensibilidad en comparación con los métodos de cultivo convencionales (Damato y Collins, 1990; Whittington *et al.*, 1998; Whittington *et al.*, 2000a). Sin embargo, también presenta inconvenientes relacionados con su manipulación o la acumulación de material radioactivo, además del elevado coste (Reddacliff *et al.*, 2003a).

II.6.3.3. Detección del ADN bacteriano.

El descubrimiento de la secuencia de inserción IS900 específica de *Map* (Green *et al.*, 1989) ha sido clave en el desarrollo y puesta a punto de nuevas técnicas moleculares diagnósticas, como la **reacción en cadena de la polimerasa o PCR**, que permite identificar el agente etiológico de la paratuberculosis de manera rápida, sencilla y específica. Dicha reacción permite amplificar el ADN micobacteriano de forma

específica a partir de una cantidad mínima de ADN diana, 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). Se trata de una técnica de elevada sensibilidad, capaz de detectar cantidades de *Map* muy bajas, con resultados disponibles en 24 horas, lo que supone una enorme ventaja en comparación con las 8 semanas de cultivo (Garrido *et al.*, 2000a).

En la actualidad se emplea la PCR como método de detección de *Map* tanto en muestras procedentes de heces (Vary *et al.*, 1990; Kawaji *et al.*, 2007; Scott *et al.*, 2007; Irengé *et al.*, 2009), leche (Grant *et al.*, 2001; Djonne *et al.*, 2003; Sevilla *et al.*, 2003; Buergelt y Williams, 2004; Kaur *et al.*, 2010), como sangre o tejidos (Gwozdz *et al.*, 1997, 2000c; Bull *et al.*, 2003; Juste *et al.*, 2005; Singh *et al.*, 2010). Entre estas últimas, la PCR a partir de sangre periférica constituye una alternativa muy interesante y esperanzadora en cuanto al diagnóstico de esta enfermedad, por tratarse de una muestra fácil de tomar, y que se suele recoger habitualmente para las pruebas serológicas. En un estudio comparativo entre la detección de anticuerpos y de *Map* en sangre de ovinos y bovinos mediante ELISA y PCR respectivamente, Juste *et al.*, (2005) llegaron a la conclusión de que esta última prueba presentaba un alto potencial como técnica complementaria, ya que permitía detectar la fracción de animales infectados que no eran detectados mediante ELISA. Sin embargo, existe controversia en cuanto a sus posibilidades; mientras algunos autores estiman que su eficacia en la detección de animales clínicamente afectados es relativamente buena y comparable a la obtenida en las mismas muestras mediante inmunodifusión en gel de agar y ELISA (Gwozdz *et al.*, 1997), los mismos autores encontraron resultados contradictorios en un estudio posterior (Gwozdz *et al.*, 2000c). En cualquier caso, la PCR en sangre podría ser un buen método de diagnóstico precoz de animales subclínicos, 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 a gran escala para poder dar una estimación fiable de la sensibilidad y especificidad de este método (Buergelt y Williams, 2004; Singh *et al.*, 2010).

A pesar de los buenos resultados obtenidos, la PCR aún presenta limitaciones, encontradas principalmente en la fase de extracción del ADN, que parece ser un punto crítico en la técnica y por tanto debe ser optimizada al máximo para incrementar el

rendimiento. Además, en el caso de las heces, se ha señalado que la presencia de sustancias inhibidoras de la PCR sería la responsable de resultados falsos negativos, (Vary *et al.*, 1990; Van der Giessen *et al.*, 1992; Collins *et al.*, 1993a, 1993b; Mori *et al.*, 1999; Englund *et al.*, 2001). Para paliar este problema, se puede recurrir a la incorporación de 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), o diluyendo el ADN extraído (Garrido *et al.*, 2000a; Garrido, 2001). Estos inconvenientes explicarían el hecho de que la PCR sea considerada, en general, como una técnica ligeramente menos sensible que los métodos de cultivo de heces tradicionales (Van der Giessen *et al.*, 1992; Englund *et al.*, 1999, 2001). Por el contrario, otros autores han encontrado valores de sensibilidad similares o superiores al cultivo (Vary *et al.*, 1990; Collins *et al.*, 1993a; Stevenson y Sharp, 1997; Sotohy y Awad-Masalmeh, 1999). El problema consiste en que la gran heterogeneidad de las metodologías empleadas impiden comparar los resultados obtenidos entre diferentes laboratorios (Garrido *et al.*, 2000a).

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). En este caso, la válvula ileocecal y los nódulos linfáticos asociados constituyen la zona de elección óptima para obtener resultados adecuados (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, obteniéndose en estos casos una sensibilidad de entre el 71 y 90% en relación con el cultivo y la IHQ, respectivamente, si bien se recomienda no superar las 24 horas de fijación, para evitar fenómenos de fragmentación de las cadenas de ADN micobacteriano a causa del formol, lo que disminuiría la sensibilidad (Plante *et al.*, 1996; Miller *et al.*, 1999; Whittington *et al.*, 1999).

Otra alternativa para incrementar la sensibilidad de la PCR ha sido la **PCR anidada** (“Nested PCR”), que 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). Por otro lado, la **PCR a tiempo real** está siendo cada vez más empleada en la detección de *Map*, por la gran ventaja de que permite cuantificar el ADN presente en la muestra. Esta moderna técnica parece muy prometedora en cuanto al diagnóstico de la enfermedad, sin embargo, se requieren aún más estudios a gran escala para poder ofrecer una idea del nivel de sensibilidad que presenta (Kim *et al.*, 2002; Stabel y Bannantine, 2005; Brey *et al.*, 2006; Jaravata *et al.*, 2006; Kawaji *et al.*, 2007).

La secuencia IS900 se considera específica de *Map*. Sin embargo, algunos autores han puesto en evidencia la detección de secuencias genéticas con considerable homología a la IS900 (“IS900-like”) en otras especies de *Mycobacterium* (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, abriendo un debate sobre la necesidad de búsqueda de secuencias diana alternativas específicas de *Map*. 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).

II.6.4. DIAGNÓSTICO BASADO EN LA RESPUESTA INMUNE DEL ANIMAL.

Como ya se ha señalado en el capítulo de patogenia, la infección paratuberculosa induce en los animales una respuesta inmune de tipo adaptativo (celular y humoral), detectable mediante pruebas diagnósticas, y estrechamente relacionada con la respuesta lesional, habiéndose podido establecer un espectro inmunopatológico en los individuos infectados. Los animales con lesiones iniciales o latentes subclínicas presentan una elevada respuesta inmune de tipo celular, mientras que conforme progresa la infección hacia fases más avanzadas y graves, la respuesta inmune de tipo humoral empieza a predominar a la vez que va perdiendo importancia la celular (Chiodini *et al.*, 1984a; García-Marín *et al.*, 2000; Stabel, 2006). Por ello, se ha recomendado que, si se quiere detectar al mayor número posible de animales infectados mediante el empleo de técnicas de diagnóstico basadas en la respuesta inmune, se empleen simultáneamente en el rebaño las que evidencian la respuesta celular y humoral, ya que permitirían detectar

animales en las diferentes fases de la infección (Pérez *et al.*, 1994b; García-Marín *et al.*, 1999; Stabel y Whitlock., 2001). 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).

II.6.4.1. Técnicas basadas en la detección de la respuesta inmune celular

La respuesta inmune celular se desarrolla principalmente en los animales infectados en las fases iniciales, o en formas latentes de la enfermedad. Dicha respuesta en el animal puede determinarse mediante diferentes pruebas diagnósticas, tanto “*in vivo*” (Larsen *et al.*, 1955; Gilmour, 1965; Merkal, 1973; Juste *et al.*, 1983; García-Marín *et al.*, 1999; Kalis *et al.*, 2003), como “*laboratoriales*” (Milner *et al.*, 1981; Pérez *et al.*, 1994b; García-Marín *et al.*, 1999; Whist *et al.*, 2000; Kalis *et al.*, 2003). Dentro de las primeras, destaca la **prueba de intradermorreacción**, y en cuanto a las pruebas “*in vitro*”, la más comúnmente empleada en la actualidad es la **prueba de liberación del Interferón-gamma (IFN- γ)**. Existe otro tipo de pruebas diagnósticas basadas en la respuesta inmune de tipo celular, como el **test de detección del receptor de interleuquina 2 (IL-2R)**, el de **transformación linfocitaria (LT)** o el de **inhibición de la migración linfocitaria**, si bien dichas pruebas se encuentran en desuso en la actualidad.

II.6.4.1.1. Test de intradermorreacción (IDR)

Esta prueba de hipersensibilidad retardada forma parte de los tests diagnósticos más antiguos para el diagnóstico de las micobacteriosis, y sigue siendo empleada, al tratarse de una prueba de campo barata y sencilla de llevar a cabo (Merkal, 1973). El principio de esta técnica consiste en medir la respuesta inmune celular que se produce localmente tras la inoculación intradérmica de un antígeno, de forma que se valora el incremento de grosor la piel en el punto de inoculación a las 48-72 horas (Fernández *et al.*, 1980; Chiodini *et al.*, 1984a; Blood *et al.*, 1989; Pérez, 1992). En general, la inyección intradérmica del antígeno suele llevarse a cabo en las tablas del cuello del animal (Gilmour y Brotherston, 1966; Chiodini *et al.*, 1984a; Blood *et al.*, 1989), aunque, en la especie ovina, se suele emplear el pliegue de la cola, por ser una zona

desprovista de lana, más adecuada para la realización de la prueba (Fernández *et al.*, 1980; Chiodini *et al.*, 1984a; Juste y Adúriz, 1990b).

En el diagnóstico de la paratuberculosis, los antígenos más empleados han sido unos derivados proteicos purificados, obtenidos bien a partir de *Map*, denominados *PPD johnina* o *paratuberculina*, o bien a partir de *Maa* (*PPD aviar*). Habitualmente se utiliza esta última, debido a su mayor disponibilidad comercial, y al haberse comprobado su elevada similitud antigénica con la *PPD johnina*, ofreciendo sensibilidades y especificidades muy parecidas entre ambas (Juste y Adúriz, 1990b; Pavlik *et al.*, 1999b; Garrido *et al.*, 2000a; Stabel y Whitlock, 2001).

A pesar de que esta prueba haya sido ampliamente usada en las campañas de tuberculosis bovina en diversos países, varios autores han señalado que posee baja sensibilidad y especificidad en el diagnóstico de la paratuberculosis, por lo que no la recomiendan como método de diagnóstico individual en rebaños infectados (de Lisle *et al.*, 1980; Juste, 1987; Körmendy, 1990; Kreeger, 1991; Pavlik *et al.*, 1999b; Olsen *et al.*, 2002; González, 2003). Por otro lado, debe tenerse en cuenta que una reacción positiva a la IDR también podría deberse a reacciones cruzadas por infecciones con otras micobacterias distintas de *Map*, o por otras bacterias como *Actinomyces* spp., *Dermatophilus* spp., *Nocardia* spp. o *Corynebacterium* spp. (Johnson y Pratt, 1944), así como por la vacunación frente a paratuberculosis (Blood *et al.*, 1989; Köhler *et al.*, 2001).

En cuanto a la sensibilidad de esta prueba, Pérez *et al.*, (1999), en un estudio realizado en ovejas desechadas por diversas causas, detectaron hasta un 80% de animales positivos a la IDR dentro de aquellos clasificados con lesiones focales. En cambio, en el grupo de animales con lesiones difusas, mientras la sensibilidad fue del 100% en las ovejas presentando lesiones paucibacilares, tan sólo fue del 11% en aquellas con formas multibacilares, caracterizadas por una elevada carga micobacteriana.

Finalmente, ha de tenerse en cuenta que una segunda prueba de IDR podría verse alterada por la sensibilización previa que genera la inoculación de tuberculina

aviar o bovina, por lo que se recomienda esperar al menos entre 42 y 60 días antes de poder repetir la prueba (Monaghan *et al.*, 1994).

II.6.4.1.2. Prueba de liberación del Interferón-gamma (IFN- γ)

Esta prueba de diagnóstico laboratorial se basa en la liberación de la citoquina “Interferón-gamma” por parte de los linfocitos T de la sangre periférica de animales infectados, tras su incubación “*in vitro*” con antígenos micobacterianos (PPD aviar o PPD johnina) durante un período de entre 18 y 36 horas. A continuación, la cuantificación de la producción de dicha citoquina se lleva a cabo mediante un ELISA utilizando un anticuerpo monoclonal frente a la misma (Pérez *et al.*, 1994b, 1999; Waters *et al.*, 2003).

Inicialmente, esta prueba fue desarrollada para el diagnóstico de la tuberculosis bovina (Rothel *et al.*, 1990), comprobándose posteriormente su gran utilidad para la detección de la paratuberculosis (Pérez *et al.*, 1994b; Burrells *et al.*, 1995; Jungersen *et al.*, 2002), existiendo un test de ELISA comercial, elaborado para el diagnóstico de la tuberculosis bovina (Rothel *et al.*, 1990; Wood *et al.*, 1990), utilizado en paratuberculosis (Billman-Jacobe *et al.*, 1992; Stabel, 1996).

En la especie ovina, Pérez *et al.*, (1999) encontraron una sensibilidad del 87 % mediante esta prueba en los animales con lesiones focales, mientras que tan sólo el 36% de los animales enfermos clínicamente fueron detectados como positivos. Sin embargo, si únicamente se consideraban las ovejas con lesiones difusas linfocíticas o paucibacilares, caracterizadas por una elevada respuesta inmune de tipo celular, este porcentaje se incrementaba hasta el 77%. 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). En corderos infectados experimentalmente, se ha comprobado que esta técnica es la primera en detectar la infección (Gwozdz *et al.*, 2000b; Stewart *et al.*, 2004; Begg *et al.*, 2005).

Existe discrepancia en cuanto al efecto de una sensibilización previa mediante IDR sobre la secreción de IFN- γ . Por un lado, algunos autores afirman que la eficacia del test del IFN- γ no parece verse significativamente alterada por la inoculación previa de tuberculinas aviar o bovina, al menos entre los 8 y 28 días posteriores a la inyección (Doherty *et al.*, 1995; Ryan *et al.*, 2000), e incluso hasta los 65 días posinoculación (Gormley *et al.*, 2004) en el caso de vacas infectadas por *M. bovis*. Por el contrario, otros estudios encontraron que la sensibilización previa que ocasiona la IDR ejercía un efecto estimulador en la producción de esta citoquina en los días posteriores a la inoculación, tanto en tuberculosis como en la paratuberculosis bovina, lo que sería un inconveniente a tener en cuenta a la hora de interpretar los test de IFN- γ (Rothel *et al.*, 1992; Whipple *et al.*, 2001; Stabel *et al.*, 2007). De esta manera, tras inocular con PPD johnina una vaca control, otra infectada subclínicamente y una tercera clínicamente enferma, el grupo de Stabel *et al.*, (2007) midieron la producción de IFN- γ en sangre a los días 0, 2, 4, 7, 10, 14 y 21 tras la IDR, encontrando un incremento significativo en la secreción de dicha citoquina en el animal subclínico, de manera más acusada a los días 7 y 10 posinoculación, mientras que no se observaron diferencias en la secreción de IFN- γ del animal control y enfermo clínico. Según los autores, la sensibilización previa incrementaría así la sensibilidad del test de IFN- γ , facilitando la distinción entre los animales subclínicamente infectados por *Map* de los controles no infectados. En cambio Rothel *et al.*, (1992) mencionan la posibilidad de que el incremento obtenido en la secreción de IFN- γ pueda afectar la especificidad del test, sugiriendo por tanto que no se debería de practicar dicha prueba en los animales durante al menos 59 días tras la IDR. En cualquier caso, las divergencias en estos resultados se pueden atribuir a numerosos factores, como la naturaleza de la infección, el número de animales empleados en los estudios, el protocolo de IDR empleado en el experimento, 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 su elevado coste económico y la rapidez con la que deben procesarse las muestras de sangre (Olsen *et al.*, 2002). Además, al igual que la IDR, su especificidad puede verse comprometida debido a la posibilidad de producirse reacciones cruzadas, principalmente en el ganado bovino, en el caso de infecciones por otras micobacterias ambientales y bacterias relacionadas (Pérez *et al.*, 1994b; Lauzi *et al.*, 2000; Olsen *et al.*, 2002). Para paliar este último inconveniente, la búsqueda de nuevos antígenos específicos de *Map* ha sido objeto de

una amplia investigación, habiéndose probado otros antígenos procedentes de *Map*, que aunque en estudios experimentales se han mostrado capaces de distinguir los animales infectados por otras especies de micobacterias, o incluso animales infectados con bacterias inactivadas, principalmente vacunas (Burrells *et al.*, 1995), su uso no se ha extendido, siendo las PPDs los antígenos más comúnmente empleados.

Por otro lado, se ha comprobado que algunas proteínas de *Map* pueden inducir una liberación innata de IFN- γ inespecífico, principalmente en animales jóvenes, no necesariamente infectados, que debe de tenerse en cuenta por la posible interferencia que puede producirse en el test (McDonald *et al.*, 1999; Olsen y Storset, 2001; Stewart *et al.*, 2007).

II.6.4.1.3. Otras pruebas.

Dentro de las pruebas diagnósticas basadas en el efecto de la infección por *Map* sobre la respuesta inmune de tipo celular, el **test de detección del receptor de interleuquina 2 (IL-2R)**, mide la cantidad de expresión del receptor IL-2R producido por los linfocitos Tcirculantes en sangre entera, tras su incubación durante 72 horas con un derivado proteico purificado de *Map*. La cuantificación de dicho receptor se realiza mediante inmunomarcaje con anticuerpos monoclonales y posterior análisis mediante citometría (Whist *et al.*, 2000). Se trata de una técnica muy laboriosa, por lo que su uso no se ha extendido.

El test de **transformación linfocitaria (LT)** se basa en la valoración de los cambios de la actividad nuclear de los linfocitos sensibilizados frente a antígenos micobacterianos (Burgelt *et al.*, 1977; Milner *et al.*, 1981). Se considera una técnica con mayor sensibilidad y especificidad que los tests serológicos y de cultivo (Johnson *et al.*, 1977; Milner *et al.*, 1981). Sin embargo, la complejidad de su realización (requiere el cultivo de linfocitos vivos purificados) hizo que se haya sustituido por otras pruebas como la del test del IFN- γ .

Finalmente, la prueba de **inhibición de la migración linfocitaria** consiste en la valoración de la migración, en una placa de azarosa, de los leucocitos tras ser incubados con un antígeno específico. En los animales infectados, en los que los leucocitos están

previamente sensibilizados, el índice de dispersión de dichas células será menor que en el caso de animales no infectados, debido a la secreción de un factor inhibidor de migración por parte de las células infectadas, que hace que éstas queden fijadas en la superficie (Bendixen, 1977; Sreenivasulu *et al.*, 1986). En ovinos vacunados frente a paratuberculosis, esta prueba detectó con éxito la respuesta inmune celular inducida desde la segunda semana posvacunación (Sreenivasulu *et al.*, 1986).

II.6.4.2. Técnicas basadas en la inmunidad humoral.

Este tipo de pruebas, basadas en la detección de anticuerpos específicos frente a antígenos de *Map*, han sido las más ampliamente utilizadas en el diagnóstico de la paratuberculosis, debido a la facilidad de obtención y procesamiento de las muestras, su bajo coste, así como la rapidez en la obtención de los resultados (Juste y Aduriz, 1990b). Dentro de las más empleadas, se distinguen el **test de fijación del complemento (FC)**, la **prueba de inmunodifusión en gel de Agar (IDGA)**, y el **test de ELISA**. De acuerdo al espectro inmunopatológico de la paratuberculosis, todas estas pruebas tendrían una eficacia similar en el diagnóstico de esta enfermedad, al detectar mayormente animales en las fases clínicas, cuando la respuesta inmune humoral se hace más evidente, mientras que no serían capaces de identificar todos los animales subclínicos (Chiodini *et al.*, 1984a; Pérez *et al.*, 1997). Por ello, como ya se ha señalado, su uso debería complementarse con aquellas técnicas basadas en la respuesta inmune celular, para permitir la detección del mayor número posible de animales infectados, abarcando diferentes estados inmunopatológicos dentro de una explotación (Pérez *et al.*, 1997, 1999; García-Marín *et al.*, 1999; Stabel y Whitlock, 2001).

II.6.4.2.1. Test de fijación del complemento (FC).

Durante varias décadas, el uso de la de FC ha estado muy extendido en el diagnóstico de la paratuberculosis (Merkal, 1973; Colgrove *et al.*, 1989). Esta técnica se basa en la capacidad que tiene el complejo antígeno-anticuerpo de activar y fijar el sistema complemento. Este fenómeno se pone en evidencia mediante la activación o no de este último sobre el sistema hemolítico, que actúa entonces como revelador de la reacción (Juste y Aduriz, 1990b). Se trata de un método barato y fácil de realizar (Dimarelli-Mali *et al.*, 1992). Sin embargo, la gran heterogeneidad obtenida en los resultados en cuanto a su sensibilidad y especificidad (de Lisle *et al.*, 1980; Juste y

Adúriz, 1990b; Huchzermeyer y Bastianello, 1992), han hecho que en la actualidad, el empleo de esta prueba se haya visto superado por otras técnicas serológicas, y su uso haya quedado restringido a estudios experimentales (Sockett *et al.*, 1992; Reichel *et al.*, 1999). Así, mientras varios autores encontraron valores de especificidad relativamente altos (90-99%), la FC se considera una técnica de baja sensibilidad (18-40%), especialmente en animales con lesiones subclínicas (Chiodini *et al.*, 1984a; Yokomizo *et al.*, 1991; Reichel *et al.*, 1999). No obstante, en ocasiones, la realización de esta prueba se ha seguido manteniendo para el control de la enfermedad, en combinación con otras técnicas (Pavlik *et al.*, 2000).

En ovinos, esta técnica parece presentar más limitaciones a la hora de interpretar los resultados, debido a la frecuente actividad anti-complementaria del suero ovino, por lo que ha sido aún menos empleada (Juste y Adúriz, 1990b).

II.6.4.2.2. Prueba de Inmunodifusión en gel de Agar (IDGA).

Es una prueba que se ha considerado como útil para la confirmación de casos clínicos sospechosos de paratuberculosis (Sherman *et al.*, 1984; Ferreira *et al.*, 2002). La IDGA es otro método de diagnóstico barato, rápido, y muy sencillo de realizar, basado en la apreciación a simple vista de una banda de precipitación sobre una placa de gel de agar, resultante de la difusión y encuentro de un suero problema con un antígeno específico de *Map*, ambos situados en pocillos contiguos. Únicamente se formará el complejo antígeno-anticuerpo, y su posterior precipitación, si el suero contiene una cantidad suficiente de anticuerpos precipitantes específicos (Juste y Adúriz, 1990b). Por ello, su eficacia en el diagnóstico varía ampliamente según la fase de infección en la que se encuentra el animal (Shulaw *et al.*, 1993; García-Marín *et al.*, 1994; Pérez *et al.*, 1997; Sergeant *et al.*, 2003). Sherman *et al.*, (1984) encontraron una sensibilidad del 96,9% en bovinos clínicamente enfermos confirmados mediante cultivo o estudio anatomopatológico. En la especie ovina, esta técnica parece ofrecer incluso mejores resultados, con valores de sensibilidad de hasta el 100% en ovejas clínicamente sospechosas, confirmadas mediante histopatología y cultivo (Juste *et al.*, 1988; Pérez *et al.*, 1997). En cambio, Colgrove *et al.*, (1989) sólo obtuvieron resultados positivos en el 54,5% de los animales con signos clínicos. Por otro lado, considerándose únicamente los animales con infección subclínica, en el estudio de Sherman *et al.*, (1990), los

valores de sensibilidad apenas alcanzaron el 18,9%. Pérez *et al.*, (1997) encontraron resultados muy similares mediante IDGA, al detectar solamente el 5,5% de los ovinos sin signos clínicos con lesiones focales y multifocales.

De forma general, la IDGA presenta una sensibilidad inferior a la técnica del ELISA (Colgrove *et al.*, 1989; Pérez *et al.*, 1997; Whittington *et al.*, 2003a), y se caracteriza por confirmar únicamente los animales con elevados títulos de anticuerpos (Sockett *et al.*, 1992).

En cambio, en cuanto a la especificidad, esta prueba se puede considerar como altamente fiable, habiéndose descrito valores del 100% en casos naturales de paratuberculosis ovina y caprina (García-Marín *et al.*, 1992c; Shulaw *et al.*, 1993; Pérez *et al.*, 1997; Sergeant *et al.*, 2003; Whittington *et al.*, 2003a).

II.6.4.2.3. Test de ELISA.

El ELISA (Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay) indirecto es de las pruebas inmunológicas más extendidas y empleadas en el diagnóstico habitual de la paratuberculosis. Esta técnica consiste en cuantificar los anticuerpos anti-*Map* presentes en el suero de los animales infectados que se hayan unido específicamente a antígenos de la micobacteria, fijados a las paredes de un pocillo de plástico. La presencia de los complejos antígeno-anticuerpo mediante la adición de un reactivo (anticuerpo con afinidad específica por las inmunoglobulinas) que lleva incorporado un enzima (conjugado). Finalmente, tras añadir el sustrato de dicho enzima, se forma una reacción colorimétrica proporcional a la cantidad de anticuerpos iniciales específicos. Constituye una técnica económica, sencilla de realizar, y que permite manejar amplios lotes de muestras (Collins *et al.*, 1993c; Garrido *et al.*, 2000a).

Al igual que la IDGA, la sensibilidad de los test de ELISA varía ampliamente en función del estatus infeccioso en el que se encuentra el animal, obteniéndose valores de entre un 15% y un 97,7% en el ganado bovino (Colgrove *et al.*, 1989; Sweeney *et al.*, 1995; Garrido, 2001; Pak *et al.*, 2003), entre un 44% y un 83,3% en la especie ovina (Juste *et al.*, 1988; Dimarelli-Malli *et al.*, 1992; Pérez *et al.*, 1997; Hope *et al.*, 2000), y entre un 54% y un 87% en el ganado caprino (Molina *et al.*, 1991; Burnside y Rowley,

1994). De esta manera, se ha comprobado que la positividad al ELISA está claramente correlacionada con la presencia de 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.*, 1999; Kalis *et al.*, 2002). 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 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 han descrito valores de especificidad del ELISA entre el 84,7% y 100% (Milner *et al.*, 1989; Pérez *et al.*, 1997; Olsen *et al.*, 2001a; Robbe-Austerman *et al.*, 2006), si bien se considera en general que estos valores son inferiores con respecto a la IDGA (Pérez *et al.*, 1997). Aún así, en comparación con otras técnicas serológicas como la FC, el ELISA proporciona mejores valores de sensibilidad y especificidad (Jørgensen y Jensen, 1978; Yokomizo *et al.*, 1991; Sockett *et al.*, 1992; Kalis *et al.*, 2002).

Esta prueba diagnóstica tiene el inconveniente de que *Map* presenta numerosas similitudes antigénicas con otras micobacterias ambientales, pudiendo dar lugar a resultados falsos positivos. Una alternativa para reducir este riesgo consistió en la introducción de una fase previa de preadsorción del suero problema con *Mycobacterium phlei*, lo que permite la eliminación de gran parte de las reacciones cruzadas con otras micobacterias o microorganismos, incrementando así la especificidad del ELISA (Yokomizo *et al.*, 1983, 1991; Reichel *et al.*, 1999). De hecho, en la actualidad, casi todos los tests ELISAs disponibles en el comercio incluyen este paso de preadsorción para optimizar el rendimiento de la técnica original (Olsen *et al.*, 2002). Aún así, cabe mencionar que no se impide del todo el riesgo de obtener resultados falsos positivos, lo cual es especialmente importante en vacas infectadas de tuberculosis bovina, que pueden dar reacciones positivas al test ELISA para el diagnóstico de paratuberculosis, a pesar de la adsorción previa del suero con *M. phlei* (Olsen *et al.*, 2001a). Además, hay autores que no encontraron diferencias significativas en mejora de la especificidad tras la adsorción de los sueros (Molina *et al.*, 1991; Valentin-Weigand *et al.*, 1991).

Al igual que sucede con la prueba del IFN- γ , la sensibilización previa de los animales mediante IDR podría interferir posteriormente en los niveles de anticuerpos séricos medidos mediante ELISA, con el consecuente riesgo de obtener resultados

falsos positivos. Este hecho ha sido descrito en el caso de la tuberculosis caprina y bovina (Harboe *et al.*, 1990; Gutiérrez *et al.*, 1998). Así, tras realizar un primer ELISA antes de la inoculación de tuberculina aviar y bovina en un grupo de 63 cabras infectadas y 13 libres de tuberculosis, Gutiérrez *et al.*, (1998) volvieron a repetir dicha prueba 15 días después de llevar a cabo la IDR para medir la respuesta “anamnástica” inducida por la sensibilización previa, obteniendo una mayor sensibilidad de detección de tuberculosis en el ELISA anamnástico (88,6%) con respecto al primer ELISA (54,9%). Además, en este caso la especificidad también fue mayor (95,8% frente al 88%, respectivamente). Recientemente, Vargas *et al.*, (2009) también 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 los autores recomiendan un tiempo de espera de al menos 90 días después de la última inoculación con PPDs para poder realizar de manera fiable un test serológico para el diagnóstico de la paratuberculosis.

El test ELISA también ha sido empleado para detectar anticuerpos anti-*Map* en muestras de leche, bien de forma individual, bien a nivel general a partir de muestras del tanque colector. De esta manera, algunos autores encontraron cierta correlación entre los resultados obtenidos con esta técnica a partir de dichas muestras y el ELISA en suero (Sweeney *et al.*, 1994b; Lombard *et al.*, 2006). Sin embargo, otros grupos de investigación no coinciden con estos resultados cuando se estudian animales individuales (Hardin y Thorne, 1996). Por ello, el ELISA en muestras de leche se considera una técnica adecuada para obtener una estimación de la prevalencia de paratuberculosis en el rebaño, pero se desaconseja su uso en el diagnóstico de animales individuales (Hendrick *et al.*, 2005).

II.7. IMPACTO ECONÓMICO Y MEDIDAS DE CONTROL

El control de la paratuberculosis constituye un verdadero desafío para la industria ganadera debido a las grandes pérdidas económicas que genera, especialmente en las explotaciones lecheras. A pesar de que esta enfermedad se conoce ya desde hace más de un siglo, en la actualidad aún se sigue buscando la estrategia de control óptima para reducir el daño económico e incrementar la rentabilidad de las explotaciones afectadas (Stabel, 1998; Olsen *et al.*, 2002). Este apartado examinará de manera breve

las repercusiones económicas que tiene la paratuberculosis sobre el comercio de animales y productos de origen animal, y por otro lado se revisarán las medidas utilizadas para el control de esta enfermedad.

II.7.1. IMPORTANCIA ECONÓMICA.

De acuerdo con los capítulos 1.1 y 1.2 del *Código Sanitario para los Animales Terrestres* de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE), la paratuberculosis es una enfermedad inscrita en la lista de la OIE, cuya identificación es de declaración obligatoria y debe ser notificada a dicha organización (OIE, 2009).

Esta enfermedad tiene un elevado impacto socio-económico sobre el sector ganadero (Merkal *et al.*, 1975; Kennedy y Benedictus, 2001). Sin embargo, las pérdidas ocasionadas específicamente por esta enfermedad resultan muy difíciles de cuantificar, debido a que la gran mayoría de animales están infectados subclínicamente, siendo difícilmente identificables mediante las pruebas diagnósticas disponibles actualmente, lo que impide conocer la prevalencia real de la enfermedad en los rebaños. Por ello, los efectos que causa la paratuberculosis sobre la productividad y el bienestar del animal muchas veces suelen pasar desapercibidos, y los ganaderos se vuelven reticentes a la hora de invertir grandes cantidades de dinero para la implantación de programas de control (Kennedy y Benedictus, 2001).

El impacto económico de esta enfermedad, estudiado mayoritariamente en la especie bovina, se estima en base a su prevalencia en el rebaño, y a las consecuentes **pérdidas económicas directas** generadas, que vienen resumidas a continuación en la tabla II.7.

Pérdidas económicas directas	Referencias
- Muerte o sacrificio de animales clínicamente enfermos	Merkal <i>et al.</i> , 1975; Chiodini <i>et al.</i> , 1984a ; Benedictus <i>et al.</i> , 1987; Juste, 1997 ; Stabel, 1998; Jonson-Ifearulundu <i>et al.</i> , 1999 ; Kennedy y Benedictus, 2001
- Sacrificio prematuro de animales	Buergelt y Duncan, 1978; Benedictus <i>et al.</i> , 1987; Wilson <i>et al.</i> , 1993, 1997; Jonson-Ifearulundu <i>et al.</i> , 1999 ; Adúriz <i>et al.</i> , 2000; Kennedy y Benedictus, 2001; McKenna <i>et al.</i> , 2006
- Descenso del valor de la canal en mataderos.	Benedictus <i>et al.</i> , 1987; Jonson-Ifearulundu <i>et al.</i> , 1999; Kudahl y Nielsen, 2009
- Menor producción de leche	Buergelt y Duncan, 1978; Benedictus <i>et al.</i> , 1985; Benedictus <i>et al.</i> , 1987; Collins y Nordlund, 1992; Spangler <i>et al.</i> , 1992; Wilson <i>et al.</i> , 1993; Sweeney <i>et al.</i> , 1994a; Adúriz <i>et al.</i> , 1994; Nordlund <i>et al.</i> , 1996; Wilson <i>et al.</i> , 1997; Stabel, 1998; Aly <i>et al.</i> , 2010
- Infertilidad	Merkal <i>et al.</i> , 1975; Buergelt y Duncan, 1978; Stabel, 1998
- Problemas de mamitis	Merkal <i>et al.</i> , 1975; Buergelt y Duncan, 1978; McKenna <i>et al.</i> , 2006
- Menores índices de crecimiento	Stabel, 1998 ; Kudahl y Nielsen, 2009
- Menores índices de conversión	Stabel, 1998 ; Jonson-Ifearulundu <i>et al.</i> , 1999

Tabla II.7. Pérdidas económicas directas generadas por la paratuberculosis.

Estas pérdidas de por sí suponen un alto coste para el ganadero, sin contar con 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.

Sin embargo, la paratuberculosis también produce grandes **pérdidas económicas indirectas**, que deben ser consideradas dentro del impacto económico general, y que abarcan todo lo relacionado con el comercio nacional e internacional en cuanto a movimiento de animales importados o exportados, restricciones de acceso al mercado, o los gastos que implican la realización de pruebas de diagnóstico en animales dedicados a la venta (Burgelt y Duncan, 1978; Kennedy y Benedictus, 2001; Olsen *et al.*, 2002).

Por otro lado, a estos dos tipos de gastos también habría que sumarles los **costes inaparentes**, menos obvios que los anteriores, pero que contribuyen a incrementar los gastos generados por esta enfermedad. Éstos derivan de 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. Estas pérdidas también se deben a las restricciones que se imponen al ganadero para poder vender alguno de sus animales de mayor valor genético, por proceder de un rebaño con paratuberculosis (Burgelt y Duncan, 1978; Adúriz *et al.*, 2000).

En el ganado de leche, se han descrito descensos en la producción lechera desde un 14,6% hasta un 19,5% en vacas clínicamente afectadas (Burgelt y Duncan, 1978; Benedictus *et al.*, 1987; Spangler *et al.*, 1992). Las vacas con infección subclínica pueden producir un 4-6% menos de leche en la penúltima lactación antes del sacrificio en comparación con la anterior, y esta reducción podría incrementarse hasta el 16% en la última lactación (Benedictus *et al.*, 1987; Nordlund *et al.*, 1996). Además, se ha descrito una asociación entre la presencia de paratuberculosis y la menor secreción de grasa y proteínas en la leche (Collins y Nordlund, 1992; Sweeney *et al.*, 1994a), lo que equivale a una pérdida de alrededor 250 dólares por vaca y por lactación (Collins y Nordlund, 1992). Ha de tenerse en cuenta que estos valores de reducción de la producción de leche en vacas subclínicas podrían estar subestimados, al depender de otros factores, como son el estadio de infección subclínica en el que se encuentra el animal en el momento del estudio (Benedictus *et al.*, 1987), la sensibilidad y especificidad de los tests empleados para identificar los animales como subclínicos (Chiodini *et al.*, 1984a; Pérez *et al.*, 1997, 1999), así como el manejo de la explotación o la presencia de infecciones concomitantes (Vanleeuwen *et al.*, 2002).

En un estudio comparativo entre vacas detectadas como positivas y negativas a la infección por *Map* mediante cultivo de heces en una explotación de Nueva York, se estimaron unas pérdidas anuales por sacrificio prematuro de 75 dólares por animal (Wilson *et al.*, 1997). Además, la edad de sacrificio en un grupo de vacas clínicas positivas al cultivo de tejido, otro grupo sin mostrar signos clínicos pero también positivos al cultivo, y un tercer grupo de vacas no infectadas, fue de 4,3, 4,9 y 7,7 respectivamente (Buergelt y Duncan, 1978). Por otro lado, el valor de la canal se ha visto reducido entre un 20 y un 30% en vacas con la enfermedad clínica (Benedictus *et al.*, 1987). Recientemente, en un estudio realizado en explotaciones vacunas lecheras danesas, Kudahl y Nielsen (2009) encontraron una reducción del 15 y del 31% en el peso y el valor de la canal al sacrificio, respectivamente, en vacas positivas al ELISA en comparación con animales negativos a dicha prueba.

Otro coste económico generado por la paratuberculosis se aprecia en la proporción de animales sacrificados por mamitis, siendo ésta mayor en el ganado vacuno positivo al cultivo en heces (22,6%) que en aquellos animales negativos a dicha prueba (3,6%) (Merkal *et al.*, 1975). El mecanismo patogénico por el que la infección subclínica de paratuberculosis puede inducir una mamitis aún no está esclarecido (McKenna *et al.*, 2006).

En un estudio llevado a cabo en 1996, se estimó que la paratuberculosis suponía unas pérdidas de 200-250 millones de dólares anuales para la industria lechera en el conjunto de los Estados Unidos (Ott *et al.*, 1999). En Canadá, los costes de producción anual de una explotación lechera tipo, con el 12,7% de vacas seropositivas a *Map*, implican una pérdida media de 2992 dólares anuales (49 dólares anuales por vaca), de los cuales el 46% de los gastos se deben a las bajas adicionales (Tiwari *et al.*, 2008). En las explotaciones holandesas, las pérdidas alcanzarían los 1250 y 1000 dólares en vacas lecheras infectadas clínica o subclínicamente, respectivamente (Benedictus *et al.*, 1987).

No se dispone de mucha información acerca del impacto económico de la paratuberculosis en pequeños rumiantes. Adúriz *et al.*, (1994) realizaron un estudio en el País Vasco en rebaños de ovejas Latxa, encontrando una reducción en la producción de leche del 10% en los animales seropositivos, 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 cabezas destinadas a la venta de carne. 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).

Por último, aunque la relación causal entre *Map* y la enfermedad de Crohn aún no ha sido confirmada, cabría añadir a todo ello el impacto socio-económico que derivaría de la inclusión de esta micobacteria a la lista de patógenos alimentarios (Kennedy y Benedictus, 2001).

II.7.2. TRATAMIENTO.

El tratamiento de esta enfermedad raramente se lleva a cabo, o sólo de manera excepcional, en animales de alto valor genético. Los tratamientos probados y disponibles en la actualidad, solamente son capaces de paliar la enfermedad, sin llegar a curarla. Además, a pesar de que los animales tratados mejoran clínicamente, siguen eliminando el bacilo por las heces, y los productos procedentes de estos animales y destinados al consumo humano no serían aceptables, por lo que el tratamiento a menudo no resulta compensatorio (Larsen y Vardaman, 1953; Merkal y Larsen, 1973).

Existen numerosos antimicrobianos eficaces frente a *Map in vitro* (Chiodini *et al.*, 1984a). Sin embargo, ninguno de ellos ha proporcionado unos resultados aceptables tras el tratamiento del animal enfermo. Este hecho se explicaría, al menos en parte, por la multiplicación intracelular de *Map*, ante la dificultad mostrada por los fármacos antimicobacterianos para acceder a los compartimentos intracelulares del bacilo (Cocito *et al.*, 1994; Adúriz *et al.*, 2000). De todos los compuestos estudiados, cabe destacar la isoniazida, la clofazimina, la rifampicina, y la gentamicina, que resultaron los más eficaces tanto *in vitro* como en el animal vivo (Cocito *et al.*, 1994). De hecho, la clofazimina es el antibiótico más comúnmente usado para el tratamiento del ganado vacuno infectado con *Map* (Merkal y Larsen, 1973). Sin embargo, ninguno de ellos es capaz de eliminar totalmente la infección.

Por ello, a pesar de los resultados prometedores de los ensayos realizados *in vitro* con diversos antimicrobianos, la quimioterapia no parece tener mucho futuro en la paratuberculosis (Cocito *et al.*, 1994).

II.7.3. CONTROL MEDIANTE VACUNACIÓN.

Los primeros ensayos de vacunación frente a la paratuberculosis fueron realizados en 1926 en el ganado bovino por dos científicos franceses, Vallée y Rinjard, quienes emplearon la inyección subcutánea de una suspensión con una cepa viva no virulenta de *Map*, la cual se reconstituyó en parafina líquida y aceite de oliva (Vallée 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). Esta vacuna se aplicó con gran éxito en Francia (Saint-Marc *et al.*, 1992), y a continuación, se siguió utilizando con ligeras modificaciones en otros países europeos como el Reino Unido (Wilesmith, 1982), Dinamarca (Jorgensen, 1983), u Holanda (Huitema, 1967; Benedictus *et al.*, 1988; Kalis *et al.*, 1992), dando buenos resultados.

Tras su introducción en 1926, numerosos estudios se han dedicado a valorar su eficacia en la especie bovina (Wilesmith, 1982; Benedictus *et al.*, 1988; Juste *et al.*, 2009a), siendo el método de control preferido en el ganado ovino (Nisbet *et al.*, 1962; Pérez *et al.*, 1995) y cada vez más empleado en el caprino (Corpa *et al.*, 2000b).

Las vacunas se suelen administrar en animales jóvenes (dentro del primer mes de vida), por ser considerado el grupo de edad de mayor riesgo de infección, y en los que la inmunización parece ser más eficiente (Larsen *et al.*, 1964; Adúriz, 1993). Sin embargo, se ha descrito la reducción en la incidencia de casos clínicos, así como una respuesta inmune mayor y más persistente en ovinos y caprinos tras la vacunación de animales de mayor edad, incluso adultos (Gilmour *et al.*, 1965a; Pérez, 1992; Corpa, 1999; Corpa *et al.*, 2000c; García-Pariente *et al.*, 2003). En cambio, otros estudios no encontraron diferencias significativas entre la edad de vacunación y la capacidad de la vacuna para estimular una respuesta inmune celular protectora (Geijo, 2007).

Las vacunas desarrolladas hasta la fecha han sido realizadas a partir de cepas vivas atenuadas de *Map* (Doyle, 1945; Stuart, 1965b; Gilmour y Brotherston, 1966; Larsen *et al.*, 1974; Gwozdz *et al.*, 2000a; Begg y Griffin, 2005), de cepas inactivas (Brotherston *et al.*, 1961b; Larsen *et al.*, 1978; García-Pariente *et al.*, 2003; Muñoz *et al.*, 2006; Reddacliff *et al.*, 2006; Reyes, 2007), o bien de fracciones de *Map* (Gilmour y Brotherston, 1966; Larsen *et al.*, 1969). Argente, (1992), combinando un ensayo con una vacuna viva atenuada de *Map* (Neo-Parasec®) junto con medidas de manejo, obtuvo resultados muy prometedores en un estudio realizado en Francia con 2073 vacas, consiguiendo reducir la excreción de *Map* en heces en un 85%, en comparación con la disminución del 23% que había conseguido en 1281 animales empleando únicamente las medidas de manejo (Argente, 1992). A pesar de estos buenos resultados con vacunas vivas, los riesgos de posibles inoculaciones accidentales por el veterinario, la vida útil de tan sólo 14 días, así como la posibilidad de que, al incluir bacilos vivos en su composición, éstos puedan originar infecciones persistentes que eventualmente pudieran circular en la explotación o revertir en su patogenicidad, han hecho que el uso de vacunas vivas se haya visto limitado y se haya recomendado la vacunación con productos inactivados, por la mayor seguridad que proporcionan (Adúriz *et al.*, 2000; Emery y Whittington, 2004).

Las vacunas más comúnmente empleadas en la actualidad suelen estar resuspendidas en aceite mineral, por ser el adyuvante capaz de inducir la mayor y más persistente respuesta inmune. Sin embargo, su uso también conlleva ciertos inconvenientes, entre los cuales destaca la formación de un nódulo subcutáneo fibrocáseo en el lugar de inoculación, que puede llegar a ser relativamente amplio e incluso en ocasiones ulcerado (Doyle, 1964; Chiodini *et al.*, 1984a; Adúriz *et al.*, 2000; Köhler *et al.*, 2001; Reyes, 2007).

Se ha comprobado que la vacunación permite reducir la prevalencia de animales con la enfermedad clínica y también es capaz de disminuir la excreción de *Map* en heces (Wilesmith, 1982; Merkal, 1984; Benedictus *et al.*, 1988; Cranwell, 1993; Körmendy, 1994; Wentink *et al.*, 1994). 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; Muñoz *et al.*, 2006; Geijo, 2007; Reyes, 2007). Las cepas vacunales de *Map* tienen elevada capacidad para estimular respuestas

serológicas persistentes en la mayoría de los animales y de manera muy precoz (Spangler *et al.*, 1991; Adúriz, 1993), aunque se ha señalado que la respuesta inmune celular que ocasionan suele ser más débil, reduciendo su poder protector (Chiodini *et al.*, 1984a). Por ello la vacuna “ideal” debería poder inducir una fuerte respuesta protectora de tipo Th1, capaz de controlar la diseminación de *Map* (Bretscher *et al.*, 2002).

Es muy importante tener presente que la vacunación frente a la paratuberculosis no previene la infección de los animales, hecho demostrado en varios estudios experimentales (Nisbet *et al.*, 1962; Larsen *et al.*, 1974; García Marín *et al.*, 1988, 1995b; Juste *et al.*, 1994; Muñoz *et al.*, 2006; Reyes, 2007) o de campo (Windsor *et al.*, 2003; García-Pariente *et al.*, 2003, 2006), sino que modifica la respuesta del hospedador frente a la infección de tal manera que consigue limitar la progresión y extensión de las lesiones granulomatosas y disminuir la cantidad de *Map* en los tejidos. Así, en los animales vacunados se han descrito lesiones formadas por granulomas de pequeño tamaño, con abundante tejido conjuntivo demarcándoles, células gigantes, escasa necrosis y calcificación, así como poca carga bacteriana (García Marín *et al.*, 1988, 1995b, 1997; Juste *et al.*, 1994; Reyes, 2007). Sin embargo, la eficacia de la vacunación ha sido ampliamente cuestionada, al haberse obtenido resultados muy dispares en los ensayos llevados a cabo hasta ahora. Mientras algunos autores no observaron reducción en la tasa de infección (Hore *et al.*, 1971; Kalis *et al.*, 2001), otros comprobaron disminuciones de entre el 50% y el 90% (Stuart, 1965b; Larsen *et al.*, 1978; Kormendy, 1992). En cualquier caso, la vacunación permite reducir la incidencia de casos clínicos, y, en menor medida, la prevalencia de la infección, pero los animales vacunados no están protegidos al 100% de la infección (Chiodini *et al.*, 1984a; Köhler *et al.*, 2010).

La eficacia de las vacunas se puede evaluar de diferentes maneras. El estudio patológico ha sido ampliamente utilizado, especialmente en pequeños rumiantes (Nisbet *et al.*, 1962; Juste *et al.*, 1994; García Marín *et al.*, 1995b). En este caso, la eficacia de la vacuna empleada se valora en función de la presencia de lesiones granulomatosas, de su progresión en el tiempo, y del tipo de lesión que induce la vacuna, comparando animales vacunados con individuos control (Juste *et al.*, 1994; Muñoz *et al.*, 2006; Reyes, 2007). Otros estudios han valorado el efecto que tiene la vacuna a nivel de rebaño en cuanto a la reducción de la excreción fecal de *Map*, contribuyendo a

disminuir las posibles fuentes de infección y reducir la contaminación de los pastos (Argente, 1992; Körmeny, 1994; Stabel, 1998). Finalmente, también se han evaluado los índices productivos en la explotación en la que se practica la vacunación, como la producción de leche (García-Pariente *et al.*, 2003; Juste *et al.*, 2009a), o bien estimar el beneficio económico que supone vacunar un rebaño afectado de paratuberculosis (Van Schaik *et al.*, 1996).

Uno de los mayores inconvenientes de la vacunación frente a la paratuberculosis en el ganado bovino, y que sigue generando controversia, es la interferencia que puede provocar dicho método de control con las pruebas de diagnóstico inmunológicas que se emplean para detectar infecciones naturales de paratuberculosis y tuberculosis en rebaños infectados. En efecto, se debe tener en cuenta que un animal vacunado ofrece un resultado positivo a los test serológicos frente a paratuberculosis, al tener incrementada su respuesta inmune humoral (Chiodini *et al.*, 1984a; Spangler *et al.*, 1991). Los programas de erradicación de la tuberculosis se basan en el uso de la prueba de IDR. La vacunación frente a *Map* también puede interferir en estos resultados, debido a las reacciones cruzadas que ocurren entre los antígenos de la cepa de *Map* usada en la vacuna, y los de otros patógenos micobacterianos como *M. bovis*. (Köhler *et al.*, 2001; Muskens *et al.*, 2002; Mackintosh *et al.*, 2005). No obstante, los animales infectados se podrían diferenciar de aquellos vacunados empleando la prueba de IDR comparada (Larsen, 1973; Chiodini *et al.*, 1984a).

II.7.4. OTRAS ESTRATEGIAS DE CONTROL.

La elevada prevalencia de la paratuberculosis así como las significativas pérdidas económicas que genera esta enfermedad han llevado a la introducción de numerosos programas de control, implantados en varios países, basados en la detección y eliminación de animales infectados (Bakker *et al.*, 2000; Kennedy y Benedictus, 2001). Por otra parte, se ha indicado que el uso de la vacunación por sí sola no sería suficiente para “eliminar” la infección de los rebaños, siendo recomendable la instauración de medidas adicionales de manejo (Juste y Saez de Ocariz, 1990; Adúriz *et al.*, 2000; Kalis *et al.*, 2001).

Los programas de control deben de tener en cuenta numerosos factores, que incluyen, entre otros, el conocimiento de las vías de infección y la epidemiología de esta enfermedad, las herramientas de diagnóstico adecuadas para la detección de animales excretores, la persistencia del microorganismo en el medio ambiente, servicios veterinarios adecuados, la trazabilidad e identificación de los animales de manera individual, consideraciones económicas y de salud pública, así como la disponibilidad de animales de reemplazo libres de la enfermedad (Kennedy y Benedictus, 2001). Las estrategias de control se basan, por un lado, en la detección y el sacrificio de animales infectados, y por otro lado, en el establecimiento de medidas higiénico-sanitarias.

II.7.4.1. Detección y eliminación de los animales infectados.

El diagnóstico y sacrificio de los animales infectados (“test-and-cull”) es uno de los métodos más utilizados en los programas de control de la paratuberculosis, ya que se lograría disminuir la prevalencia de la infección, al eliminar las posibles fuentes de contagio y evitar la introducción de animales positivos al rebaño. Aunque el objetivo consiste en llegar a la erradicación de la infección en el rebaño (Rossiter y Burhans, 1996; Benedictus *et al.*, 2000; Kalis *et al.*, 2001), los resultados obtenidos hasta el momento con estos procedimientos no lo han logrado

Para cumplir estos objetivos, se recomienda el sacrificio de todos los animales clínicamente enfermos junto con su descendencia (Doyle, 1964; Wilesmith, 1982; Riemann y Abbas, 1983), así como todo individuo que haya sido identificado como positivo a diferentes pruebas diagnósticas, realizadas de forma sistemática (Sherman, 1985). Una de las limitaciones de este método radica en la propia ineficacia de las técnicas de diagnóstico (Whitlock *et al.*, 2000). El cultivo fecal ha sido la base de varios programas de control durante muchos años, pero, debido al largo tiempo de incubación que requiere para la obtención de resultados, ha sido sustituido por otras técnicas como la PCR, y pruebas inmunológicas, fundamentalmente el ELISA (Bulaga y Collins, 1999). Los mejores resultados se han conseguido mediante la combinación del cultivo fecal junto con el test de ELISA, y a veces con otras pruebas inmunológicas como la del IFN- γ , al permitir la detección de un mayor número de animales infectados (Rossiter *et al.*, 1992; Bulaga y Collins, 1999; Kalis *et al.*, 2003).

Este método ha sido empleado con buenos resultados en diferentes países de Europa como el Reino Unido (Wilesmith, 1982), Dinamarca (Jorgensen, 1983), Holanda (Van Schaik *et al.*, 1996), Francia (Guilbert *et al.*, 1999), Suecia (Sternberg y Viske, 2003) así como en EEUU (Whitlock *et al.*, 1994). Aparentemente, la erradicación de la paratuberculosis bovina es una meta que aún no ha sido alcanzada con los conocimientos actuales, sin embargo, sí se ha logrado reducir su prevalencia, siempre y cuando se han aplicado estrictas medidas de manejo y se ha podido contar con la concienciación e implicación de los ganaderos y veterinarios (Benedictus y Kalis, 2003; Kennedy *et al.*, 2006).

II.7.4.2. Medidas higiénico-sanitarias.

El manejo adecuado de las explotaciones constituye otro de los métodos claves para el control de la enfermedad. Su cumplimiento constante va encaminado a la reducción de la carga infectiva y la limitación de 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).

Dentro de las medidas más importantes para instaurar en un rebaño con paratuberculosis, aparte de las buenas costumbres higiénicas generales, se encuentran:

- Limpieza y desinfección periódica de las instalaciones (Merkal y Whipple, 1982).
- Evitar el contacto de los purines con los animales, alimentos y bebida (Goodger *et al.*, 1996).
- Separar la zona de partos mediante paredes de cemento del resto de la explotación (Kalis *et al.*, 2001).
- Separar los recién nacidos de las madres lo antes posible y restringir el contacto madres-crías y entre terneros y animales adultos en general, manteniéndoles en instalaciones y pastos separados al menos durante los 6 primeros meses de vida (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).

- En casos de madres excretoras de *Map*, eliminar su descendencia, al poder encontrarse infectada por vía intrauterina (Chiodini *et al.*, 1984a; Whittington y Windsor, 2009).
- Aislamiento de los animales con sintomatología clínica (Chiodini *et al.*, 1984a; Blood *et al.*, 1989; Goodger *et al.*, 1996; Muskens *et al.*, 2003a).

A la hora de adquirir nuevos animales es necesario llevar un control muy estricto para evitar la introducción de la infección en un rebaño libre de paratuberculosis. Para ello, se requiere cumplir con unas garantías sanitarias rigurosas y controlar el movimiento del ganado, bien basándose en pruebas diagnósticas, bien adquiriendo animales de explotaciones que estén libres de la enfermedad (Chiodini *et al.*, 1984a; Adúriz *et al.*, 2000; Carpenter *et al.*, 2004).

Según el estudio de Groenendaal *et al.*, (2002), el manejo higiénico-sanitario de los terneros constituye el punto crítico en un programa de control para reducir la incidencia de la infección. De su correcta aplicación dependerá la posibilidad de “erradicar” la paratuberculosis en un rebaño (Groenendaal *et al.*, 2002).

II.8. IMPLICACIONES EN LA SALUD PÚBLICA.

II.8.1. ENFERMEDAD DE CROHN.

El término de “Enfermedades inflamatorias intestinales” (*Inflammatory Bowel Disease* -IBD-) engloba tres enfermedades humanas que tienen la característica común de presentarse en forma de inflamación crónica y local del intestino (European Commission, 2000):

- 1- Enfermedad de Crohn.
- 2- Colitis ulcerativa.
- 3- Colitis crónica indeterminada o sin clasificar.

La causa de la IBD aún no ha sido esclarecida. Una de las hipótesis más aceptadas en la actualidad va enfocada hacia una etiología multifactorial, donde una respuesta inmune inadecuada del huésped tendría un papel importante en el establecimiento de la inflamación local (Grant, 2005; Juste *et al.*, 2009b; Mendoza *et*

al., 2009). Otros de los factores que estarían implicados en la etiopatogenia de la IBD serían el medio ambiente, predisposiciones genéticas, así como la propia flora bacteriana comensal del intestino (Grant, 2005; Goyette *et al.*, 2007). Dentro de las IBDs humanas, la **enfermedad de Crohn** es dónde más se está estudiando la posible implicación de *Map* en su etiología.

La enfermedad de Crohn, caracterizada por una enteritis granulomatosa crónica que afecta a las personas, fue descrita por primera vez en 1932 por Crohn *et al.*, (1932), quienes observaron ocho casos de ileitis regional en un hospital de Nueva York. La similitud de las lesiones ocasionadas en estos pacientes con las de una tuberculosis intestinal originó la sospecha de una etiología micobacteriana. Sin embargo, no fue hasta 1984 cuando Chiodini y sus colaboradores aislaron por primera vez una forma de micobacteria de pared defectuosa (esferoplasto) en tres pacientes enfermos de Crohn (Chiodini *et al.*, 1984b), posteriormente identificada como *Map* (Chiodini *et al.*, 1986). Este hallazgo, junto con el aislamiento de dicho bacilo a partir de sangre y tejidos de pacientes con esta enfermedad (Naser *et al.*, 2004; Sechi *et al.*, 2005; Juste *et al.*, 2009b), han suscitado aún más interés sobre el posible papel zoonótico de esta micobacteria, y han abierto un debate muy controvertido en estas dos últimas décadas (Greenstein, 2003). Los diferentes argumentos orientados hacia la aceptación o el rechazo de *Map* como agente etiológico de la enfermedad de Crohn y comentados en este apartado vienen resumidos en la tabla II.8.

Argumentos a favor y en contra de la responsabilidad etiológica de <i>Map</i> en la enfermedad de Crohn	
A favor:	En contra:
<ul style="list-style-type: none"> - Se ha identificado la presencia de <i>Map</i> mediante PCR y cultivo en tejido y sangre en una mayor proporción de individuos con Crohn que con colitis ulcerativa o personas sin IBD. - Se detecta ADN de <i>Map</i> mediante HIS en un mayor porcentaje de secciones histológicas de pacientes de Crohn que sanos. - <i>Map</i> suele encontrarse en forma de “esferoplastos” en tejidos con lesiones de Crohn, los cuales no se tiñen con la tinción de ZN debido a su pared defectuosa. - Existen formas lesionales de paratuberculosis con escasos o ningún BAAR, lo que podría suceder de la misma manera en las lesiones del Crohn. - Los pacientes con la enfermedad de Crohn presentan una mayor respuesta serológica frente a antígenos de <i>Map</i> que personas sanas. - Los fármacos empleados para tratar la enfermedad de Crohn con resultados positivos se caracterizan por tener también un efecto anti-<i>Map</i> 	<ul style="list-style-type: none"> - Se ha detectado la presencia de <i>Map</i> en sangre de individuos controles sin IBD mediante PCR. - Algunos estudios no lograron identificar la presencia de <i>Map</i> mediante PCR en pacientes de Crohn. - La identificación de <i>Map</i> en lesiones de Crohn empleando las tinciones estándares para BAAR resulta muy dificultosa o imposible. - No se detectaron diferencias significativas en la respuesta inmune inducida por antígenos de <i>Map</i> entre pacientes con o sin IBD. - La mayor frecuencia de detección de <i>Map</i> en el intestino de enfermos de Crohn no es un argumento suficiente para justificar su papel en la etiología de esta enfermedad. - No se ha observado mayor incidencia de enfermos de Crohn entre ganaderos, veterinarios o cualquier personal directamente expuesto a casos clínicos de paratuberculosis.

Tabla II.8. Resumen de los argumentos tratados en este apartado a favor y en contra del papel etiológico de *Map* en la enfermedad de Crohn.

Los signos clínicos de esta enfermedad, parecidos a los de la paratuberculosis, incluyen malestar general, pérdida crónica de peso, dolor abdominal, diarrea y pueden manifestarse de forma intermitente (Chiodini, 1989). Además, esta enfermedad presenta una mayor prevalencia en individuos de edades comprendidas entre los 16 y 25 años, si bien se ha señalado una proporción cada vez mayor de personas afectadas con menos de 16 años. Por otro lado, también se ha descrito en individuos de entre 55-65 años, aunque más esporádicamente (Armitage *et al.*, 2001; Chacon *et al.*, 2004; Grant, 2005). 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 Blennerhasset, 2005). El tratamiento puede ser bien paliativo, mediante el empleo de fármacos anti-diarreicos e antiinflamatorios, o bien de tipo inmunosupresor, e incluso quirúrgico, con el fin de extirpar los tramos intestinales afectados o aliviar las complicaciones tales

como la formación de fistulas o de obstrucciones (Podolsky, 2002). Esta enfermedad puede presentarse en cualquier parte del tracto gastrointestinal, si bien el íleon distal suele ser el tramo más frecuentemente afectado (Grant, 2005). Las características patológicas de la enfermedad de Crohn, en comparación con aquellas de la paratuberculosis, se encuentran resumidas en el informe de la Comisión Europea acerca de la posible relación entre ambas enfermedades, emitido en el año 2000 (European Commission, 2000). De forma general, las lesiones en los casos de Crohn serían similares a algunas de las formas de la paratuberculosis, con la presencia de granulomas y agregados linfoides que pueden afectar a toda la pared intestinal. En cambio, a diferencia de ésta, pueden acompañarse también de fibrosis y afectar zonas del esófago y de la cavidad oral (European Commission, 2000).

La teoría por la que *Map* podría estar implicado en la etiología del Crohn se ha visto respaldada por los numerosos estudios en los que se ha detectado su presencia en pacientes enfermos mediante diversas pruebas diagnósticas, entre ellas el cultivo. Así, se aisló la micobacteria en el 86% de tejido extirpado quirúrgicamente y entre 20-42% de biopsias de pacientes con Crohn, frente a 5-6% y el 9% en individuos controles, respectivamente (Schwartz *et al.*, 2000; Bull *et al.*, 2003). Además, recientemente, el grupo de investigación de 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 al bacilo en ninguno de los 15 individuos controles sin IBD.

Por otra parte, el descubrimiento de la secuencia de inserción IS900 ha sido clave para la investigación sobre el papel de *Map* en la enfermedad de Crohn, al identificarse ADN del bacilo tanto en intestino (Bull *et al.*, 2003; Sechi *et al.*, 2005; Abubakar *et al.*, 2008) como a partir de sangre (Juste *et al.*, 2008) de enfermos. Sin embargo, en este caso, los resultados han sido más contradictorios y polémicos, debido a que por un lado, se ha detectado la presencia del bacilo en individuos controles no afectados de IBD (Juste *et al.*, 2008; Juste *et al.*, 2009b), y por lo contrario, otros autores no identificaron *Map* en muestras de pacientes de Crohn mediante esta técnica (Wu *et al.*, 1991; Frank y Cook, 1996). Bull *et al.*, (2003) interpretaron estos últimos resultados por la falta de sensibilidad de las metodologías empleadas, y recomendaron

añadir un paso de disrupción de la pared celular de *Map* durante la extracción de ADN, imprescindible para optimizar esta técnica en muestras de tejido de personas con Crohn.

Además, los detractores de la hipótesis de *Map* como agente etiológico del Crohn argumentan su opinión en el hecho de que el bacilo raramente ha podido identificarse histológicamente a partir de biopsias de pacientes enfermos (Jeyanathan *et al.*, 2007), mientras que en el caso de la paratuberculosis, es relativamente fácil detectar su presencia mediante la tinción de ZN (Garrido *et al.*, 2000a; Brown *et al.*, 2007). Sin embargo, cuando se ha empleado la técnica de hibridación *in situ*, más adecuada para detectar aquellas formas de *Map* de pared defectiva o *esferoplastos* en secciones de tejido incluido en parafina, se ha encontrado un mayor porcentaje de ADN de *Map* en muestras de pacientes con enfermedad de Crohn en comparación con los individuos controles sanos (Hulten *et al.*, 2001; Sechi *et al.*, 2001, 2004). Estos resultados sugieren que el bacilo estaría presente en su forma de esferoplastos en personas, y por ello no se identificaría mediante ZN (Chiodini *et al.*, 1986; Grant, 2005), mientras que en animales con paratuberculosis, esta micobacteria suele presentar la pared celular intacta, propiedad esencial para poder teñirse mediante ZN (Coetsier *et al.*, 1998). Además, debe tenerse en cuenta, tal y como se mencionó anteriormente en el capítulo de diagnóstico, que en la paratuberculosis también existen 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, a pesar de ello, nunca se ha puesto en duda el papel de *Map* como agente etiológico de esta enfermedad.

Otros grupos de investigación han centrado su estudio en la relación entre la presencia de *Map* en enfermos de Crohn, y la respuesta inmune que induce en estos últimos, en comparación con la paratuberculosis (Feller *et al.*, 2007; Juste *et al.*, 2009b). No obstante, una vez más, los resultados obtenidos en los diferentes estudios han sido controvertidos. El antígeno empleado parece influir en gran medida, siendo las proteínas p35 y p36 las más frecuentemente usadas (Naser *et al.*, 2000). Olsen *et al.*, (2001b) encontraron una mayor respuesta humoral frente a la proteína de 14 kDa de *Map* en

pacientes con enfermedad de Crohn en comparación con personas con colitis ulcerativa. Por otro lado, el grupo de Collins *et al.*, (2000) elaboraron un ELISA para detectar anticuerpos frente a *Map* en enfermos de Crohn, encontrando una mayor respuesta en estos últimos (20,7%) que en los individuos controles sanos (3,8%) en un estudio realizado con pacientes de EEUU y Dinamarca. En cambio, posteriormente, el empleo de este mismo ELISA dio lugar a la misma seropositividad (35%) tanto en pacientes de Crohn, como afectados de colitis ulcerativa o individuos controles sanos en la provincia de Manitoba, en Canadá (Bernstein *et al.*, 2004).

En base a dicha respuesta inmune, Juste *et al.*, (2009b) propusieron una nueva hipótesis para interpretar la patogenia de la enfermedad de Crohn, que sería también válida para la paratuberculosis bovina (Geijo, 2007), en la que los individuos afectados presentarían una cierta deficiencia genética de la inmunidad innata que conllevaría una disminución en la producción de citoquinas, favoreciendo así la proliferación bacteriana. De esta manera, en el estudio llevado a cabo por este grupo, 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 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). También se han descrito otros factores genéticos posiblemente relacionados con la etiología de la IBD, y, al igual que en paratuberculosis, parece existir una asociación entre una mutación en el gen NOD2/CARD15, y la mayor predisposición a padecer estas enfermedades (Hugot *et al.*, 2001; Ogura *et al.*, 2001a; Pinedo *et al.*, 2009b; Ruiz-Larrañaga *et al.*, 2010a).

Greenstein *et al.*, (2007a, 2007b, 2008), en una serie de ensayos, comprobaron que los diferentes productos empleados para el tratamiento de la IBD (en concreto el

ácido 5-aminosalicílico, el metotrexato, la 6-mercaptopurina, la ciclosporina A, así como los macrólidos Rapamicina y Tacrolimus), además de por sus efectos inmunosupresores, también se caracterizaban por tener un efecto anti-*Map*, actuando de forma sinérgica. Estos hallazgos explicarían 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). En cambio, parece ser que el tratamiento de la enfermedad del Crohn mediante terapia antibiótica no ha logrado la curación, tras emplear los antibióticos tradicionalmente recetados contra *M. tuberculosis* tales como la isoniazida, el ethambutol o la rifampicina (Thomas *et al.*, 1998).

Finalmente, hay que indicar que, a pesar de las evidencias a favor señaladas, aún existen reticencias a la hora de aceptar esta micobacteria como agente causal de la enfermedad de Crohn, principalmente por el hecho de que su mera presencia en estos pacientes no necesariamente implica que sea la causa inicial, sino que podría indicar una infección secundaria. Además, en el caso de que *Map* fuera el agente etiológico de esta enfermedad, los ganaderos y el personal más expuesto a esta micobacteria deberían tener mayor predisposición a padecer la enfermedad de Crohn, mientras que no se ha observado una mayor proporción de individuos afectados entre estas poblaciones (Jones *et al.*, 2006). En cualquier caso, en la actualidad la comunidad científica cada vez parece más favorable a aceptar una posible relación entre dicha micobacteria y la enfermedad de Crohn, si bien aún se requieren muchos más estudios para poder confirmar su papel como agente causal (European Commission, 2000; Grant, 2005; Pierce, 2009).

II.8.2. *Map* en la cadena alimentaria.

De confirmarse el papel de *Map* como agente etiológico de la enfermedad de Crohn, las repercusiones en salud pública serían muy elevadas, 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 desde el agua (Eltholth *et al.*, 2009), que pudiera participar en una posible transmisión a la especie humana

En cuanto a los productos lácteos, ya se ha comentado en otro apartado de esta revisión (“persistencia en el medio”) la resistencia de *Map* en la leche y quesos, así como posibles métodos de inactivación durante el procesado de los productos. No obstante, 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). Por otro lado, Donaghy *et al.*, (2004) observaron que la concentración de *Map* se incrementaba 10 veces durante la producción del queso Cheddar 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). Así, todo el tratamiento de la carne destinada al consumo humano, desde el momento en que el ganado entra en el propio matadero hasta el procesado de dicha carne para la venta en las plantas especializadas, debe ser llevado con precaución para evitar los riesgos de contaminaciones con *Map* a partir de un foco primario de infección. En EEUU, se ha observado que el consumo de carne picada representaba una posible fuente de infección por *Map* para los consumidores (Manning y Collins, 2001). Un hallazgo de especial relevancia fue el descrito por el grupo de investigación de Alonso-Hearn *et al.* (2009), quienes aislaron bacilos viables en el músculo diafragma de 6 terneras mediante cultivo bacteriológico y PCR convencional y a tiempo real, en un estudio con 47 vacunos enviados a mataderos del País Vasco. De estos 6 animales, sólo 4 presentaban signos clínicos, sugiriendo que el posible riesgo de transmisión de *Map* existe tanto en animales sintomáticos como en los subclínicos. 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).

Por lo contrario, otros autores investigaron la presencia de *Map* en los músculos *longissimus colli* y *extensor carpi radialis*, a menudo incluidos en la carne picada, descartando la presencia del bacilo mediante cultivo en los animales estudiados (Antognoli *et al.*, 2008). Debido a estos resultados contradictorios, 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).

Los animales infectados de paratuberculosis excretan elevadas cantidades de *Map* en heces (Chiodini *et al.*, 1984a). Debido a ello, tanto las aguas procedentes de zonas donde pasta el ganado infectado, como las aguas residuales de las explotaciones ganaderas, pueden estar contaminadas con el bacilo antes de ser convertidas en agua potable para el consumo humano (Pickup *et al.*, 2005; Whan *et al.*, 2005). Sin embargo, muy pocos estudios han sido llevados a cabo en cuanto al efecto de los tratamientos de potabilización del agua corriente sobre la viabilidad de *Map*. Según algunos autores, los procesos normales de sedimentación, filtrado y desinfección del agua no serían lo suficientemente eficientes para eliminar el bacilo, lo que explicaría su detección posterior en agua del grifo (Whittington *et al.*, 2005; Hilborn *et al.*, 2006).



III. Material y Métodos

Material and Methods

III.1. ANIMALES ESTUDIADOS

III.1.1. SELECCIÓN DE ANIMALES

III.1.1.1. Ovejas adultas

Para llevar a cabo la infección experimental, en este estudio se seleccionaron 30 ovinos de raza Churra de entre 2 y 11 años de edad, procedentes de dos explotaciones ganaderas previamente controladas, una considerada “libre” de paratuberculosis (explotación L), de la que no se tenía constancia de casos de paratuberculosis, y otra en la que se habían registrado casos ocasionales de esta enfermedad en los últimos 10 años (explotación P). Nunca se habían vacunado los animales de dichos rebaños. La edad, identificación y procedencia de las ovejas seleccionadas para este estudio se detallan en la tabla III.1.

Explotación de Procedencia:	Edad (Años):	Identificación del animal:
L	2	5
	4	29
	5	13, 23
	6	17
	7	12, 14, 22
	8	6, 11, 21, 24, 25, 27
	9	3, 7, 15, 26, 28, 30
	10	16
	11	4
P	3	8, 18
	6	9
	7	2, 10
	8	1, 19, 20

Tabla III.1. Procedencia, edad e identificación de las ovejas adultas seleccionadas para la infección experimental. L: explotación de procedencia libre de paratuberculosis; P: explotación de procedencia con casos esporádicos de paratuberculosis.

Para determinar el estatus inmunológico de los animales seleccionados, se realizaron previamente, en sangre, las pruebas de ELISA para la detección de anticuerpos frente a *Map*, y de valoración de la producción de IFN- γ , tal y como se detallan en los apartados III.4.1.1.1.y III.4.1.1.2.1, respectivamente. De la explotación libre de paratuberculosis (L), se escogieron al azar 22 ovejas negativas a ambas pruebas. De la ganadería con historia previa de paratuberculosis (P) se eligieron aleatoriamente 8

animales, de los cuales uno resultó ser positivo a la prueba de IFN- γ y negativo a la prueba de ELISA (oveja 18), siendo los 7 restantes negativos a ambas pruebas.

III.1.1.2. Corderos

También se realizó otra infección experimental en corderos jóvenes. Para ello, se emplearon 24 corderos de raza Churra, de entre 1-1,5 meses de edad, todos procedentes de una explotación ovina de leche previamente controlada y considerada libre de paratuberculosis. Las madres de estos corderos fueron negativas tanto al ELISA como a la prueba del IFN- γ .

III.1.2. PERÍODO DE ACLIMATACIÓN.

Todos las ovejas, así como los corderos una vez destetados en la explotación de origen, fueron trasladados a las instalaciones de la Granja Experimental de la Universidad de León, previamente limpiadas y desinfectadas, con el fin de mantenerlos en condiciones controladas durante todo el experimento. Todos los animales fueron sometidos a un período previo de aclimatación de unos 15 días antes de empezar con la infección experimental. Se alojaron en boxes físicamente separados, de tal forma que no existió ningún contacto entre cada grupo. Cada lote de animales fue alimentado con la ración habitual de crecimiento o de mantenimiento para esta especie a lo largo de toda la experiencia.

A su vez, aprovechando el período de aclimatación, cada animal fue desparasitado antes de empezar la infección experimental con una solución de Ivermectina al 1,0% para ovinos (IVOMECC®, Merial, España), así como con una suspensión oral frente a coccidios de Diclazuril (VECOXAN®, Veterinaria Esteve, España). Finalmente, también se administró a cada animal una emulsión inyectable de Vitamina E y Selenio a la llegada de los animales a la Granja Experimental (SELEVIT COMPLEX®, Laboratorios SYVA, España).

III.2. PROTOCOLO DE INFECCIÓN

III.2.1. INÓCULO EMPLEADO

III.2.1.1. Obtención del inóculo

El inóculo *Map* empleado para ambas infecciones experimentales se obtuvo a partir de raspados de mucosa ileal procedente de tres ovejas que presentaban signos clínicos y lesiones macroscópicas de paratuberculosis y diagnosticadas histopatológicamente como formas difusas multibacilares de esta enfermedad.

Para ello, tras la necropsia se tomaron varios tramos de unos 20 cm de intestino delgado, desde el íleon distal hasta el yeyuno proximal, que se conservaron en congelación a -20°C hasta su posterior procesado, después de haber eliminado el contenido intestinal lavando cada tramo con PBS. La extracción y purificación de las micobacterias se realizó en un período máximo de 2 días antes de su inoculación (conservándose mientras tanto a 4°C en nevera), mediante la técnica modificada de Ratnamohan y Spencer (1986), cuyo protocolo viene descrito a continuación (Tabla III.2).

Técnica modificada de Ratnamohan y Spencer (1986) para extracción y purificación de micobacterias.

Reactivos:

Tampón PBS 10X (Solución madre):

NaCl (Merck®, Darmstadt, Alemania): 80 g
KCl (Panreac; Barcelona, España): 3 g
Na₂HPO₄ (Merck®, Darmstadt, Alemania): 11,5 g
KH₂PO₄ (Prolabo™, Briare, Francia): 2 g
Disolver en 1000 ml de agua destilada. Ajustar el pH a 7,4-7,6.

Solución de trabajo PBS 1X:

Solución madre diluida al 1/10.

Técnica:

1. Descongelar la muestra de tejido y atemperar a 37°C.
2. Lavar el tramo de intestino con agua destilada y PBS 1X para eliminar su contenido.
3. Raspar la mucosa intestinal sobre una placa de Petri empleando una hoja de bisturí estéril, hasta obtener aproximadamente 20 g de la misma.
4. Añadir 2 ml de una solución de ampicilina (Sigma-Aldrich®, Madrid, España) (150 mg/ml de agua destilada estéril) por cada 5 g de mucosa obtenido, y lavar minuciosamente la superficie mucosa con esta solución.
5. Homogeneizar el raspado de mucosa en un Stomacher (Seward Stomacher®, Worthing, Reino Unido) durante 60 s en velocidad rápida.
6. Macerar manualmente empleando un homogeneizador manual de vidrio de 25 ml hasta obtener una fina mezcla.
7. Recuperar el macerado en un recipiente al que se añade una solución de Tripsina al 1% (Sigma-Aldrich®, Madrid, España) en PBS 1X con el pH convenientemente ajustado entre 7,5-8, durante 30 min, a 23°C en baño María.
8. Centrifugar a 3500 rpm durante 20 min a temperatura ambiente, repartiendo la mezcla obtenida en 4 tubos cónicos de 50 ml (EUROTUBO®, Barcelona, España).
9. Desechar el sobrenadante, resuspender vigorosamente en PBS 1X y volver a centrifugar en las mismas condiciones otras dos veces.
10. Finalmente se resuspende el botón en 10 ml de PBS 1X.
11. Comprobar la presencia de micobacterias, realizando varios frotis a concentraciones distintas, para la observación de BAAR, a través de la tinción de ZN.
12. Realizar el recuento de micobacterias (apartado III.2.1.2).
13. Congelar las micobacterias a -20°C hasta el momento de realizar la inoculación.

Tabla III.2. Purificación y extracción de micobacterias a partir de mucosa intestinal. Técnica modificada de Ratnamohan y Spencer (1986).

III.2.1.2. Cuantificación del inóculo.

Para la cuantificación de las micobacterias, se realizó una extensión de 10 µl del inóculo obtenido, a una dilución de 1/1000, sobre un área de 1 cm² de un portaobjetos. Se dejó secar y se tiñó mediante la tinción de ZN para extensiones (Tabla III.3), para permitir posteriormente el recuento en un microscopio Leitz Laborlux 11, con objetivo de 100X, de los BAAR de morfología compatible con *Map* y valorar así la cantidad de bacterias del inóculo.

Tinción de ZN para extensiones.
<p><u>Reactivos:</u></p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Metanol (Merck®, Darmstadt, Alemania). 2. Carbofucsina (Sigma-Aldrich®, Madrid, España). 3. Solución de alcohol-ácido: <ol style="list-style-type: none"> a. Alcohol de 70°: 100 ml b. Ácido clorhídrico (Merck®, Darmstadt, Alemania): 1 ml 4. Solución madre de Azul de Metileno: <ol style="list-style-type: none"> a. Azul de metileno (Panreac, Barcelona, España): 1,4 g b. Alcohol de 95%: 100 ml 5. Solución de trabajo de Azul de Metileno: <ol style="list-style-type: none"> a. Solución madre de Azul de Metileno: 10 ml b. Agua corriente: 90 ml <p><u>Método:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - Fijar la extensión una vez seca añadiendo metanol sobre el portaobjetos. - Cubrir el portaobjetos con carbofucsina, y calentar la extensión a la llama hasta que se desprenda vapor, pero sin que llegue a hervir en ningún momento. - Mantener durante 5 min, y lavar abundantemente con agua corriente. - Decolorar con alcohol ácido durante 2 min. - Lavar con agua corriente. - Contrastar con Azul de Metileno durante 1 min y finalmente lavar en agua corriente. - Deshidratar mediante el paso de las secciones por alcoholes en graduación creciente y en xilol. Montar las preparaciones y dejar secar.

Tabla III.3. Método de ZN para tinción de micobacterias en las extensiones obtenidas.

Para ello, se contaron las micobacterias presentes en 50 campos microscópicos y se halló la media de micobacterias por campo. Finalmente, se calculó el número final de BAAR contenidos en 1 ml de inóculo mediante la siguiente fórmula:

$$\text{N}^\circ \text{ de micobacterias /ml} = \text{N}^\circ \text{ medio de micobacterias por campo} \times \text{F.M.} \times 100$$

siendo F.M. el factor microscópico, valor que se obtiene de resolver la ecuación:

$$\text{F.M.} = 10000 / \pi r^2$$

en la que r es el radio del área del campo microscópico. En este caso, para el microscopio y objetivo empleados, este factor resultó ser 360242.

Los inóculos para cada grupo experimental se prepararon en función del recuento obtenido al microscopio aplicando esta fórmula, de tal manera que se elaboraron dos preparados según la cantidad de bacterias presentes: uno, con aproximadamente 10^{10} micobacterias, y otro con 10^3 bacilos, utilizados para infectar cada grupo experimental, según se detalla en el apartado III.2.2.

Para confirmar la viabilidad y realizar la cuantificación real de las micobacterias presentes en cada inóculo, se tomó un alícuota de cada vial, que se sembró en medios de Löwenstein-Jensen y 7H11 en el Instituto Vasco de Investigación y Desarrollo Agrario (NEIKER) de Derio (Vizcaya), donde se llevó a cabo un recuento de las Unidades Formadoras de Colonias (UFC). Tras 4 meses de cultivo, en el inóculo con la dosis alta se obtuvo una cantidad del orden de 10^6 UFC, mientras que en el de dosis baja, la cantidad fue de aproximadamente 10^2 UFC. No obstante, en este estudio se seguirá refiriendo a los animales infectados con “dosis alta” y “dosis baja” de *Map* aquellos que recibieron una dosis total estimada inicialmente de 10^{10} y 10^3 *Map*.

III.2.1.3. Caracterización del inóculo.

III.2.1.3.1. Especificidad del inóculo.

Antes de proceder a la infección de los animales, se comprobó mediante PCR que las bacterias que formaban el inóculo poseían la secuencia de inserción IS900 específica de *Map*. Para ello, se procedió a la extracción de ADN a partir del propio

inóculo, siguiendo el método propuesto por Challans *et al.*, (1994) y a continuación se amplificó un fragmento de 217 pares de bases (pb) de la secuencia de inserción IS900 propia de *Map* empleando los cebadores C1 y C2 (Collins *et al.*, 1993b). Dichos fragmentos fueron detectados mediante electroforesis en gel de ágar. Así mismo, también se comprobó que el inóculo obtenido era negativo a la presencia de las secuencias IS901 e IS6110, específicas de *Mycobacterium avium* subespecies *avium* (*Maa*) y del complejo *Mycobacterium tuberculosis*, respectivamente.

III.2.1.3.2. Tipificación del inóculo.

Para caracterizar la cepa concreta de *Map* obtenida, se llevó a cabo su tipificación en el Instituto Vasco de Investigación y Desarrollo Agrario (NEIKER-Tecnalia) de Derio (Vizcaya), a partir de un alícuota del inóculo, siguiendo el método propuesto por Marsh *et al.*, (1998) basado en la identificación de polimorfismos de la secuencia IS1311 presente en *Map* y en las demás subespecies de *M. avium*, y que permite discriminar entre las cepas ovinas, bovinas y de bisonte de *Map*, así como del resto de miembros del complejo (Whittington *et al.*, 2001b; Sevilla *et al.*, 2005).

Brevemente, tras amplificar 608 pb de la secuencia IS1311, se procedió a la digestión del ADN así obtenido mediante los enzimas de restricción *Hinf*I y *Mse*I. El producto resultante se sometió a una fase de electroforesis en gel de ágar y posterior tinción en baño de bromuro, pudiéndose comprobar la presencia de las dos bandas de ADN de 285 y 323 pb, características de **una cepa ovina de *Map***.

III.2.2. GRUPOS Y TRATAMIENTOS EXPERIMENTALES.

Tanto las ovejas como los corderos fueron divididos en tres grupos, cuya composición se detalla seguidamente:

III.2.2.1. Ovejas adultas.

Se emplearon dos grupos de animales infectados con diferentes dosis de *Map*, junto con un grupo control, tal y como se indica a continuación:

Grupo 1 - Grupo control sin infectar.

Grupo 2 (“Dosis baja”) - Infectados con una dosis total aproximada de 10^3 UFC de *Map* por animal.

Grupo 3 (“Dosis alta”) - Infectados con una dosis total aproximada de 10^{10} UFC de *Map* por animal.

La distribución de cada grupo se realizó aleatoriamente dentro de cada explotación de procedencia de la siguiente manera:

Grupo 1 (Control sin infectar): Constituido por 7 ovejas: 5 procedentes de la explotación L y 2 de la P.

Grupo 2 (“Dosis baja”): Formado por un total de 10 animales: 7 procedentes del rebaño libre de paratuberculosis, y 3 de la explotación P.

Grupo 3 (“Dosis alta”): Constituido por un total de 13 animales: 10 procedían de la explotación libre de paratuberculosis, y 3 del rebaño con historia previa de paratuberculosis, incluyéndose en este grupo la oveja positiva a la prueba del IFN- γ .

La identificación de cada oveja dentro del grupo experimental viene detallada en la tabla III.4.

Explotación de procedencia:	Identificación de los animales:		
	Grupo 1 No infectadas	Grupo 2 Infectadas con “dosis baja” (10^3 <i>Map</i>)	Grupo 3 Infectadas con “dosis alta” (10^{10} <i>Map</i>)
L	3, 4, 5, 6 y 7	11, 12, 13, 14, 15, 16 y 17	21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 y 30
P	1 y 2	8, 9 y 10	18, 19 y 20
Total	7	10	13

Tabla III.4. Distribución e identificación de cada oveja dentro de su respectivo grupo experimental. L: explotación de procedencia libre de paratuberculosis; P: explotación de procedencia con historia previa de paratuberculosis.

III.2.2.2. Corderos.

Los 24 corderos se dividieron a su vez en 3 grupos experimentales, según la dosis infectante empleada, de forma semejante a lo ya señalado para las ovejas adultas. En cada grupo, se incluyeron 8 animales. La identificación de cada cordero viene detallada a continuación en la tabla III.5.

Identificación de animales		
Grupo 1: No infectados	Grupo 2: Infectados con “dosis baja” (10^3 Map)	Grupo 3: Infectados con “dosis alta” (10^{10} Map)
31, 32, 33, 34, 35, 36, 37 y 38	39, 40, 41, 42, 43, 44, 45 y 46	47, 48, 49, 50, 51, 52, 53 y 54

Tabla III.5. Distribución e identificación de cada cordero dentro de su respectivo grupo experimental.

III.2.3. PAUTAS DE INFECCIÓN.

Todos los corderos y ovejas de los grupos 2 y 3 fueron sometidos a tratamientos similares, en cuanto a la pauta de administración del inóculo infectante, siendo la única diferencia la dosis total administrada a cada animal. La cantidad total de *Map* se administró en 4 tomas por animal, repartidas a lo largo de 15 días, tal y como se refleja en la tabla III.6.

La cantidad de micobacterias a inocular cada día se diluyó en solución salina fisiológica estéril y la suspensión obtenida fue dispensada por **vía oral** mediante pistola dosificadora y a razón de 10 ml por animal. Durante la inoculación, la suspensión de *Map* era homogeneizada constantemente mediante un agitador. Con el fin de asegurar una distribución más homogénea del inóculo a los animales, se administraban primero 5 ml a cada animal, anotando el orden en el que se inoculaban, para finalmente dispensar los 5 ml restantes a cada animal en el orden inverso.

A cada animal del grupo 2 se le administró una dosis total de aproximadamente $4,9 \times 10^3$ BAAR, mientras que cada animal del grupo 3 recibió una dosis total de

aproximadamente $1,2 \times 10^{10}$ bacilos (Tabla III.6). A los animales del grupo control les fueron administrados 10 ml de solución salina fisiológica estéril en cada toma.

Grupo:	N° de ovejas inoculadas:	N° de corderos inoculados:	Días de inoculaciones:	Dosis total <i>Map</i> administrada / animal**:
2 “Dosis Baja”	10	8	0, 6, 9 y 14*	$4,88 \cdot 10^3$
3 “Dosis Alta”	13	8	0, 6, 9 y 14*	$1,16 \cdot 10^{10}$

Tabla III.6. Infección experimental: pautas y dosis de infección.

* Se considera el día 0 el primer día en el que se inocularon a los animales.

** Calculado en base al recuento microscópico.

III.3. PERÍODO DE ESTUDIO Y TOMA DE MUESTRAS “IN VIVO”

Parte de los animales (n= 21) fue sacrificada entre los 100-120 días posinfección (dpi), y el resto (n= 30) a los 210-220 dpi. Estas fechas se eligieron en base a estudios previos (Chávez, 1993; Juste *et al.*, 1994; Kurade *et al.*, 2004; Reyes, 2007; Verna *et al.*, 2007), al estimarse que para entonces los animales habrían desarrollado lesiones y una respuesta inmune detectables. El número y la distribución de los animales sacrificados se reflejan en la tabla III.7. Tal y como se indica, el número total de animales estudiados fue de 51, ya que dos ovejas y un cordero murieron de forma repentina, antes del momento de sacrificio correspondiente.

Grupos:	Número de ovinos (0 dpi):		Sacrificios	
	Ovejas	Corderos	100-120 dpi	210-220 dpi
1. Controles	7	8	2 ovejas 3 corderos	4 ovejas* 4 corderos*
2. “Dosis Baja” (10^3 <i>Map</i>)	10	8	4 ovejas 3 corderos	5 ovejas* 5 corderos
3. “Dosis Alta” (10^{10} <i>Map</i>)	13	8	6 ovejas 3 corderos	7 ovejas 5 corderos
Total	30	24	21	30

Tabla III.7. Diseño experimental: distribución y protocolo de sacrificio de los diferentes grupos experimentales.

* Uno de los animales de este grupo murió durante el experimento antes del sacrificio programado.

A lo largo de todo este período se llevó a cabo un seguimiento clínico de los animales. Además, se tomaron muestras de **suero, sangre completa y heces** de cada animal **cada 15 días** hasta el final del experimento, obteniéndose, en total, muestras en 14 momentos diferentes.

Las muestras de sangre se tomaron directamente mediante extracción de la vena yugular, empleando tubos de extracción al vacío (Venoject®) de 5 ml sin aditivos, para la obtención de suero, y de 10 ml con heparina para la sangre completa. Dichos tubos fueron transportados inmediatamente al laboratorio para su procesado, a temperatura ambiente.

Las muestras de heces se tomaron directamente del recto utilizando guantes plásticos desechables, y fueron conservadas a -20°C en frascos de 40 ml (Deltalab, S.L., Barcelona, España) hasta su posterior procesado.

III.4. ESTUDIOS REALIZADOS.

III.4.1. ESTUDIOS *IN VIVO*.

III.4.1.1. Estudio de la respuesta inmune periférica.

III.4.1.1.1. Determinación de la respuesta inmune humoral mediante ELISA

La presencia de anticuerpos séricos frente a *Map* se valoró mediante una técnica de ELISA indirecto, empleada habitualmente por nuestro grupo de investigación, siguiendo el protocolo descrito por Pérez *et al.*, (1997) en el ganado ovino, con algunas modificaciones. La composición de todos los reactivos empleados se refleja en la tabla III.8.

Composición de los reactivos empleados en la técnica de ELISA

- 1. Tampón carbonato:**
 - Carbonato sódico (Na_2CO_3): 5,3 g
 - Disolver en 1000 ml de agua destilada
 - Ajustar a pH 9.6 con HCl
- 2. Solución del antígeno:**
 - Antígeno PPA3: 0,04 mg
 - Disolver en 1 ml de tampón carbonato
- 3. Solución salina de lavado:**
 - Cloruro sódico: 8,5 g
 - Tween 80: 0,5 ml
 - Disolver en 1000 ml de agua destilada
- 4. Suspensión de *M.phlei*:**
 - *M.phlei*: 5 g
 - Disolver en 1000 ml de solución salina (NaCl al 0,85%)
- 5. Tampón citrato 0,05 M:**
 - A- Ácido cítrico monohidrato: 3,8 g
 - B- Citrato sódico tribásico: 3,52 g
 - Completar hasta 500 ml con agua destilada
 - Ajustar el pH a 4.
- 6. PBS-TG (1 litro para lavar 3 placas)**
 - Fosfato monosódico monohidratado: 1,8 g
 - Fosfato disódico anhidro: 12,36 g
 - Cloruro sódico: 8,5 g
 - Agua destilada: 993 ml
 - Ajustar el pH a 7,6 con NaOH
 - Tween 80: 0,5 ml
- 7. Substrato ABTS: 2,2'-azino-di-(ethyl-benzyl-thiazoline sulfonate):**
 - ABTS: 5,48 mg
 - Disolver en 50 ml de tampón citrato
 - Añadir 19 μl de solución madre 1/25 de agua oxigenada (5 μl de agua oxigenada comercial de 30 volúmenes en 120 μl de agua destilada).
- 8. Solución de frenado:**
 - Ácido fluorhídrico (45%) 0,1 M: 889,33 μl
 - Disolver en 20 ml de agua destilada

Tabla III.8. Preparación de los reactivos utilizados en la técnica de ELISA indirecto.

Los tubos de suero se mantuvieron a temperatura ambiente durante 24 h para permitir una correcta coagulación de la sangre, y posteriormente se centrifugaron a 3500 rpm durante 5 min. Los sueros así obtenidos se recogieron en tubos de 1,5 ml convenientemente identificados y se almacenaron a -20°C hasta su posterior procesado.

En el desarrollo de la técnica de ELISA indirecto, el primer paso consistió en adsorber el antígeno protoplasmático de *Map* PPA3 (Allied Monitor Lab. Inc., Fayette, Missouri, EEUU) en microplacas de polietileno de fondo plano. Para ello, se dispensaron 100 µl / pocillo del antígeno PPA3 a una concentración de 0,04 mg/ml en tampón carbonato, manteniéndose en incubación durante toda la noche a 4°C. Posteriormente las placas adsorbidas se lavaron 3 veces en solución salina de lavado y se congelaron a -20°C hasta su utilización, cuando se lavaban con PBS-TG.

Por otra parte, se diluían 50 µl de cada suero problema en 50 µl de una suspensión de *Mycobacterium phlei* (Allied Monitor Lab. Inc., Fayette, Missouri, EEUU), a una relación 1:1, en una placa inicial no adsorbida, dejándose en incubación toda la noche a 4°C, con el fin de evitar reacciones inespecíficas. Al día siguiente, se extraían 20 µl de la placa inicial, con ayuda de una pipeta multicanal, que se mezclaban con 180 µl de PBS-TG en una placa intermedia no adsorbida, de la que finalmente se volvían a tomar 20 µl de la dilución que eran dispensados en la placa final (adsorbida con PPA3) junto con 80 µl de PBS-TG, obteniéndose así una dilución final de cada suero problema de 1/100.

Todas las muestras se dispensaron por duplicado, y se incluyeron en cada placa tres sueros controles positivos previamente conocidos y evaluados, así como tres controles negativos, habiendo recibido todos los mismos tratamientos que los sueros problema, y siendo siempre los mismos en cada placa (Figura III.1).

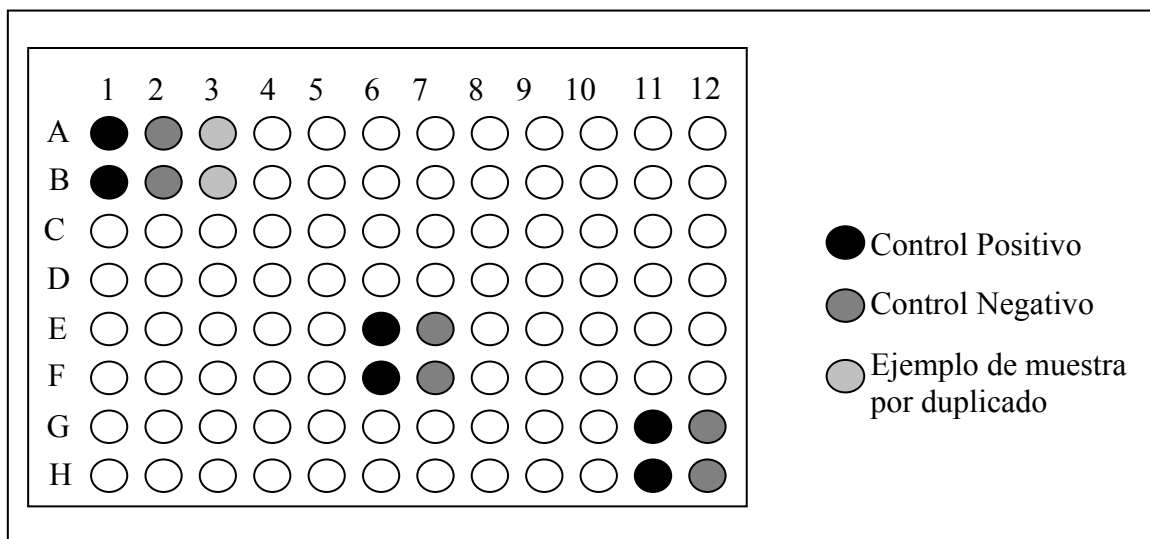


Figura III.1. Disposición de los sueros problema y controles en la placa de ELISA.

Tras una incubación de 2 h a temperatura ambiente en cámara húmeda, la placa se lavaba 3 veces con 300 µl de PBS-TG por pocillo y a continuación se añadía a cada pocillo 100 µl de proteína G marcada con peroxidasa de rábano (Bio-Rad Laboratories, S.A., Barcelona, España) a una dilución de 1/1500. Posteriormente se repitió la incubación en las mismas condiciones que en el paso anterior y, tras realizar 3 nuevos lavados con PBS-TG, se dispensaron 100 µl del substrato ABTS en cada pocillo. La placa se incubaba de 15 a 20 min en oscuridad y agitación. Pasado este tiempo, para detener la reacción, se añadían 100 µl de solución de frenado a cada pocillo, y se procedía a la lectura de las densidades ópticas en un espectrofotómetro (EL-340. Bio-Tek Instruments, Madrid, España) con un filtro de 405 nm.

Para interpretar los valores obtenidos en esta lectura, se calculó la media de las densidades ópticas (DO) de cada suero problema, así como la de los controles positivos. Finalmente estos valores eran transformados en un índice que se obtenía al dividir el valor medio de la DO de cada suero entre el valor medio de los controles positivos de cada placa:

$$\text{Índice ELISA del suero problema} = \frac{\text{DO media}_{405} \text{ Muestra}}{\text{DO media}_{405} \text{ Control Positivo}} \times 1000$$

El punto de corte se estableció en base a los resultados de estudios previos realizados por nuestro grupo investigador, de forma que se mantuviera la mayor sensibilidad posible, con la mejor especificidad (Pérez *et al.*, 1997). Se consideró que índices mayores de 900 daban un resultado positivo, aquellos situados entre 600 y 900 se consideraban dudosos, y los inferiores a 600, negativos. No obstante, se reflejó el valor absoluto del cociente en cada caso.

III.4.1.1.2. Determinación de la respuesta inmune celular

III.4.1.1.2.1. Prueba de liberación de Interferón gamma (IFN- γ)

Esta prueba se utilizó como indicador de la respuesta inmune celular específica y consiste en valorar la producción de IFN- γ por los linfocitos previamente sensibilizados (Pérez *et al.*, 1999)

Se utilizaron las muestras de sangre recogidas en tubos con heparina que, siempre dentro de las 4 horas siguientes a la extracción, fueron sometidas a un paso previo de estimulación *in vitro* de las células sanguíneas con un extracto proteico purificado (PPD) aviar (CZ Veterinaria, Porriño, Pontevedra). Para ello, y para cada muestra, se incubaron dos viales de 1,5 ml de sangre con 100 μ l de PBS en el primero, a modo de control, y el segundo con 30 μ g de PPD aviar previamente diluida hasta 100 μ l con PBS. A continuación, las muestras se homogeneizaron adecuadamente, y se incubaron en una estufa a 37°C durante un período de 20-22 h. Tras centrifugarlos durante 5 min a 3500 rpm, los plasmas así separados se recogieron en tubos de 1,5 ml convenientemente identificados y se congelaron a -20°C hasta su posterior utilización.

Se cuantificó el IFN- γ producido mediante una técnica ELISA de captura, empleando para ello el kit comercial “BOVIGAM[®] *Mycobacterium bovis* Gamma Interferon Test Kit for cattle” (Prionics AG, Suiza) que utiliza un anticuerpo monoclonal frente a esta citoquina de la especie bovina, y que ofrece reacción cruzada frente al IFN- γ ovino. La realización de esta técnica se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante. Todos los componentes del kit se conservaron siempre refrigerados a 4°C hasta su uso, y vienen descritos en la tabla III.9.

Componentes del kit comercial “BOVIGAM[®] <i>Mycobacterium bovis</i> Gamma Interferon Test Kit for cattle”
<ol style="list-style-type: none">1- Microplacas adsorbidas con el anticuerpo monoclonal específico de IFN-γ bovino.2- Control positivo liofilizado.3- Control negativo liofilizado.4- Diluyente verde: Tampón diluyente para plasmas.5- Solución de lavado concentrada 20X.6- Conjugado concentrado 100 X: anticuerpo monoclonal anti IFN-γ bovino, marcado con peroxidasa7- Diluyente azul: diluyente del conjugado concentrado 5X.8- Substrato enzimático en solución tamponada.9- Solución del cromógeno concentrada 100X.10- Solución de frenado de la reacción enzimática.

Tabla III.9. Componentes del kit “BOVIGAM[®] *Mycobacterium bovis* Gamma Interferon Test Kit for cattle” (Prionics AG, Suiza).

Tras descongelar las muestras a valorar y atemperar todos los componentes, a excepción del conjugado y del cromógeno, se dispensaron 50 μ l de diluyente verde a todos los pocillos de la placa adsorbida mediante pipeta multicanal. Inmediatamente después se añadieron dos fracciones de plasma de 50 μ l en dos pocillos contiguos, procesándose así cada muestra por duplicado, y de la misma manera se incluyeron 50 μ l de los controles positivos y negativos suministrados en el kit y previamente homogeneizados, de tal modo que cada placa incluía dos controles positivos y dos negativos, ambos por duplicado (Figura III.2). Tras homogeneizar bien las muestras dispensadas mediante pipeteo al menos 5 veces, se cubrió la placa con su tapa y se incubó durante una hora a temperatura ambiente en cámara húmeda. A continuación se vació la placa al volcarla y se lavó 6 veces con la solución de lavado diluida en agua según las instrucciones del fabricante.

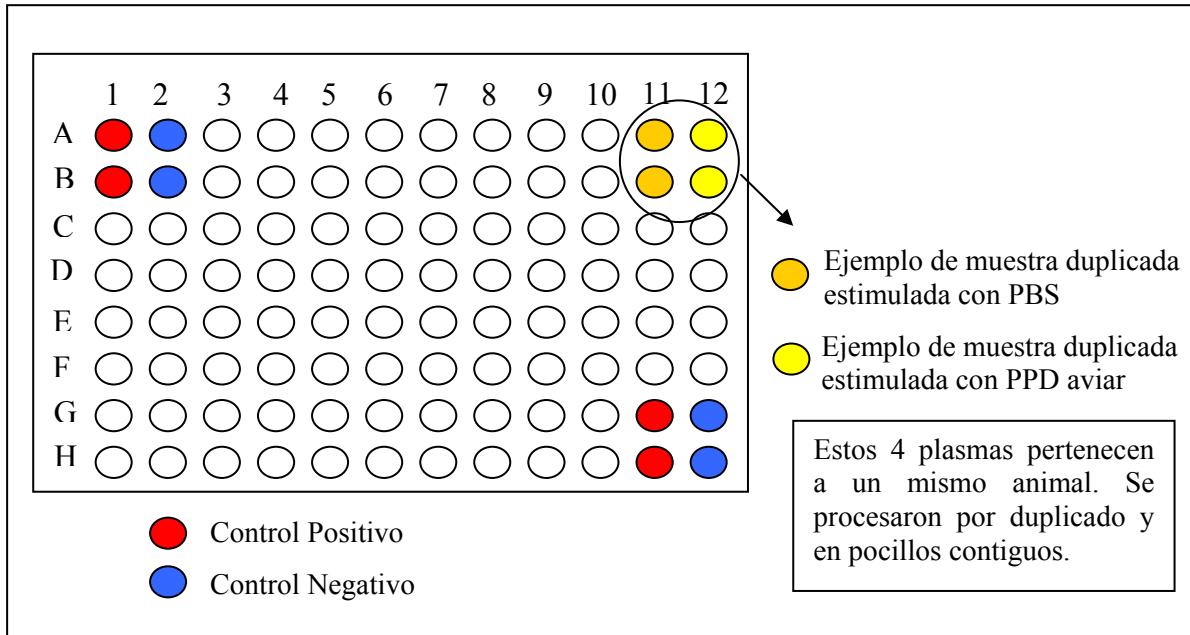


Figura III.2. Disposición de los plasmas problema y controles en una microplaca de BOVIGAM®.

Inmediatamente después, se añadieron 100 µl del conjugado a la dilución de uso 1X en cada pocillo, incubándose nuevamente 1 h en las mismas condiciones que el paso anterior, tras lo que se realizaron 6 nuevos lavados. Se dispensaron entonces 100 µl de la solución de cromógeno y sustrato a la concentración indicada y se incubaron las placas durante 30 min en oscuridad a temperatura ambiente, empezando a contar el tiempo en el momento de añadir la solución sustrato al primer pocillo. Finalmente se detuvo la reacción enzimática al dispensar 50 µl de la solución de frenado a cada pocillo, en el mismo orden en el que se añadió la solución sustrato previamente. La lectura de la absorbancia se realizó en los 20 min siguientes en un espectrofotómetro (EL-340. Bio-Tek Instruments, Madrid, España) con filtro de 450 nm.

Previamente a la interpretación de los resultados, se analizaron los controles con el fin de validar el ensayo. Para poder considerar la placa como válida, la media de las DO de los controles positivos debía ser superior a 0,700 y la de los negativos inferior a 0,130, tal y como se indica en las instrucciones del fabricante. El valor de absorbancia de cada plasma se obtuvo como la media aritmética del valor de los dos pocillos, repitiéndose la prueba cada vez que los valores diferían en más de un 20%. Además de utilizar el valor bruto de absorbancia de cada muestra, se obtuvo un índice que indicaba el nivel de IFN-γ producido, determinado al dividir el valor de la absorbancia de cada

plasma estimulado con la PPD aviar entre la DO del mismo plasma incubado con PBS de la siguiente manera:

Índice de IFN- γ del plasma problema =

$$\frac{\text{DO media}_{450} \text{ Plasma problema PPD aviar}}{\text{DO media}_{450} \text{ Plasma problema PBS}}$$

Estudios previos determinaron que una muestra era considerada positiva cuando este índice era superior o igual a 1,5, y negativa si era inferior (Gutiérrez *et al.*, 1998; Pérez *et al.*, 1999), si bien posteriormente este punto de corte fue ajustado a 2 por nuestro grupo de investigación con el fin de incrementar la especificidad. Valores entre 1,7 y 2 serían considerados como dudosos, y valores superiores a 2, positivos.

III.4.1.1.2.2. Prueba de intradermorreacción (IDR) comparada

Esta prueba se realizó en dos ocasiones, alrededor de los quince días previos al período de sacrificios. La primera fue llevada a cabo a los 90 dpi en 29 ovejas adultas, (una de ellas había muerto antes de esa fecha), así como en los 24 corderos. La segunda y última IDR se realizó a los 195 dpi en las 16 ovejas adultas, así como en los 14 corderos restantes tras el primer sacrificio, al haberse muerto otra oveja y un cordero entre ambos períodos.

La IDR se realizó de forma comparada, empleando para ello tanto PPD bovina como aviar (ambos de CZ Veterinaria, Porriño, Pontevedra). Previamente a la inoculación, se medía el grosor de los pliegues anocaudales de cada lado mediante un cutímetro en la zona donde se iban a inocular las PPDs. A continuación se procedía a la inyección intradérmica de 0,1 ml de ambos productos, asegurándose siempre de inocular el PPD bovino en el pliegue anocaudal del lado izquierdo (Figura IX.1 de la Iconografía), y el aviar del lado derecho.

A las 72 horas tras la inoculación se procedía a la lectura de la prueba, para lo que se medía el grosor de ambos pliegues cutáneos en el mismo sitio donde se habían

inoculado las PSD, y se anotaba la variación en el grosor del pliegue cutáneo. Tomando como referencia estudios previos (Pérez *et al.*, 1999), se consideraron positivos aquellos animales cuyo incremento del grosor de la piel era igual o mayor de 2 mm, y negativos los que presentaron un incremento inferior.

III.4.1.2. Detección de *Map* mediante cultivo bacteriológico de heces

Esta parte del estudio se llevó a cabo en las instalaciones del Instituto Vasco de Investigación y Desarrollo Agrario (NEIKER-Tecnalia) de Derio (Vizcaya), con la intención de valorar la excreción fecal de *Map* mediante su aislamiento e identificación en medios de cultivo. Se sembraron muestras de heces de los días 15 y 90 posinfección, así como del momento de sacrificio, de todos los animales del experimento, organizándolas en varios lotes formados cada uno por 2 o 3 animales del mismo grupo experimental. En el caso de obtenerse un crecimiento positivo en alguno de los tubos, se volvían a sembrar las muestras por separado para comprobar cuál de ellas era la positiva. Cada muestra fecal se recogió usando un guante de exploración rectal y se congeló en viales individuales a -20°C hasta su posterior procesado.

III.4.1.2.1. Preparación del medio de cultivo.

Cada muestra de heces se sembró por duplicado en 2 tubos de medio: el Löwenstein-Jensen (LJ), a base de huevo con micobactina J (MJ), así como en el medio sintético (sin base de huevo), el medio Agar Middlebrook 7H11 enriquecido con OADC. La composición de ambos medios de cultivo viene detallada en la tabla III.10.

Reactivos empleados para la elaboración de los medios de cultivo LJ y 7H11		
	Löwenstein-Jensen	Middlebrook 7H11
Löwenstein Medium Base (Difco™, MD., EEUU)	28 g	/
Micobacteria 7H11 Agar (Difco™, MD, EEUU)	/	15 g
Glicerina (Panreac, España)	10 g	5 g
Micobactina J (Allied Monitor; Missouri, EEUU)	2 mg	2 mg
Agua purificada clase 2	370 ml	900 ml
Huevos	624 ml	/
Penicilina sódica (Penilevel 1.000.000 U.I. Bencil penicilina sódica. Laboratorios ERN S.A., España)	100.000 U.I.	100.000 U.I.
Cloranfenicol (Sigma-Aldrich®, Madrid, España)	100 mg	100 mg
Anfotericina B (Sigma-Aldrich®, Madrid, España)	50 mg	50 mg
OADC Enrichment Middlebrook Micobacterias (BD, MD, EEUU)	/	100 ml

Tabla III.10. Reactivos empleados en la elaboración de los medios de cultivo para el aislamiento de micobacterias.

Medio de Löwenstein-Jensen (LJ)

Para la elaboración del medio de LJ, se mezcló bien el medio base Löwenstein junto con la glicerina y el agua purificada de clase 2. Se calentó la mezcla obtenida hasta su disolución completa, y se añadió la micobactina previamente disuelta en etanol. Tras ajustar el pH a 7,1 y autoclavar la mezcla durante 15 min a 120°C, ésta se dejó atemperar hasta los 50°C aproximadamente. En este momento se añadieron los antibióticos, antifúngicos así como los huevos enteros previamente esterilizados mediante inmersión en etanol durante 2 h. A continuación se dispensaron 8 ml del medio de cultivo en varios tubos de cristal estériles ligeramente inclinados en posición horizontal, tratando de evitar, en la medida de lo posible, la formación de burbujas. Se dejó coagular el medio así dispensado en estufa a 90°C durante 4 h, y finalmente los tubos se colocaron en una estufa a 37°C sin llegar a cerrar los tapones del todo para dejar que se evaporara el líquido de superficie. Una vez los medios se secaron totalmente en su superficie, se procedió al cierre total de cada tubo y se mantuvieron a 4°C hasta su posterior uso.

Medio Agar Middlebrook 7H11

Para la elaboración de este medio sintético, se procedió a la mezcla de la glicerina junto con el medio base M7H11 y con agua purificada clase 2, tras lo cual se añadió la micobactina previamente disuelta en etanol, y se autoclavó la mezcla resultante durante 15 min. Tras enfriar la suspensión, se añadieron los antimicrobianos así como el enriquecimiento (OADC), y a continuación se dispensaron los medios así obtenidos en cada tubo de cristal previamente esterilizado a razón de 8 ml por tubo, permaneciendo éstos en posición horizontal, ligeramente inclinados hacia arriba. Se dejó enfriar el medio en esta posición hasta su solidificación, y finalmente los tubos se mantuvieron en estufa de 37°C sin apretar los tapones del todo hasta la desaparición total del líquido de superficie. Una vez secos, se cerraron totalmente y se conservaron a 4°C hasta su posterior procesado.

III.4.1.2.2. Protocolo de cultivo.

Para esta técnica, se siguió el método de cultivo propuesto por Juste *et al.* (Juste *et al.*, 1991b), con algunas modificaciones.

Tras descongelar las muestras de heces, se pesaron 2 g con la ayuda de un depresor lingual de madera de un solo uso, a los que se añadieron 38 ml de cloruro de hexadecil piridinio (HPC) al 0,75% (RonacareTM CPC. Merck®, Darmstadt, Alemania) mediante un dispensador de líquidos, con el fin de descontaminar las muestras. Se homogeneizaron en un Stomacher 80 (Seward Stomacher®, Worthing, Reino Unido) durante 30 s a velocidad máxima, tras lo cual se dejó sedimentar el material grosero dentro de la bolsa de Stomacher® (Seward Stomacher®, Worthing, Reino Unido) en posición vertical durante 15-20 min. Al cabo de este tiempo, se recogieron 15 ml de la interfase mediante una pipeta estéril que se vertieron a tubos de centrifuga estériles de 15 ml, y se dejaron incubar así en posición vertical durante 18-24 h para dejar que actúe el HPC.

Una vez pasado este tiempo, se procedió a la inoculación de 0,2 ml de las muestras descontaminadas (4 gotas) en cada uno de los 2 tubos de medio LJ, con la ayuda de una pipeta Pasteur estéril desechable, y tratando de que la muestra quedara

homogéneamente repartida por todo el tubo de cultivo. Para ello, la siembra se realizó en dos pasos, primeramente se inoculaba una gota en cada uno de los tubos, y las tres gotas restantes se sembraban a continuación en orden inverso para homogeneizar lo más posible la concentración de micobacterias en cada tubo. Este paso se llevó a cabo en una campana de bioseguridad Clase II.

Para inocular en el medio sintético 7H11, la siembra se acompañaba de una centrifugación previa de los tubos de 15 ml a 5000 rpm durante 15 min, tras lo cual se decantó el sobrenadante con cuidado de no perder el sedimento obtenido que se resuspendió en 10 ml de PBS estéril con el fin de lavar los restos de HPC. Se homogeneizó con vórtex, se volvió a centrifugar y decantar, para finalmente resuspender el pellet en 1 ml de PBS. La siembra se realizó de la misma manera que en el caso del medio LJ. Finalmente se cerraron los tubos sin apretar, flameando previamente el tapón y la boca del tubo para evitar, en la medida de lo posible, contaminaciones.

En este momento, se colocaron los tubos sembrados en una gradilla en posición horizontal y ligeramente inclinados, y se mantuvieron en estufa a 37°C sin humedad durante una semana hasta que se había evaporado totalmente el líquido del inóculo, tras lo cual las muestras se trasladaron finalmente en gradillas verticales a otra cámara a 37°C con humedad controlada. Se comprobó el buen estado de los tubos y finalmente se cerraron completamente.

El período de incubación se prolongó hasta los 10 meses posinoculación, con revisiones periódicas, cada dos meses, mediante la visualización de los tubos con una lupa estereoscópica Leica MZ 75 (Leica. Wetzlar, Alemania) para la detección del crecimiento de colonias de *Map* sobre la superficie del cultivo.

La muestra se consideró positiva cuando se observaba la presencia de al menos una colonia de morfología característica de *Map* en alguno de los 2 tubos de LJ o de 7H11 (Figura IX.2 de la Iconografía). No obstante, antes de dar el resultado como positivo, se comprobó siempre la compatibilidad de la colonia detectada con *Map* mediante la técnica de ZN en frío (Tabla III.11), examinando al microscopio durante al

menos 5 min la extensión, confirmando así la presencia de BAAR de morfología compatible con *Map*.

Tinción de ZN en frío para extensiones de superficie de cultivo de <i>Map</i>
<p><u>Reactivos empleados:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - Coloración: Fucsina fenicada Kinyoun (Química Clínica Aplicada S.A.; Tarragona, España). - Decoloración: Alcohol-Ácido. <ul style="list-style-type: none"> • 485 ml de etanol absoluto (Panreac, Barcelona, España) • 15 ml de ácido clorhídrico al 37% (Panreac, Barcelona, España) - Contraste: Verde Malaquita. <ul style="list-style-type: none"> • 0,8 g de verde malaquita (Merck®, Darmstadt, Alemania) • 100 ml de agua purificada clase 2. <p><u>Protocolo:</u></p> <ol style="list-style-type: none"> 1- Pinchar sobre la colonia sospechosa mediante asa de platino previamente flameada. 2- Extender sobre una gota de agua destilada estéril en un portaobjetos y fijar a la llama 3- Cubrir el portaobjetos con la fucsina e incubar así durante 10 min. 4- Lavar con agua corriente. 5- Decolorar con alcohol ácido durante 15 s. 6- Lavar nuevamente con agua destilada. 7- Contratar con verde malaquita durante 3 min y dejar secar.

Tabla III.11. Reactivos y protocolo de la tinción de ZN en frío para las extensiones de cultivos de *Map*.

III.4.2. ESTUDIOS POST-MORTEM

III.4.2.1. Estudios anatomopatológicos

III.4.2.1.1. Examen macroscópico y toma de muestras

Tal y como se indica en la tabla III.7, doce ovejas y nueve corderos fueron sacrificados en un primer período entre los días 100-120 dpi, y las 16 ovejas y 14 corderos restantes entre los días 210-220 posinfección. Sin embargo, antes de la finalización del experimento murieron por diferentes causas las ovejas 4 (grupo control) y 9 (grupo de “dosis baja”) a los 19 y 99 dpi, respectivamente, así como el cordero 33

(grupo control) a los 185 dpi, por lo que fueron excluidos de los estudios post-mortem, al no poder tomarse las muestras de forma adecuada.

Los animales fueron sacrificados en condiciones humanitarias tras la inyección intravenosa de una sobredosis de barbitúrico (T61®, Intervet, S.A., Salamanca, España), y posterior desangrado. Inmediatamente se efectuó la necropsia ordenada, sistemática y completa.

La toma de muestras se llevó a cabo siguiendo el protocolo fijado en estudios previos en la especie ovina (Pérez *et al.*, 1996) y que ya había sido empleado anteriormente en las especies bovina y caprina (Corpa *et al.*, 2000a; González *et al.*, 2005). Las diferentes muestras tomadas para el estudio histopatológico se detallan en la tabla III.12 y en la Figura IX.3. Para evitar fenómenos de autólisis y putrefacción, todas las muestras fueron tomadas con la mayor rapidez posible, en un plazo máximo de 1 h a partir del sacrificio.

Muestras del aparato digestivo tomadas para estudios histopatológicos e inmunohistoquímicos:
<ul style="list-style-type: none">- Válvula ileocecal (VIC) con tejido linfoide local: 1 muestra- Ileon distal (ILd): 3-4 muestras de 5 cm- Ileon medio (ILm): 3-4 muestras de 5 cm- Ileon proximal (ILp): 3-4 muestras de 5 cm- Yeyuno distal sin placa de Peyer (YYd): 3-4 muestras de 5 cm- Yeyuno medio sin placa de Peyer (YYm): 3-4 muestras de 5 cm- Yeyuno proximal sin placa de Peyer (YYp): 3-4 muestras de 5 cm- Pacas de Peyer yeyunales distales (PPYd): 8-9 muestras de 3 cm- Placas de Peyer yeyunales mediales (PPYm): 8-9 muestras de 3 cm- Placas de Peyer yeyunales proximales (PPYp): 8-9 muestras de 3 cm- Duodeno: 2 muestras de 5 cm- Ciego: 1-2 muestras de 5 cm- Colon: 1 muestra de 5 cm- Recto: 1 muestra de 5 cm- Nódulos linfáticos ileocecales (NLIC): 1 muestra de cada- Nódulo linfático mesentérico caudal (NLMC): 1 muestra- Nódulos linfáticos yeyunales de la zona media (NLY): 4-5 muestras

Tabla III.12. Identificación de las muestras del intestino y tejido linfoide asociado tomadas en la necropsia de cada animal para el estudio microscópico (histopatológico e inmunohistoquímico).

En el examen macroscópico, para una correcta valoración de las lesiones asociadas a la infección por *Map*, se observó con detenimiento el tubo digestivo y tejido linfoide asociado. Además, en todos los animales, se llevó a cabo un estudio detallado del tejido linfoide intestinal, midiendo la extensión de la placa de Peyer ileal continua, y el número y distribución de las placas aisladas yeyunales, prestando especial atención a la existencia de diferencias entre ovejas y corderos.

La inspección macroscópica y toma de muestras también incluyeron al resto de órganos y tejidos como el hígado, riñones, glándulas adrenales, bazo, abomaso y preestómagos, músculo esquelético y cardíaco, pulmones, tonsilas, nódulos linfáticos retrofaríngeos, mediastínicos y bronquiales, mama, encéfalo, así como piel de las zonas de tuberculización, anotando siempre cualquier alteración detectada.

III.4.2.1.2. Procesado y tinciones histológicas

Todas las muestras fueron fijadas en formol tamponado al 10% durante 24-28 h. De cada una de ellas, se tallaron de tres a cuatro piezas que se colocaron en recipientes plásticos (TESPA, Giessen, Alemania) para su inclusión en un procesador de tejidos circular automático (Myr® modelo STP-120), donde fueron deshidratadas en alcoholes de gradación creciente y xilol y finalmente incluidas en parafina de 56°C de punto de fusión (Vogel Histo-Comp®, Giessen, Alemania).

A continuación, se montaron los bloques en parafina en una unidad formadora de bloques (Myr AP280) y finalmente se cortaron secciones seriadas de 4 µm de espesor mediante un microtomo (Finesse®, Termo Shandon) que se recogieron en portaobjetos impregnados de albúmina de huevo.

Tras un secado previo de 24 h en una estufa de 37°C, todos los cortes así obtenidos fueron teñidos con las técnicas de HE y la de ZN específica para la detección de BAAR. El protocolo de realización de ambas técnicas viene detallado en las tablas III.13. y III.14.

Tinción de HE

Reactivos empleados:

- **Hematoxilina de Harris:**

- Hematoxilina (Merck®, Darmstadt, Alemania): 1 g
- Alcohol 100°: 10 ml
- Alumbre amónico (Merck®, Darmstadt, Alemania): 20 g
- Agua destilada: 200 ml
- Óxido de mercurio (Merck®, Darmstadt, Alemania): 0,5 g
- Disolver la hematoxilina en el alcohol y el alumbre en agua caliente, mezclar y hervir con cuidado.
- Añadir el óxido de mercurio y retirar del fuego enfriando rápidamente.

- **Eosina:**

- Eosina (Merck®, Darmstadt, Alemania): 1 g
- Disolver en 100 ml de agua destilada y añadirle 2-3 gotas de ácido acético glacial 100% (Merck®, Darmstadt, Alemania).

Protocolo:

- 1- Desparafinar e hidratar.
- 2- Lavar en agua corriente durante 10 min.
- 3- Teñir 3-5 min en Hematoxilina de Harris
- 4- Lavar en agua corriente durante 10 min.
- 5- Teñir 30 s-1 min en eosina.
- 6- Lavar durante 1 min en agua corriente.
- 7- Deshidratar pasando los portaobjetos por alcoholes de grado creciente y xilol.
- 8- Montar.

Tabla III.13. Protocolo de realización de la tinción de Hematoxilina-Eosina (HE).

Tinción de ZN

Reactivos empleados:

- **Coloración:** Carbolfucsina (Sigma-Aldrich®, Madrid, España)
- **Decoloración:** Alcohol-Ácido.
 - Alcohol de 70°: 100 ml
 - Ácido clorhídrico (Merck®, Darmstadt, Alemania): 1 ml
- **Contraste:** Azul de Metileno
 - Solución madre de Azul de Metileno:
 - Azul de metileno (Panreac, Barcelona, España): 1,4 g
 - Alcohol de 95%: 100 ml
 - Solución de trabajo de Azul de Metileno:
 - Solución madre de Azul de Metileno: 10 ml
 - Agua corriente: 90 ml

Protocolo:

- 1- Desparafinar e hidratar. Mientras tanto, ir precalentando la carbolfucsina en estufa de 37°C.
- 2- Lavar durante 10 min en agua corriente.
- 3- Incubar en solución de carbolfucsina precalentada 1 h en estufa de 37°C.
- 4- Lavar durante 10 min en agua corriente.
- 5- Decolorar en alcohol-ácido hasta que la preparación tome un tono rosa pálido.
- 6- Lavar durante 8 min en agua corriente.
- 7- Contrastar en azul de metileno durante 15 s.
- 8- Lavar durante 10 min en agua corriente.
- 9- Deshidratar pasando los portaobjetos por alcoholes de grado creciente y xilol.
- 8- Montar.

Tabla III.14. Protocolo de realización de la tinción de ZN para secciones de tejido incluidos en parafina.

III.4.2.1.3. Estudios histopatológicos

III.4.2.1.3.1. Clasificación de los tipos de lesiones

La primera parte del estudio histológico consistió en el examen de todas las secciones de tejido del tubo digestivo teñidas mediante HE y la posterior clasificación de las lesiones observadas, siguiendo el modelo propuesto por Pérez *et al.*, (1996) en la especie ovina, que se basa en la presencia de granulomas y su localización dentro del intestino y del tejido linfóide asociado, la extensión de las lesiones, los tipos celulares presentes y la cantidad de BAAR, detectados mediante la técnica de ZN, tal y como se detalla en el apartado III.4.2.1.3.3.

III.4.2.1.3.2. Recuento de granulomas.

Con el objetivo de valorar la gravedad de las lesiones y poder llevar a cabo una comparación entre los distintos animales experimentales, se realizó un recuento del número de granulomas presentes en las muestras de tejido. Se contaron siempre tres secciones de tejido tomadas al azar de cada una de las localizaciones estudiadas del intestino y dos secciones de los nódulos linfáticos asociados (Tabla III.12), y se calculó la media de granulomas contados por sección de tejido. El recuento fue llevado a cabo siempre por un mismo observador y en el mismo microscopio (Leitz Diaplan®).

En las secciones de intestino, se valoraron las características morfológicas de los granulomas y su localización, bien en el tejido linfoide de las placas de Peyer, o en la LP asociada o no a dicho tejido.

III.4.2.1.3.3. Valoración de la presencia de *Map* mediante Ziehl-Neelsen (ZN).

Todas las secciones de intestino y nódulos linfáticos se tiñeron con la técnica de ZN para la detección de BAAR en cortes histológicos.

La inspección de los cortes se realizó en toda la superficie de las secciones de tejido, anotando si las micobacterias detectadas se encontraban en macrófagos de granulomas asociados a tejido linfoide intestinal o en aquellos presentes en la LP. En función de la cantidad de BAAR encontrada en las lesiones, éstas se clasificaron subjetivamente, por el mismo observador, en las cinco siguientes categorías:

- | |
|--|
| <p>0 = ausencia de BAAR
+- = presencia dudosa de BAAR
+ = uno o muy pocos BAAR
++ = cantidad moderada de BAAR
+++ = abundante cantidad de BAAR, llegando a rellenar por completo el citoplasma de algunos macrófagos.</p> |
|--|

III.4.2.1.4. Estudios inmunohistoquímicos

Para completar el estudio de detección de *Map* en cortes histológicos, se llevó a cabo una tinción inmunohistoquímica en aquellas secciones de tejido intestinal y de nódulos linfáticos en las que se habían encontrado lesiones granulomatosas y se había llevado a cabo su recuento, así como en una selección de secciones de tejido escogidas al azar de animales infectados en los que no se habían apreciado lesiones granulomatosas. Se empleó un anticuerpo primario policlonal frente a antígenos de *Map* proporcionado por el Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario (SERIDA) de Gijón (Asturias), previamente utilizado en la especie bovina (Balseiro *et al.*, 2003; Balseiro, 2004) y en gamos (Balseiro *et al.*, 2008). Dicho anticuerpo consistía en un suero hiperinmune de conejo anti-*Map*. Brevemente, tras suspender en PBS con un asa de platino la cepa A-82 de *Map*, obtenida a partir de un NLIC de una vaca enferma de paratuberculosis, dicha cepa se sometió a un proceso de autoclavado y sonicación, tras lo cual se centrifugó 30 min a 10000 rpm y se recogió el sobrenadante. Éste se inoculó semanalmente en 4 dosis intramusculares de 1ml, y una última intravenosa de 1 ml, a dos conejos de raza New Zealand, de los cuales finalmente se obtuvo el suero nueve días tras la última inoculación (Balseiro, 2004).

Se empleó el sistema de detección comercial Dako EnVision™ + HRP (Dako North America, Inc., California, EEUU) que consiste en la utilización de un polímero marcado con varias moléculas de peroxidasa de rábano (Horseradish Peroxidase: HRP), ya conjugado con el anticuerpo secundario, específico frente al anticuerpo primario, en nuestro caso un anticuerpo de cabra frente a IgG de conejo.

El primer paso fue probar y titular el anticuerpo primario en diferentes muestras de intestino y nódulos linfáticos pertenecientes a la especie ovina, y conocidas previamente por presentar *Map* en las secciones (controles positivos). Se emplearon diferentes diluciones, eligiéndose finalmente la de 1/9000, por ser la que ofreció una mejor señal de inmunopositividad con el menor fondo.

Esta tinción se aplicó sobre secciones de 4 µm de espesor recogidas en portaobjetos tratados con poli-L-lisina (Sigma-Aldrich®, Madrid, España) y secadas durante 24 h en estufa de 37°C. Cada vez que se realizó esta técnica, se incluyeron

muestras positivas previamente usadas como control, así como controles negativos en los que se omitieron uno de los reactivos de cada diferente paso (suero, anticuerpo primario y EnVision™ + HRP, respectivamente).

Tras desparafinar e hidratar los cortes mediante su paso por dos baños de xilol de 15 min cada uno y 5 min en alcoholes de gradientes decrecientes, se lavaron en agua corriente durante 5 min y fueron sometidos al paso de inactivación de la peroxidasa endógena con agua oxigenada al 0,3% en metanol durante 30 min en oscuridad. Después de dos lavados en TBS durante 5-10 min, se bloquearon las reacciones inespecíficas incubando las preparaciones durante 20 min en cámara húmeda con una solución de suero normal de cabra, diluido al 1/20 en TBS-BSA. Pasado este tiempo, se eliminó el exceso de suero de las preparaciones sin llegar a lavarlas, se añadieron 100 µl del anticuerpo primario a la dilución de 1/9000 en TBS-BSA, y se incubaron en cámara húmeda durante toda la noche a 4°C.

Al día siguiente, tras lavar las preparaciones dos veces en TBS durante 5-10 min, éstas se incubaron con 100 µl de EnVision™ + HRP (frente a inmunoglobulinas de conejo) durante 30 min en cámara húmeda y temperatura ambiente. Finalmente, tras un nuevo lavado en las mismas condiciones señaladas, se revelaron las muestras mediante su tratamiento con 100 µl de la solución comercial de diaminobenzidina (DAB, Peroxidase substrate kit DAB SK-4100®, Vector laboratories Inc., California, EEUU), incubándolas durante 5-10 min en cámara húmeda a temperatura ambiente, hasta que la preparación adquirió un tono marrón pálido.

Tras frenar la reacción mediante la inmersión de las muestras en agua corriente durante 10 min, éstas se contrastaron con hematoxilina durante 10-15 s, se volvieron a lavar durante 10 min en agua, y finalmente se deshidrataron y montaron en medio DPX (BDH®, Reino-Unido). Todos los reactivos empleados vienen detallados en la tabla III.15.

Reactivos empleados para la técnica de IHQ frente a antígenos de <i>Map</i>:
<ul style="list-style-type: none"> • Tris 1M (1 litro): <ul style="list-style-type: none"> - Tris: 125 g - Disolver en 800 ml de agua destilada - Añadir 65 ml de HCl para ajustar a un pH de 7,6 • Tampón TBS 10X (Solución madre) <ul style="list-style-type: none"> - Tris 1M: 250 ml - Cloruro sódico: 80 g - Disolver en 750 ml de agua destilada, ajustar el pH a 7,4– 7,6 con HCl concentrado. • Tampón TBS 1X (Solución de trabajo): <ul style="list-style-type: none"> - Solución madre diluida al 1/10 • TBS-BSA: <ul style="list-style-type: none"> - TBS 1X: 100 ml - Albúmina sérica bovina (BSA) (Sigma-Aldrich®, Madrid, España) : 0,1 g - Ázida sódica (Panreac, Barcelona, España) al 1%: 2 ml • Agua oxigenada (Panreac, Barcelona, España) • Metanol (Merck®, Darmstadt, Alemania) • Suero de cabra: diluido al 1/20 en TBS-BSA. • Anticuerpo primario anti-<i>Map</i>: hecho en conejo, diluido al 1/9000. • EnVision™ + System-HRP labelled Polymer (Dako North America, Inc., California, EEUU): hecho en cabra frente a inmunoglobulinas de conejo. • Diaminobenzidina (DAB) (Peroxidase substrate kit DAB SK-4100®, Vector laboratories Inc., California, EEUU) <ul style="list-style-type: none"> - Agua destilada: 2,5 ml - Buffer Stock Solution: 50 µl - DAB: 100 µl - Hydrogen Stock Solution: 50 µl - Agitar bien la mezcla cada vez que se añade un reactivo.

Tabla III.15. Reactivos empleados para la tinción IHQ frente a *Map*.

Las preparaciones así obtenidas se examinaron en un microscopio Leitz Diaplan® y las secciones de tejido se clasificaron subjetivamente, al igual que con la técnica de ZN (apartado III.4.2.1.3.3), en cinco categorías en función de la cantidad de antígenos de *Map* presentes en las lesiones.

<p>0 = ausencia de antígenos de <i>Map</i> +- = presencia dudosa de antígenos de <i>Map</i> + = muy pocos antígenos de <i>Map</i> ++ = cantidad moderada de antígenos de <i>Map</i> +++ = abundante cantidad de antígenos de <i>Map</i>, llegando a rellenar por completo el citoplasma de algunos macrófagos.</p>

III.4.2.2. Estudios bacteriológicos.

III.4.2.2.1. Detección de *Map* mediante PCR.

La detección del genoma micobacteriano se realizó utilizando dos técnicas de PCR. En muestras de tejido incluido en parafina, se emplearon tanto la técnica de **PCR convencional** como la **PCR anidada** (“nested PCR”) en la que se lleva a cabo una segunda amplificación de una región interna del producto de la primera reacción. Sin embargo, debido a la menor capacidad de detección mostrada por la PCR convencional en muestras incluidas en parafina, en el caso del tejido fresco se empleó únicamente la PCR anidada.

III.4.2.2.1.1. Procesamiento de las muestras

a) Muestras de tejido fresco

Esta técnica se llevó a cabo en muestras de válvula ileocecal (VIC), ileon distal (ILd), placa de Peyer yeyunal (PPY) y nódulo linfático mesentérico caudal (NLMC) de cada animal infectado así como de los animales control. Dichas muestras habían permanecido congeladas a -20°C desde su recogida hasta su procesado.

La extracción de ADN se realizó mediante el kit comercial Speedtools Tissue DNA extraction kit (Biotools® B&M Labs., S.A., Madrid, España) con algunas modificaciones. Para la elección de este procedimiento, se llevó a cabo su valoración, comparándolo con un método manual de extracción, basado en el procedimiento descrito por Challans *et al.*, (1994) en el cual las micobacterias eran extraídas mediante xilol y la rotura de su pared se realizaba mediante el método de

congelación/descongelación descrito por Garrido *et al.*, (2000b), empleando diferentes cantidades (desde 0,1 a 1 g) de tejidos ovinos en los que se había valorado la presencia de lesiones y la cantidad de *Map* presentes. El rendimiento de ambos métodos fue similar, con una mayor concentración y pureza de ADN micobacteriano en muestras procesadas con el kit comercial. Por este motivo, y la mayor comodidad y uniformidad de la técnica, se optó por utilizar el procedimiento comercial ya señalado, con una cantidad de partida de **0,5 g** de tejido.

El procesado previo de las muestras de tejido se llevó a cabo en campana extractora, con material estéril y nuevo en cada muestra. Además, cada vez que se realizó esta técnica se emplearon controles positivos conocidos de antemano (procedentes de un intestino ovino con abundantes micobacterias identificadas como *Map* previamente) así como negativos utilizando agua destilada estéril, ambos procesados a la vez que las muestras.

Tras la descongelación a temperatura ambiente, el procesado de las muestras varió ligeramente según si se trataba de muestras de intestino (VIC, ILd o PPY) o del NLMC. En el primer caso se obtuvieron 0,5 g de tejido mediante raspado de la mucosa intestinal con hoja de bisturí estéril desechable y sobre una placa de Petri estéril, mientras que el nódulo linfático precisó de un paso previo de eliminación de la grasa externa y troceado fino mediante tijeras estériles. Los 0,5 g así obtenidos eran introducidos en un vial estéril y libre de ADNasas, de 1,5 ml de tapa plana para PCR (Axygen®, Union City, California, EEUU), previamente identificado, hasta el siguiente paso.

b) Muestras de tejido incluido en parafina

La detección de ácidos nucleicos de *Map* en muestras de tejido fijado en formol e incluido en parafina se realizó tanto mediante la **PCR convencional** como a partir de una **PCR anidada**. Se analizaron las mismas muestras que aquellas incluidas en el estudio de tejido fresco (VIC, ILd, PPY y NLMC) y de los mismos animales. El procesamiento de las muestras hasta la obtención de ADN fue el mismo para las dos técnicas de PCR.

La extracción de ADN fue llevada a cabo mediante el mismo kit comercial Speedtools Tissue DNA extraction kit (Biotools® B&M Labs., S.A., Madrid, España) utilizado para el tejido fresco. En este caso, se cortaron en un microtomo previamente limpio y desinfectado con lejía al 10%, **2 secciones de 5 µm** de cada muestra, que fueron introducidas en tubos para PCR de 1,5 ml con la ayuda de pinzas estériles. El microtomo y la cuchilla empleada también fueron limpiados concienzudamente con lejía al 10% entre cada cambio de bloque de parafina. Las muestras de controles positivos (intestino ovino incluido en parafina con abundante cantidad de *Map*) fueron cortadas al final.

A continuación, se añadió 1 ml de xilol a cada tubo para extraer la parafina, se agitó vigorosamente y se incubó la muestra a temperatura ambiente durante 30 min, mezclándola en un agitador tipo vórtex ocasionalmente durante este período. Se centrifugó durante 3 min a 13000 rpm, se descartó el sobrenadante y se procedió a dos pasos de lavado con 1 ml de etanol al 96%, mezcla mediante inversión, y centrifugación en las mismas condiciones anteriores para eliminar los restos de xilol. Finalmente, tras eliminar al máximo los residuos de etanol, se incubaron los tubos con la tapa abierta en estufa a 37°C hasta su total evaporación. En cada extracción se incluyó un tubo con agua destilada estéril a modo de control negativo.

III.4.2.2.1.2. Lisis y extracción de ADN

Estos pasos se realizaron de la misma manera siguiendo las instrucciones del fabricante, tanto en muestras de tejido fresco como incluido en parafina. Los componentes del kit de extracción se almacenaron a temperatura ambiente (con la excepción de la proteinasa K que se conservaba en refrigeración a 4°C) y vienen descritos en la tabla III.16.

Componentes del kit comercial Speedtools Tissue DNA extraction kit®
<p>1- Buffer BT1 (contiene hidrocloreuro de guanidina)</p> <p>2- Proteinasa K (líoofilizada): 30 mg</p> <p>3- Buffer Proteinasa: 1,8 ml - Al abrir el kit la primera vez se tiene que reconstituir la proteinasa K líoofilizada con 1,35 ml del Buffer Proteinasa.</p> <p>4- Buffer BB1: 10 ml</p> <p>5- Reactivo BB2: 2,5 ml - Al abrir el kit se transfiere todo el contenido del Buffer BB1 en el reactivo BB2, se mezcla y la solución resultante se convierte en el Buffer BB3 (contiene hidrocloreuro de guanidina).</p> <p>6- Buffer BBW (contiene hidrocloreuro de guanidina): 30 ml</p> <p>7- Buffer BB5 (concentrado): 7 ml - Al abrir el kit la primera vez se diluye este buffer en 28 ml de etanol.</p> <p>8- Buffer de elución BBE (Tris/HCL 5mM, pH 8,5): 13 ml. No contiene EDTA en su composición</p> <p>9- Columnas de unión de ADN</p> <p>10- Tubos de 2 ml</p>

Tabla III.16. Componentes del kit comercial Speedtools Tissue DNA extraction kit (Biotools® B&M Labs., S.A., Madrid, España) para la extracción y purificación de ADN.

Tras añadir 180 µl de Buffer BT1 y 25 µl de proteinasa K, se incubaron las muestras en baño maría a 56°C durante 2-3 h, homogeneizándolas ocasionalmente con ayuda de un agitador tipo vórtex, hasta alcanzar una digestión completa del tejido. Con el fin de romper las células, completar la lisis de las muestras y así poder extraer y purificar el ADN, se dispensaron 200 µl de Buffer BB3 de lisis, homogeneizando nuevamente las muestras mediante vórtex e incubándolas a 70°C durante 10 min. Tras una centrifugación a 13000 rpm durante 5 min para precipitar el resto de partículas insolubles, se transfirió el sobrenadante a un nuevo vial de 1,5 ml para PCR.

La extracción de ADN se realizó mediante el uso de columnas de unión de ADN, previamente colocadas sobre tubos de PCR de 2 ml (incluidos en el kit). Para ello, tras añadir 210 µl de etanol (Prolabo™, Briare, Francia) al lisado y mezclar por inversión, se cargó la muestra a su columna correspondiente, que fue centrifugada durante 90 s a 13000 rpm para favorecer la unión del ADN a la membrana de sílica. A continuación se procedió al lavado de dicha membrana con el fin de eliminar cualquier impureza. Así, se realizó un primer lavado con 500 µl de Buffer BBW y, tras centrifugar durante 90 s a 13000 rpm, se llevó a cabo un segundo lavado con 600 µl de Buffer BB5 y centrifugado durante 2 min a la misma velocidad. Para eliminar el etanol

residual, se procedió al secado de la membrana con el ADN adherido, centrifugando durante 2 min a 13000 rpm.

Finalmente se llevó a cabo la elución del ADN puro, transfiriendo la columna a un nuevo vial de 1,5 ml estéril y libre de ADNasas y dispensando 50 µl del Buffer BBE precalentado a 70°C directamente en la membrana (sin llegar a tocarla). Se incubaron las muestras durante 3 min y finalmente se centrifugaron 2 min a 13000 rpm para recoger el ADN puro extraído en el vial de 1,5 ml. Se volvió a repetir el paso de elución en las mismas condiciones, de tal forma que el ADN recogido acabó diluido en 100µl de Buffer BBE. A continuación, o bien se pasaba directamente a la fase de amplificación del ADN, o bien se almacenaban las muestras a -20°C hasta su posterior uso.

III.4.2.2.1.3. Amplificación del ADN micobacteriano

a) PCR convencional

Esta técnica fue llevada a cabo únicamente en aquellas **muestras de tejido incluido en parafina**. Los cebadores empleados en este caso, cuya secuencia de oligonucleótidos viene detallada a continuación, amplifican un fragmento de 217 pares de bases (pb) de la secuencia de inserción IS900 específica de *Map* (Collins *et al.*, 1993b).

C1: 5'- GAT CGG AAC GTC GGC TGG TCA GG-3'

C2: 5'- GAT CGC CTT GCT CAT CGC TGC CG-3'

El primer paso consistió en preparar una “premezcla” de amplificación, usando los reactivos señalados en la tabla III.17 a las concentraciones indicadas.

Reactivos	Concentración inicial	Volumen (µl) / muestra
H ₂ O		14,3
Buffer (5Prime Inc.; EEUU)	10X	2,5
Mezcla de dNTPs (Bioline®; Reino Unido)	2,5 mM	2
Cebador C1 (Invitrogen; EEUU)	20 µM	0,5
Cebador C2 (Invitrogen; EEUU)	20 µM	0,5
Taq DNA polimerasa (5Prime Inc.; EEUU)	5 U/µl	0,2
ADN muestra		5
Total		25

Tabla III.17. Reactivos empleados en la amplificación de PCR convencional de la secuencia de inserción IS900 de *Map*.

A continuación, se dispensaron 20 µl de esta premezcla de amplificación en unos viales de 0,2 ml de paredes finas estériles y libres de ADNAsas (VWR collection®). Dicha premezcla se elaboró en un habitáculo adaptado exclusivamente para este uso y equipado con luz ultravioleta, que se encendía siempre unos 30 min antes de cada sesión de trabajo, permitiendo así degradar cualquier ADN que pudiera estar presente en las instalaciones, las pipetas, puntas o los propios reactivos. En otro cuarto separado, se añadieron 5 µl de ADN de las muestras problema, que se mezclaron con los 20 µl de la solución madre de amplificación. Finalmente, los viales se colocaron en un termociclador XP Thermal Cycler® (Bioer Technology Co., LTD, Japón) de la forma más céntrica y simétrica posible, y las muestras fueron sometidas al programa de amplificación detallado en la tabla III.18.

IS900 (C1 y C2)		
Ciclos	Temp. (°C)	Tiempo
Desnaturalización	96	3 min
Amplificación: 40 ciclos	96	1 min
	65	1 min
	72	2 min
Extensión	72	8 min

Tabla III.18. Programa de amplificación de la reacción de PCR convencional de la secuencia de inserción IS900 propia de *Map*.

En cada reacción de PCR se incluyó un “control positivo” y otro “control negativo de reacción” (sin ADN añadido) para comprobar el correcto desarrollo de la

amplificación de ADN y la ausencia de contaminaciones. Finalmente, las muestras amplificadas se mantuvieron en refrigeración a 4°C hasta su posterior identificación.

b) PCR anidada

La PCR anidada fue llevada a cabo tanto en las **muestras de tejido fresco** como **incluido en parafina**. Esta técnica consta de dos amplificaciones del ADN micobacteriano seguidas. Para simplificar, hemos denominado como “ronda 1” a la primera reacción de PCR normal, y “ronda 2” a la segunda reacción de PCR “anidada”, que consiste en la amplificación del ADN obtenido tras la primera ronda.

Como cebadores de la primera amplificación (ronda 1), se empleó una secuencia de oligonucleótidos que amplifica un fragmento de 381 pb de la secuencia de inserción IS900 propia de *Map* (Garrido *et al.*, 2000b).

Cebador 1: 5'- GTT CGG GGC CGT CGG CCT TAG G -3'

Cebador 2: 5'- CCC ACG TGA CCT CGC CTC CA -3'

La secuencia de los cebadores complementarios propuestos para la PCR anidada (ronda 2) que amplifican un fragmento interno de 226 pb, fue diseñada mediante el programa de libre acceso “Primer3” disponible en la siguiente página web: <http://frodo.wi.mit.edu/primer3/> (Rozen y Skaletsky, 2000) y fue proporcionada por la Dra. Ana Balseiro del Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario (SERIDA) de Gijón (Asturias).

Cebador 3: 5'- GTC GGG TAT GGC TTT CAT GT -3'

Cebador 4: 5'- AGT AAT GGT CGG CCT TAC CG -3'

Ronda 1:

El primer paso de esta PCR consistió en preparar una “premezcla” de amplificación para la ronda 1 usando para ello los reactivos que se relacionan en la tabla III.19 en las concentraciones indicadas.

Reactivos	Concentración inicial	Volumen (µl) / muestra
H ₂ O		24,8
Buffer (5Prime Inc.; EEUU)	10X	5
Mezcla de dNTPs (Bioline®; Reino Unido)	2,5 mM	5
Cebador 1 (ronda 1) (Invitrogen; EEUU) Cebador 3 (ronda 2) (Invitrogen; EEUU)	10 µM	5
Cebador 2 (ronda 1) (Invitrogen; EEUU) Cebador 4 (ronda 2) (Invitrogen; EEUU)	10 µM	5
Taq DNA polimerasa (5Prime Inc.; EEUU)	5 U/µl	0,2
ADN muestra		5
Total		50

Tabla III.19. Reactivos empleados en la amplificación de PCR anidada de la secuencia de inserción IS900 de *Map* tanto para la ronda 1 como para la 2.

A continuación se dispensaron 45 µl de esta premezcla en viales de 0,2 ml de paredes finas estériles y libres de ADNAsas (VWR collection®). Dicha premezcla se elaboró en el mismo habitáculo adaptado exclusivamente para este uso y empleado para la preparación de la amplificación de la PCR convencional. Para no contaminar dicho habitáculo con ADN, el siguiente paso se llevó a cabo en otro cuarto separado del anterior, que también disponía de luz ultravioleta, donde se añadieron 5 µl de la muestra problema a cada vial con los 45 µl de premezcla, que a continuación fueron colocados en un termociclador XP Thermal Cycler® (Bioer Technology Co., LTD, Japón). Las muestras fueron sometidas al programa de amplificación descrito en la tabla III.20.

Ronda 2:

Una vez acabada la primera PCR, se volvió a preparar otra premezcla para la ronda 2, que se elaboró en el mismo habitáculo, con los mismos reactivos y en las mismas cantidades que en la primera ronda (Tabla III.19) a la excepción de los dos cebadores que eran los específicos de la segunda reacción. Se dispensaron nuevamente 45 µl de dicha premezcla en tubos de 0,2 ml.

Sin embargo en este caso, ante el alto riesgo de contaminaciones entre las 2 rondas en el momento de abrir los viales de la primera amplificación, se añadieron los 5 µl del ADN de la ronda 1 a los viales de la ronda 2 con la premezcla en un tercer habitáculo totalmente distinto y en el que no se trabajaba con ADN, cuyo mobiliario había sido limpiado meticulosamente con cloramina al 1% (Prolabo™, Briare, Francia)

y mediante una pipeta (Eppendorf Research®) de uso exclusivo. Durante todo este paso, los viales fueron sumergidos en hielo picado para frenar el inicio de la reacción.

Finalmente, las muestras fueron introducidas en el termociclador y sometidas a otro programa de amplificación recogido en la tabla III.20.

Ronda 1			Ronda 2		
Ciclos	Temp. (°C)	Tiempo	Ciclos	Temp. (°C)	Tiempo
Desnaturalización	96	3 min	Desnaturalización	96	3 min
Amplificación: 38 ciclos	95	1 min	Amplificación: 35 ciclos	95	40 s
	65	1 min		60	40 s
	72	2 min		72	1 min
Extensión	72	8 min	Extensión	72	8 min

Tabla III.20. Programas de las rondas 1 y 2 de las reacciones de PCR anidada para la amplificación de la secuencia de inserción IS900 propia de *Map*.

En cada lote de muestras se incluyó un “control positivo de reacción” para comprobar que la amplificación se había realizado correctamente, utilizando para ello una muestra conocida de antemano como positiva a *Map*. También se empleó un “control negativo de reacción” sin ADN añadido, en cada ronda, para asegurarse de que no se hubieran producido contaminaciones durante la elaboración de las premezclas. Además, con el fin de comprobar la ausencia de ADN contaminante durante el paso de los 5 µl de ADN del vial de la ronda 1 al de la ronda 2, el control negativo de la primera ronda también se amplificó en la ronda 2 como si fuera una muestra más, actuando así como un tercer control negativo.

Una vez finalizada la PCR, las muestras se conservaron en refrigeración a 4°C hasta su posterior identificación.

III.4.2.2.1.4. Identificación del segmento amplificado

Este paso fue llevado a cabo en otro cuarto separado para trabajar específicamente con “amplicones” y en el que el material de trabajo era de uso

exclusivo. Cada fragmento de ADN amplificado tras la PCR convencional e anidada se visualizó mediante electroforesis en un gel de agarosa (SeaKem®LE Agarose, Iberlabo, S.A., Madrid, España) al 3% en tampón TBE 0,5X previamente elaborado tal y como se indica en la tabla III.21.

Preparación del gel de agarosa al 3% en tampón TBE 0,5X
<p><u>Reactivos empleados:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Tampón TBE 10 X (1 l): <ul style="list-style-type: none"> - Tris básico (Merck®, Darmstadt, Alemania): 108 g - Ácido bórico (H₃BO₃) (Calbiochem®; Merck, Alemania): 55 g - EDTA 0,02 M pH 8 (Panreac, Barcelona, España): 7,44 g - Diluir los 3 reactivos en 1000 ml de agua destilada. • Tampón TBE 1 X (1 l): <ul style="list-style-type: none"> - 100 ml solución tampón TBE 10X - 900 ml agua destilada • Tampón TBE 0,5 X (1 l) <ul style="list-style-type: none"> - 50 ml solución tampón TBE 10X - 950 ml agua destilada • Agarosa (SeaKem®LE Agarose, Iberlabo, S.A., Madrid, España) <p><u>Protocolo:</u></p> <ol style="list-style-type: none"> 1) Disolver 3 g de agarosa en 100 ml de TBE 0,5X 2) Calentar la mezcla en microondas hasta que se disuelva completamente 3) Después de dejar atemperar, verter en una bandeja de electroforesis con una rendija para marcar los pocillos, y dejar enfriar durante 1 h. 4) Una vez el gel seco, depositarlo en una cubeta de electroforesis llena de TBE 1X.

Tabla III.21. Reactivos y protocolo de preparación del gel de agarosa para la visualización de los fragmentos de ADN amplificados.

Para cargar en el gel las muestras problema, primero se marcaron unas “huellas” circulares en la superficie de papel parafinado (Parafilm®), una para cada muestra, en las que se dispensaron 5 µl de azul de bromofenol con ARNasas (Ecogen®, Madrid, España) en agua destilada, libre de ADNasas y estéril como tampón de carga. A continuación se añadieron 7 µl del producto de PCR de cada muestra problema en su “huella” correspondiente, se mezcló con el azul de bromofenol mediante varios pipeteos suaves y finalmente se cargaron los 12 µl en su pocillo correspondiente en el gel. Se

repiteieron los mismos pasos para cada muestra, incluidos los controles positivos y negativos, que se colocaron cada uno en los extremos opuestos del gel. Finalmente se dispensaron 6 µl de un marcador molecular de 100 pb (Biotools®, Madrid, España) mezclado igualmente con azul de bromofenol, también en los pocillos de ambos extremos de cada gel, junto con los controles.

Seguidamente el gel fue sometido a una corriente eléctrica de 90 V durante aproximadamente 90 min. Pasado este tiempo, se tiñó en un baño en agitación con una solución de 0,5 µg/ml de bromuro de etidio (Merck®, Darmstadt, Alemania) durante 30 min. Finalmente, se visualizó el gel, manipulándolo siempre con guantes, en una cámara de luz ultravioleta conectada a un sistema informático de tratamiento de imágenes (BioCapt MW1).

La interpretación del resultado se llevó a cabo tras comprobar, en primer lugar, que en los pocillos correspondientes a los controles positivos aparecía una banda fluorescente de 217 pb (si se trataba del producto amplificado mediante PCR convencional) o 226 pb (en caso de proceder de la PCR anidada), ambos correspondientes al fragmento amplificado de la secuencia *IS900*, y no aparecían bandas en los pocillos donde se habían depositado los controles negativos. Se consideró como resultado positivo, y por tanto, indicador de la presencia de *Map* en la muestra, la visualización de una banda a la altura de 217 o 226 pb, según la PCR realizada, que coincidía con la de los controles positivos (Figura IX.4).

Finalmente se procedió a la secuenciación (Servicio de Ácidos Nucleicos, Laboratorio de Técnicas Instrumentales, Universidad de León) de un número significativo de muestras amplificadas para comprobar la identidad del producto obtenido, confirmándose en todos los casos la amplificación de un fragmento de la secuencia de inserción *IS900* de *Map*.

III.4.2.2.2. Detección de *Map* mediante cultivo bacteriológico

La realización de esta parte del estudio se llevó a cabo en las instalaciones del Instituto Vasco de Investigación y Desarrollo Agrario (NEIKER-Tecnalia) de Derio (Vizcaya). Se analizaron tanto las muestras de heces obtenidas en el momento del sacrificio (apartado III.3) como la de distintos tejidos.

III.4.2.2.2.1. Toma de muestras

Durante la necropsia de cada animal, se recogieron muestras de válvula ileocecal (VIC), íleon distal (ILD), placas de Peyer yeyunales (PPY) así como del nódulo linfático mesentérico caudal (NLMC) adyacentes a las utilizadas para la detección de *Map* mediante PCR (III.4.2.2.1.1.), que se congelaron inmediatamente a -20°C hasta su uso. Al igual que con las heces, cada muestra se sembró en 4 tubos, 2 en medio de cultivo LJ con micobactina J y 2 en medio Middlebrook 7H11 con OADC.

Cada tipo de tejido se sembró por separado, excepto en el caso de las ovejas adultas en las que, por falta de tejido suficiente de VIC, las muestras de este órgano se procesaron junto con las de ILD. Debido al número tan elevado de muestras de ovejas adultas, se decidió sembrar en un primer momento todos los animales del grupo infectado con “dosis alta” de *Map* (Grupo 3) en lotes de 2, y el resto, pertenecientes al grupo control (Grupo 1) e infectados con “dosis baja” de *Map* (Grupo 2), en lotes de 4 o 2, respectivamente. En cuanto a los corderos, las muestras de cada animal se procesaron individualmente, salvo las del grupo control, que se agruparon en lotes de 2 o 3 animales. En el caso de obtener algún aislamiento, se volvían a sembrar dichas muestras por separado para identificar al animal positivo.

III.4.2.2.2.2. Preparación de los medios y protocolo de cultivo

Tanto el medio LJ como el Agar Middlebrook 7H11 se elaboraron siguiendo el procedimiento descrito para las muestras fecales en el apartado III.4.1.2.1.

Para el cultivo de las muestras de tejido, se procedió de la siguiente manera: En campana extractora, utilizando material estéril y nuevo en cada muestra, y tras descongelar las muestras a temperatura ambiente, se procedió al raspado de 2 g de mucosa intestinal con hoja de bisturí estéril desechable, así como al troceado y triturado de 2 g del nódulo linfático de cada animal. El material así procesado se introdujo en una bolsa de Stomacher® (Seward Stomacher®, Worthing, Reino Unido), en la que se dispensaron 38 ml de HPC al 0,75% para la homogeneización y posterior incubación durante 18-24 h, procediéndose a la siembra e interpretación de los resultados del modo ya descrito para las muestras fecales en el apartado III.4.1.2.2.

III.4.2.3. Estudios inmunológicos en muestras de tejido

III.4.2.3.1. Secreción *in vitro* del Interferón gamma (IFN- γ)

Dentro del estudio de la respuesta inmune local, se valoró la producción *in situ* de esta citoquina en diferentes tejidos tomados en la necropsia. La determinación se llevó a cabo de dos formas: incubando directamente una porción del tejido, o los linfocitos extraídos del mismo. Todo el material y reactivos empleados en este estudio están señalados en la tabla III.22.

Determinación de la secreción <i>in vitro</i> de IFN-γ por los linfocitos tisulares y tejidos.
<p><u>Reactivos empleados:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Medio RPMI 1640 1X (Gibco®, Invitrogen™, EEUU). • Suero Fetal Bovino (“Foetal Bovine Serum Gamma irradiated”, Gibco®, Invitrogen™, EEUU) previamente inactivado a 56 °C durante 30 min en baño maría. • Antibiótico-antimicótico (“Antibiotic-antimycotic 100X”, Gibco®, Invitrogen™, EEUU), preparado comercial con: <ul style="list-style-type: none"> - 10000 U/ml Penicilina G - 10000 µg/ml Sulfato de Streptomina - 25 µg/ml Anfotericina B • Medio de cultivo RPMI: solución de trabajo <ul style="list-style-type: none"> - RPMI 1640 1X: 100 ml - Suero Fetal Bovino: 2 ml - Antibiótico-antimicótico: 50 µl • Extracto proteico purificado (PPD) aviar (CZ Veterinaria, Porriño, Pontevedra). • Lymphoprep™, (Axis-Shield, Oslo, Noruega). • Kit comercial “BOVIGAM® <i>Mycobacterium bovis</i> Gamma Interferon Test Kit for cattle” (Prionics AG, Suiza) <p><u>Material:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Microplacas de cultivo de 24 pocillos (Nunc™, EEUU) • Lana de vidrio (Merck®, Darmstadt, Alemania)

Tabla III.22. Material y reactivos empleados para la valoración de la secreción *in vitro* de IFN- γ por los linfocitos tisulares y tejidos.

III.4.2.3.1.1. Toma de muestras

Se tomaron muestras de aproximadamente unos 3 cm de longitud, de íleon distal (ILd), placa de Peyer yeyunal (PPY), así como un fragmento del nódulo linfático mesentérico caudal (NLMC) de cada animal, tanto oveja adulta como cordero. Dichas muestras fueron lavadas en PBS y sumergidas en medio de cultivo RPMI previamente preparado según lo indicado en la tabla III.22. De cada una de ellas, se obtuvo una porción de aproximadamente 0,5 cm³, que se mantuvo en dicho medio hasta su posterior procesado, mientras que en el resto de la muestra se llevó a cabo la extracción de linfocitos presentes en el tejido linfoide.

III.4.2.3.1.2. Extracción de linfocitos

Este paso fue llevado a cabo en campana extractora y usando material estéril para cada muestra. Tras eliminar toda la grasa adherida, se trocearon meticulosamente los nódulos linfáticos en una placa de Petri con la ayuda de pinzas y tijeras hasta obtener una fina mezcla. En el caso de las muestras de ILd y de PPY, se raspó la mucosa mediante hoja de bisturí estéril desechable. En cada caso, la mezcla así obtenida se diluyó en 10 ml del medio RPMI y se vertió en una bolsa de Stomacher® (Seward Stomacher®, Worthing, Reino Unido) para homogeneizar el tejido en un Stomacher 80 (Seward Stomacher®, Worthing, Reino Unido) durante 2,5 min a velocidad máxima. A continuación, el homogeneizado obtenido se filtró a través de lana de vidrio, recogiendo el líquido filtrado en un tubo de 50 ml que se rellenó hasta los 45 ml con RPMI. Seguidamente, los tubos se centrifugaron durante 10 min a 2220 rpm a temperatura ambiente, tras lo cual se eliminó el sobrenadante y se reconstituyó el sedimento obtenido en 7 ml de RPMI. A continuación, estos 7 ml se vertieron cuidadosamente sobre un colchón de 7 ml de Lymphoprep™ en un tubo de 15 ml, que se centrifugó a 4°C durante 30 min a 4100 rpm con el freno de la centrífuga puesto en cero, para evitar la separación brusca de la capa de linfocitos formada. Seguidamente, se extrajo dicha banda con la ayuda de una pipeta Pasteur y se pasó a un tubo de 15 ml que se rellenó hasta los 14 ml con RPMI. Se centrifugó 10 min a 2200 rpm y temperatura ambiente para eliminar el exceso de Lymphoprep™. Finalmente, tras eliminar el sobrenadante, el sedimento de linfocitos se resuspendió en 10 ml de RPMI.

III.4.2.3.1.3. Siembra e incubación de linfocitos y tejidos

Tras rotular convenientemente las placas de cultivo tal y como viene representado en la figura III.3, se dispensaron 0,5 ml del medio RPMI en los pocillos previstos para los linfocitos, y 1,5 ml en aquellos en los que se incubaron los trozos de tejidos. También se añadieron 0,5 ml del medio de cultivo solo y junto con PBS en dos pocillos aparte, a modo de controles negativos de cada placa. A continuación, se añadieron 100 µl de PBS en un pocillo, y 30 µg de PPD aviar previamente diluida hasta 100 µl con PBS en el pocillo contiguo, y así para cada muestra (Figura III.3). Seguidamente se dispensó 1 ml de los linfocitos extraídos previamente en sus dos pocillos correspondientes, y de la misma manera se depositó el trozo de tejido que se había preservado anteriormente en los dos pocillos correspondientes. Se empleó una placa de cultivo para cada animal, y todo el procesado fue realizado en una campana de bioseguridad de clase II previamente limpiada y desinfectada. Finalmente, tras una breve homogeneización, las placas se incubaron durante un período de 20-24 h en una estufa de CO₂ al 5%.

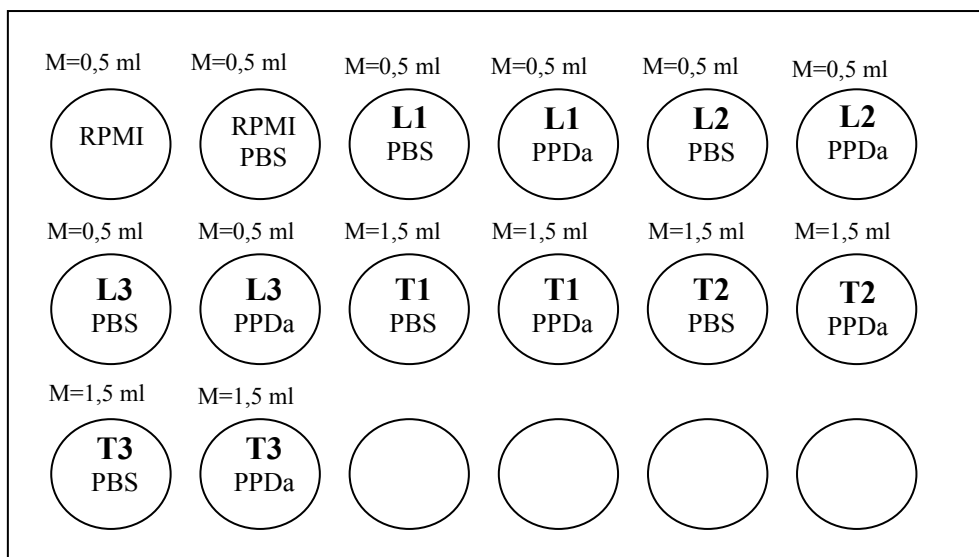


Figura III.3. Secreción *in vitro* del IFN- γ producido por linfocitos tisulares (L) y tejidos propios (T). Disposición en la placa de cultivo de L1 / T1, L2 / T2 y L3 / T3 = linfocitos tisulares / tejido propio de ILd, PPY y NLMC respectivamente, sin estimular (PBS) y estimulados con PPD aviar (PPDa). M = Medio de cultivo RPMI+ SFB+antibiótico-antimicótico. Los pocillos con RPMI y RPMI+PBS sirven de controles negativos de la placa.

III.4.2.3.1.4. Valoración de la producción del Interferón gamma (IFN- γ)

Tras centrifugar durante 5 min a 3500 rpm el sobrenadante obtenido de cada pocillo, éste se recogió en tubos de 1,5 ml correctamente identificados, que se congelaron a -20°C hasta su posterior procesado. Finalmente, se cuantificó la secreción de IFN- γ producida por los linfocitos tisulares así como por el propio tejido mediante el kit comercial “BOVIGAM[®] *Mycobacterium bovis* Gamma Interferon Test Kit for cattle” (Prionics AG, Suiza) siguiendo las instrucciones del fabricante, y cuya técnica e interpretación de resultados ha sido previamente detallada en el apartado III.4.1.1.2.1.

III.4.2.3.2. Determinación de la expresión de citoquinas y otros mediadores de la respuesta inmune mediante qPCR a tiempo real

Esta parte del estudio se llevó a cabo en las instalaciones del centro de Tours (Francia) del “Institut National de la Recherche Agronomique (INRA)”, con la intención de valorar la expresión génica de diversas citoquinas y receptores de respuesta inmune innata mediante PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR), a partir de muestras de tejido.

III.4.2.3.2.1. Toma y selección de muestras

De cada animal y utilizando material estéril, se tomaron muestras de aproximadamente 0,5 cm³ de íleon distal (ILd), placas de Peyer yeyunales (PPY) así como del nódulo linfático mesentérico caudal (NLMC), que fueron sumergidas rápidamente en 5-10 volúmenes de solución de fijación RNAlater[®] (Ambion, Huntingdon, Reino Unido) en frascos individuales. Dichas muestras se incubaron durante 20 h a 4°C para permitir la correcta penetración del RNA later[®], y finalmente se congelaron a -20°C hasta su uso.

Debido a lo laborioso de la técnica y al elevado número de animales, se llevó a cabo una selección de individuos y muestras a analizar, en función del tipo de lesión que habían presentado en el tejido contiguo al de la muestra aquí analizada, como se detalla en el capítulo de resultados. De esta forma, y como se indica en la tabla III.23, se analizaron muestras de determinados corderos y ovejas, clasificadas en cinco categorías: animales control, infectados sin lesión, lesión focal, multifocal a (caracterizada por la

presencia de escasos BAAR) y multifocal b (asociada a la presencia de abundantes BAAR en las lesiones granulomatosas).

Grupos estudiados:	Identificación:	Tejido estudiado:
Control	31	ILd PPY NLM
	34	ILd PPJ NLM
	38	ILd PPJ NLM
Infectados sin lesión	39	PPJ NLM
	40	ILd PPY NLM
	44	ILd PPJ NLM
Lesión focal	50	ILd PPJ NLM
	53	ILd PPJ NLM
	22	ILd PPJ NLM
	23	NLM
	29	ILd PPJ NLM
Lesión multifocal a	47	ILd PPJ NLM
	52	ILd PPJ NLM
	28	ILd NLM
Lesión multifocal b	48	ILd NLM
	49	ILd PPJ NLM
	51	NLM
	54	ILd PPJ

Tabla III.23. Muestras e individuos seleccionados en función del tipo de lesión para el estudio de la variación de expresión génica de diversas citoquinas y receptores de respuesta inmune innata.

III.4.2.3.2.2. Extracción de ARN

La realización de esta etapa fue llevada a cabo bajo campana de bioseguridad clase II (Equiplabo®), y mediante material estéril desechable.

Tras la descongelación a temperatura ambiente y eliminación del RNAlater® residual impregnado en el tejido con papel absorbente, se pesaron en una báscula de precisión (Mettler AE 260, DeltaRange®) trozos de aproximadamente 50 mg de tejido. La extracción de ARN fue realizada mediante el uso de Trizol® (TRIzol® Reagent, Invitrogen™, EE.UU). Brevemente, tras añadir 1 ml de Trizol®, las muestras se homogeneizaron mediante un homogeneizador de tejidos (Tissue Tearor™) y se incubaron durante 5 min a temperatura ambiente. Tras centrifugar durante 10 min a 11000g, se recuperaron aproximadamente 600-800 µl del sobrenadante obtenido en tubos libres de ADN y ARN. Para separar las fases, se añadieron 200 µl de cloroformo (Sigma-Aldrich®, Lyon, Francia), se mezclaron los tubos por inversión y se incubaron a temperatura ambiente durante 2-3 min, tras lo cual se centrifugaron durante 15 min a 11000g y 4°C, y se transfirieron aproximadamente 400 µl de la fase acuosa conteniendo el ARN a nuevos tubos libres de ADN y ARN. La precipitación del ARN se llevó a cabo mediante el añadido de 500 µl de isopropanol, mezcla por inversión, e incubación a temperatura ambiente durante 15 min. Tras centrifugar 10 min a 11000g y 4°C, el ARN formó un sedimento en el fondo del tubo. Se eliminó el sobrenadante, y se lavó dicho sedimento añadiendo 1 ml de etanol al 75% (Sigma-Aldrich®, Lyon, Francia) y centrifugando nuevamente a 7500g, 4°C durante 10 min. Se volvió a eliminar el sobrenadante y se dejaron secar los sedimento durante 15 min en hielo. Finalmente, se resuspendieron los ARNs en 20 µl de agua tratada con DEPC (Dietil pirocarbonato) al 0,1% (Gibco®, Invitrogen™, EEUU) y se congelaron a -80°C hasta su uso.

Se cuantificó el ARN total extraído mediante espectrofotometría (Nanodrop® ND-1000 Spectrophotometer), y se estimó su calidad e integridad mediante su examen visual en un gel de agarosa al 1%, teñido en bromuro de etidio (Figura IX.5). De esta manera, 5 de las 42 muestras seleccionadas tuvieron que ser eliminadas de este estudio, debido a que su ARN estaba parcialmente degradado.

Finalmente, antes de llevar a cabo la reacción de retrotranscripción, se procedió a la eliminación del ADN genómico contaminante mediante el tratamiento del ARN con ADNasas (DNase I recombinant, Roche Applied Science, Mannheim, Alemania). Para ello, en unos tubos de 0,2 ml libres de ADN y ARN para PCR, se mezclaron los reactivos indicados en la tabla III.24, a las concentraciones correspondientes, de tal manera que en cada reacción se procesaron 10 µg de ARN, que se incubaron durante 15 min a 30°C en un termociclador (iCycler, Biorad, California, EE.UU).

Reactivos	Concentración de trabajo
H₂O DEPC (Gibco®, Invitrogen™; EEUU)	
DNase I recombinant Incubation Buffer 10X (Roche Applied Science, Mannheim, Alemania)	1X
DNase I recombinant 10 U/µl (Roche Applied Science, Mannheim, Alemania)	5 U/ µg ARN
rRNasin®, RNase Inhibitor 40 U/µl (Promega, Madison, EEUU)	5 U/ µg ARN
ARN muestra: tratamiento de 10 µg	

Tabla III.24. Reactivos y sus concentraciones correspondientes empleados en la digestión del ARN extraído con ADNasas.

Tras ello, se añadió EDTA (EDTA 25 mM, Invitrogen™, EE.UU) a una concentración final de 6 mM, y se volvieron a incubar los tubos durante 10 min a 75°C. Finalmente se confirmó la eliminación total de ADN contaminante al amplificar 0,5 µl del ARN ya digerido con ADNasas, en una reacción de PCR frente al gen GAPDH, empleando para ello los reactivos indicados en la tabla III.25, y usando el programa de amplificación detallado en la tabla III.26. Se visualizaron los resultados en un gel de agarosa al 1%, donde únicamente debía aparecer teñida la banda de 119 pb correspondiente a la muestra de ADNc que se utilizó como control positivo de la amplificación, pero ninguna de las muestras de ARN previamente digeridas con ADNasas, para poder confirmar la eliminación total de residuos de ADN contaminante. Una vez lograda la eliminación del ADN contaminante, las muestras se congelaron a -80°C hasta la realización de la transcripción inversa.

Reactivos	Concentración inicial	Volumen (µl) / muestra
H₂O DEPC (Gibco®, Invitrogen™; EEUU)		19,25
Buffer 10X RedTaq® (Sigma-Aldrich®, Lyon, Francia)	10X	2,5
dNTPs (Promega, Madison, EEUU)	10 mM	0,5
GAPDH forw: GCGGTGAACCACGAGAAGTATAA (Eurogentec, Lieja, Bélgica)	25 µM	0,5
GAPDH rev: CCCTCCACGATGCCAAAGT (Eurogentec, Lieja, Bélgica)	25 µM	0,5
REDTaq® ADN polimerasa (Sigma-Aldrich®, Lyon, Francia)	1 U/µl	1,25
ARN tras digestión con ADNasas		0,5
Total		25

Tabla III.25. Reactivos empleados en la amplificación mediante PCR del gen control GAPDH para la confirmación de la eliminación total de ADN contaminante.

GAPDH		
Ciclos	Temp. (°C)	Tiempo
Desnaturalización	92	4 min
Amplificación: 35 ciclos	92	45 seg
	60	1 min
	72	1 min
Extensión	72	10 min

Tabla III.26. Programa de amplificación de la reacción control de PCR del gen GAPDH.

III.4.2.3.2.3. Síntesis de ADNc

El paso siguiente consistió en convertir el ARN obtenido en ADN complementario (ADNc) mediante una reacción de transcripción inversa. En unos tubos de 0,2 ml para PCR, se mezclaron 2 µg de ARN con 2 µl de oligo DT al 133 pmol/µl (Oligo (dT) 15 Primer, Promega, Madison, EEUU) y agua tratada con DEPC (Gibco®, Invitrogen™, EEUU) hasta un volumen total de 11 µl. Esta mezcla se incubó en un termociclador (iCycler, Biorad, California, EEUU) durante 10 min a 65°C, para permitir el correcto despliegue de las hebras de ARN, e inmediatamente se enfrió en hielo durante al menos 2 min, con el fin de evitar que se volvieran a replegar dichas hebras, y

así favorecer la hibridación de los oligo DT. En este momento, se añadieron a cada tubo 9 µl de la mezcla enzimática compuesta por 4 µl de buffer 5X (Buffer Mu-MLV, Eurogentec, Lieja, Bélgica), 2 µl de dNTPs 10 mM (Promega, Madison, EEUU), y 0,1 µl de transcriptasa inversa (Mu-MLV, 200U/µl, Eurogentec, Lieja, Bélgica) diluidos hasta los 9 µl en agua DEPC. Los tubos se incubaron en un termociclador a 37°C durante 1h 30 min, seguidos de 10 min a 85°C, para inactivar el enzima residual. Para confirmar el paso de ARN a ADNc, se realizó nuevamente una PCR control del gen GAPDH, amplificando 1 µl del ADNc obtenido, tal y como se detalló en el apartado anterior (III.4.2.3.2.2), y visualizando los resultados en un gel de agarosa al 1%. En este caso, sin embargo, todas las muestras procesadas se tiñeron mediante bromuro de etidio como unas bandas claras de 119 pb, al mismo nivel que el control positivo empleado para esta amplificación, confirmando así la presencia de ADNc. Finalmente, el ADNc obtenido tras la transcripción inversa se diluyó al 1/10 en agua tratada con DEPC y se congeló a -20°C hasta su uso.

III.4.2.3.2.4. PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR)

Para cuantificar el ADNc, y por tanto el ARNm presente en cada muestra, en primer lugar se prepararon una serie de diluciones al 1/5 de ADNc a modo de control positivo para cada reacción de qPCR. Dicho ADNc se obtuvo por transcripción inversa a partir de ARNm aislados de células ovinas de bazo ($3 \cdot 10^6$ células/ml) estimuladas durante 22 h con una mezcla de lipopolisacárido (LPS, 10 µg/ml, InvitrogenTM, EE.UU) y concanavalina A (Con A, 5µg/ml, Sigma-Aldrich®, Lyon, Francia). Además, en cada reacción de qPCR se utilizó agua tratada con DEPC como control negativo.

Se estudió la expresión de los genes que codifican la expresión de 9 citoquinas (IL-17, TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-12, IFN- γ , IL-13, IL-4 y IL-10), del factor de transcripción Fox P3 así como del receptor de respuesta inmune innata TLR2. Para poder comparar el nivel de expresión génica entre las diferentes muestras, minimizando las variaciones inespecíficas, se normalizaron los valores obtenidos mediante el uso de “genes de referencia”, es decir genes controles internos conocidos por mantener constante su nivel de expresión, independientemente del estatus del animal. En este estudio, se emplearon dos genes comúnmente utilizados, GAPDH y HPRT, y también se añadió el gen HK5.1, por ser considerado uno de los más estables en cuanto al nivel de expresión en tejido intestinal (Taylor *et al.*, 2008). La selección de 3 genes de

referencia, en vez de uno sólo, se decidió siguiendo las recomendaciones de Vandesompele *et al.* (2002) para incrementar la fiabilidad del factor de normalización. Las secuencias de los cebadores correspondientes, detalladas en la tabla III.27, fueron diseñadas en el centro de Tours (Francia) del “Institut National de la Recherche Agronomique (INRA)” y proporcionadas por la Dra. Laurence Guilloteau.

Las reacciones de PCR cuantitativa a tiempo real se desarrollaron en un aparato Chromo 4™ (Biorad, California, EE.UU), amplificando cada muestra por duplicado en una placa de 96 pocillos (Biorad, California, EE.UU). Se dispensó a cada pocillo un volumen total de 15 µl, conteniendo 2 µl de ADNc y 13 µl de una mezcla de reacción compuesta por 4,9 µl de agua DEPC, 0,3 µl de cada cebador a una concentración final de 500 nM (salvo IL-17 al 250 nM), y 7,5 µl de iQ™ SYBR®Green Supermix (Biorad®, California, EE.UU), constituida por 100 mM KCl, 40 mM Tris-HCl pH 8.4, 0,4 mM de cada dNTP, 50 U/mL de iTaq polimerasa, 6 mM MgCl₂, y SYBR Green I 20 nM de fluoresceína. Se utilizó agua tratada con DEPC para sustituir el ADNc en 4 pocillos de cada placa de qPCR a modo de control negativo. Una vez en el termociclador, las muestras fueron sometidas a una primera incubación de 5 min a 95°C para la desnaturalización del ADNc, seguida de 39 ciclos de 10 s a 95°C, 15 s a 60°C (salvo en el caso del gen IL-12, donde los 15 s eran a 62°C, y el gen HPRT a 56°C) (Tabla III.27) y adquisición de la señal de fluorescencia.

Gen	Secuencia del cebador	Tamaño del producto (pb)	T°C Hibr.
IL-17	F: TCCATCTCACAGCGAGCACAAG R: AGCCACCAGACTCAGAAGCAGTAG	113	60
TNFα	F: ACACTCAGGTCATCTTCTCAA R: GAGGACCTGCGAGTAGATGAG	192	60
IL-1β	F: CAGGCAGGTAGTGTCGGTCAT R: GATGTTTCGAAGATGACAGG	135	60
IL-6	F: GGTGATGACTTCTGCTTTCC R: TTTTCTGCCAGTGTCTCCTT	204	60
IL-12	F: AACCTGCAACTGAGACCACT R: ATCCTTGTGGCATGTGACTT	186	62
IFN-γ	F: TTCCGGTGGATGATCTGC R: GAGAACCATTACATTGATGCTC	148	60
IL-13	F: CTGTGCAATGGCAGCATGG R: TAGCTGAGGGCTTGTGAGG	151	60
IL-4	F: ATGTACCAGCCACTTCGTCC R: ACGTCTGCTACAGGCAGCTC	120	60
IL-10	F: AGCAGCTGTACCCACTTCC R: CAGCAGAGACTGGGTCAAC	132	60
Fox P3	F: ACTGCTGGCAAATGGTGTC R: CTGCATAGCACCCAGCTTC	196	60
TLR2	F: TCACACGGTGGAGGAAGATTC R: TGAACCAGGAAGATGATAAGTTAGAT	98	60
GAPDH	F: GGCGTGAACCACGAGAAGTATAA R: CCCTCCACGATGCCAAAGT	119	60
HPRT	F: AAACCAAAGATGGTCAAGGT R: TCTTAGGCTTTGTATTTTGCTT	200	56
HK5,1	F: GCCATAGGCGGTCTTATTC R: AGACCGTGATCGACCTTTG	152	60

Tabla III.27. Lista de los cebadores empleados en este estudio de qPCR con sus respectivas secuencias, tamaño y temperatura de hibridación (T °C Hibr.).

Finalmente, antes de analizar los resultados, la especificidad de cada reacción de qPCR fue comprobada automáticamente tras la amplificación, mediante un análisis de las curvas de disociación, al someter las muestras a un gradiente de temperaturas de 65 a 95°C, con lectura de la fluorescencia emitida cada 0,5°C. Esta última etapa permitió confirmar la identidad del producto amplificado y distinguir de la posible presencia de otros productos o de la formación de dímeros de cebadores (Figura III.4).

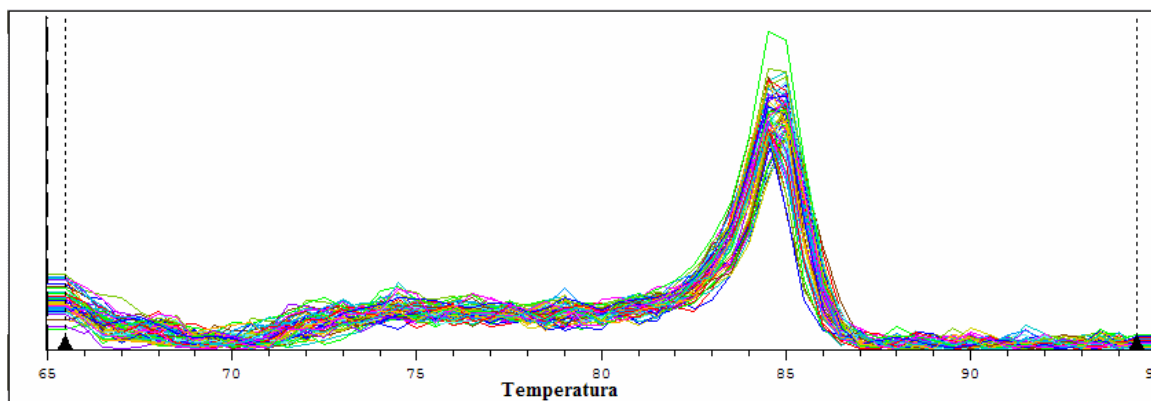


Figura III.4. Ejemplo de las curvas de disociación (representación logarítmica) obtenidas tras la amplificación del gen GAPDH mediante qPCR a través del programa MJ Opticon Monitor 3™ Analysis Software (Biorad, CA, EEUU). En esta representación logarítmica se aprecia un pico en la emisión de fluorescencia que aparece a la misma temperatura en todas las muestras, lo cual confirma la especificidad del producto amplificado.

A continuación, para cuantificar el ADNc presente en cada muestra, el programa MJ Opticon Monitor 3™ Analysis Software (Biorad, California, EE.UU) elaboró una recta patrón para cada gen estudiado a partir de la serie de diluciones equivalentes a una cantidad del ADNc empleado como control positivo, asignando un Cq (ciclo en el que la emisión de fluorescencia empieza a incrementarse significativamente) a cada dilución correspondiente. Una vez establecida esta recta, este mismo programa cuantificó el “ADNc problema” al comparar el Cq obtenido en cada muestra con el de los diferentes puntos de la recta patrón (Figura III.5).

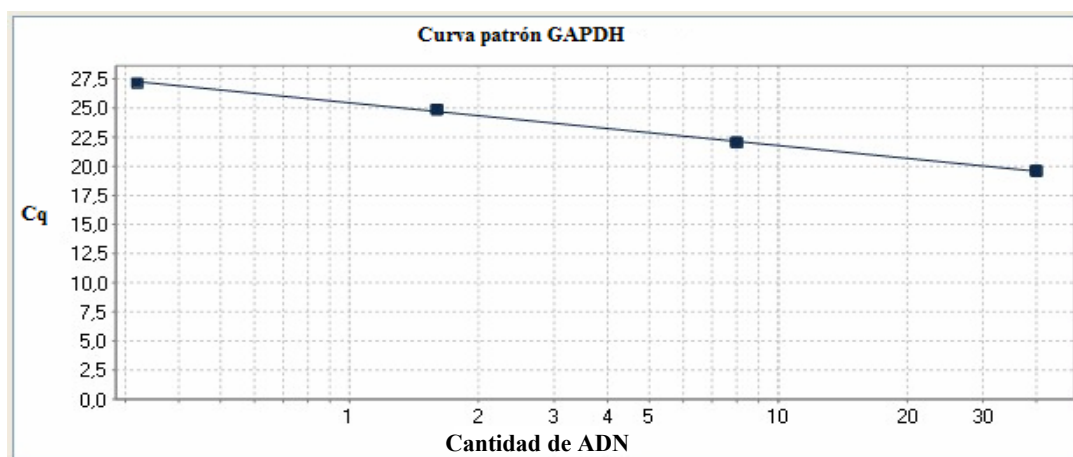


Figura III. 5. Ejemplo de recta patrón obtenida para el gen GAPDH tras la amplificación mediante qPCR de una serie de diluciones de ADNc control previamente estimulado. Cada punto representa una de las diluciones al 1/5 con su correspondiente cantidad de ADNc. Esta recta permite asignar una cantidad determinada para cada muestra en función del Cq obtenido en la reacción. Dicha recta fue representada tras el análisis posterior de los datos a través del programa Qbaseplus (Biogazelle©, Ghent, BE).

Finalmente, todos los datos brutos obtenidos se exportaron en Excel y se analizaron a través del programa Qbaseplus (Biogazelle©, Gante, Bélgica), que calculó e integró el factor de normalización a partir de los 3 genes de referencia con el resto de los datos obtenidos, al igual que la obtención de la eficiencia de las PCR y las variaciones entre cada reacción de PCR (“inter-run”). El fundamento de este programa, así como los cálculos realizados para la normalización de los datos netos, vienen detallados por el grupo de investigación de Hellemans *et al.*, (2007) y Bustin *et al.*, (2009).

III.5. MATERIAL ÓPTICO, FOTOGRÁFICO E INFORMÁTICO

El estudio de todas las secciones histológicas fue llevado a cabo siempre en un microscopio Leitz Diaplan® provisto de un cabezal múltiple de discusión y con óptica PL Fluorar, alternando entre los distintos objetivos de 4X, 10X, 25X, 40X y 63X según el caso. La cuantificación de micobacterias para la preparación del inóculo (apartado III.2.1.2) 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.

Las fotografías macroscópicas se realizaron mediante una cámara digital Nikon DF100 con objetivo macro Nikkor®.

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. Además, el análisis de datos obtenidos mediante PCR cuantitativa a tiempo real se realizó a través de los programas MJ Opticon Monitor 3™ Analysis Software (Biorad, CA, EEUU) y Qbaseplus (Biogazelle©, Ghent, BE). Por último, se empleó el programa informático Win Episcopy Ver. 2.0, para el análisis del grado de concordancias entre pruebas diagnósticas.

III.6. 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 ELISA, IFN- γ o PCR cuantitativa fueron sometidos a una transformación logarítmica de base e. Las comparaciones de medias se hicieron mediante la prueba de la t de Student para las medias ajustadas. Los datos de tipo frecuencia, como los obtenidos en las pruebas de detección de *Map*, se analizaron mediante la prueba de comparación de frecuencias de la probabilidad exacta de Fisher. En todos los casos se consideró como límite de significación estadística una probabilidad del 0.05.

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, EEUU, 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 “*edad*”, “*tratamiento*” (dosis alta, baja y control), “*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, también se tuvieron en cuenta las variables “*localización en el intestino o nódulos linfáticos mesentéricos asociados*” 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*”. Finalmente, para el análisis estadístico de la cuantificación de citoquinas y otros mediadores inmunes mediante qPCR, se tuvo en cuenta la variable independiente “*tipo de lesión*”.

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 anidada) como a partir de tejido incluido en parafina (ZN, IHQ,

PCR convencional y PCR anidada). Para ello, se calculó el índice kappa (k) de concordancia entre pruebas mediante el programa informático Win Episcopo 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

Results

IV.1. DETERMINACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE PERIFÉRICA

IV.1.1. RESPUESTA INMUNE HUMORAL

En el gráfico IV.1 aparece reflejada la evolución de la producción de anticuerpos frente a *Map*, evaluada mediante el test de ELISA indirecto y expresada como las medias de los cocientes de DO, observada en los animales de cada grupo a lo largo del experimento. Los resultados específicos de cada animal aparecen recogidos en las tablas X.1 y X.2 de los anexos.

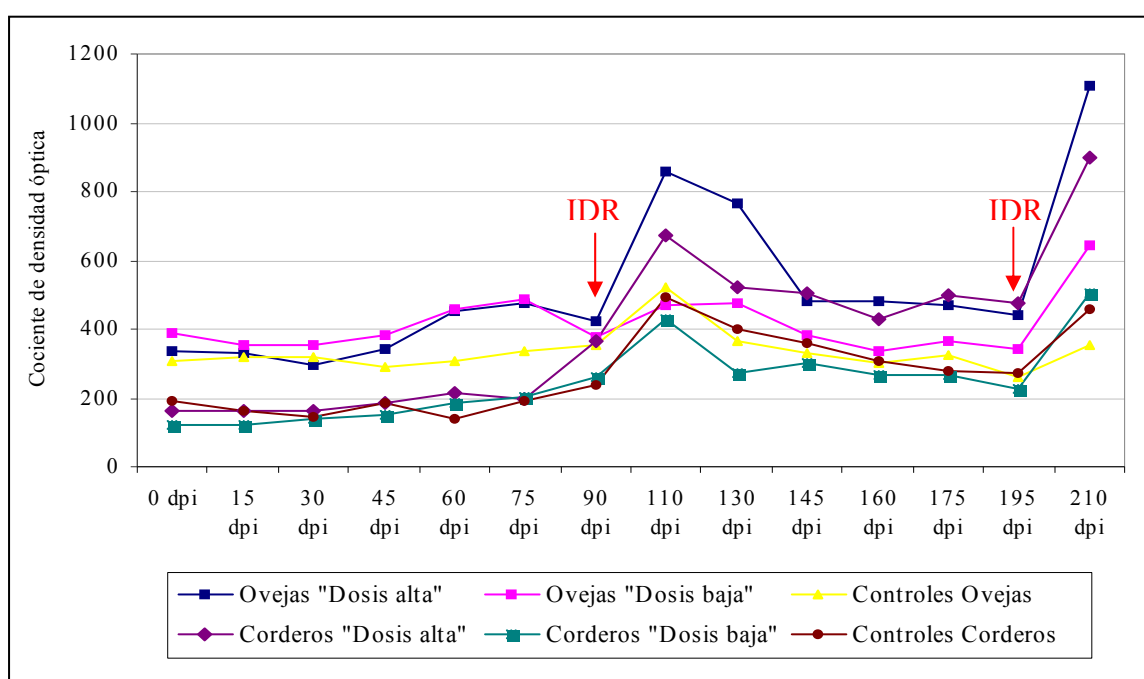


Gráfico IV.1. Evolución de los resultados del ELISA frente a *Map* a lo largo del estudio según cada grupo experimental, tanto en los corderos como en las ovejas adultas. Los valores representados se obtuvieron calculando la media hallada en los diferentes muestreos dentro de cada grupo. Las flechas rojas indican el momento en el que se realizó la prueba de intradermorreacción (IDR).

No se apreciaron diferencias significativas entre las ovejas adultas procedentes del rebaño en el que se observaron casos ocasionales de paratuberculosis (P), de las procedentes de la explotación libre (L), por lo que no se ha tenido en cuenta este factor y los valores se han representado de forma conjunta. Tal y como se aprecia en el gráfico IV.1, la respuesta humoral mostró un patrón diferente a lo largo de este estudio en función del grupo experimental. Entre los días 0 a 45 dpi, no se observaron diferencias estadísticamente significativas dentro de los grupos de ovejas, ni dentro de los corderos, independientemente del tratamiento experimental. En cambio, los títulos de anticuerpos

anti-*Map* fueron significativamente mayores en los 3 grupos de ovejas con respecto a los 3 mismos grupos de corderos ($p < 0,05$). A partir de los **60 dpi**, la respuesta humoral de las **ovejas** de los grupos infectados con “dosis baja” y “dosis alta” de *Map* empezó a mostrar un marcado incremento, con diferencias muy significativas respecto a los corderos ($p < 0,001$ a los 60 dpi, y $p < 0,001$ a los 75 dpi). Dichas diferencias se hicieron aún más evidentes entre los muestreos de los 110-130 dpi, cuando la respuesta humoral de las ovejas infectadas con “dosis alta” de *Map* se elevó hasta alcanzar un valor significativamente superior al de los demás grupos de ovejas y corderos ($p < 0,05$). Además, a los **110 dpi**, cabe destacar también el incremento de la respuesta humoral del grupo de **corderos** infectados con “dosis alta” de *Map*, que, a pesar de ser inferior a la de las ovejas del mismo grupo, fue significativamente más elevada que la de los demás corderos, así como del resto de ovejas ($p < 0,05$). A continuación, desde los 145 hasta los 195 dpi, los títulos de anticuerpos anti-*Map* disminuyeron significativamente con respecto al muestreo anterior (110 dpi), si bien dicha respuesta se mantuvo siempre más elevada en las ovejas y corderos procedentes del grupo de “dosis alta” de *Map* que en los demás grupos ($p < 0,05$). Finalmente, los mayores títulos de anticuerpos se alcanzaron en el último muestreo (210 dpi), tras un brusco incremento de la respuesta humoral en todos los grupos experimentales de este estudio. Este último incremento fue significativamente superior en las ovejas de “dosis alta” de *Map* con respecto a todos los demás grupos ($p < 0,001$), seguido del de los corderos de este mismo grupo, mayor que el de las ovejas y corderos controles y de “dosis baja” de *Map* ($p < 0,001$).

La aparición de estos dos incrementos puntuales en la respuesta humoral frente a *Map*, a los 110 y a los 210 dpi, significativamente mayor en el caso de los animales infectados con “dosis alta” de *Map*, y a su vez más altos en las ovejas que en los corderos, se produce en ambos casos unos 15-20 días tras la realización de la prueba de la IDR (90 y 195 dpi, respectivamente) (gráfico IV.1).

Los niveles de anticuerpos en suero alcanzaron el valor máximo a los 210 dpi, siendo significativamente superiores en comparación con los demás muestreos, especialmente con respecto al período entre los 0 y 90 dpi, en todos los grupos de ovejas y corderos de este estudio ($p < 0,05$). En el grupo de ovejas control, en cambio, no se apreciaron diferencias estadísticamente significativas a lo largo de los muestreos en el nivel sérico de anticuerpos. A los 210 dpi, el cociente de DO de las ovejas y corderos de

“dosis alta” de *Map* alcanzó valores levemente superiores a 900, umbral de positividad establecido para esta técnica cuando se utiliza para fines diagnóstico en el caso de infecciones naturales.

IV.1.2. RESPUESTA INMUNE CELULAR

IV.1.2.1. Resultados de la prueba del Interferón gamma (IFN- γ)

En el gráfico IV.2 se representa la evolución de la producción de **IFN- γ específico** por los linfocitos circulantes, expresada como el valor medio de los animales que formaban cada grupo experimental, a lo largo del tiempo. No se encontraron diferencias significativas entre las ovejas adultas procedentes de los rebaños “P” y “L”, por lo que se representan los resultados en conjunto. Los valores específicos individuales vienen detallados en las tablas X.3 y X.4 de los anexos.

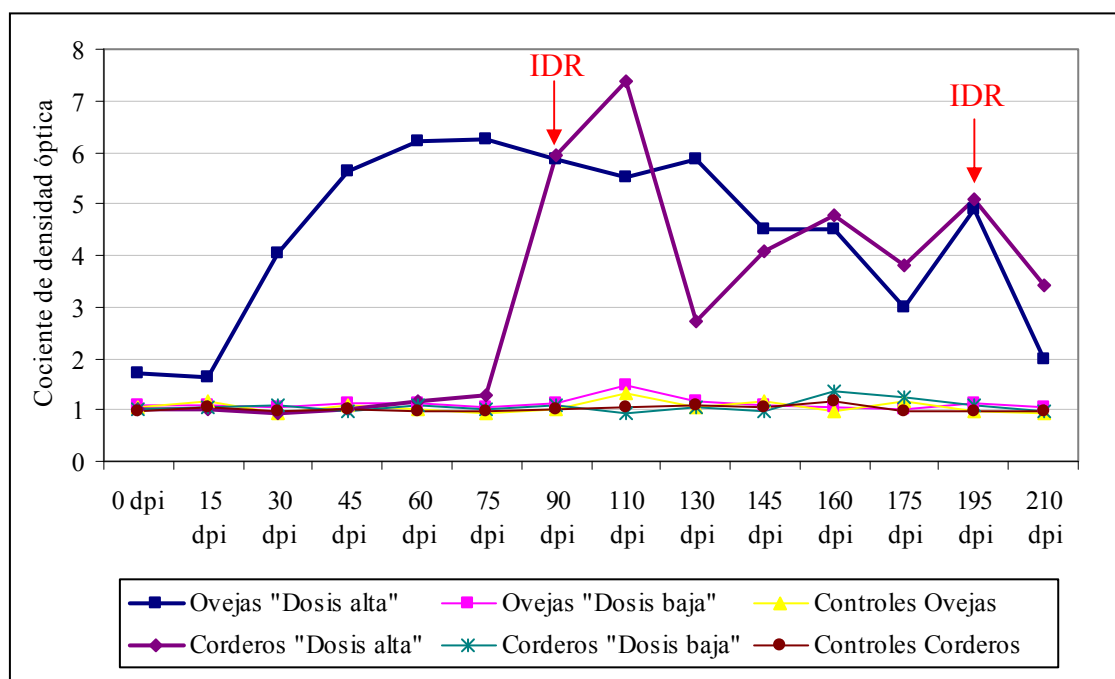


Gráfico IV.2. Evolución de la **producción de IFN- γ** a lo largo del estudio según **cada grupo experimental**, tanto en los **corderos** como en las **ovejas adultas**. Los valores representados se obtuvieron calculando la media hallada en los diferentes muestreos dentro de cada grupo. Los resultados se expresan como un cociente entre el valor de la absorbancia de cada plasma esimulado con PPD aviar y la densidad óptica del mismo plasma incubado con PBS. Las flechas rojas indican el momento en el que se realizó la prueba de intradermorreacción (IDR).

No se apreciaron diferencias estadísticamente significativas a lo largo de los 14 muestreos de esta infección experimental en los corderos y ovejas del grupo control, ni en aquellos pertenecientes al grupo de animales infectados con “dosis baja” de *Map*,

manteniendo todos ellos una producción media de IFN- γ con valores muy bajos durante el transcurso del estudio.

En cambio, los animales infectados con “dosis alta” de *Map* mostraron una respuesta claramente superior con respecto a los ovinos infectados con “dosis baja” de *Map* y los pertenecientes al grupo control. La producción específica de IFN- γ de las **ovejas** del grupo de “**dosis alta**” de *Map* empezó a incrementarse de forma precoz, a partir de los **30 dpi**, manteniendo niveles estadísticamente superiores con respecto a los demás grupos hasta el final del estudio ($p < 0,05$), alcanzando los valores máximos entre los 45 y 130 dpi, y disminuyendo paulatinamente hasta el final del experimento. Por otro lado, los niveles de IFN- γ secretado por los linfocitos circulantes de los **corderos** infectados con “**dosis alta**” de *Map* incrementaron de manera más tardía, a partir de los **90 dpi**, y mediante una subida más brusca, alcanzando los valores máximos a los 110 dpi, con diferencias significativas con respecto a los animales controles e infectados con “dosis baja” de *Map* ($p < 0,001$). Estos corderos mantuvieron valores significativamente superiores a los animales controles y del grupo de “dosis baja” hasta el final del estudio ($p < 0,05$), salvo a los 130 dpi, cuando los niveles de IFN- γ disminuyeron de forma pronunciada, antes de volver a incrementar en el muestreo siguiente.

En el último muestreo (210 dpi), a pesar de mantenerse con valores superiores a los demás grupos, la producción de IFN- γ tanto de las ovejas como de los corderos infectados con “dosis alta” de *Map* disminuyó con respecto al muestreo anterior, de manera más significativa en el caso de las ovejas ($p < 0,05$).

Desde los 30 dpi en el caso de las ovejas, y a partir de los 90 dpi en los corderos pertenecientes al grupo infectado con “dosis alta” de *Map*, la secreción de IFN- γ en respuesta a la estimulación con PPD aviar superó el umbral establecido para esta técnica como “positivo” (cociente ≥ 2) en casos de infección natural. La oveja 18, positiva a dicha prueba desde el inicio del estudio, no experimentó cambios significativos con respecto a los demás animales del mismo grupo, salvo una mayor producción neta de IFN- γ , que fue disminuyendo paulatinamente hasta los 210 dpi, al igual que las demás ovejas (Tabla X.3 de los anexos).

Por otro lado, también se estudió la evolución de la **producción basal bruta de IFN- γ (IFN- γ_0)**, expresada como el valor de absorbancia de los plasmas tras la incubación con PBS, para analizar el patrón de respuesta inmune celular inespecífica desarrollado en cada grupo de animales (gráfico IV.3). Los valores concretos de cada animal vienen recogidos en las tablas X.5 y X.6 de los anexos.

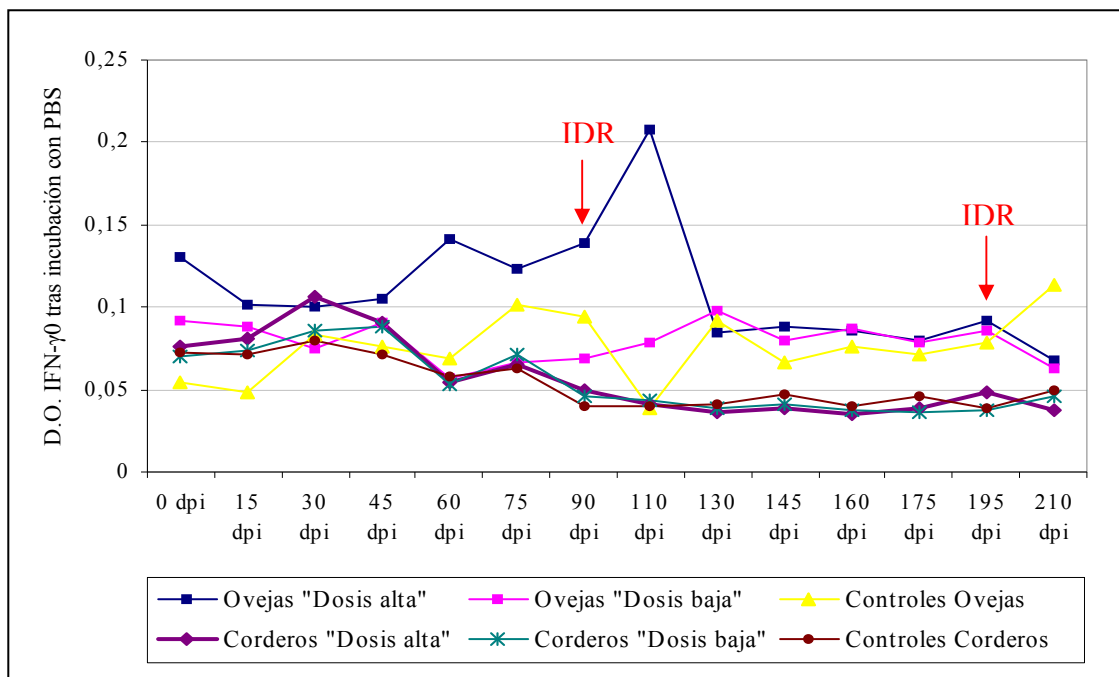


Gráfico IV.3. Evolución del IFN- γ_0 a lo largo del estudio en **cada grupo experimental**, tanto en los **corderos** como en las **ovejas adultas**. Los resultados representados se obtuvieron calculando la media del valor de la absorbancia de cada plasma incubado con PBS en los diferentes muestreos, dentro de cada grupo. D.O.: Densidad óptica. Las flechas rojas indican el momento en el que se realizó la prueba de intradermoreacción (IDR).

No se observaron diferencias estadísticamente significativas en los 3 grupos de corderos, ni tampoco en las ovejas controles y aquellas infectadas con “dosis baja” de *Map* a lo largo de todo el experimento, y la cantidad de IFN- γ_0 producido por estos animales permaneció en niveles bajos (Gráfico IV.3).

En cambio, el patrón de producción inespecífica de IFN- γ_0 en las **ovejas adultas** infectadas con “**dosis alta**” de *Map* varió durante el transcurso del experimento, incrementándose desde el inicio del estudio hasta alcanzar los valores máximos a los **110 dpi**, con niveles significativamente superiores ($p < 0,05$) con respecto a los muestreos anteriores (0-75 dpi) y posteriores (130-210 dpi). Desde los días 130 a 195 posinfección, la secreción basal de IFN- γ_0 de estas ovejas se mantuvo en niveles bajos, y, finalmente, disminuyó en el último muestreo (210 dpi) hasta valores inferiores a los

del inicio del experimento, e incluso con diferencias significativas con respecto a los días 60, 90 y 110 posinfección ($p < 0,05$).

En comparación con los demás grupos de este estudio, las ovejas adultas infectadas con “dosis alta” de *Map* secretaron cantidades basales de IFN- γ_0 significativamente superiores a las de todos los corderos así como a las ovejas infectadas con “dosis baja” de *Map* a los 60 y 90 dpi ($p < 0,01$). A los 110 dpi, dichas diferencias fueron muy significativas con respecto a todos los corderos ($p < 0,001$) y demás ovejas del estudio ($p < 0,01$) (Gráfico IV.3).

Por último, a continuación se muestra la evolución de la **secreción bruta específica de IFN- γ** tras la incubación con PPD aviar, sin haber corregido dichos valores con la producción inespecífica de dicha citoquina. El valor de absorbancia de los plasmas en cada grupo experimental tras la estimulación con dicha PPD viene representado en el gráfico IV.4. Los valores concretos de cada animal vienen detallados en las tablas X.7 y X.8 de los anexos.

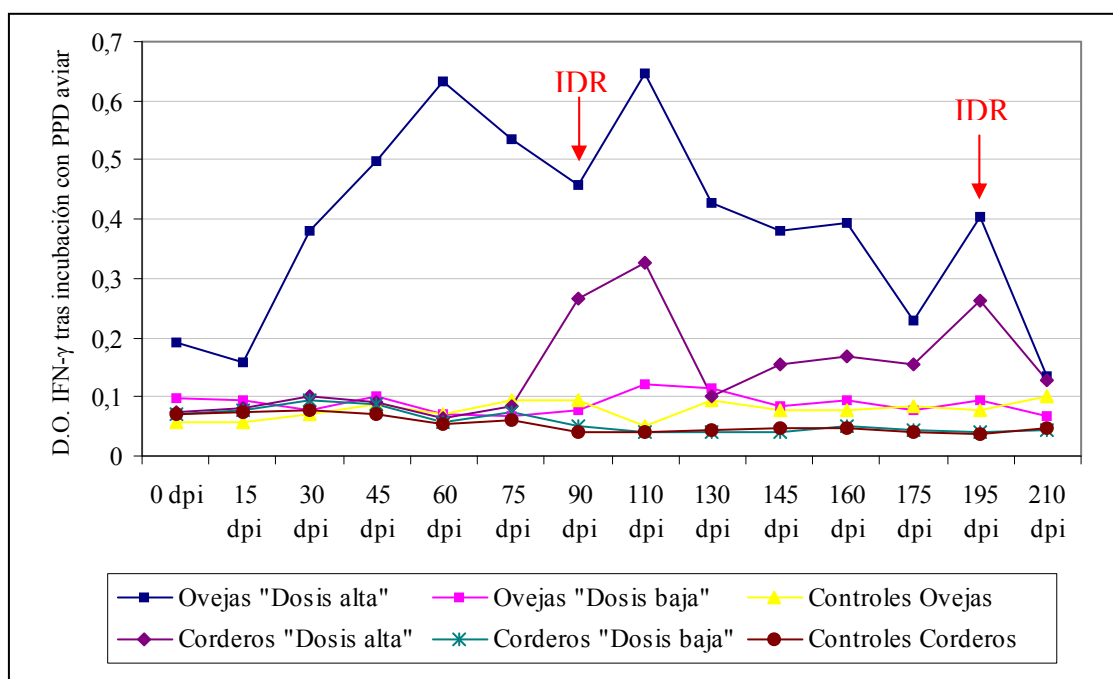


Gráfico IV.4. Evolución del IFN- γ específico bruto a lo largo del estudio en **cada grupo experimental**, tanto en los **corderos** como en las **ovejas adultas**. Los resultados representados se obtuvieron calculando la media del valor de la absorbancia de cada plasma incubado con PPD aviar en los diferentes muestreos, dentro de cada grupo. D.O.: Densidad óptica. Las flechas rojas indican el momento en el que se realizó la prueba de intradermorreacción (IDR).

Tras el análisis estadístico, no se encontraron diferencias significativas en cuanto a la producción específica bruta de IFN- γ en el transcurso del experimento en los grupos de **ovejas y corderos controles** e infectados con “**dosis baja**” de *Map* (Gráfico IV.4).

En cambio, el patrón de secreción específica de IFN- γ tras la estimulación con PPD aviar, varió a lo largo de los 210 días del estudio en los corderos y ovejas infectados con “**dosis alta**” de *Map*. En los **corderos**, los niveles de IFN- γ se mantuvieron bajos y homogéneos desde el inicio del experimento hasta los 75 dpi. Sin embargo, incrementaron de forma marcada entre los muestreos **90 y 110 dpi**, con diferencias significativas con respecto a los muestreos anteriores ($p < 0,05$). A los 130 dpi, la secreción específica de dicha citoquina experimentó una disminución significativa en comparación con el muestreo anterior ($p < 0,05$), seguida de una nueva subida hasta los 195 dpi, para finalmente volver a disminuir en el último muestreo (210 dpi). En cuanto a las **ovejas** de este mismo grupo, la producción específica de IFN- γ empezó a incrementar de forma precoz, desde los **30 dpi**, manteniendo diferencias significativas con respecto a los muestreos iniciales (0-15 dpi) hasta los 160 dpi, y también a los 195 dpi ($p < 0,05$). La mayor secreción de dicha citoquina se alcanzó en los muestreos 60 y 110 dpi, con diferencias significativas en comparación con los días 0 y 30 posinfección, así como con respecto al período 130-210 dpi ($p < 0,05$). Finalmente, en el último muestreo (210 dpi), los niveles de IFN- γ producidos por las ovejas disminuyeron de forma significativa con respecto al muestreo anterior (195 dpi) ($p < 0,05$).

Comparando entre los diferentes grupos experimentales, la producción específica de IFN- γ de las **ovejas** infectadas con “**dosis alta**” de *Map* fue significativamente mayor a los demás grupos de ovinos desde los **30 dpi** hasta los 160 dpi ($p < 0,05$). No se observaron diferencias estadísticamente significativas a los 175 y 210 dpi; en cambio, a los 195 dpi, la producción bruta específica de dicha citoquina en las ovejas de este mismo grupo fue significativamente mayor que la de los animales infectados con “dosis baja” de *Map* así como de los controles ($p < 0,01$). En cuanto a la secreción bruta específica de IFN- γ en los **corderos** infectados con “**dosis alta**” de *Map*, a pesar de mantenerse con niveles inferiores a la de las ovejas de este mismo grupo durante todo el experimento, se empezó a desmarcar de los demás grupos desde los **90 dpi** hasta el final del estudio (salvo a los 130 dpi), de forma significativa con respecto a

los demás corderos así como a las ovejas infectadas con “dosis baja” a los 90 dpi ($p < 0,05$), y únicamente con respecto a los demás corderos a los 110 dpi ($p < 0,05$) (Gráfico IV.4).

IV.1.2.2. Resultados de la prueba de IDR

Esta prueba se realizó, de forma comparada, a los 90 dpi en todos los animales, y a los 195 dpi en los individuos restantes tras el primer sacrificio. Tal y como se aprecia en el gráfico IV.5, donde vienen representados los incrementos medios del grosor del pliegue anocaudal de los **corderos** tras la inoculación de 0,1 ml de PPD aviar y bovina, los animales infectados con “**dosis alta**” de *Map* presentaron un resultado significativamente mayor con respecto al grupo de animales infectados con “dosis baja” y al de los controles ($p < 0,001$), siendo además los únicos que ofrecieron una respuesta considerada como **positiva**, es decir superior a 2 mm. La reacción fue más intensa a la PPD aviar que a la bovina tanto a los 90 como a los 195 dpi (Figura IX.6).

Los resultados de esta prueba fueron muy similares en las **ovejas adultas**, al evidenciarse una reacción **positiva** y significativamente mayor en los animales infectados con “**dosis alta**” de *Map* en comparación con aquellos infectados con “dosis baja” y los animales del grupo control ($p < 0,001$) (Gráfico IV.6). Además, a los 90 dpi, la reacción a la IDR de estas ovejas adultas tras la inoculación de PPD aviar fue significativamente más intensa ($p < 0,001$) que la de los corderos del mismo grupo (infectados con 10^{10} UFC de *Map*). Sin embargo, a diferencia de los corderos, la respuesta a la IDR en el segundo test (4,5 mm), en las ovejas adultas, fue menos intensa que en el primero (7 mm), siendo estas diferencias significativas ($p < 0,001$). Otro de los hallazgos destacables fue la ligera reacción basal a la IDR observada en las ovejas, tanto en los animales controles como aquellos infectados con “dosis baja” de *Map*, con valores superiores a los de los corderos de los mismos grupos, alcanzando diferencias estadísticamente significativas a los 195 dpi en el caso de las ovejas infectadas con “dosis baja” de *Map* en comparación con estos últimos corderos ($p < 0,05$). Por último, al igual que sucedió en los corderos, la respuesta fue siempre mayor en el pliegue inoculado con PPD aviar que con PPD bovina (Figura IX.7).

Los valores específicos del incremento de cada animal en las dos IDRs se muestran en las tablas X.9 y X.10 de los anexos.

En las muestras de piel de las zonas de tuberculinización, independientemente de la inoculación con la PPD aviar o bovina, se apreció una inflamación de la dermis superficial y profunda, cuya distribución (de multifocal a difusa) y gravedad eran directamente proporcionales al incremento macroscópico observado en la piel de la zona inoculada. El infiltrado inflamatorio era fundamentalmente de tipo linfoplasmocitario, observándose también macrófagos, escasos neutrófilos, y un ligero edema. La dermatitis presentó un patrón principalmente perivascular, y las células inflamatorias aparecían de forma más dispersas y en menor número en el caso de los animales controles y aquellos cuya reacción a dicha prueba fue leve o nula. En cambio, en los casos con reacción mas intensa, se pudo apreciar la presencia de una leve escara haciendo prominencia sobre la epidermis, constituida por material necrótico junto con abundantes neutrófilos (Figura IX.8).

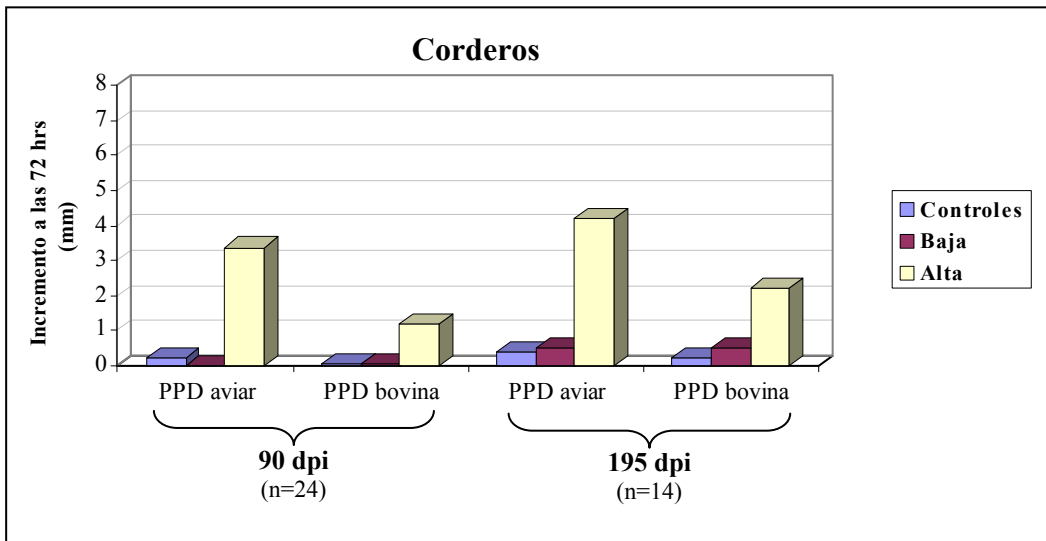


Gráfico IV.5. Resultados de la prueba de la IDR comparada realizada a los 90 y 195 dpi en los **corderos**, expresados como el valor medio del incremento del grosor cutáneo en mm, del pliegue anocaudal a las 72 horas de la inoculación con PPD aviar y con PPD bovina, respectivamente.

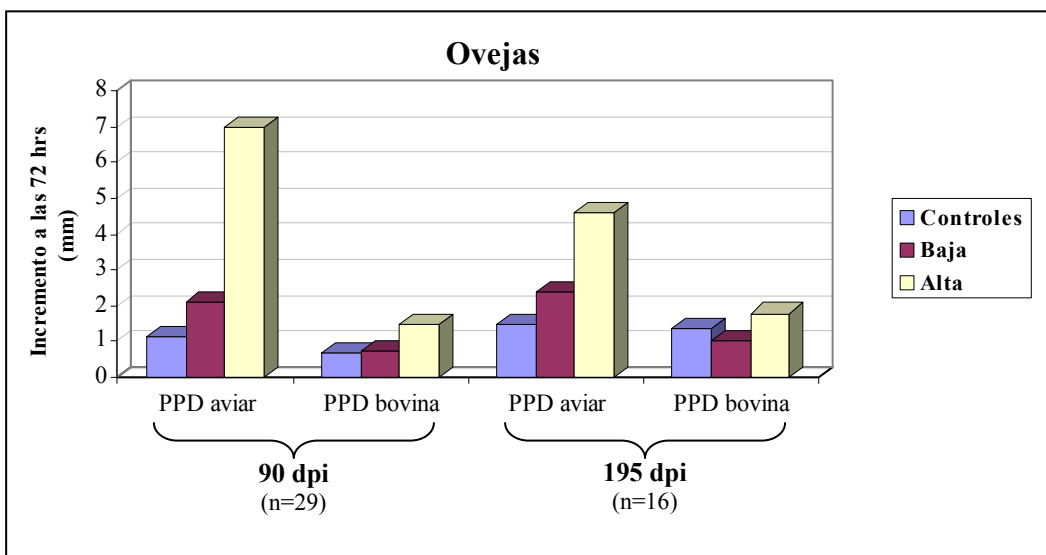


Gráfico IV.6. Resultados de la prueba de la IDR comparada realizada a los 90 y 195 dpi en las **ovejas adultas**, expresados como el valor medio del incremento del grosor cutáneo en mm, del pliegue anocaudal a las 72 horas de la inoculación con PPD aviar y con PPD bovina, respectivamente.

IV.2. RESULTADOS ANATOMOPATOLÓGICOS

No se observaron signos clínicos asociados a la paratuberculosis en ninguno de los animales estudiados durante los 7 meses que duró la infección experimental. Los diferentes animales sacrificados se indican a continuación en la tabla IV.1.

Grupos:	1er sacrificio: 100-120 dpi		2º sacrificio: 210-220 dpi	
	Ovejas:	Corderos:	Ovejas:	Corderos:
1- Controles	1 y 5	31, 32 y 35	2, 3, 6 y 7	34, 36, 37 y 38
2- “Dosis Baja” (10^3 Map)	8, 13, 14 y 17	39, 41 y 45	10, 11, 12, 15 y 16	40, 42, 43, 44 y 46
3- “Dosis Alta” (10^{10} Map)	19, 22, 23, 25, 27 y 30	47, 51 y 54	18, 20, 21, 24, 26, 28 y 29	48, 49, 50, 52 y 53

Tabla IV.1. Diseño experimental. Identificación de los animales de cada grupo experimental sacrificados a los 100-120 dpi y 210-220 dpi.

IV.2.1. HALLAZGOS MACROSCÓPICOS.

Intestino y nódulos linfáticos mesentéricos:

No se observaron lesiones macroscópicas compatibles con paratuberculosis en ninguno de los animales, independientemente del momento del sacrificio, con la excepción de la oveja 28, sacrificada a los 210-220 dpi, en la que se apreció una leve linfangiectasia en la serosa de una PPYd, y el cordero 49, en el que se observó un leve engrosamiento focal de la pared del intestino en el yeyuno medio.

Sin embargo, se apreciaron diferencias en la distribución y cantidad de tejido linfoide intestinal entre los animales adultos y jóvenes. Las ovejas no presentaron placas de Peyer en el íleon mientras que en los corderos este tejido linfoide apareció en forma de placa continua en esta localización (Figura IX.9). En el yeyuno, dichas placas se presentaban de forma discontinua, encontrándose diferente número según si se trataba de ovejas adultas o de corderos (Tabla IV.2). De manera general, los corderos presentaron siempre mayor cantidad de placas de Peyer yeyunales, pero además dichas placas eran de mayor grosor y mayor tamaño que las de las ovejas, donde no hacían

apenas prominencia sobre la mucosa intestinal, por lo que fue mucho más difícil detectar su presencia. Se contaron unas 16 PPY de media por animal adulto, mientras que en los jóvenes el número medio era casi el doble (29) por animal (Tabla IV.2).

	Número medio de placas de Peyer yeyunales (desviación estándar):			
	PPYd	PPYm	PPYp	Media del total PPYs
Ovejas	5,43 (±1,36)	4,25 (±1,57)	6,56 (±2,66)	16,25 (±3,17)
Corderos	10,83 (±2,48)	9,5 (±2,81)	9 (±2)	29 (±6,75)

Tabla IV.2. Media del número de placas de Peyer yeyunales (PPY) encontradas durante la necropsia de cada animal sacrificado, tanto a nivel distal (PPYd), medio (PPYm) o proximal (PPYp), así como sumando los tres niveles (total de PPYs), en las ovejas adultas y en los corderos. Entre paréntesis, se indica la desviación estándar.

No se observaron lesiones macroscópicas en los nódulos linfáticos mesentéricos en ningún caso.

Otros órganos y tejidos:

No se observaron lesiones de mayor relevancia en el resto de órganos y tejidos, con la excepción de algunos hallazgos detallados a continuación:

- Presencia de quistes hidatídicos colapsados y calcificados en el hígado de cuatro ovejas (3, 10, 15 y 30) y en pulmones de dos (3 y 15), siempre en número escaso.
- Vesículas de *Cysticercus tenuicollis* (1-3 vesículas por animal) en cuatro ovejas (2, 13, 16 y 28), en la cavidad abdominal.
- Presencia de una abomasitis crónica leve, con la formación de proliferaciones nodulares sobre la mucosa, asociada a la parasitación por *Ostertagia* spp, en siete ovejas (3, 10, 15, 16, 26, 28 y 29).
- Sarcosporidiosis esofágica leve en cinco ovejas adultas (10, 15, 16, 26 y 29).
- Neumonía catarral focal y leve en dos corderos (43 y 49).
- Neumonía intersticial crónica (Maedi) leve en una oveja adulta (2).
- Osteoperiodontitis crónica necrótica en la rama mandibular derecha de una oveja adulta (10).

IV.2.2. HALLAZGOS HISTOLÓGICOS.

En el estudio histológico se confirmaron las diferencias observadas macroscópicamente en cuanto a la mayor densidad del tejido linfoide de las placas de Peyer en corderos frente al de las ovejas (Figura IX.10).

No se observaron lesiones compatibles con paratuberculosis en ninguna de las secciones de tejido examinadas de los animales controles no infectados, ni tampoco en las ovejas o corderos pertenecientes al grupo de infectados con “dosis baja” de *Map*, por lo que en este apartado la descripción de las observaciones histológicas compatibles con esta enfermedad se centrará únicamente en aquellos animales infectados con “**dosis alta**” de *Map* (Grupo 3).

El estudio histológico se realizó siguiendo los criterios propuestos por Pérez *et al.*, (1996) en la especie ovina, clasificando las lesiones asociadas a la infección paratuberculosa en función de la presencia de lesiones granulomatosas, de su intensidad y extensión, así como del tipo celular predominante en el infiltrado inflamatorio, y poniendo especial atención a la localización de dichas lesiones en los diferentes compartimentos del intestino. Así, las lesiones fueron clasificadas como **focales** cuando los granulomas se localizaban exclusivamente en el tejido linfoide intestinal, independientemente de si eran muchos o pocos. En cuanto dichas lesiones se observaban también en la LP, éstas se clasificaron como **multifocales**, siempre y cuando la estructura normal de la mucosa intestinal no se viera alterada de manera difusa. Dentro de esta categoría, se establecieron en este estudio otras dos subcategorías:

Multifocal a: cuando se encontraron granulomas en la LP asociada al tejido linfoide de las placas de Peyer. Estas lesiones se corresponderían con las del tipo 2 de la clasificación propuesta por Pérez *et al.*, (1996).

Multifocal b: cuando dichos granulomas se extendían hacia zonas de mucosa **no** relacionada con el tejido linfoide de las placas de Peyer, afectando a varias vellosidades con distribución multifocal, sin llegar a provocar una enteritis difusa. Este tipo de lesiones se correspondería con el subtipo 3a de la clasificación establecida por Pérez *et al.*, (1996) en la especie ovina.

No se encontraron lesiones de carácter difuso en ningún animal examinado, tal y como se puede comprobar en los apartados siguientes, donde se exponen las lesiones granulomatosas encontradas de forma más detallada.

En primer lugar se **definen** y **describen** el **tipo de lesiones** asociadas a paratuberculosis encontradas tanto en los corderos como en las ovejas infectadas con “**dosis alta**” de *Map*. A continuación se determina la **distribución y extensión** de dichas lesiones en el intestino y nódulos linfáticos asociados mediante el **recuento de granulomas**, y finalmente, según dichos resultados, se propone una **clasificación lesional** para cada animal. En el último subapartado se resumen las lesiones no relacionadas con paratuberculosis halladas en los animales experimentales.

IV.2.2.1. Lesiones asociadas a paratuberculosis

Dentro del grupo de animales infectados con “**dosis alta**” de *Map*, se encontraron diferencias en las lesiones observadas y el tipo de granulomas entre los corderos y las ovejas adultas, por lo que los resultados se presentarán por separado.

IV.2.2.1.1. Corderos

Los 8 corderos del grupo de “**dosis alta**” (100%) mostraron algún tipo de lesión compatible con paratuberculosis. En ambos sacrificios se encontraron pequeños granulomas, de distribución focal, localizados en el espacio interfolicular del tejido linfoide de las placas de Peyer (Figuras IX.11 y 12), distribuyéndose desde la zona basal, hasta, en ocasiones, extendiéndose hacia las zonas apicales de las placas. En algunas ocasiones, los granulomas confluían (Figura IX.13), incrementando su tamaño hasta incluso alterar la estructura normal del tejido linfoide local (lesiones de **tipo focal**). En otras ocasiones, los granulomas se extendían en número variable hacia la LP asociada a placas de Peyer, desde su zona basal (Figuras IX.14 y 15), hasta el ápice de las vellosidades (Figura IX.16) (lesiones de **tipo multifocal a**), e incluso a veces invadían parte de la mucosa no relacionada con dicho tejido linfoide (**multifocal b**) (Figura IX.17). Estos granulomas se caracterizaron por estar formados principalmente por macrófagos de morfología homogénea, mostrando abundante citoplasma eosinófilo

y núcleo voluminoso con escasa heterocromatina, así como por escasos linfocitos dispersos entre dichas células (Figura IX.18). No se encontraron células gigantes formando parte de los granulomas.

Además, en dos de los tres corderos del primer sacrificio (47 y 51) y especialmente en dos de los que fueron sacrificados al final del experimento (48 y 49), los granulomas llegaron a provocar el ensanchamiento de algunas vellosidades y a alterar parcialmente la estructura normal de algunas áreas de mucosa intestinal, causando lesiones casi difusas. Sin embargo, el engrosamiento ocasionado siempre fue moderado y localizado, y las vellosidades afectadas por este infiltrado inflamatorio se alternaban con otras que no mostraban lesiones apreciables, por lo que las lesiones de estos animales no llegaron a clasificarse como difusas, sino como *multifocales b* (Figura IX.19).

En estos cuatro corderos (47, 48, 49 y 51) también se observaron lesiones granulomatosas en los nódulos linfáticos ileocecales y el mesentérico caudal (Figura IX.20). En estos casos los granulomas eran muy numerosos, constituidos por macrófagos con abundante citoplasma, similares a los descritos, que llegaban a confluír, extendiéndose por todo el área interfolicular y paracortical, con distribución multifocal. En concreto, los granulomas de los corderos 48 y 49 tenían un tamaño de entre 20 a 50 células, mientras que los de los corderos 51 y 54 llegaban a extenderse casi de manera difusa por toda la zona paracortical, con granulomas de hasta 100 células (Figura IX.21). También se vieron afectados los nódulos linfáticos mesentéricos caudales de los corderos 50 y 52, y el yeyunal de este último cordero y del 49, aunque con lesiones menos extensas, caracterizadas por la presencia de pequeños granulomas focales, de menos de 10 células, en el espacio interfolicular de la zona cortical (Figura IX.22).

IV.2.2.1.2. Ovejas

Se observaron lesiones compatibles con paratuberculosis en 12 de las 13 ovejas (92,3%) infectadas con “dosis alta” de *Map* (la oveja número 30 no presentó lesiones), independientemente del rebaño de procedencia, si bien en estos animales el tipo de granulomas y su extensión era muy diferente al observado en los corderos. La presencia de granulomas estaba restringida al espacio interfolicular del tejido linfoide de las

placas de Peyer, principalmente en su zona basal, y en pocas ocasiones se observaban en el área apical; en ningún caso llegaban a encontrarse en la LP (lesiones de **tipo focal**) (figura IX.23). Aunque en este caso los granulomas estaban también formados por macrófagos, a diferencia de los corderos, siempre fueron más pequeños y de morfología más esférica y estaban muy bien delimitados del tejido adyacente, mostrando un carácter “regresivo” (Figura IX.24). Además, en alguna ocasión llegaron a presentar un inicio de fibrosis caracterizada por la presencia de escasas fibras conjuntivas dispersas entre los macrófagos (Figura IX.25).

En cuanto a los nódulos linfáticos, se encontró un número muy bajo de granulomas focales y de pequeño tamaño en la zona paracortical de los nódulos linfáticos ileocecales y mesentéricos de 6 ovejas de las 13 (46,15%) infectadas con “dosis alta” de *Map* (Tabla IV.6). Estos granulomas estaban formados generalmente por apenas 5-8 células macrofágicas (Figura IX.26), y no confluían en ningún momento.

La única excepción dentro de las 12 ovejas con lesiones compatibles con paratuberculosis fue la oveja 28, sacrificada al final del experimento y procedente del rebaño libre de paratuberculosis, en la que se observó un gran número de granulomas, algunos de gran tamaño y confluyendo, con presencia de alguna célula gigante multinucleada de tipo Langhans, de unos 5-6 núcleos, que se extendían desde las placas de Peyer ileocecales y yeyunal distal hacia la LP adyacente (lesiones de **tipo multifocal a**) (Figura IX. 27). Además, este animal presentó una leve linfangitis granulomatosa de distribución multifocal y caracterizada por un infiltrado inflamatorio constituido por macrófagos, linfocitos así como escasas células multinucleadas en la submucosa y serosa intestinal de la VIC (Figuras IX. 28 y 29).

IV.2.2.2. Recuento y distribución de los granulomas

Para determinar la extensión de las lesiones y poder comparar su evolución en cada animal desde el momento del primer sacrificio (100-120 dpi) hasta el final del experimento (210-220 dpi), así como para conocer las posibles diferencias entre jóvenes y adultos, se procedió a un recuento exhaustivo de granulomas, distinguiéndoles **por compartimentos** entre aquellos localizados en el tejido linfoide intestinal y en la LP asociada o no a dicho tejido. Estos resultados se muestran detallados por animal en la

tabla IV.3 y en el gráfico IV.7, así como resumidos en el gráfico IV.8, donde se representan los valores medios de los granulomas contados por cada sección de tejido y en cada sacrificio.

Un hallazgo destacable dentro del **primer sacrificio** fue que el número medio del total de granulomas contados en cada cordero (85,55) era significativamente superior ($p < 0,01$) al de las ovejas adultas (19,37) (Gráfico IV.8). Además, aquéllos fueron los únicos en presentar lesiones granulomatosas en lámina propia, tanto en relación con el tejido linfoide (corderos 47, 51 y 54) como incluso en lámina propia no asociada a dicho tejido (corderos 51 y 54). En cambio, las lesiones en las ovejas adultas aparecieron en menor número y restringidas a las placas de Peyer (Gráficos IV.7 y 8; Tabla IV.3).

En los animales del **segundo sacrificio**, llevado a cabo unos 100-120 días tras el primero, se pudo constatar, en el caso de los **corderos**, la marcada y significativa disminución del número de granulomas encontrados en el tejido linfoide en comparación con el primer sacrificio ($p < 0,05$), incrementándose levemente la cantidad de aquellos localizados en LP (Gráfico IV.8), sobre todo en los corderos 48 y 49, donde las lesiones se extendían también hacia mucosa no relacionada con el tejido linfoide y fueron más graves, tal y como se describió en el apartado IV.2.2.1.1. Sin embargo, en las **ovejas adultas**, el número total de granulomas contados por animal (24,03) seguía siendo menor que en los corderos (42,05) ($p < 0,05$), y las lesiones sólo se encontraron en el tejido linfoide de las placas de Peyer en los 6 animales, con la excepción de la oveja 28, único animal adulto infectado en el que se apreció una extensión de la lesión hacia la LP. Este último animal, así como la oveja 29, caben ser destacados por el elevado número de granulomas formados en el tejido linfoide intestinal (Tabla IV.3, gráfico IV.7).

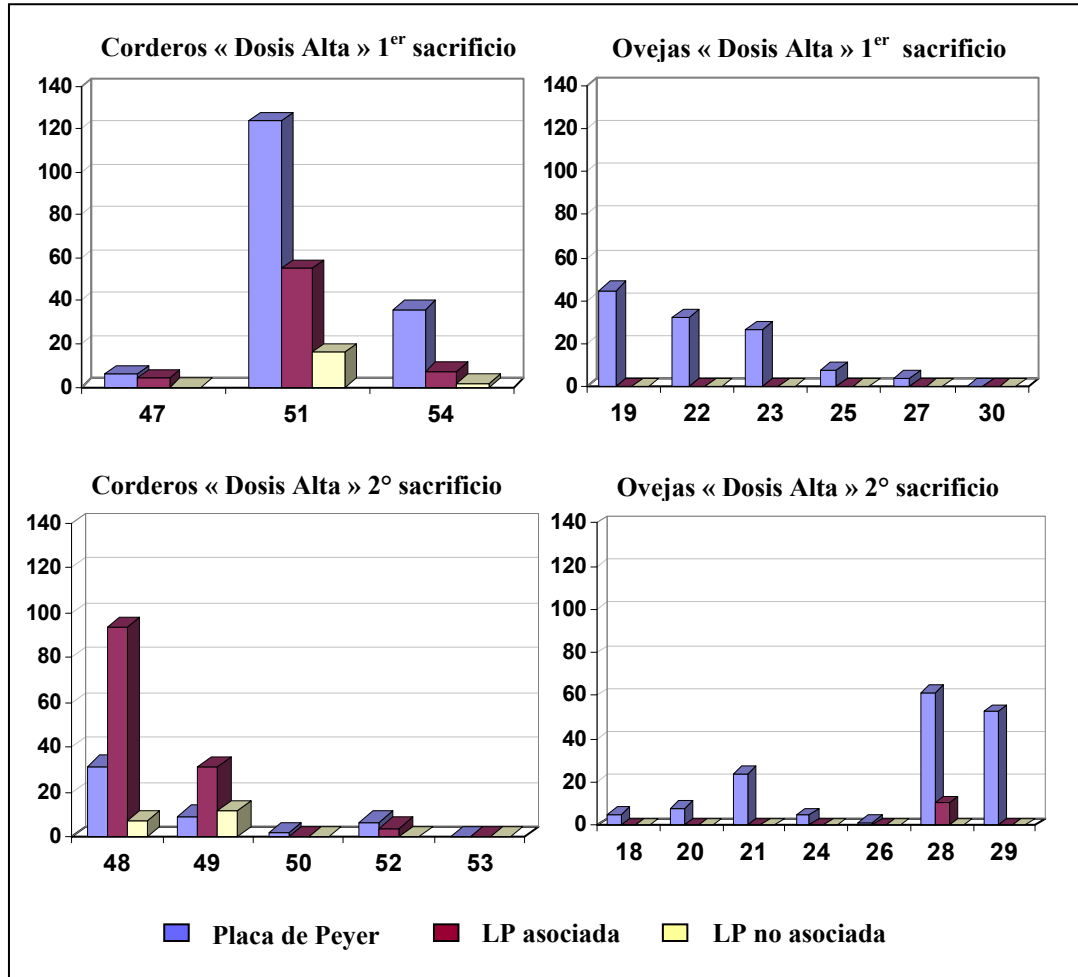


Gráfico IV.7. Número de granulomas según su distribución en los diferentes compartimentos intestinales de cada cordero y oveja infectados con “dosis alta” de *Map*, tanto en el primer como en el segundo sacrificio. Se representa el número medio de granulomas por cada sección de tejido. LP asociada: Lámina propia asociada a la placa de Peyer; LP no asociada: Lámina propia no relacionada a la placa de Peyer.

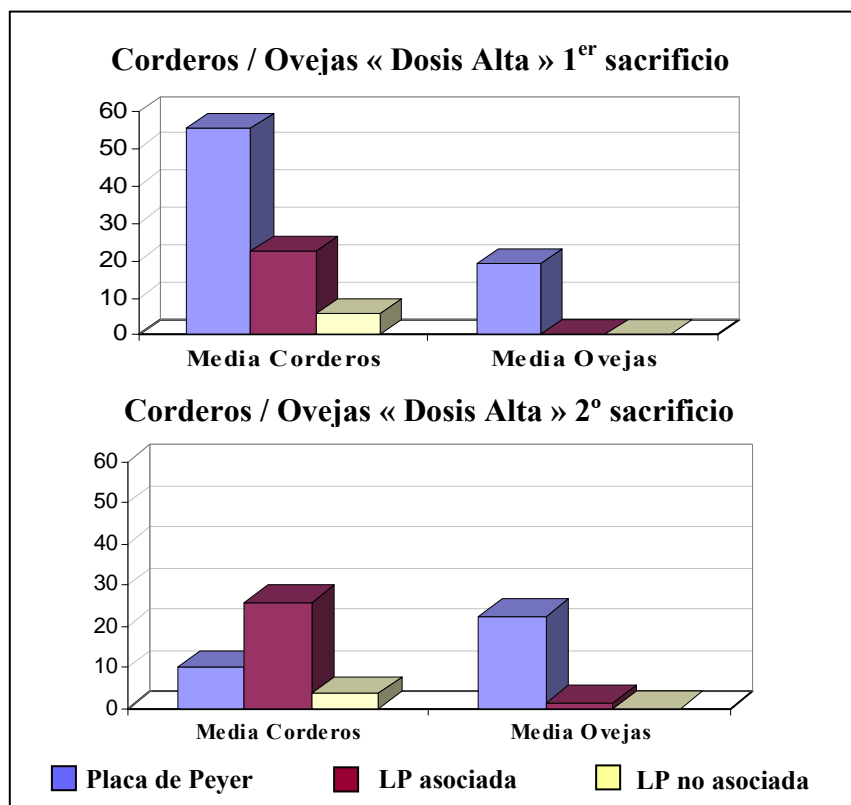


Gráfico IV.8. Valor medio del número de granulomas según su distribución en los diferentes compartimentos intestinales de los corderos y ovejas infectados con “dosis alta” de *Map*, tanto en el primer como en el segundo sacrificio. LP asociada: Lámina propia asociada a la placa de Peyer; LP no asociada: Lámina propia no relacionada a la placa de Peyer.

1er	Iden.	Placa de Peyer	LP asociada	LP no asociada	2°	Iden.	Placa de Peyer	LP asociada	LP no asociada
Corderos	47	5,66	4,33	0	Corderos	48	31,66	93,66	7,33
	51	123,66	55,33	16,33		49	9,33	31,33	11,33
	54	36	7,33	1,66		50	2	0	0
						52	6,66	4	0
						53	0,33	0	0
	Media	55,11	22,33	6		Media	10	25,8	3,73
Ovejas	19	45	0	0	Ovejas	18	5	0	0
	22	32,66	0	0		20	8	0	0
	23	27	0	0		21	24	0	0
	25	7,66	0	0		24	4,66	0	0
	27	4	0	0		26	1,33	0	0
	30	0	0	0		28	61,66	10	0
						29	52,33	0	0
	Media	19,39	0	0		Media	22,43	1,43	0

Tabla IV.3. Número medio de granulomas por sección en los diferentes compartimentos intestinales estudiados en los corderos y ovejas infectados con “dosis alta” de *Map* sacrificados a los 100-120 dpi (1er sacrificio) y 210-220 dpi (2° sacrificio). Iden.: Identificación. LP: Lámina propia.

Por otro lado, también se estudió la distribución de los granulomas en los **diferentes tramos de intestino**, desde la VIC hasta el duodeno, independientemente de su localización en el tejido linfoide intestinal o en LP. Esta distribución aparece reflejada en el gráfico IV.9 por sacrificios, y en el IV.10 mostrando los resultados generales en corderos y ovejas. Los valores individuales vienen detallados en las tablas IV.4 y IV.5.

Confirmando los resultados obtenidos anteriormente, se pudo apreciar en el **primer sacrificio** un número significativamente mayor ($p < 0,05$) de granulomas en los corderos frente a las ovejas en todas las localizaciones del intestino delgado estudiadas, a excepción de la VIC, donde el recuento fue mayor en estas últimas (Gráfico IV.9). Sin embargo, en el segundo sacrificio, llamó la atención el mayor número de granulomas encontrados en las PPYd de las ovejas adultas. No obstante, esta diferencia no fue significativa, ya que, como se observa en la tabla IV.5, es solo la oveja 29 la que presenta un elevado número de lesiones en esas localizaciones (Gráfico IV.9).

En resumen, y considerando de forma conjunta los valores obtenidos en todos los animales infectados con “dosis alta” de *Map* del primer y del segundo sacrificio (Gráfico IV.10), se pudo comprobar que, en este experimento, las lesiones fueron más numerosas en los **corderos** que en las ovejas ($p < 0,05$), con la mayor diferencia significativa entre ambos grupos en la **PPYm** ($p < 0,05$). La única excepción fue la **VIC**, donde los granulomas fueron más frecuentes en las **ovejas adultas**.

El número de granulomas fue siempre mayor en las placas de Peyer (ileocecal, ileales y yeyunales) que en el resto del intestino sin tejido linfoide, con diferencias significativas ($p < 0,01$) con respecto a los tramos de YY distal, medio y proximal (Gráfico IV.10), lo que permite establecer una relación estrecha entre la presencia de granulomas y el tejido linfoide intestinal. Asimismo, en corderos y como ya se ha señalado, dentro de los granulomas asociados a dichas placas, éstos fueron significativamente más numerosos en la PPYm que en las ileales o las PPYd y PPYp ($p < 0,05$) (Gráfico IV.10). En cuanto a las ovejas, el número de granulomas contados fue significativamente mayor en la placa de Peyer de la VIC que en el resto de tejido linfoide intestinal estudiado ($p < 0,05$) (Gráfico IV.10).

En relación con lo anterior, otro hallazgo destacable fue la marcada diferencia observada a nivel de íleon, donde sólo se apreciaron granulomas en los **corderos**, asociados o no al tejido linfoide, y en mayor cantidad en el primer sacrificio que en el segundo ($p < 0,05$). También se observaron escasos granulomas en tramos de YY sin placa de Peyer en los corderos mientras que no se apreció ninguno en las ovejas (Gráficos IV.9 y 10).

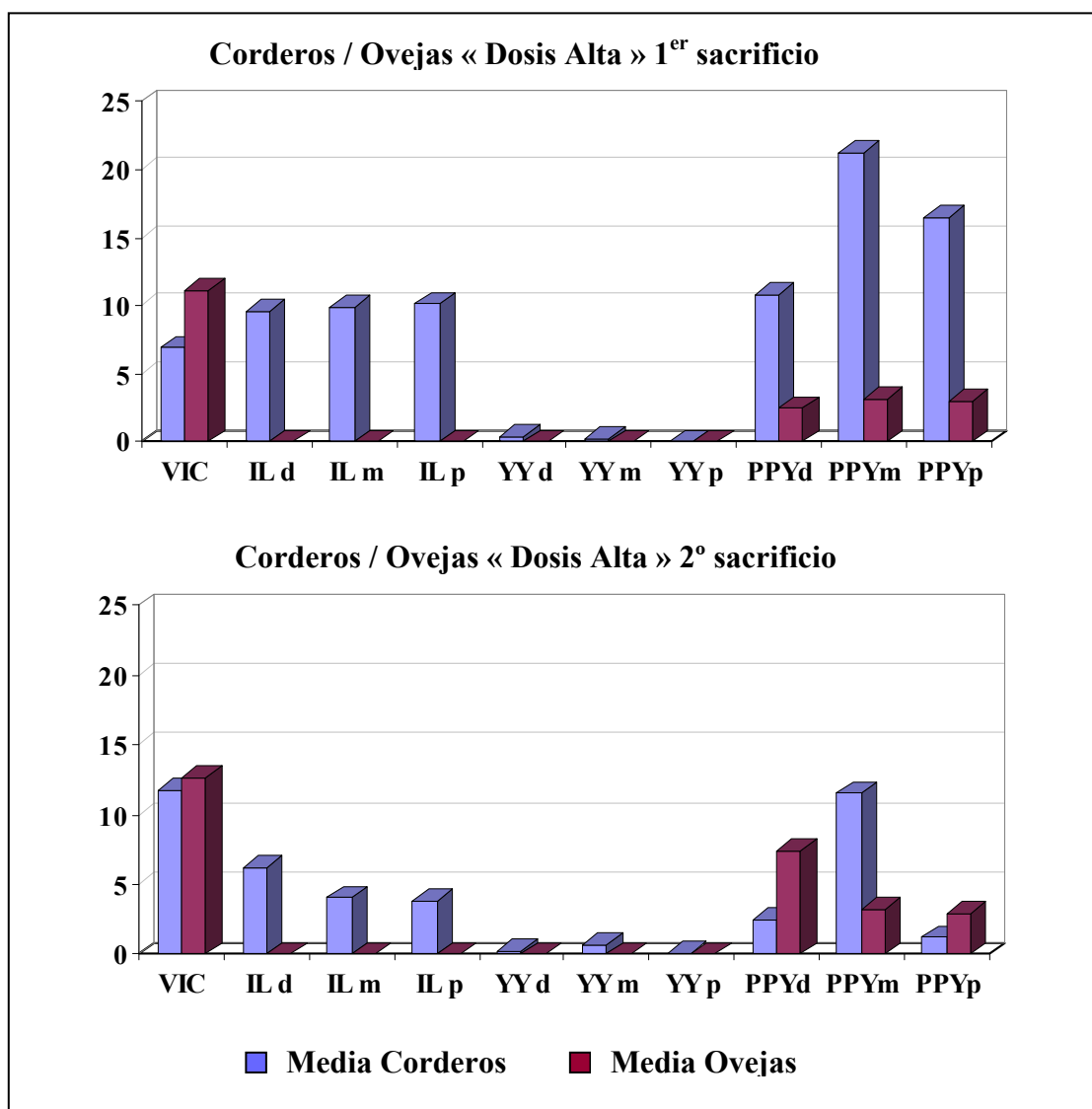


Gráfico IV.9. Valor medio del número de granulomas según su distribución en las diferentes localizaciones estudiadas del intestino de los corderos y ovejas infectados con “dosis alta” de *Map*, tanto en el primer como en el segundo sacrificio. VIC: Válvula ileocecal; ILd, ILm, ILp: Íleon distal, medio y proximal, respectivamente; YYd, YYm, YYp: Yeyuno distal, medio y proximal, respectivamente; PPYd, PPYm, PPYp: Placa de Peyer yeyunal distal, media y proximal, respectivamente.

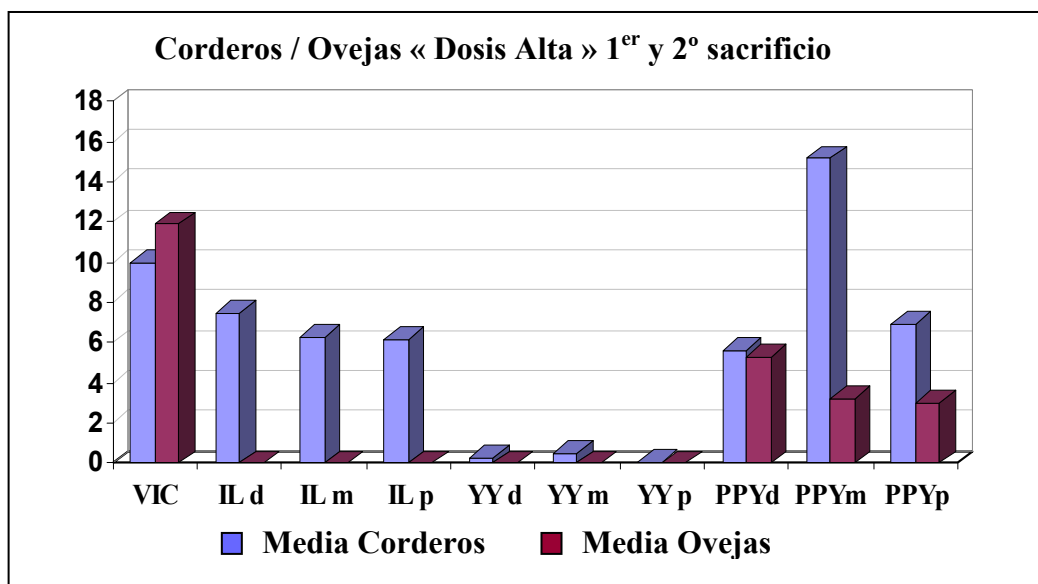


Gráfico IV.10. Valor medio del número de granulomas según su distribución en las diferentes localizaciones estudiadas del intestino de todos los corderos y ovejas infectados con “dosis alta” de *Map*, sumando los del primer y segundo sacrificio. VIC: Válvula ileocecal; ILd, ILm, ILp: Ileon distal, medio y proximal, respectivamente; YYd, YYm, YYp: Yeyuno distal, medio y proximal, respectivamente; PPYd, PPYm, PPYp: Placa de Peyer yeyunal distal, media y proximal, respectivamente.

1er		VIC	IL d	IL m	IL p	YY d	YY m	YY p	PPYd	PPYm	PPYp
Corderos	47	3	2,66	2	0,33	0	0	0	0,33	1	0,66
	51	17,66	25,33	25	26	0,66	0,66	0	30	47,33	29
	54	0	0,66	2,66	4	0,66	0	0	2	15,33	19,66
	M	6,88	9,55	9,88	10,11	0,44	0,22	0	10,77	21,22	16,44
Ovejas	19	29,33	0	0	0	0	0	0	3,33	4,66	7,66
	22	28,33	0	0	0	0	0	0	1,33	1,66	1,33
	23	5,66	0	0	0	0	0	0	5,33	8,66	7,33
	25	3,33	0	0	0	0	0	0	2,33	1,66	0,33
	27	0	0	0	0	0	0	0	0	2,33	1,66
	30	0	0	0	0	0	SD	0	SD	0	0
	M	11,11	0	0	0	0	0	0	2,46	3,16	3,05

Tabla IV.4. Número medio de granulomas por sección en las diferentes localizaciones estudiadas del intestino de los corderos y ovejas infectados con “dosis alta” de *Map* sacrificados a los 100-120 dpi (1er sacrificio). M: Media; SD: Sin Datos; VIC: Válvula ileocecal; ILd, ILm, ILp: Ileon distal, medio y proximal, respectivamente; YYd, YYm, YYp: Yeyuno distal, medio y proximal, respectivamente; PPYd, PPYm, PPYp: Placa de Peyer yeyunal distal, media y proximal, respectivamente.

2°		VIC	IL d	IL m	IL p	YY d	YY m	YY p	PPYd	PPYm	PPYp
Corderos	48	36,66	19,66	9,66	15	0	0	0,33	4	44,33	3
	49	9,33	11,66	10,66	3,33	1	3,33	0	3,66	8	1
	50	9,33	0	0	0	0	0	0	0,66	2,66	2
	52	3,33	0	0	0,66	0	0	0	4	2,66	0
	53	0,33	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	M	11,79	6,26	4,06	3,79	0,2	0,66	0,06	2,46	11,53	1,2
Ovejas	18	0	0	0	0	0	0	0	0,33	2,33	2,33
	20	6,66	0	0	0	0	0	0	0	1,33	0
	21	6,33	0	0	0	0	0	0	5,66	7,33	4,66
	24	0,66	0	0	0	0	0	0	1	0,66	2,33
	26	SD	0	0	0	0	0	0	1,33	0	SD
	28	53,66	0	0	0	0	0	0	9	4,33	4,66
	29	8,66	0	0	0	0	0	0	34,33	7	3,66
	M	12,66	0	0	0	0	0	0	7,38	3,28	2,94

Tabla IV.5. Número medio de granulomas por sección en las diferentes localizaciones estudiadas del intestino de los **corderos** y **ovejas** infectados con “dosis alta” de *Map* sacrificados a los 210-220 dpi (2° sacrificio). M: Media ; SD: Sin datos; VIC: Válvula ileocecal; ILd, ILm, ILp: Ileon distal, medio y proximal, respectivamente; YYd, YYm, YYp: Yeyuno distal, medio y proximal, respectivamente; PPYd, PPYm, PPYp: Placa de Peyer yeyunal distal, media y proximal, respectivamente.

En cuanto a la distribución de granulomas en los **nódulos linfáticos**, al igual que lo destacado en el intestino, éstos fueron significativamente más numerosos en los **corderos** que en las **ovejas**, tanto en el 1er como en el segundo sacrificio ($p < 0,001$) (Gráficos IV.11. y IV.12, Tabla IV.6). Además, los animales con mayor número de granulomas en nódulos linfáticos coinciden con aquellos que presentaron las lesiones más avanzadas en LP, es decir, los corderos 51 y 54 del primer sacrificio, y los animales 48 y 49 sacrificados a los 210-220 dpi (Tabla IV.6, apartado IV.2.2.1.1).

En todos los casos, los granulomas se localizaron más frecuentemente en los **nódulos linfáticos ileocecales** o **mesentérico caudal**. Concretamente, dentro de los corderos sacrificados a los 100-120 dpi, el número era mayor en los nódulos ileocecales que en el mesentérico caudal, mientras que en aquellos sacrificados más tarde (210-220 dpi) el más afectado fue precisamente este último (Gráfico IV.11). Sin embargo, sumando todos los animales en ambos sacrificios, el número de granulomas contados fue significativamente mayor en el **nódulo linfático mesentérico caudal** comparado con los ileocecales en los corderos ($p < 0,01$), y también en las ovejas adultas, aunque en

este último caso las diferencias no eran estadísticamente significativas ($p > 0,05$) (Gráfico IV.12).

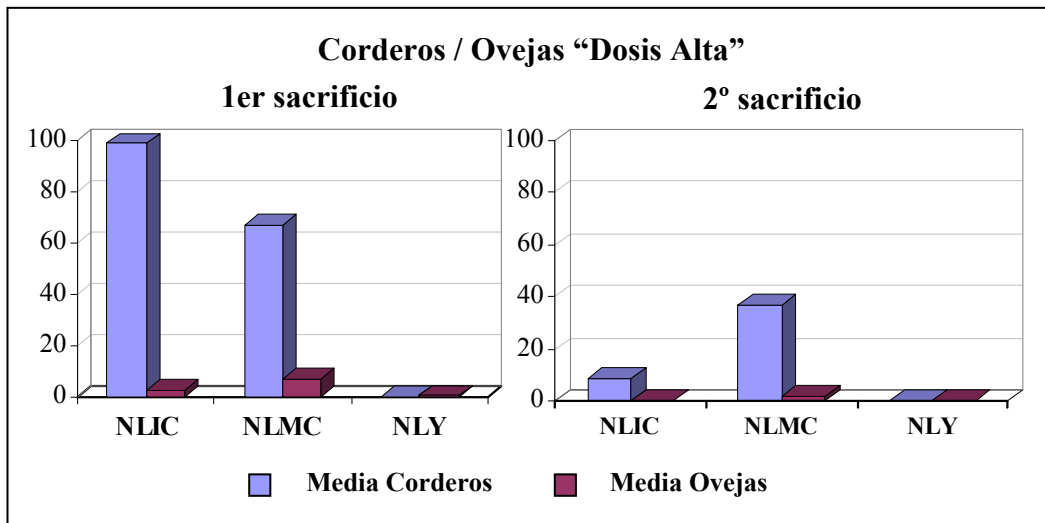


Gráfico IV.11. Número medio de granulomas por sección de tejido contados en los nódulos linfáticos asociados al intestino de los corderos y ovejas infectados con "dosis alta" de *Map* en cada sacrificio. NLIC, NLMC y NLY: Nódulo linfático Ileocecal, Mesentérico caudal y Yeyunal, respectivamente.

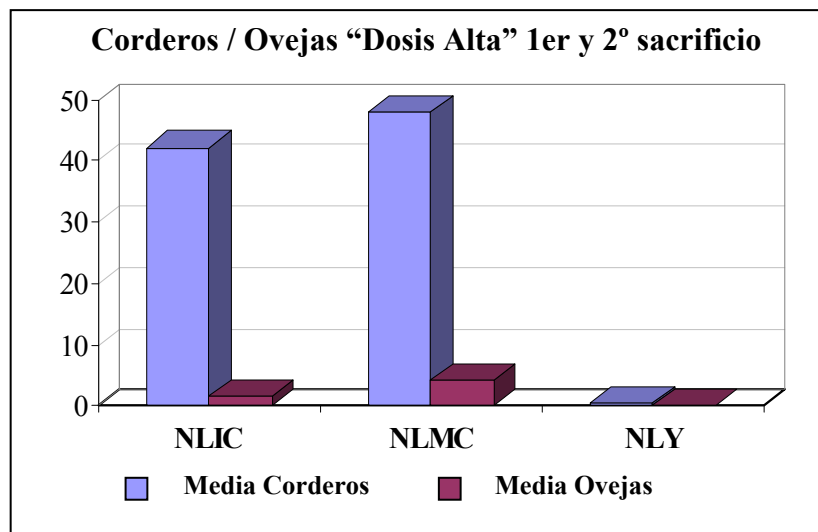


Gráfico IV.12. Número medio de granulomas por sección de tejido contados en los nódulos linfáticos asociados al intestino de todos los corderos y ovejas infectados con "dosis alta" de *Map*, sumando los del primer con los del segundo sacrificio. NLIC, NLMC y NLY: Nódulo linfático Ileocecal, Mesentérico caudal y Yeyunal, respectivamente.

1er	Iden.	NLIC	NLMC	NLY	2°	Iden.	NLIC	NLMC	NLY
Corderos	47	0	0	0	Corderos	48	6	22,5	0
	51	200	200	0		49	36,5	160	3,5
	54	95	0	0		50	0	1,5	0
						52	0	1	0,5
						53	0	0	0
	M	98,33	66,66	0		M	8,5	37	0,8
Ovejas	19	13,5	39,5	4	Ovejas	18	0	0	0
	22	0	0	0		20	0	0	0
	23	0	2	0		21	1,5	8	0
	25	3,5	0	0		24	0	0	0
	27	0	0	0		26	0	1,5	0
	30	0	0	0		28	3,5	2,5	0
						29	0	0	0
	M	2,83	6,92	0,66		M	0,71	1,71	0

Tabla IV.6. Número medio de granulomas por sección de tejido en los diferentes **nódulos linfáticos** estudiados de los **corderos** y **ovejas** infectados con “**dosis alta**” de *Map*, sacrificados a los **100-120 dpi (1er sacrificio)** y **210-220 dpi (2° sacrificio)**. NLIC, NLMC y NLY: Nódulo linfático Ileocecal, Mesentérico caudal y Yeyunal, respectivamente; M: Media; Iden: Identificación.

IV.2.2.3. Clasificación de lesiones asociadas a paratuberculosis

Las lesiones granulomatosas de cada animal fueron clasificadas en relación con su intensidad y extensión, la naturaleza del infiltrado inflamatorio, y sobre todo en función de la localización de los granulomas en los diferentes compartimentos del intestino.

Cada tramo intestinal estudiado fue clasificado siguiendo estos criterios, y finalmente se asignó una **clasificación final** para cada animal, teniéndose en cuenta siempre la lesión de mayor grado encontrada. Por otro lado, las lesiones de los nódulos linfáticos fueron clasificadas por separado como **focales** cuando los granulomas eran escasos, pequeños y no llegaban a confluir, mientras que aquellas formadas por un número elevado de lesiones granulomatosas extensas, coalescentes y constituidas por numerosas células macrofágicas fueron considerados como **multifocales**. Los resultados

en los corderos y ovejas vienen representados en las tablas IV.7 y IV.8, respectivamente, así como en el gráfico IV.13.

Dentro de los animales infectados con “dosis alta” de *Map*, los 8 **corderos (100%)** presentaron lesiones compatibles con paratuberculosis, la mitad de ellos incluso con lesiones muy avanzadas (multifocales). De esta manera, los corderos 51 y 54 del primer sacrificio así como los 48 y 49 del segundo sacrificio fueron clasificados como ***multifocales de tipo b***, al presentar numerosos granulomas en lámina propia no relacionada con el tejido linfoide, tanto en válvula ileocecal (cordero 51), yeyuno (corderos 49, 51 y 54) como en íleon o placas de Peyer yeyunales (Tabla IV.7; gráfico IV.13). Además, tanto el cordero 47, sacrificado a los 100-120 dpi, como el 52, sacrificado al final del experimento, mostraron numerosos granulomas en la mucosa, si bien las lesiones en estos dos animales no progresaron hacia la LP no relacionada con el tejido linfoide, por lo que estos dos animales (25% dentro de este grupo), fueron clasificados como ***multifocales de tipo a***. En ellos, las lesiones eran más extensas en la mucosa del íleon y de las placas de Peyer yeyunales distales y medias en el caso del cordero 47, mientras que en el 52 los granulomas invadían la LP asociada al tejido linfoide de la VIC, del íleon proximal y de la PPYd (Tabla IV.7, gráfico IV.13). Finalmente, en los dos corderos restantes (el 25% del grupo), sacrificados al final del experimento, sólo se observaron pequeños granulomas restringidos al tejido linfoide de la VIC en los dos corderos (50 y 53) y de las placas de Peyer yeyunales en el caso del 50, por lo que estos dos animales fueron clasificados como ***focales*** (Tabla IV.7, gráfico IV.13).

En cuanto a las **ovejas**, de las 13 infectadas con dosis “alta” de *Map*, doce (**92,3%**) presentaron lesiones compatibles con paratuberculosis, sin diferencias según el rebaño de procedencia. De éstas, 11 fueron clasificadas como ***focales*** (84,61% del grupo), ya que los granulomas únicamente aparecieron en el tejido linfoide de la VIC o de las placas de Peyer yeyunales, según el animal, sin llegar en ningún momento a infiltrar la mucosa. La única excepción fue el caso de la **oveja 28**, en la que los granulomas, en número elevado, se extendían hacia la LP asociada al tejido linfoide de la VIC y de la PPYd. Por esa razón, esta oveja fue finalmente clasificada como ***multifocal de tipo a*** (Tabla IV.8, gráfico IV.13).

En cuanto a los **nódulos linfáticos** de los **corderos**, sólo se clasificaron como **multifocales** las lesiones encontradas en los nódulos linfáticos ileocecales y mesentérico caudal de los corderos 49 y 51, los ileocecales del 54 y el mesentérico caudal del 48, es decir, únicamente aquellos cuatro corderos que fueron clasificados como **multifocales de tipo b** según sus **lesiones intestinales**, con numerosos granulomas afectando la mucosa intestinal. Los corderos 50 y 52 presentaron pequeñas lesiones granulomatosas compatibles con paratuberculosis y clasificadas como **focales** en el NLMC de ambos y el NLY del 52, y finalmente, no se hallaron lesiones en los nódulos linfáticos del cordero 47 ni del 53 (Tabla IV.7).

En cuanto a las **ovejas adultas**, los granulomas presentes en los **nódulos linfáticos** fueron menos numerosos y mucho más pequeños que los de los corderos. Se observaron lesiones clasificadas como **focales** en las ovejas 21, 23, 25, 26 y 28 tanto en los nódulos linfáticos ileocecales como en el mesentérico caudal, según el animal (Tabla IV.8). La oveja 19 fue la que más granulomas presentó, tanto en los nódulos ileocecales, el mesentérico caudal, mostrando incluso lesiones en el yeyunal. Sin embargo, a pesar de que el recuento fue elevado en los dos primeros nódulos linfáticos (Tabla IV.6), las lesiones granulomatosas eran pequeñas, y no confluyeron en ningún momento, por lo que se decidió clasificar a las lesiones de estos nódulos linfáticos como **focales**. No se encontró ningún granuloma en los nódulos linfáticos de las ovejas 18, 20, 22, 24, 27, 29 y 30 (Tabla IV.8).

Sacrif	Iden	VIC	Ileon			Yeyuno			Placas de Peyer Yeyunales			Nódulo linfático			Clasif final
			Dist.	Med.	Prox.	Dist.	Med.	Prox.	Dist.	Med.	Prox.	IC	MC	Yey	
1er	47	F	MFa	MFa	F	SL	SL	SL	MFa	MFa	F	SL	SL	SL	MFa
	51	MFBb	MFBb	MFBb	MFBb	MFBb	MFBb	SL	MFBb	MFa	MFa	MF	MF	SL	MFBb
	54	SL	F	MFBb	MFa	MFBb	SL	SL	MFa	MFBb	MFa	MF	SL	SL	MFBb
	48	MFa	MFBb	MFBb	MFBb	SL	SL	F	MFBb	MFBb	MFa	F	MF	SL	MFBb
2º	49	MFa	MFBb	MFBb	MFBb	MFBb	MFBb	SL	MFBb	MFBb	MFa	MF	MF	F	MFBb
	50	F	SL	SL	SL	SL	SL	F	F	F	F	SL	F	SL	F
	52	MFa	SL	SL	MFa	SL	SL	MFa	F	SL	SL	F	F	MFa	
	53	F	SL	SL	SL	SL	SL	SL	SL	SL	SL	SL	SL	SL	F

Tabla IV.7. Clasificación de las lesiones observadas en las diferentes localizaciones del **intestino y nódulos linfáticos asociados** de cada **cordero** infectado con “**dosis alta**” de *Map*. Sacrif.: Sacrificio; Iden.: Identificación del animal; Clasif final.: Clasificación final del animal; IC: Ileocecal; MC: Mesentérico caudal; Yey: Yeyunal; SL: Sin Lesión; F: Focal; MF: Multifocal; Dist: Distal; Med.: Medial; Prox.: Proximal.

Sacrif	Iden	VIC	Ileon			Yeyuno			Placas de Peyer Yeyunales			Nódulo Linfático			Clasif final	
			Dist.	Med.	Prox.	Dist.	Med.	Prox.	Dist.	Med.	Prox.	IC	MC	Yey		
1er	19	F	SL	SL	SL	SL	SL	SL	F	F	F	F	F	F	F	
	22	F	SL	SL	SL	SL	SL	SL	F	F	F	F	SL	SL	SL	F
	23	F	SL	SL	SL	SL	SL	SL	F	F	F	F	SL	F	SL	F
	25	F	SL	SL	SL	SL	SL	SL	F	F	F	F	F	SL	SL	F
	27	SL	SL	SL	SL	SL	SL	SL	SL	F	F	F	SL	SL	SL	F
	30	SL	SL	SL	SL	SL	SD	SL	SD	SL	SL	SL	SL	SL	SL	SL
2º	18	SL	SL	SL	SL	SL	SL	SL	F	F	F	F	SL	SL	SL	F
	20	F	SL	SL	SL	SL	SL	SL	SL	F	SL	SL	SL	SL	SL	F
	21	F	SL	SL	SL	SL	SL	SL	F	F	F	F	F	SL	SL	F
	24	F	SL	SL	SL	SL	SL	SL	F	F	F	F	SL	SL	SL	F
	26	SD	SL	SL	SL	SL	SL	SL	F	SL	SD	SD	SL	F	SL	F
	28	MFa	SL	SL	SL	SL	SL	SL	MFa	F	F	F	F	F	SL	MFa
29	F	SL	SL	SL	SL	SL	SL	F	F	F	F	SL	SL	SL	F	

Tabla IV.8. Clasificación de las lesiones observadas en las diferentes localizaciones del **intestino y nódulos linfáticos asociados** de cada **oveja** infectada con “**dosis alta**” de *Map*. Sacrif.: Sacrificio; Iden.: Identificación del animal; Clasif final.: Clasificación final del animal; IC: Ileocecal; MC: Mesentérico caudal; Yey: Yeyunal; SL: Sin Lesión; F: Focal; MF: Multifocal; SD.: Sin Datos. Dist: Distal; Med.: Medial; Prox.: Proximal.

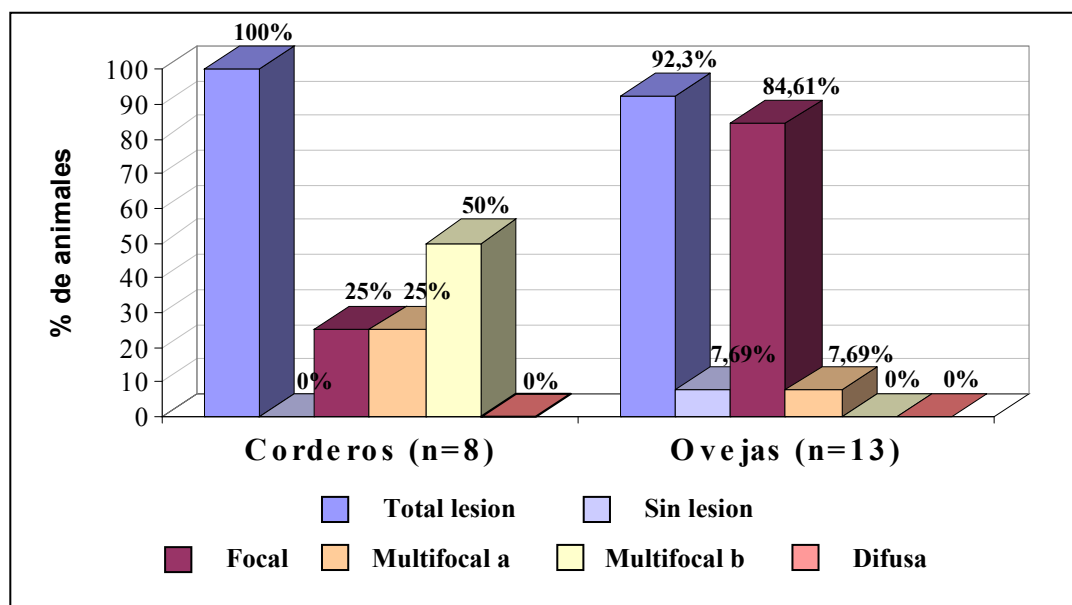


Gráfico IV.13. Distribución del tipo lesional de las ovejas y corderos infectados con "dosis alta" de *Map*. Se considera únicamente la "clasificación final" atribuida a cada animal.

IV.2.2.4. Otras lesiones no asociadas a paratuberculosis

Intestino y nódulos linfáticos mesentéricos:

En las **ovejas adultas** se encontraron otras lesiones granulomatosas que hubieron de ser diferenciadas de las asociadas a paratuberculosis. Concretamente se observaron pequeños grupos de 5-10 células de morfología macrofágica, cuyo citoplasma, en algunas ocasiones, se encontraba repleto de un número muy variado de estructuras cristaloides y otras veces presentaba un pigmento pardo distribuido de manera homogénea en su interior (Figura IX.30). Estos últimos granulomas, oscilando entre 1 y 20 por animal, se hallaron más frecuentemente en los nódulos linfáticos, principalmente en el mesentérico caudal, aunque también en los ileocecales y en menor medida en el resto de nódulos linfáticos yeyunales. Con menor frecuencia aún, aparecieron también asociados a la zona basal del tejido linfoide intestinal, tanto a nivel de VIC como en algunas placas de Peyer yeyunales. Los granulomas que contenían estructuras cristaloides, mucho más escasos, apreciaron con más frecuencia en el tejido linfoide intestinal

Este tipo de granulomas no fue considerado como "característico" de paratuberculosis, por lo que no se incluyeron en el recuento de lesiones (apartado IV.2.2.2). Por su escaso número y al observarse sólo en las ovejas, independientemente

del grupo experimental al que pertenecieran, éstos se consideraron como granulomas “de cuerpo extraño”.

Además, en las ovejas 6, 19, 21, 25 y en los corderos 42, 44 y 52 se observó la presencia de granulomas de gran tamaño, encapsulados por abundante tejido conjuntivo y delimitados del tejido adyacente por una corona linfoplasmocitaria, en la LP de las placas de Peyer yeyunales o bien en la zona paracortical del NLY en el caso de la oveja 6. Dichos granulomas, además de las estructuras mencionadas, estaban constituidos por numerosos macrófagos de forma y tamaño irregular, células multinucleadas de cuerpo extraño, así como algún eosinófilo (Figura IX.31). También se observó otro tipo de granuloma similar, si bien éste no estaba encapsulado y el componente inflamatorio infiltraba levemente el tejido adyacente, estando constituido principalmente por numerosos eosinófilos junto con escasos linfocitos, rodeando una zona central de necrosis eosinofílica, tanto a nivel de placa de Peyer yeyunal en la oveja 23, en la LP del yeyuno de la 24, o en el íleon proximal de los corderos 36 y 41. En cualquier caso, ambas formaciones mostraron siempre un carácter muy focal, sin llegar a alterar estructuras adyacentes, asociándose a una etiología parasitaria.

En los animales 11, 20, 29, 31, y 43 también se apreciaron formas protozoarias características de esquizontes de coccidios en la LP del íleon distal, yeyuno o a nivel de las placas de Peyer yeyunales, en número muy bajo y ocasionalmente asociados a una leve reacción inflamatoria linfoplasmocitaria y eosinofílica alrededor (Figura IX.32). Además, en los corderos 35, 36, 37, 45, 47, 48, 50 y 53 se pudo comprobar la presencia de formaciones parasitarias compatibles con ooquistes de coccidios en las células epiteliales de las vellosidades y de las criptas intestinales, en muy bajo número y asociadas a un leve incremento del número de eosinófilos y linfocitos en la LP adyacente, siempre de carácter focal y restringido, en zonas de yeyuno o íleon.

Finalmente, en el NLY de las ovejas 17 y 24, se encontró una forma parasitaria compatible con *Linguatula serrata*, encapsulada por una fuerte reacción fibrosa. En estos mismos animales, así como en la oveja 6, también se pudo apreciar la existencia de focos de necrosis eosinofílica de diferente tamaño, acompañados en ocasiones por zonas de calcificación distrófica, rodeados de tejido conjuntivo fibroso y con la

presencia de una fuerte reacción eosinofílica (Figura IX.33). Estos hallazgos serían compatibles con trayectos de migración de parásito.

Otros órganos y tejidos:

No se observaron lesiones relevantes en el resto de tejidos y órganos estudiados, salvo la confirmación de aquellos hallazgos macroscópicos detallados en el apartado IV.2.1.

IV.2.3. DETECCIÓN DE *MAP* EN TEJIDOS

IV.2.3.1. Tinción de Ziehl-Neelsen

Se llevó a cabo la tinción de ZN en los cortes histológicos adyacentes a los utilizados para observar las lesiones. Cuando ésta era positiva, los BAAR se observaban como estructuras de morfología bacilar, teñidas intensamente de color púrpura por la carbolfucsina, y aparecían siempre en el citoplasma de células de morfología macrofágica. Como se ha indicado en el capítulo de material y métodos, las secciones donde se observaron lesiones compatibles con paratuberculosis fueron clasificadas en cinco categorías dependiendo de la cantidad de BAAR presentes, de forma que la categoría 0 correspondía a las secciones donde no se apreciaron BAAR, +- cuando la tinción era dudosa, + un número muy bajo de BAAR, ++ BAAR en cantidad moderada y +++ si eran abundantes.

Los animales infectados con “**dosis alta**” de *Map* fueron los únicos en los que se demostró la presencia de un número variable de BAAR, siendo asimismo los únicos en presentar lesiones granulomatosas compatibles con paratuberculosis. Tal y como se indica en la tabla IV.9, se detectaron BAAR en los 3 **corderos** sacrificados a los 100-120 dpi, y en 2 de los 5 sacrificados al final del experimento (48 y 49), apareciendo en diferentes cantidades según el animal y la sección de intestino estudiada. Estos 5 animales positivos presentaban todas lesiones avanzadas, con granulomas en la mucosa, clasificadas como *multifocales de tipo b* en cuatro animales (48, 49, 51 y 54) y el cordero 47 como *multifocal de tipo a*. No se detectaron BAAR en los corderos 50 y 53, clasificados como *focales*, ni tampoco en los granulomas del cordero 52, clasificado como *multifocal de tipo a*. Los BAAR fueron abundantes en los corderos 48 y 49,

llegando a ocupar prácticamente todo el citoplasma de los macrófagos que infiltraban algunos tramos de íleon y placas de Peyer yeyunales, mientras que aparecían de forma esporádica en los otros 3 corderos (47, 51 y 54) (Tablas IV.9, Figuras IX. 34 y 35). Los BAAR se detectaron de forma más numerosa en el citoplasma de macrófagos de la mucosa intestinal que en placa de Peyer.

En el caso de las **ovejas** infectadas con “dosis alta”, se estudiaron las secciones de VIC y de placas de Peyer yeyunales, al ser los únicos tramos donde se observaron granulomas compatibles con una infección por *Map*. Sólo se puso en evidencia la presencia de escasos BAAR en el tejido linfoide de la PPIC de las ovejas 22 y 29, y en la yeyunal media de la 23, las tres clasificadas con lesiones *focales*. A diferencia de los corderos, los bacilos sólo se observaron de forma aislada y su detección fue más complicada y dudosa debido a la posible confusión que originó la presencia de algunos cristales o de pigmento parduzco dentro de los granulomas. No se detectó ningún microorganismo positivo mediante ZN en la única oveja con granulomas en la mucosa (nº 28) (Tabla IV.10).

En los **nódulos linfáticos**, tanto en **ovejas** como en **corderos**, tan solo se evidenciaron BAAR en muy escasa cantidad en el nódulo **mesentérico caudal** del **cordero 51**, en un granuloma situado en zona cortical.

	VIC (PP / M)	IL d (PP / M)	IL m (PP / M)	IL p (PP / M)	YY d (M)	YY m (M)	YY p (M)	PPYd (PP / M)	PPYm (PP / M)	PPYp (PP / M)	Clasif.
47	+/+	0	0	0	SL	SL	SL	0	0/+	0	MFa
51	+/+	0/+	0/+	0/+	0	0	SL	0	+ / 0	+ / 0	MFb
54	SL	0/+	0/+	0	0	SL	SL	0/+	++ / 0	0	MFb
48	++ / ++	0 / ++	0 / ++	0 / ++	SL	SL	0	0 / ++	0 / ++	0	MFb
49	0 / ++	0 / +++	0 / +++	0 / +++	++	++	SL	0 / +++	0 / +++	0	MFb
50	0	SL	SL	SL	SL	SL	SL	0	0	0	F
52	0	SL	SL	0	SL	SL	SL	0	0	SL	MFa
53	0	SL	SL	SL	SL	SL	SL	SL	SL	SL	F

Tabla IV.9. Distribución y cantidad de BAAR detectados mediante **tinción ZN** en secciones de intestino (tejido linfoide/mucosa) **de cada cordero**. PP: placa de Peyer; M: Mucosa; VIC: Válvula ileocecal, ILd, ILM e ILp: Íleon distal, medio y proximal, respectivamente; YYd, YYm y YYp: Yeyuno distal, medio y proximal, respectivamente; PPYd, PPYm y PPYp: Placa de Peyer yeyunal distal, media y proximal, respectivamente; SL: Sin lesión; F: Focal; MFa y MFb: Multifocal a y b, respectivamente; Clasif: Clasificación histológica final. 0: ausencia de BAAR; +/-: presencia dudosa de BAAR, +: muy pocos BAAR; ++: número moderado de BAAR; +++: abundante cantidad de BAAR.

1er	VIC (PP / M)	PPYd (PP / M)	PPYm (PP / M)	PPYp (PP / M)	Clasif.	2°	VIC (PP / M)	PPYd (PP / M)	PPYm (PP / M)	PPYp (PP / M)	Clasif.
19	0	0	0	0	F	18	SL	0	0	0	F
22	+ - / 0	0	0	0	F	20	0	SL	0	SL	F
23	0	0	+ - / 0	0	F	21	0	0	0	0	F
25	0	0	0	0	F	24	0	0	0	0	F
27	SL	SL	0	0	F	26	SD	0	SL	SD	F
30	SL	SD	SL	SL	SL	28	0	0	0	0	MFa
						29	+ - / 0	0	0	0	F

Tabla IV.10. Distribución y cantidad de BAAR detectados mediante tinción ZN en secciones de intestino (tejido linfóide/mucosa) de cada oveja. PP: placa de Peyer; M: Mucosa; VIC: Válvula ileocecal; PPYd, PPYm y PPYp: Placa de Peyer yeyunal distal, media y proximal, respectivamente; SD: Sin datos; SL: Sin lesión; F: Focal; MFa: Multifocal a; Clasif: Clasificación histológica final; 0: ausencia de BAAR; + -: presencia dudosa de BAAR; +: muy pocos BAAR; ++: número moderado de BAAR; +++: abundante cantidad de BAAR.

IV.2.3.2. Técnica inmunohistoquímica

La tinción inmunohistoquímica (IHQ) se llevó a cabo en las mismas secciones de tejido intestinal y de nódulos linfáticos en las que se realizaron las tinciones de ZN, es decir, aquellas que presentaban lesiones granulomatosas, así como en algunas seleccionadas al azar en las que no se habían apreciado lesiones, procedentes de animales infectados. Únicamente se pudo constatar una inmunotinción positiva, que indicaría la presencia de antígenos de *Map*, en aquellos animales infectados con “dosis alta”, que se observaba como la presencia de una coloración marronácea en el citoplasma de los macrófagos que formaban los granulomas, y que no aparecía en las muestras utilizadas como control negativo. Al igual que en el caso del ZN, la intensidad de la inmunotinción se clasificó de forma subjetiva en cinco categorías. En el grupo de **corderos** infectados con “**dosis alta**”, se encontró inmunotinción positiva en los 5 animales en los que se detectaron BAAR mediante ZN (47, 48, 49, 51 y 54), pero también en el 52, negativo a la técnica anterior; es decir en todos los corderos que fueron clasificados como **multifocales**, y por tanto aquellos cuyas lesiones se extendieron hacia la LP (Tabla IV.11). La cantidad de antígenos detectados fue diferente según el animal y la sección de intestino estudiada, guardando relación con el número de microorganismos detectados mediante la tinción de ZN (Tablas IV.9 y IV.11). Así, los animales con mayor cantidad de células inmunomarcadas frente a *Map*

fueron los corderos 48 y 49, de forma similar a lo observado con la técnica de ZN (Figura IX.36). Los individuos 47 y 52, con lesiones *multifocales de tipo a*, fueron los que menor intensidad de inmunotinción presentaron, observándose la tinción positiva de forma esporádica. Al igual que mediante la tinción de ZN, los antígenos de *Map* se localizaron en el interior de los macrófagos que constituían los granulomas, llegando a ocupar la casi totalidad del citoplasma en los animales 48 y 49 en algunas áreas de íleon y placas de Peyer yeyunales, mientras que su detección fue más complicada en los demás animales debido a su escasa cantidad. Además, la presencia de *Map* fue significativamente más frecuente en los macrófagos de la mucosa intestinal que a nivel de placas de Peyer, tal y como se observó mediante ZN. No se obtuvieron resultados positivos mediante IHQ en los 2 corderos con lesiones *focales*.

En el caso de las **ovejas adultas** infectadas con “dosis alta”, no se evidenciaron antígenos de *Map* en ninguna de las ovejas sacrificadas a los 100-120 dpi, pero la técnica de IHQ detectó tres animales positivos en el segundo sacrificio (Tabla IV.12). La inmunotinción fue siempre escasa y se observó de forma muy esporádica en granulomas del tejido linfoide de la VIC de los animales 28 y 29, así como de las placas de Peyer yeyunales de las ovejas 18 y 29. Sin embargo, la interpretación de la positividad también resultó dificultosa en este tipo de granulomas debido a la presencia, en ocasiones, de pigmento parduzco o de cristales dentro del citoplasma de los macrófagos.

Finalmente, la tinción IHQ puso en evidencia muy escasa positividad en el citoplasma de algún granuloma aislado en la zona cortical del **nódulo linfático mesentérico caudal** de los **corderos 49 y 51** así como en el **ileocecal** del animal **54**, a diferencia de la técnica de ZN. No se detectaron antígenos de *Map* mediante IHQ en ninguno de los nódulos linfáticos de las ovejas.

	VIC (PP / M)	IL d (PP / M)	IL m (PP / M)	IL p (PP / M)	YY d (M)	YY m (M)	YY p (M)	PPYd (PP / M)	PPYm (PP / M)	PPYp (PP / M)	Clasif.
47	+ / 0	0	0	0	SL	SL	SL	0	0	0	MFa
51	+ / 0	0 / +	0 / +	0 / ++	0	0	SL	+ / 0	+ / 0	+ / +	MFb
54	SL	0	+ / +	0 / +	0	SL	SL	0	+ + / 0	0 / 0	MFb
48	+ + / + +	+ + / + +	0 / + +	0 / + +	SL	SL	0	0	+ + / + +	0	MFb
49	+ + / + +	+ / + + +	0 / + + +	0 / + + +	+ +	+ +	SL	0 / + +	0 / + + +	0	MFb
50	0	SL	SL	SL	SL	SL	SL	0	0	0	F
52	+ / 0	SL	SL	0	SL	SL	SL	+ / 0	0	SL	MFa
53	0	SL	SL	SL	SL	SL	SL	SL	SL	SL	F

Tabla IV.11. Distribución e intensidad de la inmunotinción frente a *Map*, mediante técnicas **inmunohistoquímicas** (anticuerpo policlonal anti-*Map*) en secciones de intestino (tejido linfoide/mucosa) **de cada cordero**. PP: placa de Peyer; M: Mucosa; VIC: Válvula ileocecal, ILd, ILM e ILp: Ileon distal, medio y proximal, respectivamente; YYd, YYm y YYp: Yeyuno distal, medio y proximal, respectivamente; PPYd, PPYm y PPYp: Placa de Peyer yeyunal distal, media y proximal, respectivamente; SL: Sin lesión; F: Focal; MFa y MFb: Multifocal a y b, respectivamente; Clasif: Clasificación histológica final. 0: ausencia de antígenos de *Map*; +/-: presencia dudosa de antígenos de *Map*; +: muy pocos antígenos de *Map*; ++: número moderado de antígenos de *Map*; +++: abundante cantidad de antígenos de *Map*.

1er	VIC (PP / M)	PPYd (PP / M)	PPYm (PP / M)	PPYp (PP / M)	Clasif.	2º	VIC (PP / M)	PPYd (PP / M)	PPYm (PP / M)	PPYp (PP / M)	Clasif.
19	0	0	0	0	F	18	SL	+ - / 0	0	+ - / 0	F
22	0	0	0	0	F	20	0	SL	0	SL	F
23	0	0	0	0	F	21	0	0	0	0	F
25	0	0	0	0	F	24	0	0	0	0	F
27	SL	SL	0	0	F	26	SD	0	SL	SD	F
30	SL	SD	SL	SL	SL	28	+ - / 0	0	0	0	MFa
						29	+ - / 0	+ - / 0	0	0	F

Tabla IV.12. Distribución e intensidad de la inmunotinción frente a *Map*, mediante técnicas **inmunohistoquímicas** (anticuerpo policlonal anti-*Map*) en secciones de intestino (tejido linfoide/mucosa) **de cada oveja**. PP: placa de Peyer; M: Mucosa; VIC: Válvula ileocecal; PPYd, PPYm y PPYp: Placa de Peyer yeyunal distal, media y proximal, respectivamente; SD: Sin datos; SL: Sin lesión; F: Focal; MFa: Multifocal a; Clasif: Clasificación histológica final; 0: ausencia de antígenos de *Map*; +/-: presencia dudosa de antígenos de *Map*; +: muy pocos antígenos de *Map*; ++: número moderado de antígenos de *Map*; +++: abundante cantidad de antígenos de *Map*.

IV.3. RESULTADOS DEL ESTUDIO DE LA RESPUESTA INMUNE LOCAL

IV.3.1. PRODUCCIÓN *IN VITRO* LOCAL DEL INTERFERÓN GAMMA (IFN- γ)

La determinación de la producción de esta citoquina se llevó a cabo en muestras de tejido de ILd, PPY y NLMC así como a partir de los linfocitos extraídos de dichos tejidos, en todos los animales empleados en esta infección experimental, con el fin de valorar la producción *in vitro* de esta citoquina. Los resultados vienen representados tanto en los corderos como en las ovejas en los gráficos IV.14 y IV.15 así como de forma detallada en las tablas X.11 y X.12 de los anexos, respectivamente.

No se observaron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la secreción *in vitro* de IFN- γ a partir de la incubación de secciones completas de los propios **tejidos** estudiados, en ninguno de los grupos experimentales de esta tesis doctoral (Gráficos IV.14 y 15).

En cuanto a la producción de dicha citoquina a partir de los **linfocitos** aislados de estos tejidos, en el caso de los **corderos**, se observó a los 100-120 dpi una mayor secreción por parte de los **linfocitos** de la **PPY** estimulados con PPDa en el grupo de corderos infectados con “**dosis alta**” de *Map*, y en el **NLMC** del grupo **control** ($p < 0,05$) (Gráfico IV.14).

En las **ovejas adultas**, se observó un incremento significativo en la producción de esta citoquina por parte de los **linfocitos** aislados de **NLMC** de las ovejas infectadas con “**dosis alta**” en comparación con el ILd y la PPY del mismo grupo, así como con aquellos animales de “dosis baja” y del grupo control ($p < 0,001$), tanto en el primer como en el segundo sacrificio (Gráfico IV.15 y Tabla X.12). No se apreciaron diferencias significativas en las ovejas del grupo control e infectadas con “dosis baja” de *Map*.

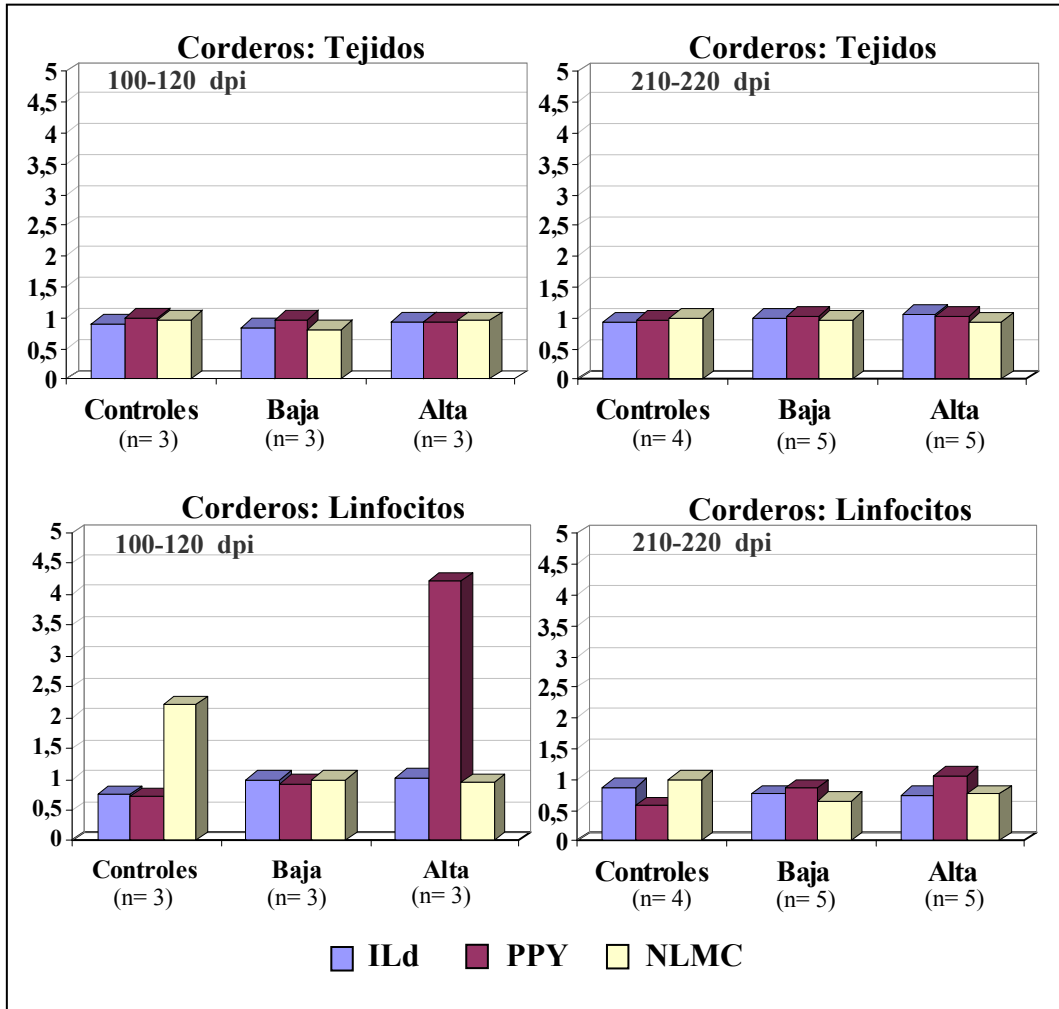


Gráfico IV.14. Resultados de los valores medios de la producción de IFN- γ secretado *in vitro* por los tejidos o linfocitos de ILd, PPY y NLMC de los corderos, tanto en el 1er sacrificio (100-120 dpi) como en el 2º sacrificio (210-220 dpi), tras estimulación con PPDA e incubación 24 horas. Los valores vienen representados en cocientes de densidades ópticas. ILd: Ileón distal; PPY: Placa de Peyer yeyunal; NLMC: Nódulo linfático mesentérico caudal.

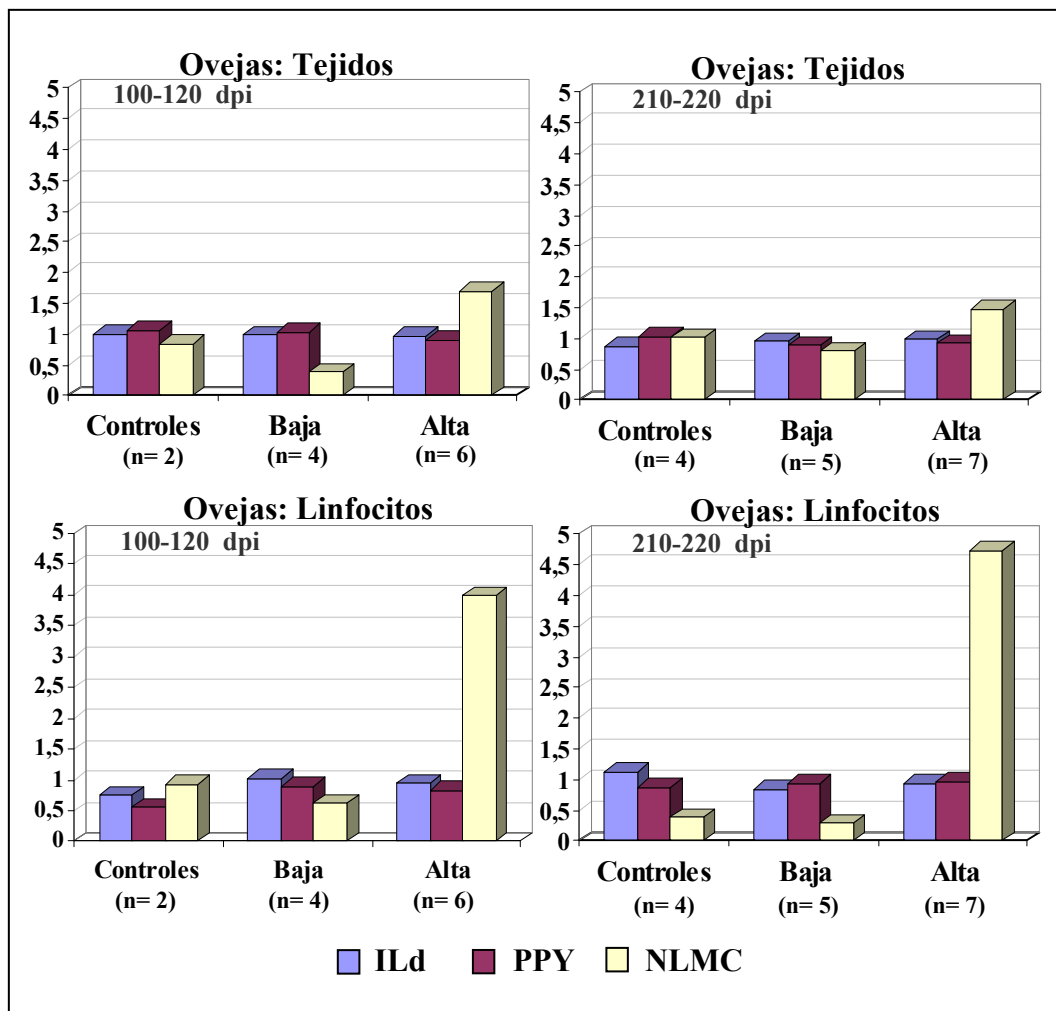


Gráfico IV.15. Resultados de los valores medios de la producción de IFN- γ secretado *in vitro* por los tejidos o linfocitos de ILd, PPY y NLMC de las ovejas, tanto en el 1er sacrificio (100-120 dpi) como en el 2º sacrificio (210-220 dpi), tras estimulación con PPDa e incubación 24 horas. Los valores vienen representados en cocientes de densidades ópticas. ILd: Ileon distal; PPY: Placa de Peyer yeyunal; NLMC: Nódulo linfático mesentérico caudal.

IV.3.2. DETERMINACIÓN DEL NIVEL DE EXPRESIÓN GÉNICA DE DIVERSOS MEDIADORES DE LA RESPUESTA INMUNE MEDIANTE PCR A TIEMPO REAL

Se valoró la expresión génica de diversas citoquinas, un receptor de respuesta inmune innata así como un factor de transcripción mediante qPCR, a partir de muestras de ILd, PPY y NLMC. Para ello, se seleccionaron un total de 18 ovejas y corderos de este estudio, en función del tipo de lesión que presentaron en el tejido contiguo al de la muestra aquí analizada, tal y como se detalló en el apartado III.4.2.3.2.1 del capítulo de material y métodos (tabla III.23). Esta selección de animales se realizó de tal forma que estuvieran representados al menos 3 ovinos en cada una de las 5 categorías analizadas:

- Animales controles no infectados
- Sin lesión (SL): corderos infectados experimentalmente en los que no se observaron lesiones granulomatosas en el estudio histopatológico.
- Lesión focal (F): lesión restringida al tejido linfoide, con escasos o ningún BAAR.
- Lesión multifocal a (MFa): lesión extendida a la lámina propia que presenta un bajo número de BAAR en las áreas afectadas.
- Lesión multifocal b (MFb): asociada con la presencia de una cantidad moderada-abundante de BAAR en las lesiones granulomatosas, extendidas también a la lámina propia no adyacente al tejido linfoide.

Debido a la degradación de los ARNm de algunas muestras, no se pudieron analizar los 3 tejidos de cada animal, de tal manera que la cantidad definitiva de muestras de ILd, PPY y NLMC estudiadas en cada categoría viene recogida en la tabla IV.13.

Tejidos analizados:	Tipo lesional:				
	Control	SL	F	MFa	MFb
ILd	3	2	4	3	3
PPY	3	3	4	2	2
NLMC	3	3	5	3	3
Total	9	8	13	8	8

Tabla IV.13. Número de muestras de cada tejido de los corderos y ovejas infectadas así como corderos controles, **analizados mediante qPCR** para valorar la expresión génica de diversas citoquinas, factor de transcripción y receptor de respuesta inmune innata, según el tipo lesional.

Tras normalizar previamente todos los niveles de expresión génica mediante los 3 genes de referencia empleados en este estudio, se comparó la variación de dicha expresión en los animales según el tipo lesional, sin distinguir entre la muestra de tejido. De esta manera, únicamente se apreciaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre los distintos grupos de animales en la expresión génica de las citoquinas IL-6, IL-12 e IFN- γ , no mostrando variación significativa los demás genes entre los cinco diferentes grupos estudiados (Gráfico IV.16). Por tanto, de los 11 genes analizados, 3 mostraron variabilidad, mientras que la mayoría de ellos (8) se expresaron de forma más homogénea en los animales analizados, a pesar de la diferente intensidad de lesión desarrollada por los animales.

La cuantificación del ARNm de la IL-6 mediante qPCR fue hasta 3 veces mayor en las formas focales frente a aquellos animales infectados sin lesión ($p < 0,05$). Por otro lado, la expresión de los genes que codifican para la citoquina IL-12 fue significativamente mayor en los animales con lesiones focales, en comparación con aquellos con lesiones más avanzadas, especialmente con las de tipo MFb, con abundantes BAAR en los granulomas ($p < 0,05$), triplicando los niveles. Finalmente, la expresión génica del IFN- γ fue más intensa en los animales infectados que no desarrollaron lesiones en comparación con los ovinos controles, o aquellos del grupo F o MFa ($p < 0,05$) (Gráfico IV.16). Los valores individuales del nivel de expresión de cada gen así como su valor medio en cada grupo, vienen detallados en las tablas X.13 y X.14 de los anexos.

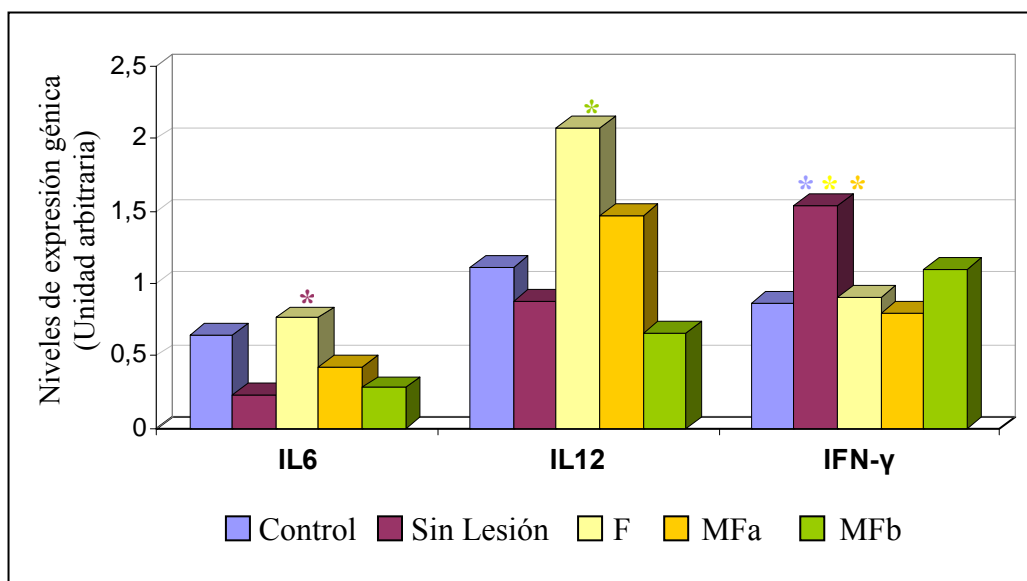


Gráfico IV.16. Niveles de expresión génica de IL-6, IL-12 e IFN- γ entre los diferentes grupos lesionales, obtenidos mediante qPCR, tras su normalización con los genes de referencia. Se representan únicamente los genes estudiados en los que se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes tipos de lesión. Se consideraron los valores medios de cada grupo lesional, sin distinguir entre los diferentes tejidos. El color del * indica el grupo respecto al que existe diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$).

Por otro lado, tras analizar los niveles de expresión de los 11 genes en cada uno de los 3 tejidos estudiados, se comprobó que determinadas citoquinas, factor de transcripción o receptor de inmunidad innata, seguían un perfil de expresión génica diferente según el tejido afectado, tal y como se aprecia en el gráfico IV.17. Los valores específicos de los niveles de expresión de cada gen, así como su valor medio en cada tejido, vienen detallados en las tablas X.13 y X.15 a 17 de los anexos.

El **ILD** fue el tejido que más variaciones génicas experimentó según los grupos patológicos, detectándose diferencias significativas en la expresión de 6 de los 11 genes estudiados, en concreto de 4 citoquinas (TNF- α , IL-1 β , IFN- γ e IL-10), el receptor de inmunidad innata TLR2 así como el factor de transcripción FoxP3. Por otro lado, cuatro citoquinas se expresaron de forma diferente según el tipo de lesión en el **NLM** (IL-17, TNF- α , IL-6 e IL-12), mientras que la **PPY** fue el tejido más homogéneo en cuanto a variabilidad de expresión génica según la intensidad de lesiones, donde sólo el IFN- γ y la IL-13 mostraron diferencias estadísticamente significativas, siendo más constante la expresión de los demás genes en esta localización (Gráfico IV.17).

Concretamente, en el **ILD**, cabe destacar la disminución de la expresión génica del TLR2 en las formas MFb ($p < 0,05$) respecto al resto de grupos, con niveles de expresión 4 veces inferiores al de las formas MFa. El gen que codifica para el factor de transcripción FoxP3 se detectó con mayor intensidad en los animales MFa con respecto a los demás grupos ($p < 0,05$). Por otro lado, la expresión génica del IFN- γ fue cerca de 3 veces mayor en los ovinos infectados sin lesión en comparación con aquellos con las lesiones con mayor cantidad de BAAR, es decir los MFb ($p < 0,05$). La cantidad de ARNm de la IL-10 fue significativamente mayor en las formas más avanzadas en comparación con los animales infectados sin lesión, con formas F o MFa ($p < 0,05$). Finalmente, los niveles de expresión génica de la IL1- β fueron estadísticamente superiores en las formas focales en comparación con los animales infectados sin lesión o con formas MFa ($p < 0,05$) (Gráfico IV.17). La expresión génica de TNF- α fue superior en los individuos controles que en los infectados.

Por otro lado, en **PPY**, el perfil de expresión del IFN- γ fue similar al observado en el ILd, en el sentido de que la cuantificación del ARNm que lo codifica fue mayor en los ovinos infectados sin lesión, con diferencias significativas en comparación con los individuos controles, F, o MFa ($p < 0,05$). En este mismo tejido, la IL-13 fue significativamente más elevada en los animales con lesiones focales y escasos *Map*, con respecto a los demás grupos ($p < 0,05$) (Gráfico IV.17).

En cuanto al **NLMC**, el nivel de expresión de la citoquina IL-17 fue significativamente más elevado en las formas con mayor cantidad de BAAR, es decir los MFb, en comparación con los demás animales infectados ($p < 0,05$). Por el contrario, tanto los genes de la IL-6 como los de la IL-12 se transcribieron en cantidad inferior en dichas formas más avanzadas, con diferencias significativas con respecto a las F, los controles (IL-6) o las MFa (IL-12) ($p < 0,05$). Por otro lado, la expresión génica del TNF- α fue más intensa en los ovinos con lesiones MFa en comparación con aquellos con formas F, con una diferencia de cerca del doble ($p < 0,05$) (Gráfico IV.17).

Por último, cabe destacar la IL-4, única citoquina en la que no se observaron diferencias estadísticamente significativas en los diferentes tejidos entre cada forma patológica ($p > 0,05$).

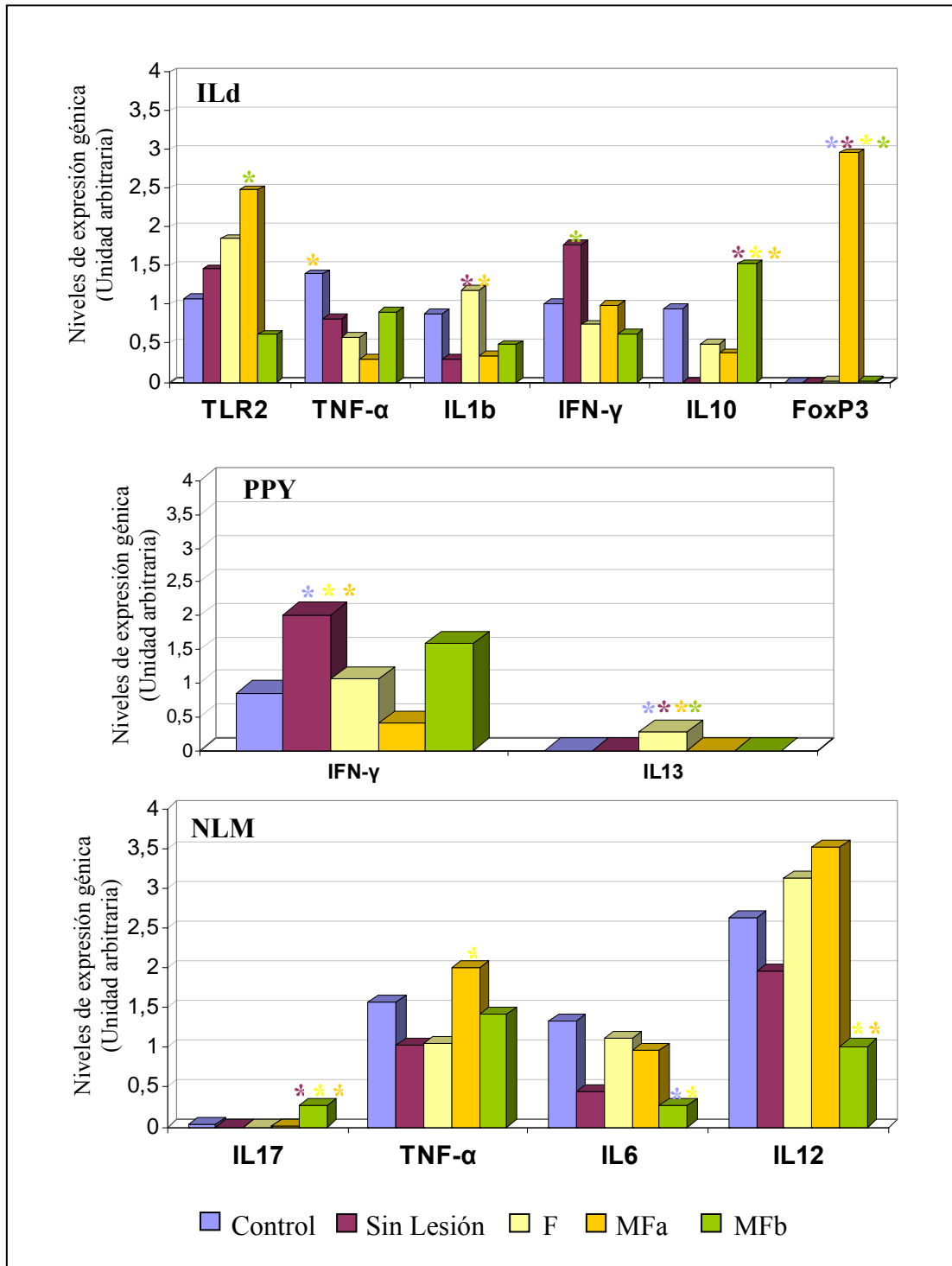


Gráfico IV.17. Niveles de expresión génica de **diversos mediadores** entre los diferentes grupos lesionales en el **ileon distal (ILd)**, **placa de Peyer yeyunal (PPY)** y **nódulo linfático mesentérico caudal (NLMC)** obtenidos mediante qPCR, tras su normalización con los genes de referencia. Se representan únicamente los genes estudiados en los que se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes tipos de lesión en cada tejido. Se consideraron los valores medios de cada grupo lesional. El color del * indica el grupo respecto al que existe diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$).

IV.4. RESULTADOS EN LAS PRUEBAS DE DETECCIÓN DE MAP

IV.4.1. CULTIVO

Esta técnica se llevó a cabo en heces (a los 15 y 90 dpi, y al sacrificio), y en muestras de válvula ileocecal (VIC), íleon distal (ILd), placas de Peyer yeyunales (PPY) y del nódulo linfático mesentérico caudal (NLMC), en los corderos y ovejas sacrificadas.

IV.4.1.1. Detección en heces.

Respecto a las muestras de **heces**, no se lograron aislamientos positivos en los dos muestreos analizados, mientras que al sacrificio, se logró identificar *Map* en medio de **Middlebrook 7H11**, únicamente en cuatro **corderos** infectados con “**dosis alta**”, uno del primer sacrificio (51) y tres del segundo (48, 49, 53) (Figura IX.37), y en ninguna oveja (Tabla IV.14). En todos los casos, excepto el cordero 53 que presentaba lesión focal (F), los animales presentaban lesiones MFb, con abundantes micobacterias en las muestras de tejido detectadas mediante ZN e IHQ.

IV.4.1.2. Detección en muestras de tejido.

En cuanto a los **tejidos**, no se aislaron micobacterias en ninguna de las muestras procedentes de los animales del grupo control ni de aquellos infectados con “**dosis baja**” de *Map*.

Dentro de los animales infectados con “**dosis alta**” de *Map*, sólo se obtuvieron algunos resultados positivos mediante cultivo en muestras de **corderos**, y únicamente en el medio de cultivo **Middlebrook 7H11**, mientras que no se aislaron micobacterias en ninguna de las ovejas adultas (Tabla IV.14). Tan solo el cordero 51, con lesión MFb, resultó ser positivo dentro de los tres sacrificados a los 100-120 dpi, mientras que 4 de los 5 corderos sacrificados al final del experimento (210-220 dpi) fueron positivos, dos con lesión MFb (con abundantes micobacterias en los tejidos) y dos de tipo F, tal y como queda reflejado en la tabla IV.14.

En estos 5 animales positivos, la **VIC** fue el tejido donde más frecuentemente se aisló *Map* (4 de 5 corderos), mientras que sólo se detectó en ILd de 2 corderos (48 y 53). En cambio, todas las muestras de PPY y de NLMC resultaron negativas (Tabla IV.14). Todas las muestras positivas fueron confirmadas mediante tinción de ZN en frío.

	Sacrificio	Animal	VIC	ILd	PPY	NLMC	Heces	Clasif.
Corderos	1er (100-120 dpi)	47	-	-	-	-	-	MFa
		51	+	-	-	-	+	MFb
		54	-	-	-	-	-	MFb
	2° (210-220 dpi)	48	+	+	-	-	+	MFb
		49	-	-	-	-	+	MFb
		50	+	-	-	-	-	F
		52	-	-	-	-	-	MFa
		53	+	+	-	-	+	F

Tabla IV.14. Resultado de las muestras **cultivadas** en medio sólido **Middlebrook 7H11** en el grupo de **corderos** infectados con “**dosis alta**” de *Map*, en el momento del sacrificio. “+” = Muestra positiva; “-” = Muestra negativa. VIC = Válvula ileocecal; ILd = íleon distal; PPY = Placa de Peyer yeyunal; NLMC = Nódulo linfático mesentérico caudal. Clasif: Clasificación histológica final. F: Focal; MFa, MFb: Multifocal a y b, respectivamente.

IV.4.2. PCR

La técnica de la PCR se realizó en las mismas muestras empleadas para el cultivo, es decir, válvula ileocecal (VIC), íleon distal (ILd), placa de Peyer yeyunal (PPY) así como nódulo linfático mesentérico caudal (NLMC), tanto a partir de tejido fresco como incluido en parafina.

IV.4.2.1. Detección en tejido fresco.

La detección de la secuencia de inserción IS900 de *Map* en muestras de tejido fresco se realizó a partir de la técnica de **PCR anidada**.

Todos los corderos y ovejas estudiados dentro del grupo control fueron negativos a la detección de *Map*.

Los resultados obtenidos en las muestras de los **corderos** se pueden apreciar en detalle en las tablas IV.15 (dosis alta) y IV.16 (dosis baja), así como en los gráficos IV.18 y IV.19, donde se representa el porcentaje de animales detectados como positivos, bien por sacrificios, bien por localización estudiada, respectivamente. Mediante PCR anidada, la secuencia de inserción IS900 característica de *Map* fue detectada en **todos** los **corderos** infectados con “**dosis alta**” (100%), y **7 de los 8 corderos** infectados con “**dosis baja**” de *Map* (87,5%). Dentro de aquellos infectados con “**dosis alta**”, al menos 3 de los 4 órganos estudiados fueron positivos, siendo la **VIC** y el **NLMC** los dos tejidos detectados en el 100% de los casos (Tabla IV.15, Gráficos IV.18 y IV.19 y Figura IX.38). Tan sólo el ILd del cordero 54 y la PPY del 48 dieron resultados negativos.

En los **7 corderos** infectados con “**dosis baja**” y positivos a la PCR, al menos un tejido fue siempre positivo. El cordero 45 (sacrificado a los 120 dpi) ofreció resultados negativos en las 4 muestras estudiadas (Tabla IV.16 y gráfico IV.18). Dentro de este grupo de animales, el **NLMC** y la **VIC** fueron los tejidos más frecuentemente infectados, siendo positivos en 5 de 8, y en 4 de 8 corderos, respectivamente (Tabla IV.16, Gráfico IV.19). Los corderos 40 y 43, ambos sacrificados a los 210 dpi, resultaron ser los más positivos, detectándose la presencia de *Map* en 3 de los 4 tejidos estudiados, mientras que sólo se detectó en una sola muestra en el caso de los corderos 41, 42, 44 y 46 (Tabla IV.16).

PCR anidada							
	Sacrificio	Animal	VIC	ILd	PPY	NLMC	Clasif.
Corderos "dosis alta"	1er (100-120 dpi)	47	+	+	+	+	MFa
		51	+	+	+	+	MFb
		54	+	-	+	+	MFb
	2° (210-220 dpi)	48	+	+	-	+	MFb
		49	+	+	+	+	MFb
		50	+	+	+	+	F
		52	+	+	+	+	MFa
		53	+	+	+	+	F

Tabla IV.15. Resultados de la técnica de la **PCR anidada** en **tejido fresco** en el grupo de **corderos** infectados con "**dosis alta**" de *Map*. "+": Muestra positiva a la detección de la secuencia IS900 de *Map*; "-": Muestra negativa. VIC: Válvula ileocecal; ILd: íleon distal; PPY: Placa de Peyer yeyunal; NLMC: Nódulo linfático mesentérico caudal. Clasif: Clasificación histológica final. F: Focal; MFa, MFb: Multifocal a y b, respectivamente

PCR anidada							
	Sacrificio	Animal	VIC	ILd	PPY	NLMC	Clasif.
Corderos "dosis baja"	1er (100-120 dpi)	39	+	-	-	+	SL
		41	-	-	-	+	SL
		45	-	-	-	-	SL
	2° (210-220 dpi)	40	+	+	+	-	SL
		42	-	-	-	+	SL
		43	+	+	-	+	SL
		44	+	-	-	-	SL
		46	-	-	-	+	SL

Tabla IV.16. Resultados de la técnica de la **PCR anidada** en **tejido fresco** en el grupo de **corderos** infectados con "**dosis baja**" de *Map*. "+": Muestra positiva a la detección de la secuencia IS900 de *Map*; "-": Muestra negativa. VIC: Válvula ileocecal; ILd: íleon distal; PPY: Placa de Peyer yeyunal; NLMC: Nódulo linfático mesentérico caudal; Clasif: Clasificación histológica final; SL: Sin lesión.

En cuanto a las **ovejas adultas**, esta técnica permitió detectar ácidos nucleicos del agente etiológico en **11 de las 13** infectadas con "**dosis alta**" (**84,61%**) y en **6 de las 9** **ovejas (66,6%)** infectadas con "**dosis baja**" de *Map* en al menos una localización, tal y como viene detallado en las tabla IV.17 y IV.18 y representado en el gráfico IV.18.

Así, en las **ovejas** infectadas con “**dosis alta**” de *Map*, la secuencia de inserción IS900 se pudo evidenciar en todas aquellas sacrificadas al final del experimento, mientras que se detectó en 4 de las 6 ovejas sacrificadas a los 100-120 dpi, al resultar negativas las ovejas 25 y 27. La mayor cantidad de muestras positivas en este grupo de animales se detectó en la **VIC** (Tabla IV.17, Gráfico IV.19), donde por lo general aparecía el mayor número de lesiones.

Seis de las nueve **ovejas** infectadas con “**dosis baja**” de *Map* dieron resultados positivos en al menos un tejido, no habiéndose detectado la presencia de *Map* en las ovejas 8 y 17, sacrificadas a los 100-120 dpi, ni tampoco en la oveja 16, sacrificada al final del experimento (Tabla IV.18, gráfico IV.18). Nuevamente, la **VIC** fue el tejido donde más veces se identificó la secuencia IS900 (Gráfico IV.19). Así mismo, la oveja 12 resultó ser la más infectada, al dar resultados positivos en 3 de los 4 tejidos estudiados, mientras que sólo se detectó *Map* en una de las muestras estudiadas de las ovejas 10, 13, 14 y 15 (Tabla IV.18).

PCR anidada							
	Sacrificio	Animal	VIC	ILd	PPY	NLMC	Clasif.
Ovejas “dosis alta”	1er (100-120 dpi)	19	SD	+	+	-	F
		22	+	+	-	-	F
		23	-	-	-	+	F
		25	-	-	SD	-	F
		27	-	-	-	-	F
		30	+	+	-	-	SL
	2° (210-220 dpi)	18	+	+	+	+	F
		20	+	+	+	+	F
		21	+	-	+	+	F
		24	-	+	-	+	F
		26	+	-	+	-	F
		28	+	+	-	SD	MFa
		29	+	-	-	SD	F

Tabla IV.17. Resultados de la técnica de la **PCR anidada** en **tejido fresco** en el grupo de **ovejas** infectadas con “**dosis alta**” de *Map*. “+”: Muestra positiva a la detección de la secuencia IS900 de *Map*; “-”: Muestra negativa. VIC: Válvula ileocecal; ILd: íleon distal; PPY: Placa de Peyer yeyunal; NLMC: Nódulo linfático mesentérico caudal; SD: Sin datos. Clasif: Clasificación histológica final. SL: Sin lesión; F: Focal; MFa: Multifocal a.

PCR anidada							
	Sacrificio	Animal	VIC	ILd	PPY	NLMC	Clasif.
Ovejas “dosis baja”	1er (100-120 dpi)	8	-	-	-	-	SL
		13	+	-	-	-	SL
		14	-	+	-	-	SL
		17	-	-	-	-	SL
	2° (100-120 dpi)	10	-	-	-	+	SL
		11	+	-	+	-	SL
		12	+	+	-	+	SL
		15	-	-	+	-	SL
		16	-	-	-	-	SL

Tabla IV.18. Resultados de la técnica de la **PCR anidada** en **tejido fresco** en el grupo de **ovejas** infectadas con “**dosis baja**” de *Map*. “+”: Muestra positiva a la detección de la secuencia IS900 de *Map*; “-”: Muestra negativa. VIC: Válvula ileocecal; ILd: íleon distal; PPY: Placa de Peyer yeyunal; NLMC: Nódulo linfático mesentérico caudal. Clasif: Clasificación histológica final; SL: Sin lesión.

En resumen, se detectaron siempre más animales positivos a *Map* mediante PCR anidada en muestras de tejido fresco de aquellos individuos que fueron mantenidos hasta el final del experimento (210-220 dpi) que en aquellos sacrificados de manera más precoz, a los 100-120 dpi, salvo en el caso de los corderos infectados con “dosis alta”, donde todos los animales fueron detectados, tanto en el primero como en el segundo sacrificio (Gráfico IV.18). Por otro lado, sumando todas las muestras de tejido analizadas por grupos experimentales, se identificó la presencia de la secuencia IS900 de *Map* de manera significativamente más frecuente en los **corderos** frente a las ovejas adultas, tanto en aquellos del grupo infectados con “dosis alta” como con “dosis baja” de *Map* ($p < 0,05$). Por otro lado, tanto en los corderos como en las ovejas, se obtuvieron un número significativamente mayor de animales y muestras positivas a la detección de ácidos nucleicos de *Map* dentro del grupo de “dosis alta” en comparación con aquel de “dosis baja” de *Map* ($p < 0,001$). De esta manera, 30 de las 32 muestras (**93,75%**) de los **corderos** infectados con **10^{10} UFC de *Map*** fueron positivas a la presencia de la secuencia IS900 mediante PCR anidada, frente a 25 de las 48 muestras (**52,08%**) en las **ovejas adultas** del mismo grupo (Tablas IV.15 y 17). Por otro lado, 12 de los 32 tejidos (**37,5%**) analizados en los **corderos** infectados con “**dosis baja**” de *Map* fueron positivos en comparación con 9 de los 36 tejidos (**25%**) estudiados en las **ovejas adultas** (Tablas IV.16 y 18). Así mismo, la **VIC** fue el tejido más frecuentemente

analizado como positivo a la presencia de *Map* en las ovejas, junto con el NLMC en los corderos, si bien las diferencias observadas entre los tejidos analizados no fueron estadísticamente significativas (Gráfico IV.19).

Finalmente, un número significativo de muestras positivas fueron secuenciadas para comprobar la especificidad del producto amplificado. En todos los casos, las secuencias de nucleótidos obtenidas presentaron una homología con la de inserción IS900 de *Map* de más de un 97%.

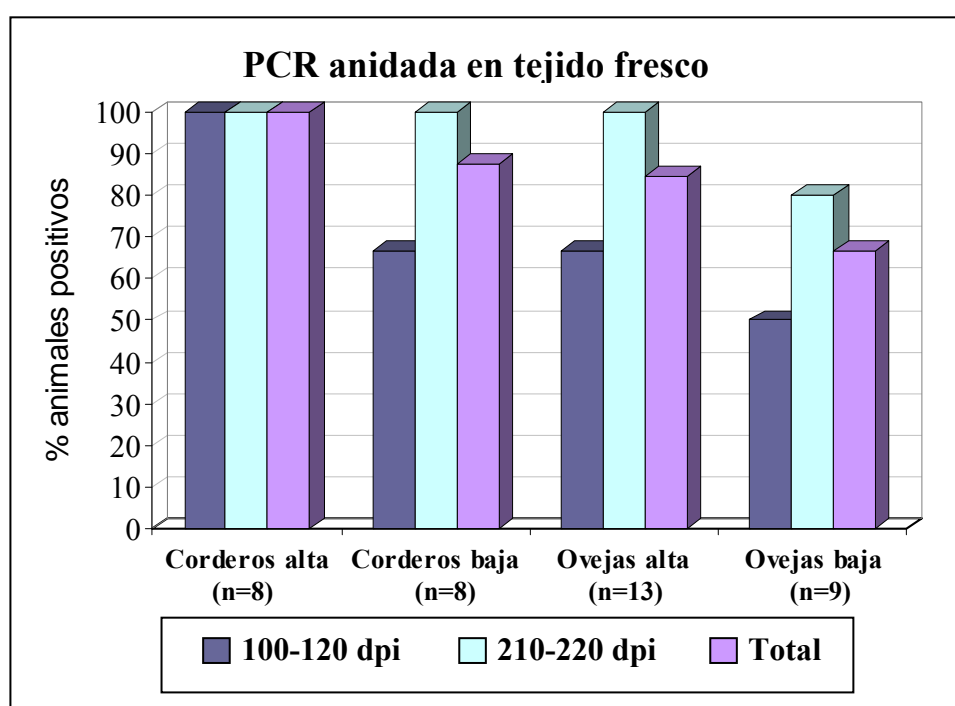


Gráfico IV.18. Porcentaje de animales detectados como positivos a la presencia de la secuencia de inserción IS900 mediante PCR anidada en muestras de tejido fresco, en cada sacrificio así como en el conjunto del experimento (total).

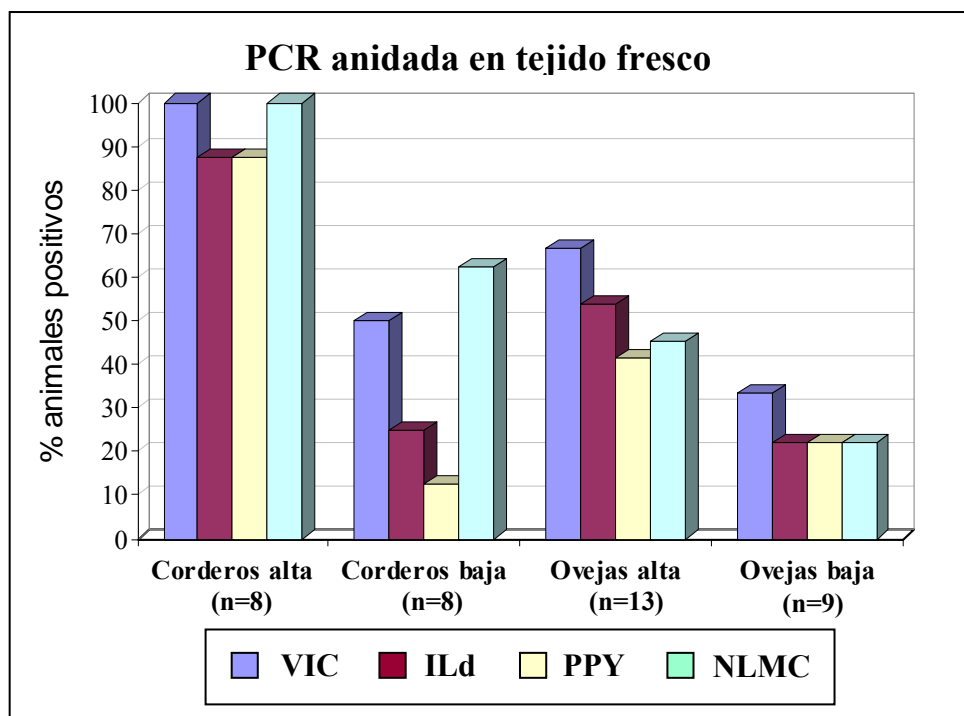


Gráfico IV.19. Porcentaje de animales detectados como **positivos** a la **presencia de la secuencia de inserción IS900** mediante **PCR anidada** en muestras de **tejido fresco**, según la localización estudiada en cada grupo de animales infectados. VIC: Válvula ileocecal; ILd: Ileon distal; PPY: placa de Peyer yeyunal; NLMC: Nódulo linfático mesentérico caudal.

IV.4.2.2. Detección en tejido incluido en parafina.

En este caso, la presencia de los ácidos nucleicos de *Map* en muestras de tejido incluido en parafina se estudió tanto mediante PCR convencional, como empleando la PCR anidada, en secciones de VIC, ILd, PPY y NLMC (Ver apartado III.4.2.2.1.3 del capítulo de material y métodos).

IV.4.2.2.1. PCR convencional

Las secciones de tejido incluido en parafina de los animales controles no infectados analizadas mediante esta técnica, fueron negativas a la detección de *Map*.

Los resultados de los **corderos** infectados con “**dosis alta**” y “**baja**” de *Map* vienen recogidos en las tablas IV.19 y 20, respectivamente, así como representados en porcentajes de animales positivos dentro de cada grupo, y en función del tejido estudiado, en las gráficas IV.20 y 21.

Mediante PCR convencional, se detectó la secuencia de inserción IS900 específica de *Map* en **7 de los 8 corderos** infectados con “**dosis alta**” (87,5%), y en **un cordero de los 8** infectados con “**dosis baja**” de *Map* (12,5%), que no había mostrado lesiones. Dentro de aquellos infectados con “**dosis alta**”, el cordero 47, sacrificado a los 100-120 dpi, fue el único en el que no se identificó la presencia de ácidos nucleicos de *Map* mediante PCR convencional, detectándose en todos los demás en al menos un tejido (Tabla IV.19; Gráfico IV.20). El animal 50 resultó ser el menos infectado, al identificarse la secuencia IS900 en un solo tejido, el ILd, mientras que la IS900 fue identificada con mayor frecuencia en el cordero 54, sacrificado a los 100-120 dpi, detectándose su presencia en los 4 tejidos estudiados (Tabla IV.19). El **ILd** fue el tejido más frecuentemente analizado como positivo a la presencia de *Map* en comparación con los otros 3, detectándose en 7 de los 8 corderos (87,5%) (Tabla IV.19; Gráfico IV.21).

En cuanto a los **corderos** infectados con “**dosis baja**” de *Map*, sólo se identificó la secuencia IS900 de *Map* en la **PPY** del animal 41 (Tabla IV.20, Gráficos IV.20 y 21).

PCR convencional							
	Sacrificio	Animal	VIC	ILd	PPY	NLMC	Clasif.
Corderos “dosis alta”	1er (100-120 dpi)	47	-	-	-	-	MFa
		51	-	+	+	+	MFb
		54	+	+	+	+	MFb
	2° (100-120 dpi)	48	-	+	+	-	MFb
		49	-	+	+	+	MFb
		50	-	+	-	-	F
		52	+	+	-	-	MFa
		53	-	+	+	+	F

Tabla IV.19. Resultados de la técnica de la **PCR convencional** en **tejido incluido en parafina** en el grupo de **corderos** infectados con “**dosis alta**” de *Map*. “+”: Muestra positiva a la detección de la secuencia IS900 de *Map*; “-”: Muestra negativa. VIC: Válvula ileocecal; ILd: íleon distal; PPY: Placa de Peyer yeyunal; NLMC: Nódulo linfático mesentérico caudal. Clasif: Clasificación histológica final; F: Focal; MFa y b: Multifocal a y b, respectivamente.

PCR convencional							
	Sacrificio	Animal	VIC	ILd	PPY	NLMC	Clasif.
Corderos “dosis baja”	1er (100-120 dpi)	39	-	-	-	-	SL
		41	-	-	+	-	SL
		45	-	-	-	-	SL
	2° (210-220 dpi)	40	-	-	-	-	SL
		42	-	-	-	-	SL
		43	-	-	-	-	SL
		44	-	-	-	-	SL
		46	-	-	-	-	SL

Tabla IV.20. Resultados de la técnica de la **PCR convencional** en **tejido incluido en parafina** en el grupo de **corderos** infectados con “**dosis baja**” de *Map*. “+”: Muestra positiva a la detección de la secuencia IS900 de *Map*; “-”: Muestra negativa. VIC: Válvula ileocecal; ILd: íleon distal; PPY: Placa de Peyer yeyunal; NLMC: Nódulo linfático mesentérico caudal; Clasif: Clasificación histológica final; SL: Sin lesión.

De manera similar, en los animales adultos, se detectaron como positivas a la presencia de ácidos nucleicos de *Map* **6 de las 13 ovejas (46,15%)** infectadas con “**dosis alta**”, así como **una de las 9 (11,11%)** infectadas con “**dosis baja**” de *Map* (sin lesiones detectadas) en al menos una localización, tal y como viene reflejado en las tablas IV.21 y 22, y en los gráficos IV.20 y 21.

Respecto a las **ovejas** infectadas con “**dosis alta**” de *Map*, se identificó la secuencia IS900 en 2 tejidos del animal 22 y en tres de los individuos 23 y 25, sacrificados a los 100-120 dpi, frente a un único tejido de los animales 18, 20 y 21, sacrificados a los 210-220 dpi (Tabla IV.21, Gráficos IV.20 y 21). En este caso, la **PPY** resultó ser la localización en la que más frecuentemente se detectó la presencia de ácidos nucleicos de *Map* mediante PCR convencional, aunque sin diferencias significativas con respecto a los demás tejidos, ofreciendo resultados positivos en 4 de los 13 (30,77%) animales de este grupo (Tabla IV.21 y Gráfico IV.21). En cambio, dentro de aquellas infectadas con “**dosis baja**” de *Map*, sólo la número 17 fue positiva en la **PPY** (Tabla IV.22 y Gráficos IV.20 y 21).

PCR convencional							
	Sacrificio	Animal	VIC	ILd	PPY	NLMC	Clasif.
Ovejas “dosis alta”	1er (100-120 dpi)	19	-	-	-	-	F
		22	-	+	+	-	F
		23	+	-	+	+	F
		25	+	+	+	-	F
		27	-	-	-	-	F
		30	-	-	-	-	SL
	2° (210-220 dpi)	18	-	-	-	+	F
		20	-	-	-	+	F
		21	-	-	+	-	F
		24	-	-	-	-	F
		26	SD	-	-	-	F
		28	-	-	-	-	MFa
		29	-	-	-	-	F

Tabla IV.21. Resultados de la técnica de la PCR convencional en tejido incluido en parafina en el grupo de ovejas infectados con “dosis alta” de *Map*. “+”: Muestra positiva a la detección de la secuencia IS900 de *Map*; “-”: Muestra negativa. SD: Sin datos. VIC: Válvula ileocecal; ILd: íleon distal; PPY: Placa de Peyer yeyunal; NLMC: Nódulo linfático mesentérico caudal. Clasif: Clasificación histológica final; SL: Sin lesión; F: Focal; MFa: Multifocal a.

PCR convencional							
	Sacrificio	Animal	VIC	ILd	PPY	NLMC	Clasif.
Ovejas “dosis baja”	1er (100-120 dpi)	8	-	-	-	-	SL
		13	-	-	-	-	SL
		14	-	-	-	-	SL
		17	-	-	+	-	SL
	2° (210-220 dpi)	10	-	-	-	-	SL
		11	-	-	-	-	SL
		12	-	-	-	-	SL
		15	-	-	-	-	SL
		16	-	-	-	-	SL

Tabla IV.22. Resultados de la técnica de la PCR convencional en tejido incluido en parafina en el grupo de ovejas infectadas con “dosis baja” de *Map*. “+”: Muestra positiva a la detección de la secuencia IS900 de *Map*; “-”: Muestra negativa. VIC: Válvula ileocecal; ILd: íleon distal; PPY: Placa de Peyer yeyunal; NLMC: Nódulo linfático mesentérico caudal; Clasif: Clasificación histológica final; SL: Sin lesión.

En resumen, dentro de aquellos ovinos pertenecientes al grupo de animales infectados con **10¹⁰ UFC de *Map* (dosis alta)**, se detectaron más **corderos** que ovejas positivos a *Map* mediante PCR convencional en secciones de tejido incluido en parafina ($p < 0,01$). De esta manera, con respecto al número total de secciones estudiadas en cada grupo, se identificó la presencia de la secuencia IS900 de *Map* en 18 secciones de las 32 analizadas (**54,25%**) en el caso de los **corderos**, frente a 11 de las 51 secciones estudiadas (**21,57%**) en las **ovejas adultas** (Tablas IV.19 y 21). Por otro lado, tan sólo un animal resultó ser positivo mediante PCR convencional, en un sólo tejido, dentro del grupo de ovinos infectados con **10³ UFC de *Map* (dosis baja)**, tanto en los adultos como en los corderos. Una sola sección de tejido de las 32 analizadas (**3,12%**) fue detectada como positiva dentro de los **corderos** frente a una de las 36 estudiadas (**2,77%**) en el caso de las **ovejas** (Tablas IV.20 y 22). Además, se identificó la presencia de la secuencia IS900 de *Map* en un mayor porcentaje de animales sacrificados a los 200-210 dpi en el caso de los corderos del grupo de “dosis alta”, mientras que en los demás grupos, la mayoría de los animales detectados como positivos fueron sacrificados de manera más precoz, a los 100-120 dpi (Gráfico IV.20). Finalmente, el **ILd** fue la muestra más frecuentemente colonizada por la presencia de *Map* en los corderos infectados con “dosis alta”, mientras que la **PPY** fue la localización que ofreció un mayor número de resultados positivos en los demás grupos, siendo el único tejido en el caso de los animales infectados con “dosis baja”, tanto corderos como ovejas (Gráfica IV.21).

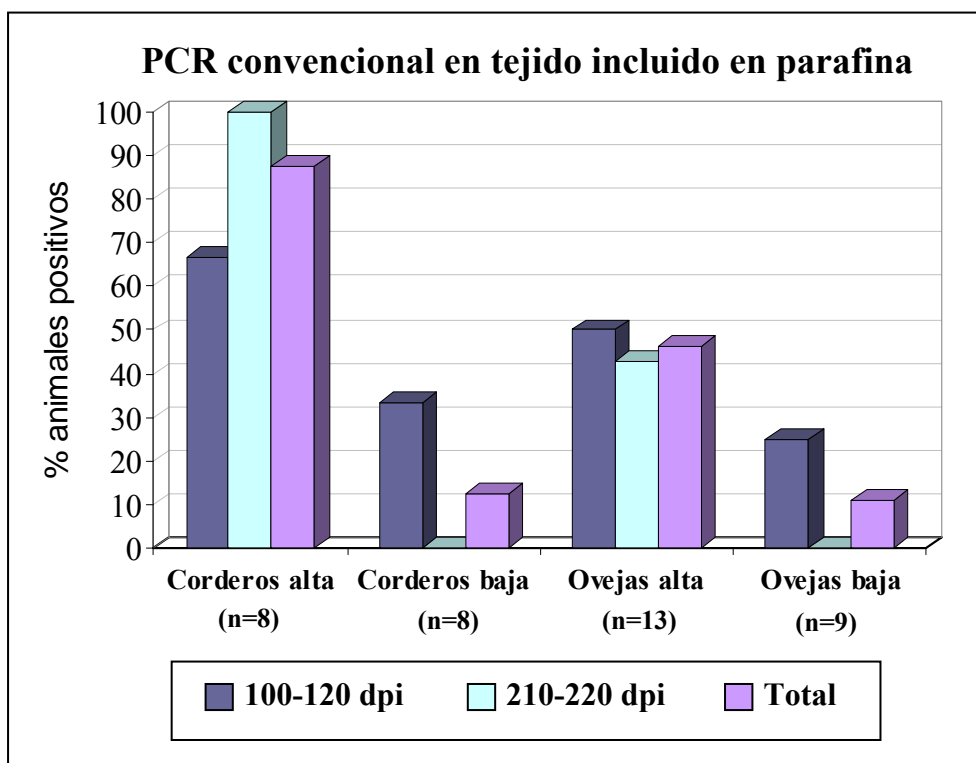


Gráfico IV.20. Porcentaje de animales detectados como **positivos** a la **presencia de la secuencia de inserción IS900** mediante **PCR convencional** en muestras de **tejido incluido en parafina**, según el momento de sacrificio así como en el conjunto del experimento (total).

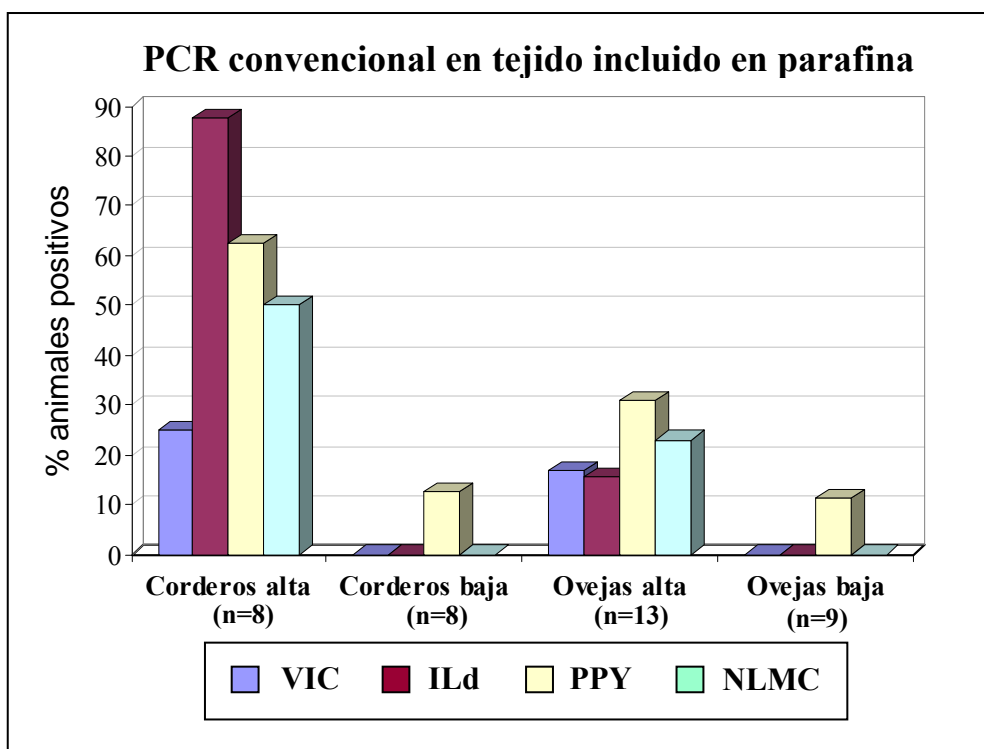


Gráfico IV.21. Porcentaje de animales detectados como **positivos** a la **presencia de la secuencia de inserción IS900** mediante **PCR convencional** en muestras de **tejido incluido en parafina**, según la localización en cada grupo de animales infectados. VIC: Válvula ileocecal; ILd: Ileon distal; PPY: placa de Peyer yeyunal; NLMC: Nódulo linfático mesentérico caudal.

IV.4.2.2.2. PCR anidada

De manera similar, se procedió al estudio de la presencia de la secuencia de inserción IS900 propia de *Map* a partir de muestras de **tejido incluido en parafina** mediante **PCR anidada**, en las mismas muestras que en la PCR convencional. Los resultados vienen detallados a continuación en las tablas IV.23 a IV.26, así como representados en los gráficos IV.22 y IV.23.

Todas las muestras de los corderos y de las ovejas controles estudiadas mediante esta técnica fueron negativas a la presencia de ácidos nucleicos de *Map*.

Todos los **corderos** infectados con “**dosis alta**” (100%) y 7 de los **8 corderos** pertenecientes al grupo de infectados con “**dosis baja**” de *Map* (87,5%) dieron resultados positivos a la detección de la secuencia IS900 (Tablas IV.23 y IV.24, gráfico IV.22).

Concretamente, todos los **corderos** infectados con “**dosis alta**” de *Map* fueron positivos en al menos 2 tejidos (Tabla IV.23, gráfico IV.22). El cordero 47, sacrificado a los 100-120 dpi, y el 50, mantenido hasta el final del experimento, fueron los únicos en dar resultados negativos, en PPY y NLM en el primer caso, y en ILd y PPY en el último, mientras que el resto fue positivo en todas las muestras. La **VIC** fue el único tejido detectado en el 100% de los animales de este grupo (Tabla IV.23, Gráfico IV.23).

Dentro de los **corderos** pertenecientes al grupo de infectados con “**dosis baja**” de *Map* (sin lesiones histológicas), esta técnica detectó 7 de los 8 animales (87,5%) en al menos un tejido (Tabla IV.24, Gráfico IV.22). El cordero 45, sacrificado a los 100-120 dpi, fue el único en el que no se pudo identificar la secuencia IS900 en ninguno de los tejidos estudiados. En cambio el animal 42, mantenido hasta el final del experimento, mostró resultados positivos en 3 de los 4 tejidos analizados. Se identificó la secuencia IS900 con mayor frecuencia en la VIC y el NLMC, aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas (Tabla IV.24, Gráfico IV.23). Dentro de este grupo, se detectaron ácidos nucleicos de *Map* con mayor frecuencia en los animales sacrificados al final de la infección experimental que en aquellos sacrificados a los 100-120 dpi.

PCR anidada							
	Sacrificio	Animal	VIC	ILd	PPY	NLMC	Clasif.
Corderos “dosis alta”	1er (100-120 dpi)	47	+	+	-	-	MFa
		51	+	+	+	+	MFb
		54	+	+	+	+	MFb
	2° (210-220 dpi)	48	+	+	+	+	MFb
		49	+	+	+	+	MFb
		50	+	-	-	+	F
		52	+	+	+	+	MFa
		53	+	+	+	+	F

Tabla IV.23. Resultados de la técnica de la **PCR anidada en tejido incluido en parafina** en el grupo de **corderos** infectados con “**dosis alta**” de *Map*. “+”: Muestra positiva a la detección de la secuencia IS900 de *Map*; “-”: Muestra negativa. VIC: Válvula ileocecal; ILd: íleon distal; PPY: Placa de Peyer yeyunal; NLMC: Nódulo linfático mesentérico caudal. Clasif: Clasificación histológica final; F: Focal; MFa y MFb: Multifocal a y b, respectivamente.

PCR anidada							
	Sacrificio	Animal	VIC	ILd	PPY	NLMC	Clasif.
Corderos “dosis baja”	1er (100-120 dpi)	39	+	-	+	-	SL
		41	-	-	+	-	SL
		45	-	-	-	-	SL
	2° (210-220 dpi)	40	+	-	-	+	SL
		42	+	-	+	+	SL
		43	+	-	-	+	SL
		44	-	+	-	-	SL
		46	-	-	-	+	SL

Tabla IV.24. Resultados de la técnica de la **PCR anidada en tejido incluido en parafina** en el grupo de **corderos** infectados con “**dosis baja**” de *Map*. “+”: Muestra positiva a la detección de la secuencia IS900 de *Map*; “-”: Muestra negativa. VIC: Válvula ileocecal; ILd: íleon distal; PPY: Placa de Peyer yeyunal; NLMC: Nódulo linfático mesentérico caudal. Clasif: Clasificación histológica final; SL: Sin lesión.

Al estudiar la presencia de la secuencia IS900 de *Map* en las **ovejas** a partir de tejido incluido en parafina, se detectaron **12 de las 13** ovejas infectadas con “**dosis alta**” (**92,31%**) y **7 de los 9** animales (**77,77%**) infectados con “**dosis baja**” de *Map* (Tablas IV.25 y IV.26, gráfico IV.22).

En las **ovejas** de “**dosis alta**”, doce de ellas fueron positivas en al menos un tejido, al no detectarse ácidos nucleicos de *Map* en ninguno de los tejidos estudiados de la oveja 21, sacrificada a los 210-220 dpi (Tabla IV.25, Gráfico IV.22). En esta ocasión, esta técnica detectó la presencia de la secuencia IS900 con mayor frecuencia en la **VIC** y el **NLMC**, si bien, nuevamente, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas (Tabla IV.25, Gráfico IV.23).

En aquellas **ovejas** infectadas con “**dosis baja**” de *Map*, siete animales dieron resultados positivos a la detección de la secuencia IS900 en al menos un tejido, siendo negativas las ovejas 11 y 15, sacrificadas al final del experimento (Tabla IV.26, gráfico IV.22). En este grupo de animales, el **NLMC** fue el tejido donde *Map* se identificó con mayor frecuencia, pero sin diferencias significativas con respecto a los demás tejidos, detectándose en 4 de las 9 ovejas (Tabla IV.26, gráfico IV.23).

PCR anidada							
	Sacrificio	Animal	VIC	ILd	PPY	NLMC	Clasif.
Ovejas “dosis alta”	1er (100-120 dpi)	19	-	-	-	+	F
		22	+	+	+	-	F
		23	+	+	-	+	F
		25	+	-	+	+	F
		27	-	-	+	-	F
		30	+	-	-	-	SL
	2º (210-220 dpi)	18	+	+	-	+	F
		20	+	-	+	-	F
		21	-	-	-	-	F
		24	-	-	+	-	F
		26	SD	-	+	+	F
		28	-	+	-	+	MFa
		29	+	-	-	-	+

Tabla IV.25. Resultados de la técnica de la **PCR anidada** en **tejido incluido en parafina** en el grupo de **ovejas** infectadas con “**dosis alta**” de *Map*. “+”: Muestra positiva a la detección de la secuencia IS900 de *Map*; “-”: Muestra negativa. SD: Sin datos. VIC: Válvula ileocecal; ILd: íleon distal; PPY: Placa de Peyer yeyunal; NLMC: Nódulo linfático mesentérico caudal. Clasif: Clasificación histológica final; SL: Sin lesión; F: Focal; MFa: Multifocal a.

PCR anidada							
	Sacrificio	Animal	VIC	ILd	PPY	NLMC	Clasif.
Ovejas “dosis baja”	1er (100-120 dpi)	8	+	-	+	-	SL
		13	-	-	-	+	SL
		14	+	-	-	-	SL
		17	-	-	-	+	SL
	2° (210-220 dpi)	10	+	-	-	+	SL
		11	-	-	-	-	SL
		12	-	-	+	+	SL
		15	-	-	-	-	SL
		16	-	+	-	-	SL

Tabla IV.26. Resultados de la técnica de la **PCR anidada en tejido incluido en parafina** en el grupo de **ovejas** infectadas con “**dosis baja**” de *Map*. “+”: Muestra positiva a la detección de la secuencia IS900 de *Map*; “-”: Muestra negativa. VIC: Válvula ileocecal; ILd: íleon distal; PPY: Placa de Peyer yeyunal; NLMC: Nódulo linfático mesentérico caudal. Clasif: Clasificación histológica final; SL: Sin lesión.

Los ácidos nucleicos de *Map* se identificaron con mayor frecuencia en los tejidos de los **corderos** que en los de las **ovejas**, y de forma significativa dentro del grupo de “dosis alta” ($p < 0,05$). Además, en los **corderos**, se detectó una mayor cantidad de secciones de tejido positivas mediante PCR anidada en aquellos animales del grupo de “dosis alta” que en los de “dosis baja” ($p < 0,01$). En cambio, en las **ovejas**, se identificaron más secciones negativas que positivas a la presencia de *Map*, independientemente del grupo experimental ($p < 0,01$). De esta manera, sumando las secciones de tejido con resultado positivo a la presencia de la secuencia IS900 de *Map* del total analizado mediante PCR anidada, 28 de las 32 secciones estudiadas (**87,5%**) en los **corderos** infectados con “**dosis alta**” de *Map* fueron positivas, frente a 24 de las 51 secciones de tejido (**47,06%**) en el caso de las **ovejas adultas** del mismo grupo experimental (Tablas IV.23 y 25). En cuanto a los animales del grupo de infectados con **10³ UFC de *Map* (dosis baja)**, doce de las 32 secciones de tejido (**37,5%**) fueron positivas en el caso de los **corderos**, frente a 10 de las 36 (**27,77%**) en las **ovejas adultas** (Tablas IV.24 y 26). Además, se detectaron más **corderos** positivos en el segundo sacrificio que en el primero en ambos grupos. Sin embargo, en esta ocasión, se identificaron más **ovejas** positivas a los 100-120 dpi que al final del experimento (210-220 dpi) (Gráfico IV.22). La **VIC** fue el tejido en el que se identificaron ácidos nucleicos de *Map* con mayor frecuencia en las **ovejas** y **corderos** infectados con “dosis

alta”, junto con el NLMC en aquellos infectados con “dosis baja”, si bien estas diferencias no fueron significativas (Gráfico IV.23).

Al igual que se realizó con las muestras de tejido fresco, se secuenció un número significativo de muestras positivas de tejido incluido en parafina para confirmar la especificidad del producto amplificado, de forma que las secuencias de nucleótidos obtenidas presentaron una homología con la de inserción IS900 de *Map* de más de un 97%.

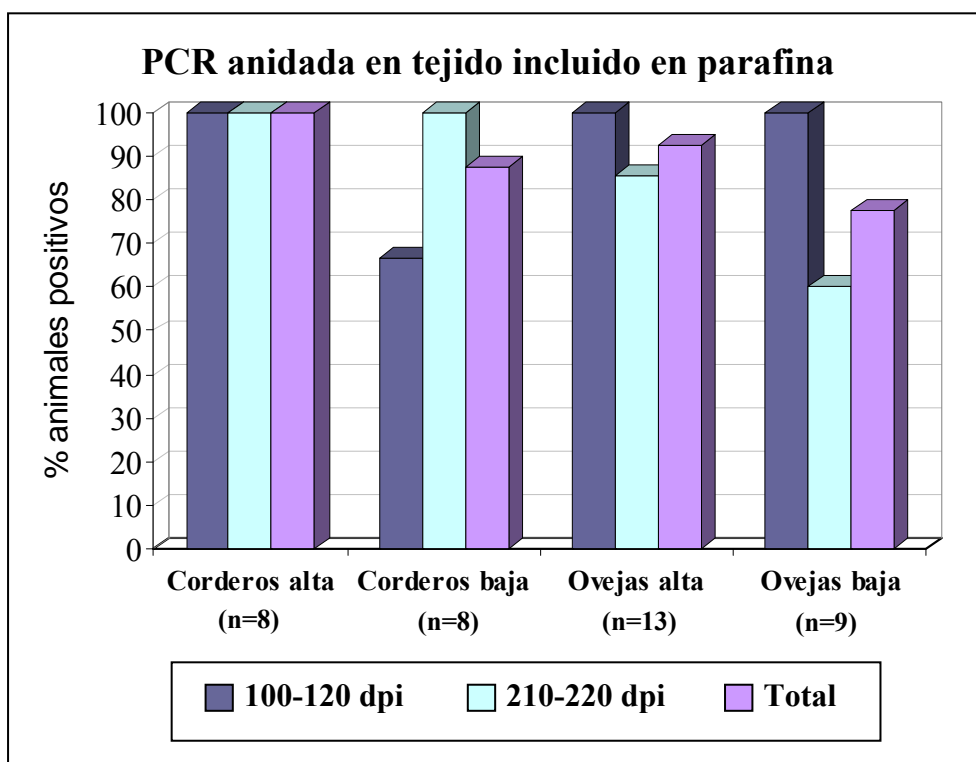


Gráfico IV.22. Porcentaje de animales detectados como positivos a la presencia de la secuencia de inserción IS900 mediante PCR anidada en muestras de tejido incluido en parafina, en función del sacrificio así como en el conjunto del experimento (total).

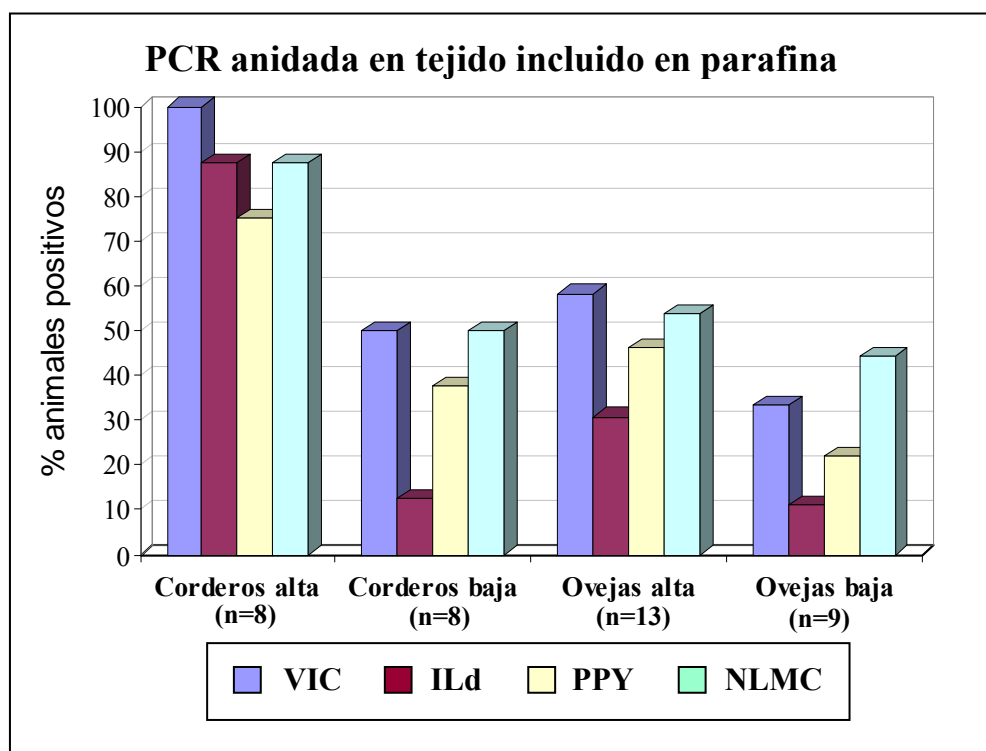


Gráfico IV.23. Porcentaje de animales detectados como **positivos** a la **presencia de la secuencia de inserción IS900** mediante **PCR anidada** en muestras de **tejido incluido en parafina**, según la localización estudiada en cada grupo de animales infectados. VIC: Válvula ileocecal; ILd: Ileon distal; PPY: placa de Peyer yeyunal; NLMC: Nódulo linfático mesentérico caudal.

IV.5. RELACIÓN ENTRE LA RESPUESTA A LAS TÉCNICAS DE DETECCIÓN DE *MAP* Y EL TIPO LESIONAL

Se llevó a cabo un estudio comparativo entre las diferentes técnicas empleadas en esta tesis doctoral para detectar la presencia del agente etiológico tanto en muestras de tejido fresco por un lado, como en muestras de tejido incluido en parafina por otro lado, en relación con las lesiones.

IV.5.1. ESTUDIO COMPARATIVO EN MUESTRAS DE TEJIDO FRESCO

La detección de *Map* en las muestras de **tejido fresco** se llevó a cabo mediante **cultivo** (Tabla IV.14) y **PCR anidada** (Tablas IV.15 a 18; Gráficos IV.18 y 19), tal y como se detalló anteriormente en los apartados IV.4.1 e IV.4.2.1, respectivamente. Las tablas IV.27 y IV.28 representan los corderos y ovejas detectados como positivos mediante dichas técnicas en relación con el tipo lesional, tomando como referencia la **clasificación histológica final** que se atribuyó a cada animal (Tablas IV.7 y IV.8) e

incluyendo tanto los animales infectados con “dosis baja”, sin lesión, como aquellos infectados con “dosis alta” de *Map*. Además, dichos resultados se encuentran resumidos en la tabla IV.29, donde se han sumado tanto los corderos como las ovejas adultas, y representados de forma esquemática en el gráfico IV.24.

Corderos	Tipo lesional*:			
	SL	F	MFa	MFb
Cultivo: (+ / total)	0 / 8	2 / 2	0 / 2	2 / 4
Positivos (%)	(0)	(100)	(0)	(50)
PCR anidada: (+ / total)	7 / 8	2 / 2	2 / 2	4 / 4
Positivos (%)	(87,5)	(100)	(100)	(100)

Tabla IV.27. Número de **corderos** detectados como positivos mediante **cultivo** y **PCR anidada** a partir de muestras de **tejido fresco** con respecto al número total de corderos infectados (porcentaje), incluyendo todos los del grupo de “dosis alta” y “baja” de *Map*, según el tipo lesional. Se consideró el animal como “positivo” cuando *Map* era detectado en al menos uno de los tejidos estudiados. SL: Sin lesión; F: Focal; MFa y MFb: Multifocal a y b, respectivamente. * Se tomó como referencia la clasificación histológica final atribuida a cada animal en la tabla IV.7.

Ovejas	Tipo lesional*:		
	SL	F	MFa
Cultivo: (+ / total)	0 / 10	0 / 11	0 / 1
Positivos (%)	(0)	(0)	(0)
PCR anidada: (+ / total)	7 / 10	9 / 11	1 / 1
Positivos (%)	(70)	(81,82)	(100)

Tabla IV.28. Número de **ovejas** detectadas como positivas mediante **cultivo** y **PCR anidada** a partir de muestras de **tejido fresco** con respecto al número total de ovejas infectadas (porcentaje), incluyendo todas las del grupo de “dosis alta” y “baja” de *Map*, según el tipo lesional. Se consideró el animal como “positivo” cuando *Map* era detectado en al menos uno de los tejidos estudiados. SL: Sin lesión; F: Focal; MFa: Multifocal a. * Se tomó como referencia la clasificación histológica final atribuida a cada animal en la tabla IV.8.

Corderos y Ovejas	Tipo lesional*:			
	SL	F	MFa	MFb
Cultivo: (+ / total)	0 / 18	2 / 13	0 / 3	2 / 4
Positivos (%)	(0)	(15,38)	(0)	(50)
PCR anidada: (+ / total)	14 / 18	11 / 13	3 / 3	4 / 4
Positivos (%)	(77,77)	(84,61)	(100)	(100)

Tabla IV.29. Número de **corderos y ovejas juntos** detectados como positivos mediante **cultivo** y **PCR anidada** a partir de muestras de **tejido fresco**, con respecto al número total de ovinos infectados (porcentaje), incluyendo todos los del grupo de “dosis alta” y “baja” de *Map*, según el tipo lesional. Se consideró el animal como “positivo” cuando *Map* era detectado en al menos uno de los tejidos estudiados. SL: Sin lesión; F: Focal; MFa y MFb: Multifocal a y b, respectivamente. * Se tomó como referencia la clasificación histológica final atribuida a cada animal en las tablas IV.7 y 8.

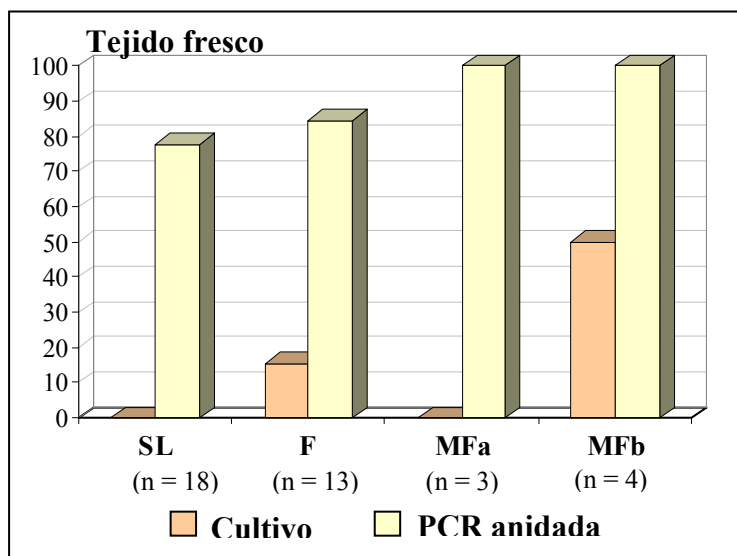


Gráfico IV.24. Porcentaje de animales infectados detectados como positivos mediante **cultivo** y **PCR anidada** a partir de muestras de **tejido fresco**, incluyendo tanto **ovejas** como **corderos**, según el tipo lesional. Se consideró el animal como “positivo” cuando *Map* era detectado en al menos uno de los tejidos estudiados. SL: Sin lesión; F: Focal; MFa y MFb: Multifocal a y b, respectivamente.

Tomando como referencia la clasificación histológica definitiva que se atribuyó a cada animal, la PCR anidada fue la técnica más sensible para identificar la presencia de *Map* en muestras de tejido fresco, detectando el 100% de los corderos con lesiones F, MFa y MFb, e incluso la ovejas 28, único animal adulto de este estudio con lesiones MFa (Tablas IV.27 y 28). En cambio, no se aislaron colonias viables de *Map* de ninguno de los animales adultos ni de los corderos con lesiones MFa o de aquellos en los que no se apreciaron lesiones histológicas. Por otro lado, la PCR anidada fue la única técnica que permitió identificar algunos de estos últimos animales (infectados pero sin lesiones), con mayor eficacia en el caso de los corderos (Tablas IV.27 y 28). Sumando las ovejas con los corderos, se confirmaron estos resultados, al detectar un mayor número de animales mediante la PCR anidada que el cultivo (Tabla IV.29; Gráfico IV.24).

Por otro lado, se llevó a cabo un análisis del grado de concordancia entre ambas pruebas con un nivel de confianza del 95%, sumando los resultados de las ovejas y corderos juntos, según cada tipo lesional. También se calculó el índice estadístico “kappa” (κ) agrupando todos los animales en los que se observó algún tipo de lesión granulomatosa tras el estudio histológico, es decir tanto los focales como los

multifocales a y b, en una categoría denominada “Con lesión” (CL). Finalmente, se analizó el grado de concordancia entre ambas pruebas diagnósticas sumando todos los ovinos infectados experimentalmente en este estudio, en otra categoría denominada “Infectados”. Todos estos resultados se encuentran detallados en la figura IV.1.

SL		Cultivo		κ
		Pos	Neg	
PCR anidada	Pos	0	14	0
	Neg	0	4	
F		Cultivo		κ
		Pos	Neg	
PCR anidada	Pos	2	9	0,06
	Neg	0	2	
MFa		Cultivo		κ
		Pos	Neg	
PCR anidada	Pos	0	3	0
	Neg	0	0	
MFb		Cultivo		κ
		Pos	Neg	
PCR anidada	Pos	2	2	0
	Neg	0	0	
CL		Cultivo		κ
		Pos	Neg	
PCR anidada	Pos	4	14	0,05
	Neg	0	2	
Infectados		Cultivo		κ
		Pos	Neg	
PCR anidada	Pos	4	28	0,04
	Neg	0	6	

Figura IV.1. Análisis del **grado de concordancia** entre las pruebas diagnósticas del **cultivo** y de la **PCR anidada** a partir de muestras de **tejido fresco** en todos los ovinos adultos y corderos infectados en este estudio, según el tipo lesional. Se consideró el animal como positivo cuando *Map* era detectado en al menos uno de los tejidos estudiados. κ: Índice estadístico kappa; SL: Sin lesión; F: Focal; MFa y MFb: Multifocal a y b, respectivamente; CL: animales con lesión (F, MFa y MFb); Infectados: todos los ovinos infectados experimentalmente; Pos: resultado positivo ; Neg: Resultado negativo.

Tomando como referencia el cultivo, considerado como la prueba de diagnóstico “gold standard” en paratuberculosis, la técnica de la PCR anidada en muestras de tejido fresco mostró un grado de **concordancia débil** dentro de las formas *focales* (F), las agrupaciones de animales “*con lesión*” (CL) y entre todos los ovinos infectados en este estudio (grupo de “*infectados*”), con un índice kappa de 0,06, 0,05 y 0,04, respectivamente. Por otro lado, la posible concordancia observada dentro del grupo de ovinos infectados *sin lesión* (SL), y *multifocales* (MFa y MFb) fue debida exclusivamente **al azar** (Figura IV.1).

IV.5.2. ESTUDIO COMPARATIVO EN MUESTRAS DE TEJIDO INCLUIDO EN PARAFINA.

Para llevar a cabo el estudio comparativo entre las técnicas empleadas para detectar la presencia de *Map* en secciones de **tejido incluido en parafina**, se tomaron de forma conjunta todos los **corderos y ovejas infectados** experimentalmente, es decir, todos los del grupo de dosis “alta” y “baja”, y se agruparon en función del tipo lesional que presentaron en las diferentes secciones de tejido estudiadas (VIC, ILd, PPY y NLMC), según se ha detallado en las tablas IV.7 y IV.8 de forma individualizada, para los animales infectados con “dosis alta” de *Map*, no habiéndose encontrado lesiones en ninguno de los animales del grupo de “dosis baja”. La distribución de las secciones de tejido incluidas en este estudio y analizadas mediante **ZN, IHQ y PCR convencional y anidada**, viene representada en la tabla IV.30. Tras comprobar que en todas las secciones de tejido sin lesiones analizadas mediante ZN e IHQ los resultados fueron negativos, se ha asumido que todas aquellas muestras donde no aparecieron lesiones granulomatosas fueron negativas a ambas técnicas.

Animal:	Tipo lesional:	Número de secciones estudiadas en cada tejido:				
		VIC	ILd	PPY	NLMC	Total
Corderos	SL	9	11	9	11	40
	F	3	1	2	2	8
	MFa*	3	1	2	3	9
	MFb	1	3	3	/	7
Ovejas	SL	12	22	11	17	62
	F	8	/	10	5	23
	MFa*	1	/	1	/	2

Tabla IV.30. Distribución de las secciones de **tejido incluido en parafina** estudiadas en **ovejas y corderos** para la detección del agente etiológico mediante **ZN, IHQ, PCR anidada y convencional** en función del tipo lesional. Se consideraron todos los animales pertenecientes a los grupos experimentales infectados (grupos de “dosis alta” y “baja” de *Map*). De cada animal se estudió una sección de tejido por VIC, ILd, PPY y NLMC. No se dispuso de secciones de VIC de la oveja 26 para este estudio. * Los NLMC clasificados como MF se incluyeron en el tipo lesional MFa. SL: Sin lesión; F: Focal; MFa y MFb: Multifocal a y b, respectivamente; VIC: Válvula ileocecal; ILd: Ileon distal; PPY: Placa de Peyer yeyunal; NLMC: Nódulo linfático mesentérico caudal.

Los resultados obtenidos en las muestras de los corderos y ovejas, considerando de forma conjunta todas las secciones analizadas, se detallan en las tablas IV.31 y IV.32, respectivamente. Además, se analizaron las secciones de tejido calificadas como

positivas de corderos y ovejas de forma conjunta, tal y como se representa en la tabla IV.33 y el gráfico IV.25.

Corderos	Tipo lesional:			
	SL	F	MFa	MFb
ZN: (+ / total)	0 / 40	2 / 8	5 / 9	7 / 7
Positivos (%)	(0)	(25)	(55,55)	(100)
IHQ: (+ / total)	0 / 40	1 / 8	6 / 9	7 / 7
Positivos (%)	(0)	(12,5)	(66,66)	(100)
PCR convencional: (+ / total)	8 / 40	1 / 8	4 / 9	6 / 7
Positivos (%)	(20)	(12,5)	(44,44)	(85,71)
PCR anidada: (+ / total)	18 / 40	7 / 8	8 / 9	7 / 7
Positivos (%)	(45)	(87,5)	(88,88)	(100)

Tabla IV.31. Número de secciones de **tejido incluido en parafina** de los **corderos** infectados, detectadas como positivas mediante **ZN, IHQ, PCR convencional** o **anidada**, con respecto al número total de secciones estudiadas (porcentaje), según el tipo lesional. Estos resultados se obtuvieron agrupando los 4 tejidos examinados. SL: Sin lesión; F: Focal; MFa y MFb: Multifocal a y b, respectivamente.

Ovejas	Tipo lesional:		
	SL	F	MFa
ZN: (+ / total)	0 / 62	3* / 23	0 / 2
Positivos (%)	(0)	(13,04)	(0)
IHQ: (+ / total)	0 / 62	1* / 23	1* / 2
Positivos (%)	(0)	(4,35)	(50)
PCR convencional: (+ / total)	5 / 62	7 / 23	0 / 2
Positivos (%)	(8,06)	(30,43)	(0)
PCR anidada: (+ / total)	20 / 62	14 / 23	0 / 2
Positivos (%)	(32,26)	(60,87)	(0)

Tabla IV.32. Número de secciones de **tejido incluido en parafina** de las **ovejas** infectadas, detectadas como positivas mediante **ZN, IHQ, PCR convencional** o **anidada**, con respecto al número total de secciones estudiadas (porcentaje), según el tipo lesional. Estos datos se obtuvieron agrupando los 4 tejidos examinados. *Los resultados dudosos de estas secciones se consideraron positivos. SL: Sin lesión; F: Focal; MFa: Multifocal a.

Corderos y Ovejas	Tipo lesional:			
	SL	F	MFa	MFb
ZN: (+ / total) Positivos (%)	0 / 102 (0)	5 / 31 (16,13)	5 / 11 (45,45)	7 / 7 (100)
IHQ: (+ / total) Positivos (%)	0 / 102 (0)	2 / 31 (6,45)	7 / 11 (63,63)	7 / 7 (100)
PCR convencional: (+ / total) Positivos (%)	13 / 102 (12,74)	8 / 31 (25,8)	4 / 11 (36,36)	6 / 7 (85,71)
PCR anidada: (+ / total) Positivos (%)	38 / 102 (37,25)	21 / 31 (67,74)	8 / 11 (72,73)	7 / 7 (100)

Tabla IV.33. Número de secciones de **tejido incluido en parafina** de los **corderos y ovejas** infectados, detectadas como positivas mediante **ZN, IHQ, PCR convencional** o **anidada** con respecto al número total de secciones estudiadas (porcentaje), según el tipo lesional. Estos resultados se obtuvieron agrupando los 4 tejidos examinados. SL: Sin lesión; F: Focal; MFa y MFb: Multifocal a y b, respectivamente.

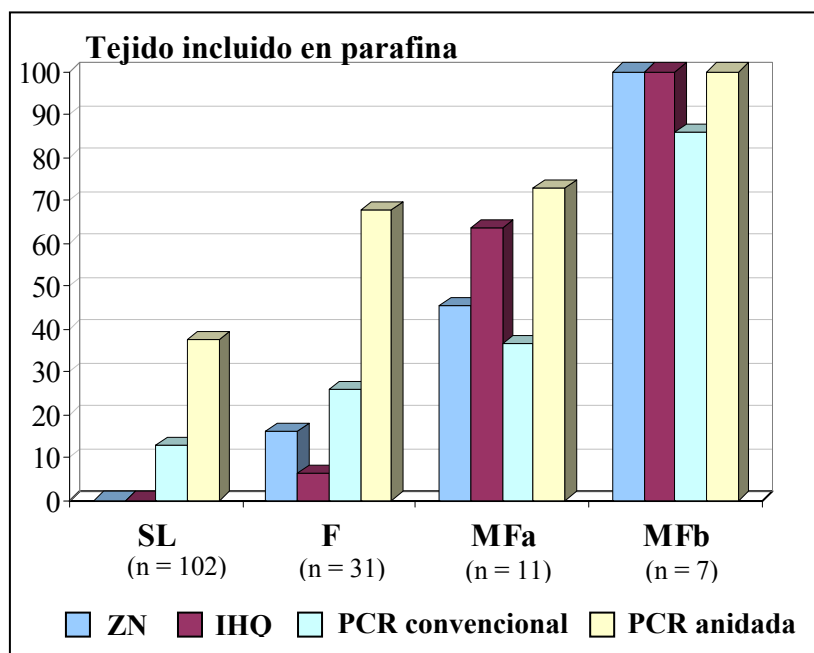


Gráfico IV.25. Porcentaje de animales infectados detectados como positivos mediante **ZN, IHQ, PCR convencional** o **anidada** a partir de muestras de **tejido incluido en parafina**, incluyendo tanto **ovejas** como **corderos**, según el tipo lesional. Estos resultados se obtuvieron agrupando los 4 tejidos examinados. SL: Sin lesión; F: Focal; MFa y MFb: Multifocal a y b, respectivamente.

Tomando como referencia el estudio histopatológico, y considerando las secciones de tejido de las ovejas con resultados “dudosos” en el ZN e IHQ como “positivas” a dichas pruebas, las cuatro técnicas empleadas en esta tesis doctoral para identificar la presencia del agente etiológico en tejido incluido en parafina, detectaron *Map* con mayor eficacia en cuanto más avanzadas eran las lesiones (Tablas IV.31 a 33;

Gráfico IV.25). En el caso de los **corderos**, todas las técnicas alcanzaron una sensibilidad del 100% en las secciones de tejido con lesiones MFb, salvo la PCR convencional, en la que ésta fue del 85,71%, al no haberse detectado la presencia de ácidos nucleicos de *Map* de una de dichas secciones (Tabla IV.31). En las **ovejas**, sólo se dispuso de dos secciones de tejido con lesiones multifocales (procedentes de la oveja 28, con lesión MFa), que fueron negativas, para comparar la eficacia de dichas pruebas (Tabla IV.32). Por otro lado, la sensibilidad del ZN, IHQ y PCR anidada fue siempre menor en las ovejas que en los corderos con lesiones focales, con sensibilidades del 25%, 12,5%, y 87,5% en secciones de tejido de estos últimos, respectivamente, frente al 13,04%, 4,35% y 60,87%, en las ovejas adultas. En el caso de la PCR convencional, la sensibilidad fue mayor en los tejidos de los corderos, salvo en el caso de las lesiones focales, en las que se detectó la presencia de la secuencia IS900 en una mayor cantidad de secciones de tejido en las ovejas adultas (30,43%) que en corderos (12,5%) (Tablas IV.31 y 32).

La PCR anidada fue la técnica más sensible, siendo capaz de detectar los ácidos nucleicos de *Map* hasta en un 87,5% de las secciones de tejido de los corderos, y el 60,87% de las ovejas con lesiones focales (Tablas IV.31 y 32). Además, esta prueba identificó la presencia de la secuencia IS900 en corderos y ovejas infectados en los que no se encontraron lesiones (Tablas IV.31 y 32).

Sumando las secciones de tejido detectadas como positivas a la presencia de *Map* en ovejas y corderos de manera conjunta, se confirmaron dichos resultados, con una mayor sensibilidad en cada técnica empleada conforme progresaban las lesiones hacia una mayor gravedad, de forma que se incrementaba la cantidad de BAAR detectada en ellas. Además, comparando ambas PCR, la anidada fue siempre más sensible que la convencional. De hecho, la PCR anidada fue la técnica con mejor rendimiento en cuanto a la detección de *Map* en cada forma patológica estudiada. (Tabla IV.33; Gráfico IV. 25).

Distinguiendo entre cada tejido, y dentro de los animales en los que no se detectaron lesiones granulomatosas mediante el estudio histológico (animales infectados SL), la **VIC** y el **NLMC** fueron las muestras en las que la PCR anidada mostró el mejor

rendimiento en cuanto a la detección de ácidos nucleicos de *Map*, aunque sin mostrar diferencias significativas con respecto a los demás tejidos (Gráfico IV. 26).

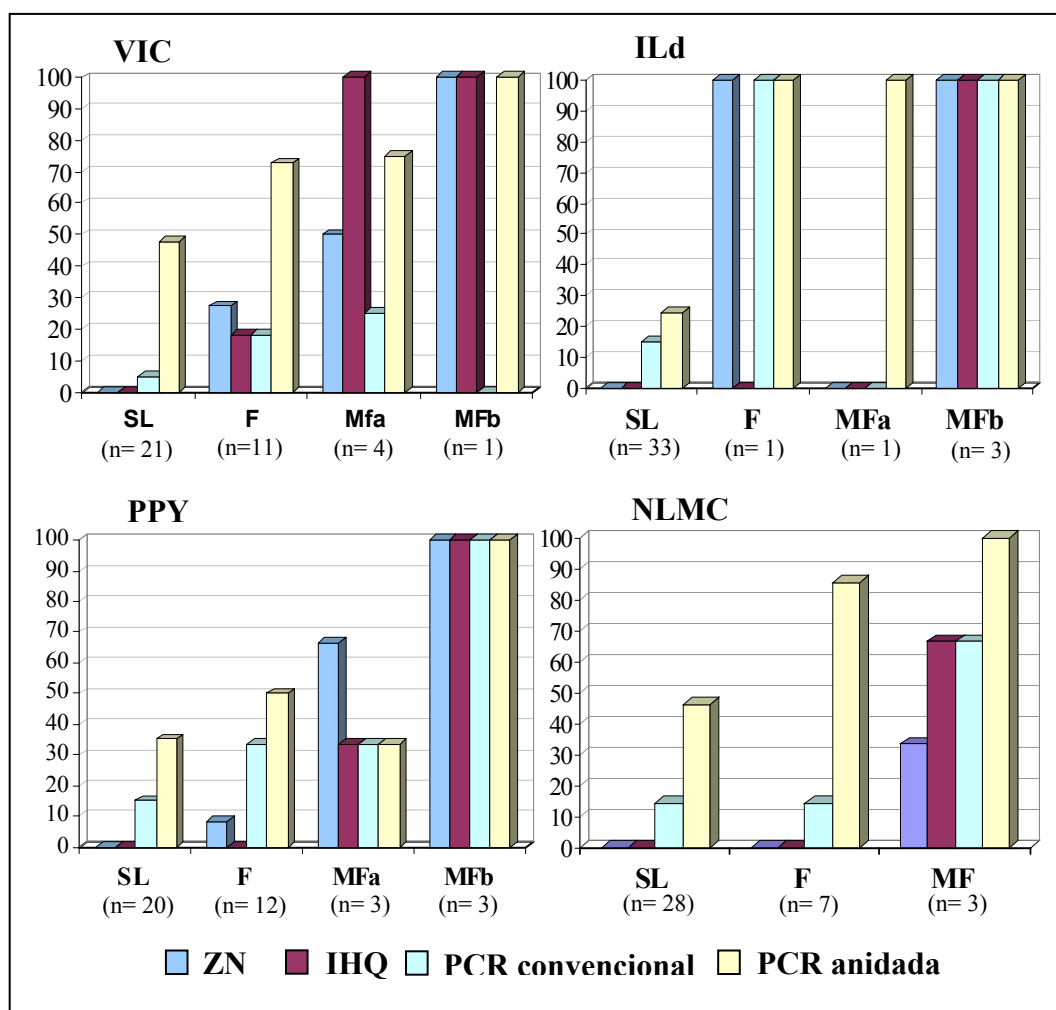


Gráfico IV.26. Porcentaje de animales infectados detectados como positivos mediante ZN, IHQ, PCR convencional o anidada en cada localización a partir de secciones de **tejido incluido en parafina**, incluyendo tanto **ovejas** como **corderos**, según el tipo lesional. Los resultados dudosos obtenidos mediante ZN o IHQ en alguna sección de VIC y PPYm de las ovejas se consideraron positivos. VIC: Válvula ileocecal; ILd: Ileon distal; PPY: Placa de Peyer yeyunal; NLMC: Nódulo linfático mesentérico caudal; SL: Sin lesión; F: Focal; MFa y MFb: Multifocal a y b, respectivamente.

Por último, también se llevó a cabo el análisis del grado de concordancia entre las cuatro técnicas, con un nivel de confianza del 95%, tomando los resultados obtenidos en las muestras de ovejas y corderos de forma conjunta, según el tipo lesional. Al igual que en el apartado anterior (IV.5.1), también se agruparon en la categoría “con lesión” (CL) todos los animales en los que se observó algún tipo de lesión granulomatosa tras el estudio histológico, es decir tanto los focales como los multifocales a y b. Por otro lado, se calculó el índice estadístico kappa (κ) para analizar

la concordancia en dichas pruebas entre todos los animales infectados experimentalmente en este estudio, en la categoría denominada “infectados” (Figuras IV.2, IV.3 y IV.4).

No se calculó el índice kappa entre las pruebas del ZN e IHQ dentro de la categoría de “*sin lesión*”, por coincidir todos los resultados negativos en ambas pruebas. Tampoco se calculó dicho valor con la IHQ y la PCR anidada, en el grupo de ovinos con lesiones *multifocales b* tomando el ZN como prueba de referencia, por coincidir todos los siete resultados positivos a dichas pruebas.

Tomando el ZN como referencia, el grado de concordancia entre dicha técnica y la IHQ fue **significativo** dentro de los animales “*con lesión*” así como en todos aquellos “*infectados*” experimentalmente, mientras que sólo fue **moderado** en los ovinos con lesiones *focales*, y **escaso** en los *multifocales a*. La concordancia se consideró **escasa** entre el ZN y la PCR convencional, y **débil** con la PCR anidada en los ovinos “*con lesión*” y en los “*infectados*”. El índice estadístico kappa mostró una concordancia **débil** entre la prueba de ZN y ambas PCR en los ovinos con lesiones *focales* y *multifocales a*. Por último, según dicho índice, la posible concordancia observada entre el ZN y ambas PCR en los ovinos *infectados sin lesión*, así como entre el ZN y la PCR convencional dentro de los ovinos con lesiones *multifocales b*, estaría debida **exclusivamente al azar** (Figura IV.2).

SL		ZN		κ
		Pos	Neg	
PCR convenc.	Pos	0	13	0
	Neg	0	89	
PCR anidada	Pos	0	38	0
	Neg	0	64	

MFb		ZN		κ
		Pos	Neg	
PCR convenc.	Pos	6	0	0
	Neg	1	0	

F		ZN		κ
		Pos	Neg	
IHQ	Pos	2	0	0,53
	Neg	3	26	
PCR convenc.	Pos	2	6	0,14
	Neg	3	20	
PCR anidada	Pos	4	17	0,06
	Neg	1	9	

MFa		ZN		κ
		Pos	Neg	
IHQ	Pos	4	3	0,29
	Neg	1	3	
PCR convenc.	Pos	2	2	0,07
	Neg	3	4	
PCR anidada	Pos	4	4	0,13
	Neg	1	2	

CL		ZN		κ
		Pos	Neg	
IHQ	Pos	13	3	0,68
	Neg	4	29	
PCR convenc.	Pos	10	8	0,33
	Neg	7	24	
PCR anidada	Pos	15	21	0,18
	Neg	2	11	

Infectados		ZN		κ
		Pos	Neg	
IHQ	Pos	13	3	0,76
	Neg	4	131	
PCR convenc.	Pos	10	21	0,32
	Neg	7	113	
PCR anidada	Pos	15	59	0,18
	Neg	2	75	

Figura IV.2. Análisis del **grado de concordancia** entre las pruebas diagnósticas realizadas a partir de secciones de **tejido incluido en parafina** en todos los **ovinos adultos y corderos** infectados, según el tipo lesional, y tomando el **ZN** como referencia. Estos resultados se obtuvieron agrupando los 4 tejidos. κ: Índice estadístico kappa; SL: Sin lesión; F: Focal; MFa y MFb: Multifocal a y b, respectivamente; CL: animales con lesión (F, MFa y MFb); Infectados: todos los ovinos infectados experimentalmente; Pos: resultado positivo; Neg: Resultado negativo; PCR convenc.: PCR convencional.

Por otro lado, tomando como prueba de referencia la tinción **IHQ**, tampoco se calculó el grado de concordancia entre dicha prueba y la PCR anidada en aquellos animales con lesiones *multifocales b*, por coincidir todos los siete resultados positivos a ambas pruebas. Se encontró un grado de concordancia **moderado** entre la técnica IHQ y la PCR convencional en los ovinos con lesiones *multifocales a*, mientras que sólo fue **escaso** con respecto a la PCR anidada (Figura IV.3). El índice kappa también mostró un grado de concordancia **escaso** entre la tinción IHQ y ambas PCR en aquellos animales “con lesión”, y entre la IHQ y la PCR convencional en la categoría de “infectados”. El nivel de concordancia fue **débil** entre la IHQ y la PCR anidada dentro de este último grupo, así como frente a ambas PCR en aquellos con lesiones *focales*. Finalmente, la

concordancia se estimó como **debida al azar** con respecto a ambas PCR en los ovinos infectados “*sin lesión*”, así como entre la IHQ y la PCR convencional dentro de los animales con lesiones *multifocales b* (Figura IV.3).

SL		IHQ		κ
		Pos	Neg	
PCR convenc.	Pos	0	13	0
	Neg	0	89	
PCR anidada	Pos	0	38	0
	Neg	0	64	

F		IHQ		κ
		Pos	Neg	
PCR convenc.	Pos	0	8	-0,11
	Neg	2	21	
PCR anidada	Pos	2	19	0,06
	Neg	0	10	

MFa		IHQ		κ
		Pos	Neg	
PCR convenc.	Pos	4	0	0,49
	Neg	3	4	
PCR anidada	Pos	6	2	0,38
	Neg	1	2	

MFb		IHQ		κ
		Pos	Neg	
PCR convenc.	Pos	6	0	0
	Neg	1	0	

CL		IHQ		κ
		Pos	Neg	
PCR convenc.	Pos	10	8	0,37
	Neg	6	25	
PCR anidada	Pos	15	21	0,23
	Neg	1	12	

Infectados		IHQ		κ
		Pos	Neg	
PCR convenc.	Pos	10	21	0,33
	Neg	6	114	
PCR anidada	Pos	15	59	0,19
	Neg	1	76	

Figura IV.3. Análisis del **grado de concordancia** entre las pruebas diagnósticas realizadas a partir de secciones de **tejido incluido en parafina** en todos los **ovinos adultos y corderos** infectados, según el tipo lesional, y tomando la **IHQ** como referencia. Estos resultados se obtuvieron agrupando los 4 tejidos. κ: Índice estadístico kappa; SL: Sin lesión; F: Focal; MFa y MFb: Multifocal a y b, respectivamente; CL: animales con lesión (F, MFa y MFb); Infectados: todos los ovinos infectados experimentalmente; Pos: resultado positivo ; Neg: Resultado negativo; PCR convenc.: PCR convencional.

Por último, tomando como referencia la PCR convencional, el grado de concordancia calculado entre ambas PCRs fue debido **exclusivamente al azar** en aquellos animales con lesiones *multifocales b*. Por otro lado, la concordancia entre ambas pruebas fue considerada como **débil** en el caso de los animales con lesiones “*focales*”, y finalmente el índice kappa calculado entre dichas PCRs fue **escaso** en los demás grupos de ovinos (Figura IV.4).

SL		PCR conv.		κ
		Pos	Neg	
PCR anidada	Pos	9	29	0,20
	Neg	4	60	

F		PCR conv.		κ
		Pos	Neg	
PCR anidada	Pos	6	15	0,06
	Neg	2	8	

MFa		PCR conv.		κ
		Pos	Neg	
PCR anidada	Pos	4	4	0,35
	Neg	0	3	

MFb		PCR conv.		κ
		Pos	Neg	
PCR anidada	Pos	6	1	0
	Neg	0	0	

CL		PCR conv.		κ
		Pos	Neg	
PCR anidada	Pos	16	20	0,20
	Neg	2	11	

Infectados		PCR conv.		κ
		Pos	Neg	
PCR anidada	Pos	25	49	0,26
	Neg	6	71	

Figura IV.4. Análisis del **grado de concordancia** entre las pruebas diagnósticas realizadas a partir de secciones de **tejido incluido en parafina** en todos los **ovinos adultos** y **corderos** infectados, según el tipo lesional, y tomando la **PCR convencional** como referencia. Estos resultados se obtuvieron agrupando los 4 tejidos. κ: Índice estadístico kappa; SL: Sin lesión; F: Focal; MFa y MFb: Multifocal a y b, respectivamente; CL: animales con lesión (F, MFa y MFb); Infectados: todos los ovinos infectados experimentalmente; Pos: resultado positivo ; Neg: Resultado negativo; PCR conv.: PCR convencional.

IV.5.3. RESUMEN GENERAL

Todos los resultados obtenidos tanto en las **ovejas** como en los **corderos** del grupo de animales infectados con “**dosis alta**” y “**dosis baja**” de *Map*, en cuanto a la detección de dicho agente mediante las diferentes técnicas empleadas en este estudio, así como su relación con las lesiones observadas, se muestran en las tablas IV.38 y IV.39.

Dentro de los **corderos** infectados con “**dosis alta**”, la presencia de *Map* se detectó con mayor frecuencia mediante las distintas técnicas empleadas en esta tesis doctoral, en los cuatro animales clasificados como *multifocales b* (48, 49, 51 y 54), principalmente los corderos 51 y 54, que fueron positivos a todas las pruebas empleadas (Tabla IV.38). Estos cuatro corderos fueron a su vez los que mayor cantidad de *Map* presentaron en sus lesiones según los resultados de las tinciones de ZN e IHQ. Además, los dos corderos clasificados como *focales* (50 y 53) fueron los únicos en los que no se detectó la presencia del agente etiológico mediante ZN o IHQ, y a su vez el cordero 50

fue el menos detectado mediante las diversas técnicas empleadas en este estudio, junto con el 47 y 52, ambos en la categoría de *multifocales de tipo a* (Tabla IV.38). La técnica de la PCR, tanto anidada como convencional, destacó por ser la prueba más sensible en los 8 corderos. El cultivo de tejidos permitió aislar colonias de *Map* tanto en dos corderos con lesión *multifocal b* (48 y 51), con abundantes BAAR en sus lesiones, como en los dos animales con lesiones focales (50 y 53), en los que no se detectó su presencia (Tabla IV.38).

En cuanto a las **ovejas** infectadas con “**dosis alta**”, sólo se obtuvieron resultados dudosos en la detección del agente etiológico de la paratuberculosis mediante ZN e IHQ en 5 ovejas (18, 22, 23, 28 y 29), entre las cuales la 28, clasificada como *multifocal a*. Todos los animales de este grupo presentaron lesiones *focales*, salvo esta última (28), con lesiones *multifocal a*, y la oveja 30, en la que no se apreciaron lesiones tras el estudio histopatológico. Por otro lado, el cultivo no permitió detectar a ninguno de estos ovinos adultos. En cambio, la PCR anidada y convencional fue, nuevamente, la técnica más sensible, al detectar la presencia de ácidos nucleicos de *Map* en la mayoría de los animales, especialmente la PCR anidada (Tabla IV.38).

Por último, no se apreciaron lesiones compatibles con paratuberculosis en ninguno de los animales infectados con “**dosis baja**”, tanto **ovejas** como **corderos** (Tabla IV.39). Además, no se confirmó la presencia de *Map* en ninguno de estos animales mediante ZN, IHQ o cultivo. Tan sólo la técnica de la PCR permitió identificar los ácidos nucleicos de dicho agente, resultando ser nuevamente la técnica más sensible. El cordero 45 fue el único animal de este grupo experimental con resultados negativos a todas las pruebas empleadas en esta tesis doctoral (Tabla IV.39). Por otro lado, las ovejas 8 y 16 sólo dieron resultados positivos mediante PCR anidada en secciones de tejido incluido en parafina (Tabla IV.39).

A)

Fecha sacrificio	Iden.	Clasif. Histol. ^a	ZN ^b	IHQ ^b	Cultivo Tejido ^b	Cultivo Heces ^c	PCRa Tej. fresco ^b	PCRc Tej. parafina ^b	PCRa Tej. parafina ^b
100-120 dpi	47	MFa	+	+	-	-	+	-	+
	51	MFb	+	+	+	+	+	+	+
	54	MFb	+	+	-	-	+	+	+
210-220 dpi	48	MFb	+	+	+	+	+	+	+
	49	MFb	+	+	-	+	+	+	+
	50	F	-	-	+	-	+	+	+
	52	MFa	-	+	-	-	+	+	+
	53	F	-	-	+	+	+	+	+

B)

Fecha sacrificio	Iden.	Clasif. Histol. ^a	ZN ^b	IHQ ^b	Cultivo Tejido ^b	Cultivo Heces ^c	PCRa Tej. Fresco ^b	PCRc Tej. parafina ^b	PCRa Tej. parafina ^b
100-120 dpi	19	F	-	-	-	-	+	-	+
	22	F	+/-	-	-	-	+	+	+
	23	F	+/-	-	-	-	+	+	+
	25	F	-	-	-	-	-	+	+
	27	F	-	-	-	-	-	-	+
	30	SL	-	-	-	-	+	-	+
210-220 dpi	18	F	-	+/-	-	-	+	+	+
	20	F	-	-	-	-	+	+	+
	21	F	-	-	-	-	+	+	-
	24	F	-	-	-	-	+	-	+
	26	F	-	-	-	-	+	-	+
	28	MFa	-	+/-	-	-	+	-	+
	29	F	+/-	+/-	-	-	+	-	+

Tabla IV.34. Resumen de los resultados obtenidos en los **corderos (A)** y **ovejas (B)** infectados con “dosis alta” en las pruebas de **detección de *Map* en tejido y heces** así como su relación con las **lesiones**. Iden.: Identificación; Clasif. histol.: Clasificación histológica; Tej.: Tejido; PCRa: PCR anidada; PCRc: PCR convencional. ^a Se representa la clasificación histológica final de cada animal. ^b Se considera el animal positivo (+) cuando *Map* es detectado mediante esta técnica en al menos uno de los tejidos estudiados. (-): negativo; (+/-): dudoso. ^c Se considera el animal positivo (+) cuando *Map* es aislado en las heces en el momento del sacrificio. (-): negativo; SL: Sin lesión; F: Focal; MFa y MFb: Multifocal a y b, respectivamente.

A)

Fecha sacrificio	Iden.	Clasif. Histol. ^a	ZN ^b	IHQ ^b	Cultivo Tejido ^b	Cultivo Heces ^c	PCRa Tej. fresco ^b	PCRc Tej. parafina ^b	PCRa Tej. parafina ^b
100-120 dpi	39	SL	-	-	-	-	+	-	+
	41	SL	-	-	-	-	+	+	+
	45	SL	-	-	-	-	-	-	-
210-220 dpi	40	SL	-	-	-	-	+	-	+
	42	SL	-	-	-	-	+	-	+
	43	SL	-	-	-	-	+	-	+
	44	SL	-	-	-	-	+	-	+
	46	SL	-	-	-	-	+	-	+

B)

Fecha sacrificio	Iden.	Clasif. Histol. ^a	ZN ^b	IHQ ^b	Cultivo Tejido ^b	Cultivo Heces ^c	PCRa Tej. Fresco ^b	PCRc Tej. parafina ^b	PCRa Tej. parafina ^b
100-120 dpi	8	SL	-	-	-	-	-	-	+
	13	SL	-	-	-	-	+	-	+
	14	SL	-	-	-	-	+	-	+
	17	SL	-	-	-	-	-	+	+
210-220 dpi	10	SL	-	-	-	-	+	-	+
	11	SL	-	-	-	-	+	-	-
	12	SL	-	-	-	-	+	-	+
	15	SL	-	-	-	-	+	-	-
	16	SL	-	-	-	-	-	-	+

Tabla IV.35. Resumen de los resultados obtenidos en los **chivos (A) y ovejitas (B)** infectados con “**dosis baja**” en las pruebas de **detección de *Map* en tejido y heces** así como su relación con las **lesiones**. Se asume que las secciones de tejido en las que no se apreciaron lesiones granulomatosas son negativas a las tinciones de ZN e IHQ. Iden.: Identificación; Clasif. histol.: Clasificación histológica; Tej.: Tejido; PCRa: PCR anidada; PCRc: PCR convencional. ^a Se representa la clasificación histológica final de cada animal. ^b Se considera el animal positivo (+) cuando *Map* es detectado mediante esta técnica en al menos uno de los tejidos estudiados. (-): negativo. ^c Se considera el animal positivo (+) cuando *Map* es aislado en las heces en el momento del sacrificio. (-): negativo. SL: Sin lesión.

IV.6. RELACIÓN ENTRE LA RESPUESTA A LAS TÉCNICAS DE DETECCIÓN DE LA INMUNIDAD PERIFÉRICA FRENTE A *MAP* Y EL TIPO LESIONAL

IV.6.1. ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE LAS PRUEBAS BASADAS EN LA DETECCIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE

Se llevó a cabo un estudio comparativo para valorar la relación entre el **tipo lesional** que mostraban los animales al sacrificio, y su **respuesta inmune periférica** frente a *Map*. Para ello, se utilizaron los resultados obtenidos en el test **ELISA** para determinar la respuesta humoral (Gráfico IV.1), y las pruebas de liberación de **IFN- γ** (Gráfico IV.2) y de **IDR** (Gráficos IV.5 y IV.6) para valorar la respuesta inmune celular específica.

Se consideraron los resultados obtenidos en los muestreos **90** o **195 dpi**, en vez de los del momento del sacrificio (15-20 días después), para que el efecto que sobre la respuesta inmune periférica tuvo la inoculación de PPD aviar durante la prueba de IDR no afectara al resultado de las pruebas, asumiendo que las formas lesiones de los animales no habrían cambiado durante este corto intervalo de tiempo. La obtención del índice, así como el umbral de positividad utilizado en el test ELISA (cociente de 900), la prueba de liberación de IFN- γ (índice de 2) así como la IDR (incremento de piel de más de 2 mm), vienen detallados en los apartados III.4.1.1.1, III.4.1.1.2.1. y III.4.1.1.2.2 del material y métodos, respectivamente. Las tablas IV.40 y IV.41 representan los **corderos** y **ovejas** detectados como positivos mediante las tres pruebas diagnósticas en relación con el tipo lesional, tomando como referencia la **clasificación histológica final** que se atribuyó a cada animal (Tablas IV.7 y IV.8) e incluyendo tanto los animales infectados con “**dosis baja**”, sin lesión, como aquellos infectados con “**dosis alta**” de *Map*. Además, dichos resultados se encuentran resumidos en la tabla IV.42, donde se sumaron tanto los corderos como las ovejas adultas, y se encuentran representados en el gráfico IV.27.

Corderos	Tipo lesional*:			
	SL	F	MFa	MFb
ELISA: (+ / total)	0 / 8	0 / 2	0 / 2	0 / 4
Positivos (%)	(0)	(0)	(0)	(0)
IFN-γ: (+ / total)	0 / 8	1 / 2	1 / 2	4 / 4
Positivos (%)	(0)	(50)	(50)	(100)
IDR: (+ / total)	0 / 8	1 / 2	1 / 2	4 / 4
Positivos (%)	(0)	(50)	(50)	(100)

Tabla IV.36. Número de **corderos** detectados como positivos mediante el test **ELISA**, la prueba de liberación de **IFN- γ** , o la prueba de **IDR** (intradermorreacción), con respecto al número total de corderos infectados (porcentaje), según el tipo lesional. Estos resultados se obtuvieron agrupando los corderos infectados con dosis “alta” y “baja” de *Map*, considerando el valor obtenido en cada prueba 15 días antes del sacrificio (90 o 195 dpi, según el animal). SL: Sin lesión; F: Focal; MFa y MFb: Multifocal a y b, respectivamente. * Se tomó como referencia la clasificación histológica final atribuida a cada animal en las tablas IV.7 y 8.

Ovejas	Tipo lesional*:		
	SL	F	MFa
ELISA: (+ / total)	0 / 10	0 / 11	0 / 1
Positivos (%)	(0)	(0)	(0)
IFN-γ: (+ / total)	0 / 10	10 / 11	1 / 1
Positivos (%)	(0)	(90,9)	(100)
IDR: (+ / total)	3 / 10	11 / 11	0 / 1
Positivos (%)	(30)	(100)	(0)

Tabla IV.37. Número de **ovejas** detectadas como positivas mediante el test **ELISA**, la prueba de liberación de **IFN- γ** , o la prueba de **IDR** (intradermorreacción), con respecto al número total de ovejas infectados (porcentaje), según el tipo lesional. Estos resultados se obtuvieron agrupando las ovejas infectadas con dosis “alta” y “baja” de *Map*, considerando el valor obtenido en cada prueba 15 días antes del sacrificio (90 o 195 dpi, según el animal). SL: Sin lesión; F: Focal; MFa: Multifocal a. * Se tomó como referencia la clasificación histológica final atribuida a cada animal en las tablas IV.7 y IV.8.

Corderos y ovejas	Tipo lesional*:			
	SL	F	MFa	MFb
ELISA: (+ / total)	0 / 18	0 / 13	0 / 3	0 / 4
Positivos (%)	(0)	(0)	(0)	(0)
IFN-γ: (+ / total)	0 / 18	11 / 13	2 / 3	4 / 4
Positivos (%)	(0)	(84,61)	(66,66)	(100)
IDR: (+ / total)	3 / 18	12 / 13	1 / 3	4 / 4
Positivos (%)	(16,66)	(92,3)	(33,33)	(100)

Tabla IV.38. Número de **corderos** y **ovejas** detectadas como positivas mediante el test **ELISA**, la prueba de liberación de **IFN- γ** , o la prueba de **IDR** (intradermorreacción), con respecto al número total de animales infectados (porcentaje), según el tipo lesional. Estos resultados se obtuvieron agrupando los ovinos infectados con dosis “alta” y “baja” de *Map*, considerando el valor obtenido en cada prueba 15 días antes del sacrificio (90 o 195 dpi, según el animal). SL: Sin lesión; F: Focal; MFa y MFb: Multifocal a y b, respectivamente. * Se tomó como referencia la clasificación histológica final atribuida a cada animal en las tablas IV.7 y IV.8

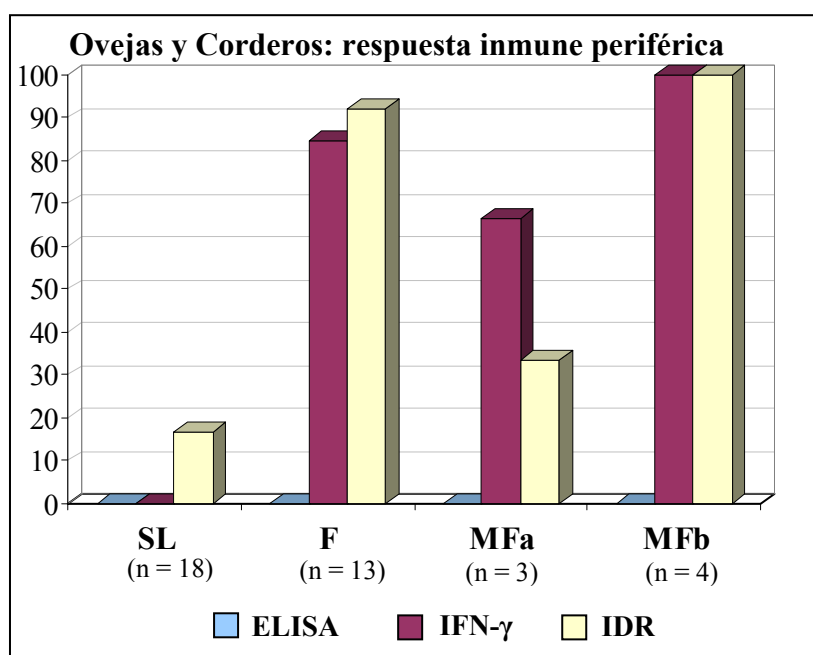


Gráfico IV.27. Porcentaje de animales infectados detectados como positivos mediante el test **ELISA**, la prueba de liberación de **IFN- γ** , o la prueba de **IDR** (intradermorreacción), incluyendo tanto **ovejas** como **corderos**, según el tipo lesional. Estos resultados se obtuvieron agrupando los ovinos infectados con dosis “alta” y “baja” de *Map*, considerando el valor obtenido en cada prueba 15 días antes del sacrificio (90 o 195 dpi, según el animal). IDR: Intradermorreacción; SL: Sin lesión; F: Focal; MFa y MFb: Multifocal a y b, respectivamente.

Ninguno de los animales estudiados ofreció resultado positivo a la técnica ELISA, independientemente del tipo lesional (Tabla IV.42; Gráfico IV.27). Las pruebas de inmunidad celular, tanto la técnica de liberación de IFN- γ como la prueba de IDR, fueron más eficaces para detectar a los animales con lesiones *focales* y *multifocales b* (Tabla IV.42; Gráfico IV.27). Por otro lado, la IDR fue el único test capaz de detectar una respuesta inmune celular considerada como positiva frente a *Map* en animales infectados sin lesión, tratándose los tres casos de ovejas adultas (Tabla IV.41; Gráfico IV.27). Sin embargo, esta técnica no permitió identificar como positiva a la única oveja con lesiones *multifocales a* (Tabla IV.41). En cambio, el 100% de los ovinos con lesiones multifocales b, con una cantidad moderada-abundante de BAAR, desarrollaron una respuesta inmune celular detectable tanto mediante la prueba de secreción de IFN- γ como a través del test de IDR (Tablas IV.40, IV.42 y Gráfico IV.27).

Por último, al igual que en el apartado IV.5, también se llevó a cabo un análisis del grado de concordancia entre las tres pruebas diagnósticas, con un nivel de confianza

del 95%, considerando de forma conjunta los resultados obtenidos en las ovejas y corderos, y en función del tipo lesional. También se agruparon dentro de la categoría “con lesión” (CL) a todos aquellos animales en los que se observó algún tipo de lesión granulomatosa tras el estudio histológico, es decir tanto los *focales* como los *multifocales a y b*. Así mismo, también se calculó el índice estadístico kappa entre dichas pruebas considerando todos los ovinos infectados experimentalmente en este estudio, dentro del grupo denominado “infectados” (Figuras IV.5 y IV.6).

SL		ELISA		κ
		Pos	Neg	
IDR	Pos	0	3	0
	Neg	0	15	
MFa		ELISA		κ
		Pos	Neg	
IFN- γ	Pos	0	2	0
	Neg	0	1	
IDR	Pos	0	1	0
	Neg	0	2	
CL		ELISA		κ
		Pos	Neg	
IFN- γ	Pos	0	17	0
	Neg	0	3	
IDR	Pos	0	17	0
	Neg	0	3	
F		ELISA		κ
		Pos	Neg	
IFN- γ	Pos	0	11	0
	Neg	0	2	
IDR	Pos	0	12	0
	Neg	0	1	
MFb		ELISA		κ
		Pos	Neg	
IFN- γ	Pos	0	4	0
	Neg	0	0	
IDR	Pos	0	4	0
	Neg	0	0	
Infectados		ELISA		κ
		Pos	Neg	
IFN- γ	Pos	0	17	0
	Neg	0	21	
IDR	Pos	0	20	0
	Neg	0	18	

Figura IV.5. Análisis del **grado de concordancia** entre las pruebas diagnósticas basadas en la **respuesta inmune humoral y celular periférica** frente a *Map* en todos los **ovinos adultos y corderos** infectados, según el tipo lesional, tomando el test ELISA como referencia. Estos resultados se obtuvieron agrupando los ovinos infectados con dosis “alta” y “baja” de *Map*, considerando el valor obtenido en cada prueba 15 días antes del sacrificio (90 o 195 dpi, según el animal). IDR: Intradermorreacción; κ : Índice estadístico kappa; SL: Sin lesión; F: Focal; MFa: Multifocal a; MFb: Multifocal b; CL: animales con lesión (F, MFa y MFb); Infectados: todos los ovinos infectados experimentalmente; Pos: resultado positivo ; Neg: Resultado negativo.

En todos los casos, la posible concordancia observada entre la técnica ELISA y las otras dos pruebas, basadas en la detección de la respuesta inmune celular frente a *Map*, fue **debido al azar** (índice $\kappa = 0$) (Figura IV.5).

SL		IFN- γ		κ	F		IFN- γ		κ
		Pos	Neg				Pos	Neg	
IDR	Pos	0	3	0	IDR	Pos	10	2	-0,114
	Neg	0	15			Neg	1	0	

MFa		IFN- γ		κ
		Pos	Neg	
IDR	Pos	1	0	0,4
	Neg	1	1	

CL		IFN- γ		κ	Infectados		IFN- γ		κ
		Pos	Neg				Pos	Neg	
IDR	Pos	15	2	0,216	IDR	Pos	15	5	0,634
	Neg	2	1			Neg	2	16	

Figura IV.6. Análisis del **grado de concordancia** entre las pruebas diagnósticas basadas en la **respuesta inmune celular periférica** frente a *Map* en todos los **ovinos adultos y corderos** infectados, según el tipo lesional, tomando la **prueba de liberación de IFN- γ** como referencia. Estos resultados se obtuvieron agrupando los ovinos infectados con dosis “alta” y “baja” de *Map*, considerando el valor obtenido en cada prueba 15 días antes del sacrificio (90 o 195 dpi, según el animal). IDR: Intradermorreacción; κ : Índice estadístico kappa; SL: Sin lesión; F: Focal; MFa y MFb: Multifocal a y b, respectivamente; CL: animales con lesión (F, MFa y MFb); Infectados: todos los ovinos infectados experimentalmente; Pos: resultado positivo ; Neg: Resultado negativo.

No se calculó el grado de concordancia entre la prueba del IFN- γ y la IDR en los animales con lesiones *multifocales b*, al coincidir los cuatro corderos con dichas lesiones como positivos a ambas pruebas. Sin embargo, la concordancia observada entre ambas pruebas de detección de la respuesta inmune periférica celular varió según el tipo lesional, y, mientras el índice kappa reveló una **disconcordancia** entre ambas pruebas en los ovinos con lesiones *focales*, dicha concordancia fue considerada como **debida al azar** en aquellos infectados *sin lesión*, **escasa** en el grupo de animales “*con lesión*” (lesiones focales y multifocales a y b), **moderada** en las lesiones *multifocales a*, y finalmente, la concordancia fue **significativa** al considerar todos los ovinos dentro de la categoría de “*infectados*” (Figura IV.6).

IV.6.2. RESUMEN GENERAL

Los resultados obtenidos en todos los **corderos** y **ovejas** infectados en este estudio en cuanto a la determinación de la respuesta inmune periférica frente a *Map* a los 90 y 195 dpi (15-20 días previos al sacrificio), en función del tipo lesional, vienen

expuestos en la tabla IV.43 en el caso de los animales infectados con “**dosis alta**” de *Map*, y en la tabla IV.44 en aquellos infectados con “**dosis baja**”.

Tal y como se comentó en el apartado anterior, ningún animal infectado mostró una **respuesta inmune humoral** frente a *Map* detectable como positiva mediante la técnica **ELISA** utilizada en este estudio unos 15 días antes del sacrificio, independientemente del tipo lesional desarrollado o de la dosis de *Map* inoculada (Tablas IV.43 y IV.44).

En cuanto a la **respuesta inmune periférica celular**, casi todos los ovinos infectados con “**dosis baja**” de *Map*, sin lesión detectada en el estudio histopatológico, fueron **negativos** tanto a la prueba de liberación de **IFN- γ** como a la **IDR**, salvo las ovejas adultas 12 y 16, sacrificadas a los 210-220 dpi, cuya reacción a la inoculación de PPD aviar fue positiva, con incrementos de la piel de 3 y 5,5 mm, respectivamente (Tabla IV.44). En cambio, la mayoría de los animales infectados con “**dosis alta**” de *Map* fueron **positivos** a ambas pruebas, salvo algunas excepciones. El cordero 47, con lesiones *multifocal a* y sacrificado a los 100-120 dpi, fue el único animal de este grupo experimental negativo a las tres pruebas poco antes de ser sacrificado. La oveja 30, en la que no se apreciaron lesiones, sólo fue positiva a la prueba de la IDR. Dentro de los animales con lesiones *focales*, la oveja 25 y el cordero 50 fueron negativos a la prueba de IFN- γ y positivos a la IDR, mientras que en el cordero 53 sucedía lo contrario. Finalmente, la oveja 28, único animal adulto con lesiones *multifocales a*, sólo fue positiva a la prueba de liberación de IFN- γ (Tabla IV.44).

A)

Fecha muestreo	Iden.	Clasif. Histol. ^a	ELISA ^b		IFN- γ ^c		IDR ^d	
			Coc.	Result.	Coc.	Result.	Coc.	Result.
90 dpi	47	MFa	398	-	1,74	-	2	-
	51	MFb	396	-	20,76	+	7	+
	54	MFb	160	-	6,68	+	3	+
195 dpi	48	MFb	784	-	3,24	+	3	+
	49	MFb	382	-	9,76	+	5	+
	50	F	222	-	1,59	-	5,5	+
	52	MFa	771	-	7,9	+	5,5	+
	53	F	213	-	2,96	+	2	-

B)

Fecha muestreo	Iden.	Clasif. Histol. ^a	ELISA ^b		IFN- γ ^c		IDR ^d	
			Coc.	Result.	Coc.	Result.	Incr.	Result.
90 dpi	19	F	340	-	10,18	+	7	+
	22	F	247	-	2,11	+	4,5	+
	23	F	435	-	4	+	9	+
	25	F	655	-	1,27	-	5,5	+
	27	F	394	-	7,38	+	9	+
	30	SL	579	-	1,01	-	7,5	+
195 dpi	18	F	792	-	7,71	+	5,5	+
	20	F	530	-	7,32	+	4	+
	21	F	470	-	2,04	+	3	+
	24	F	573	-	6,72	+	5,5	+
	26	F	323	-	3,24	+	6	+
	28	MFa	202	-	3,13	+	2	-
	29	F	184	-	3,96	+	6	+

Tabla IV.39. Resumen de los resultados obtenidos en los **corderos (A)** y **ovejas (B)** infectados con “dosis alta” en el análisis de la **respuesta inmune periférica humoral y celular** frente a *Map*, evaluadas mediante el test **ELISA**, la prueba de liberación de **IFN- γ** , así como la prueba de **intraderrmorreacción (IDR)**, y su relación con las **lesiones**. Iden.: Identificación; Clasif. histol.: Clasificación histológica; Coc.: Cociente; Result.: Resultado; Incr: Incremento medio del grosor de piel a las 72 horas tras la inoculación con la PPD aviar, en mm. ^a Se representa la clasificación histológica final de cada animal. ^b Se considera el animal como positivo (+) cuando el cociente del ELISA 15 días antes del sacrificio es superior a 900. ^c Se considera el animal como positivo (+) cuando el cociente del IFN- γ 15 días antes del sacrificio es superior a 2. ^d Se considera el animal como positivo (+) cuando el incremento de piel en la IDR realizada 15 días antes del sacrificio supera los 2 mm. SL: Sin lesión; F: Focal; MFa y MFb: Multifocal a y b, respectivamente. (-): negativo.

A)

Fecha muestreo	Iden.	Clasif. Histol. ^a	ELISA ^b		IFN- γ ^c		IDR ^d	
			Coc.	Result.	Coc.	Result.	Incr.	Result.
90 dpi	39	SL	151	-	0,95	-	0	-
	41	SL	200	-	1,14	-	0	-
	45	SL	458	-	1,09	-	0	-
195 dpi	40	SL	134	-	1,1	-	1	-
	42	SL	199	-	1,07	-	0	-
	43	SL	293	-	1,1	-	1,5	-
	44	SL	278	-	0,9	-	0	-
	46	SL	215	-	1,18	-	0	-

B)

Fecha muestreo	Iden.	Clasif. Histol. ^a	ELISA ^b		IFN- γ ^c		IDR ^d	
			Coc.	Result.	Coc.	Coc.	Result.	Coc.
90 dpi	8	SL	538	-	1,47	-	2	-
	13	SL	390	-	1,05	-	2	-
	14	SL	284	-	1,06	-	2	-
	17	SL	266	-	0,95	-	0,5	-
195 dpi	10	SL	345	-	1,13	-	1,5	-
	11	SL	503	-	0,96	-	0,5	-
	12	SL	416	-	1,64	-	3	+
	15	SL	189	-	1,03	-	1,5	-
	16	SL	262	-	0,92	-	5,5	+

Tabla IV.40. Resumen de los resultados obtenidos en los corderos (A) y ovejas (B) infectados con “dosis baja” en el análisis de la respuesta inmune periférica humoral y celular frente a *Map*, evaluadas mediante el test ELISA, la prueba de liberación de IFN- γ , así como la prueba de intradermoreacción (IDR), y su relación con las lesiones. Iden.: Identificación; Clasif. histol.: Clasificación histológica; Coc.: Cociente; Result.: Resultado; Incr: Incremento medio del grosor de piel a las 72 horas tras la inoculación con la PPD aviar, en mm. ^a Se representa la clasificación histológica final de cada animal. ^b Se considera el animal como positivo (+) cuando el cociente del ELISA 15 días antes del sacrificio es superior a 900. ^c Se considera el animal como positivo (+) cuando el cociente del IFN- γ 15 días antes del sacrificio es superior a 2. ^d Se considera el animal como positivo (+) cuando el incremento de piel en la IDR realizada 15 días antes del sacrificio supera los 2 mm. SL: Sin lesión. (-): negativo.



V. Discusión
Discussion

En esta tesis doctoral se ha llevado a cabo una infección experimental con *Map* en ovejas adultas y corderos, con el objetivo principal de conocer el efecto de la edad de los animales en el momento de la infección y de la dosis de *Map* inoculada sobre la patogenia de la paratuberculosis ovina. A continuación, se discutirán los principales hallazgos encontrados en dicho estudio. Para una mejor comprensión, se ha organizado este capítulo en cuatro apartados diferentes: en primer lugar, se analizarán los principales hallazgos lesionales en los animales infectados; seguidamente, se valorará la respuesta inmune periférica y local inducida por la infección, y por último, se discutirán los resultados de las pruebas diagnósticas empleadas para la detección de *Map*.

V.1. HALLAZGOS LESIONALES

Los resultados lesionales más destacables de este estudio reflejan que la infección experimental con *Map* ha sido capaz de inducir lesiones granulomatosas tanto en ovejas como en corderos, pero únicamente en aquellos animales infectados con una dosis alta de la micobacteria. Además, se han encontrado diferencias según la edad de los ovinos a la infección, de forma que las lesiones en corderos eran más intensas y graves que en las ovejas adultas. De estos resultados se puede inferir que tanto la dosis inoculada como la edad de los animales influyen sobre el desarrollo de lesiones asociadas a la infección por *Map*.

En el caso de las ovejas adultas, se encontraron lesiones compatibles con paratuberculosis en 12 de las 13 (92,3%) infectadas con “dosis alta” de *Map* (10^{10} UFC de *Map*), que tenían entre 3 y 9 años en el momento de la infección. Además, también se pudo detectar la presencia de *Map* en ellas, y se comprobó que desarrollaron una respuesta inmune asociada, independientemente de proceder de un rebaño en el que se habían registrado casos ocasionales de paratuberculosis o de una explotación aparentemente libre de esta enfermedad (Tabla IV.8; Gráfico IV.13), sin que se observaran diferencias entre ellos. En cambio, no se encontraron lesiones similares, ni se obtuvieron respuestas inmunes frente a *Map*, en ninguna de las ovejas del grupo control, que no recibieron el inóculo infectante. Por lo tanto, estos resultados sugieren que los ovinos adultos mayores de tres años pueden infectarse con dosis elevadas, del orden de 10^{10} UFC de *Map*. De hecho, 6 ovejas presentaron lesiones focales con 8 años,

otra con 9 años, e incluso una oveja desarrolló lesiones multifocales en VIC y PPYd con esta misma edad. En la especie bovina, Hagan (1938) y posteriormente Taylor (1953a) llegaron a la conclusión de que los terneros se volvían resistentes a la infección paratuberculosa a partir de los 4 y 6 meses de edad, respectivamente. En cambio, otros autores demostraron que *Map* era capaz de causar lesiones en vacas infectadas experimentalmente con 3 años (Payne y Rankin, 1961a), 5 años (Doyle, 1953) y hasta con 8 y 9 años de edad (Larsen *et al.*, 1975a), si bien las lesiones fueron más leves y más restringidas que en los terneros infectados en las mismas condiciones con menos de tres meses de edad (Payne y Rankin, 1961a; Larsen *et al.*, 1975a), observaciones que coinciden con nuestros resultados. Estas diferencias no habían sido estudiadas hasta el momento en la especie ovina, y tampoco se han determinado cuales son los mecanismos patogénicos responsables de esta mayor resistencia en los animales adultos.

No se detectaron lesiones macroscópicas compatibles con paratuberculosis en los animales infectados en este experimento, salvo la presencia de linfangiectasias focales en la serosa de la PPYd de la oveja 28, así como un leve engrosamiento focal de la pared intestinal a nivel del yeyuno medio del cordero 49. Con la excepción de estos dos hallazgos, por otra parte inespecíficos, la ausencia de lesiones macroscópicas era esperable dada la corta duración de este estudio (220 dpi), y al ser la paratuberculosis una enfermedad de largo período de incubación en la cual las lesiones macroscópicas aparecen ya en casos avanzados y graves (Chiodini *et al.*, 1984a; Clarke, 1997; Pérez *et al.*, 2000). No obstante, en la literatura existen discrepancias en cuanto al tiempo transcurrido desde la inoculación hasta la detección de lesiones macroscópicas. Coincidiendo con nuestros resultados, otros autores tampoco encontraron cambios visibles en infecciones experimentales realizadas en las especies ovina y bovina de duración similar a nuestro estudio, es decir, tras unos 6-7 meses desde la infección (Payne y Rankin, 1961a; Begg *et al.*, 2005). Por el contrario, Larsen *et al.*, (1975a) sí que observaron una tumefacción y edema de los nódulos linfáticos mesentéricos en dos terneros infectados con un mes de edad, a los 150 dpi, si bien hay que tener en cuenta que ésta es una lesión inespecífica que puede aparecer en diversos procesos. En otros experimentos realizados en el ganado ovino, se encontraron cambios macroscópicos a los 220 dpi en forma de prominencias nodulares de 3-8 mm de diámetro distribuidas por el intestino delgado, especialmente la VIC, en dos corderos infectados con un mes de vida y con una cepa bovina (Juste *et al.*, 1994), mientras que Nisbet *et al.*, (1962)

describieron lesiones macroscópicas repartidas desde el YY hasta la VIC, junto con la tumefacción de nódulos linfáticos mesentéricos en un cordero a los 6 meses tras la infección experimental, también con una cepa bovina. El origen de la cepa empleada también podría haber influido en la aparición de lesiones macroscópicas. Nuestro experimento fue llevado a cabo a partir una cepa tipificada como ovina, al igual que el de Begg *et al.*, (2005), en el que no encontraron lesiones macroscópicas hasta los 9 meses posinfección. En nuestro estudio, es probable que los corderos que presentaban lesión de tipo *multifocal b* hubieran llegado a desarrollar cambios macroscópicos de haberse prolongado el experimento.

En cuanto a los hallazgos histopatológicos, y como ya se ha señalado, el modelo experimental empleado para esta infección puede considerarse eficaz, ya que ha sido capaz de reproducir lesiones en los animales infectados. Mientras que no aparecieron lesiones en los animales inoculados con dosis del orden de 10^3 UFC de *Map*, el 92,3% de las ovejas y el 100% de los corderos infectados con 10^{10} UFC de *Map* presentaron alteraciones compatibles con paratuberculosis, de diferentes intensidades (Gráfico IV.13). Además, cabe destacar el hecho de que se observaron lesiones granulomatosas ya desde los 100-120 dpi, en el 100% de los corderos y en 5 de las 6 ovejas sacrificados (Tablas IV.7 y IV.8), incluyendo lesiones muy avanzadas en los corderos 51 y 54, con la presencia de granulomas en LP no relacionada con el tejido linfoide. Este hallazgo no es de sorprender, al haberse descrito lesiones histológicas compatibles con paratuberculosis desde los 2 meses posinfección en la especie bovina (Payne y Rankin, 1961a), o desde los 45 dpi (Juste *et al.*, 1994) o el mes posinfección (Nisbet *et al.*, 1962) en infecciones experimentales realizadas en la especie ovina. Por el contrario, Begg *et al.*, (2005) no detectaron lesiones microscópicas en los corderos infectados a los 6 meses posinfección (aunque sí 3 meses después), a pesar de haber empleado dosis relativamente altas de *Map* (10^9 UFC), incluso superiores a las del experimento de Juste *et al.*, (1994) ($1,36 \cdot 10^6$ UFC). No obstante, cabe tener en cuenta que los autores emplearon como inóculo infectante una cepa ovina administrada oralmente a partir de homogeneizados de nódulos linfáticos, probablemente menos patogénica (Begg *et al.*, 2005), y que la sistemática de muestreo era diferente a la nuestra.

En nuestro estudio se ha empleado un inóculo procedente de raspados de mucosa intestinal siguiendo la técnica modificada de Ratnamohan y Spencer (1986), el cual, a la

vista de los resultados, ha demostrado su eficacia en la infección experimental de los ovinos. Este tipo de inóculo ya había sido empleado con éxito anteriormente en otras infecciones experimentales realizadas por nuestro grupo investigador tanto en la especie ovina (Reyes, 2007; Verna *et al.*, 2007) como en la bovina (Muñoz *et al.*, 2006). A pesar de que el uso de cepas de *Map* cultivadas en laboratorio ha sido recomendado por diversos grupos de investigadores, al tratarse de cepas más estandarizadas y conocerse con exactitud las características del inóculo (Hines II *et al.*, 2007), su elección vino motivada por el hecho de que se ha comprobado que la virulencia de las cepas puede disminuir tras numerosos pases en cultivo (Radosevich *et al.*, 2007). Además, estudios previos ya habían señalado una mayor patogenicidad de los inóculos procedentes de raspados de mucosa intestinal frente a cepas de laboratorio tanto en la especie bovina (Stewart *et al.*, 2007; Stabel *et al.*, 2009), ovina (Chávez, 1993; Stewart *et al.*, 2004; Begg *et al.*, 2005, 2009) como caprina (Stewart *et al.*, 2006). Por otra parte, si bien no se puede descartar el hecho de que el inóculo obtenido directamente de raspados de mucosa intestinal de ovejas clínicamente enfermas pueda contener otros microorganismos intestinales que puedan haber influido en el transcurso de la infección, dicho inóculo sería más representativo de las bacterias que ingieren los animales en condiciones naturales.

A pesar de que se observaron lesiones compatibles con paratuberculosis tanto en las ovejas (92,3%) como en los corderos (100%) infectados con “dosis alta” de *Map*, su desarrollo y evolución, así como el tipo de granuloma encontrado, fueron diferentes entre adultos y jóvenes. Por un lado, en la mayoría de los casos, las lesiones en las ovejas fueron clasificadas como *focales*, es decir restringidas en todo momento al tejido linfóide de las placas de Peyer, con granulomas pequeños, redondos y bien delimitados del tejido adyacente, incluso en alguna ocasión con un inicio de fibrosis, sugiriendo un carácter regresivo de los mismos. Además, no se detectaron BAAR o antígenos de *Map* en este tipo de lesiones mediante ZN o IHQ salvo algunos casos dudosos, ni se consiguió el aislamiento de *Map* mediante cultivo, aunque sí se demostró la presencia de ADN de la bacteria utilizando la técnica de PCR. En cambio, en los corderos del mismo grupo (infectado con “dosis alta” de *Map*), los granulomas fueron más numerosos, de mayor tamaño, llegando a confluir en los casos más graves, y alterando parcialmente la estructura del tejido linfóide de las placas de Peyer, observándose una clara progresión de la lesión hacia áreas de la mucosa tanto relacionada como no

(lesiones de tipo multifocal a y b) con el tejido linfoide. Se pudieron detectar BAAR y antígenos de *Map* en 5 y 6 de los 8 corderos, respectivamente, y se identificó la presencia de *Map* en tejido mediante cultivo, PCR convencional o anidada en la mayor parte de estos ovinos jóvenes. La existencia de lesiones granulomatosas en zonas de lámina propia no asociada al tejido linfoide se ha relacionado con un estadio más avanzado de la infección (Nisbet *et al.*, 1962; Van Kruiningen *et al.*, 1986; Pérez *et al.*, 1996; Corpa *et al.*, 2000a; García-Marín *et al.*, 2000; Kurade *et al.*, 2004; González *et al.*, 2005; Muñoz *et al.*, 2006), lo que se confirma en nuestro estudio con la marcada disminución del número de granulomas encontrados en el tejido linfoide y su incremento en la LP entre el primer y el segundo sacrificio (Gráfico IV.8), así como con la elevada carga micobacteriana de las lesiones, valorada mediante ZN e IHQ, en los corderos 48 y 49. De hecho, las lesiones de estos dos últimos animales no fueron clasificadas como *difusas multibacilares*, asociadas a formas graves (Pérez *et al.*, 1996), por no extenderse por tramos amplios de la mucosa intestinal, si bien sus características morfológicas se encontraban próximas a esta categoría.

En cualquier caso, el tipo de lesión encontrado y su evolución han sido muy diferentes entre los animales jóvenes y los adultos. Un hallazgo semejante lo refieren Payne y Rankin (1961a) en vacas infectadas experimentalmente con 3 años de edad, donde las lesiones granulomatosas fueron mucho más escasas, delimitadas del tejido adyacente y con ausencia de BAAR a los 4 y 6 meses posinfección, mientras que en los terneros de 3 meses infectados en las mismas condiciones, el infiltrado inflamatorio formaba agregados difusos en la mucosa intestinal y los nódulos linfáticos mesentéricos, con algunos bacilos en relación con estas lesiones. Sin embargo, en el mismo experimento, observaron que en momentos anteriores, a los 2 meses posinfección, las lesiones eran más graves y extensas en vacas adultas que en terneros. Para estos autores, esto se debería a que la infección paratuberculosa habría alcanzado su máximo desarrollo en los animales adultos a los 2 meses posinfección, momento en el que su sistema inmune habría sido capaz de reaccionar eficientemente y controlar rápidamente la progresión de las lesiones, lo que permitió la regresión de las mismas hacia los 6 meses posinfección, contrariamente a lo que sucedió en los terneros. En nuestro diseño experimental, no se sacrificaron animales hasta los 4 meses posteriores a la infección (100-120 dpi), por lo que no es posible conocer si sucedió lo mismo en las ovejas. No obstante, el hecho de que los granulomas en estas últimas tuvieran un

carácter focal y regresivo podría sugerir un fenómeno similar, de forma que la infección pudiera haberse instaurado y desarrollado más rápida e intensamente en las ovejas que en los corderos, habiendo sido capaces las primeras de limitar su progresión. Para algunos autores (Payne y Rankin, 1961a; Rankin, 1962), esa mayor capacidad de frenar la progresión de la infección en los bovinos adultos se debería al desencadenamiento de una respuesta inmune más eficaz en estos animales. En nuestro estudio, esta hipótesis se vería apoyada por la existencia de una respuesta inmune periférica de tipo celular, medida por la producción de IFN- γ , de mayor intensidad y aparición precoz en ovejas (Gráfico IV.2) así como de una reacción más intensa en la respuesta a la PPD aviar en la IDR (Gráficos IV.5 y 6) en los individuos adultos.

Uno de los factores que explicarían esta mayor resistencia en los animales adultos, asociada a una respuesta inmune más precoz e intensa, podría ser la exposición previa a micobacterias de las ovejas adultas. En nuestro estudio, algunas de las ovejas provenían de un rebaño con casos esporádicos de paratuberculosis, mientras que las otras lo hacían de un rebaño en principio libre, si bien no puede asegurarse completamente la ausencia de la micobacteria en el ambiente. Aunque todos, excepto uno, de los animales empleados habían sido negativos al ELISA y a la prueba del IFN- γ al inicio del experimento, estos animales podrían haber tenido un contacto previo con *Map* o con otras micobacterias ambientales, y en tal caso, la inoculación llevada a cabo sería una reinfección. En este sentido, numerosos autores achacan el fenómeno de resistencia asociada con la edad precisamente a la sensibilización previa que experimenta el sistema inmune de los animales tras contactos anteriores y repetidos con la micobacteria, antígenos de la misma o con otras micobacterias (saprofitas), que permitiría una mayor especialización en la respuesta inmunológica (Doyle, 1956; Payne y Rankin, 1961a; García-Marín *et al.*, 2000). De esta manera, los animales seleccionados para el presente trabajo constituirían una muestra lo más parecida posible a lo que podría suceder dentro de un rebaño en condiciones naturales. Por otro lado, otro factor a tener en cuenta en este estudio es el hecho de que algunas de las ovejas seleccionadas eran especialmente mayores (algunas entre 9 y 11 años), lo que podría haber aumentado la probabilidad de que hubiesen tenido contactos previos o infecciones inespecíficas, y podría sugerir que de por sí se trate de animales con una cierta resistencia individual, si bien no se han visto diferencias en el tipo e intensidad lesional entre las ovejas adultas “mayores” y las “más jóvenes”.

Además de su carácter regresivo, es de destacar que en la gran mayoría de las ovejas adultas las lesiones granulomatosas, siempre de carácter focal, aparecían exclusivamente en el espacio interfolicular del tejido linfoide intestinal (Tabla IV.8; Gráfico IV.13). Son varios los estudios donde se ha relacionado la existencia de este tipo de lesiones con las primeras fases de la infección paratuberculosa (Kluge *et al.*, 1968; Chávez, 1993; Juste *et al.*, 1994; Begara-McGorum *et al.*, 1998; Valheim *et al.*, 2002; Kurade *et al.*, 2004; Munjal *et al.*, 2005; Reyes, 2007). En nuestro caso, al tratarse de animales adultos, algunos procedentes de un rebaño con casos confirmados de paratuberculosis, todos mayores de 2 años de edad, y por tanto hipotéticamente más resistentes a la infección paratuberculosa (Hagan, 1938; Taylor, 1953a; Doyle, 1953, 1956; Rankin, 1959, 1961a, 1962; Larsen *et al.*, 1975a), no se podría descartar la posibilidad de que dichos granulomas se hubieran formado cuando estos animales eran jóvenes, y que se hubieran convertido con el tiempo en lesiones latentes, tal y como se ha sugerido que podría ocurrir en condiciones naturales (García Marín *et al.*, 1992c; Pérez *et al.*, 1996; Corpa *et al.*, 2000a; González *et al.*, 2005). Sin embargo, el hecho de que estas lesiones focales no se hayan encontrado en las ovejas adultas infectadas con dosis de 10^3 UFC de *Map* ni en los animales controles, indicaría que el origen de estos granulomas sería consecuencia directa de la dosis de *Map* administrada experimentalmente y del establecimiento de una infección inicial en animales adultos. Según nuestros resultados, en el caso de encontrar lesiones granulomatosas compatibles con la infección por *Map* en el tejido linfoide de ovinos adultos, debería tenerse en cuenta tanto la posibilidad de que su origen sea una infección inicial como un proceso latente.

En este estudio también se ha puesto en evidencia la importancia del tejido linfoide intestinal en la instauración de la infección paratuberculosa, al haberse encontrado una mayor presencia de lesiones granulomatosas en esta localización, tanto en las placas de Peyer yeyunales (PPY), las ileocecales (PPIC) o en las ileales (PPI), en comparación con las áreas desprovistas de dicho tejido (Gráficos IV.9 y IV.10). Estos resultados apoyan y confirman los resultados obtenidos en estudios previos que indican que las lesiones de paratuberculosis se establecerían inicialmente en las placas de Peyer (Kluge *et al.*, 1968; Van Kruiningen *et al.*, 1986; García Marín *et al.*, 1988; Chávez, 1993; Juste *et al.*, 1994; García Marín *et al.*, 1995; Pérez *et al.*, 1996; Sigurdardóttir *et*

al., 1999; García Marín *et al.*, 2000; Sigurdardóttir *et al.*, 2001; Valheim *et al.*, 2002; Kurade *et al.*, 2004). En este estudio, además, se observa que esto sucede tanto en corderos jóvenes como en ovejas adultas, por lo que el tejido linfoide intestinal sería el asiento primario de la infección por *Map*, independientemente de la edad y del grado de desarrollo de dicho tejido. Sin embargo, la evolución posterior de esas lesiones sí sufre una variación, y es probable que las diferencias que existen en el tejido linfoide entre jóvenes y adultos (Reynolds y Morris, 1983; Landsverk *et al.*, 1991; Lie *et al.*, 2005) pudieran jugar un papel.

La principal puerta de entrada de *Map* en el intestino son las células M y células epiteliales adyacentes de las placas de Peyer (Momotani *et al.*, 1988; García Marín *et al.*, 1992a; Sigurdardóttir *et al.*, 2001). Sin embargo, se ha descrito la existencia de numerosas diferencias anatómicas, morfológicas y funcionales entre el tejido linfoide de las PPICs, las PPIs y las PPYs en los rumiantes (Reynolds y Morris, 1983; Landsverk *et al.*, 1991; Griebel y Hein, 1996; Corpa *et al.*, 2001; Valheim *et al.*, 2002; Lie *et al.*, 2005). De esta manera, en ovinos, la PPI alcanzaría su máximo desarrollo a los 2-3 meses de edad, pudiendo ocupar entonces hasta 2 metros de longitud, involucionando posteriormente para haber regresado en su casi totalidad alrededor de los 15-18 meses de vida (Reynolds y Morris, 1983; Griebel y Hein, 1996). En cambio, las PPYs persisten durante toda la vida del animal, si bien la densidad de los folículos linfoides suele reducirse con la edad (Griebel y Hein, 1996). En nuestro experimento, en la necropsia se confirmaron estos cambios al observarse diferencias entre los corderos y las ovejas adultas. No se encontraron PPI en estas últimas, mientras que en los corderos, el tejido linfoide de dichas placas aparecía distribuido en forma de una larga placa continua. En cambio, a nivel de yeyuno dicho tejido linfoide se extendió a modo de numerosas placas discontinuas por todo el tramo, si bien éstas fueron más evidentes y abundantes en los animales jóvenes, y más discretas y escasas en los adultos. Así, la cantidad media de PPYs encontradas en los corderos casi duplicó la de las ovejas (Tabla IV.2). Se ha sugerido que la mayor resistencia de los rumiantes adultos a la infección por *Map* podría estar relacionada con la reducción paulatina de la superficie del tejido linfoide y de la densidad de los folículos linfoides de las placas de Peyer del intestino delgado con la edad, hecho que también se ha comprobado en la especie bovina (Lubis *et al.*, 1982). En la especie ovina, y en el caso de las encefalopatías espongiiformes, se ha sugerido que ésta podría ser la causa de la mayor resistencia de los individuos

adultos (St Rose *et al.*, 2007). En nuestro estudio, también debería considerarse la posibilidad de que la menor cantidad de tejido linfoide encontrado en las ovejas adultas, y su diferente grado de maduración, podría haber limitado la penetración del bacilo en el intestino del hospedador.

Respecto a la distribución de las lesiones observadas, cabe destacar la importancia de las placas de Peyer ileocecales y las yeyunales. Concretamente, en el caso de las ovejas, la PPIC fue la más frecuentemente afectada, mientras que en los corderos predominaron las lesiones en la PPYm. (Gráfico IV.10). Estas dos localizaciones ya han sido señaladas como las que presentan lesiones con más frecuencia en estudios anteriores llevados a cabo tanto en la especie ovina (García-Marín *et al.*, 1992c; Chávez, 1993; Pérez *et al.*, 1996; Reyes, 2007; Verna *et al.*, 2007) como caprina (Corpa *et al.*, 2000a; Valheim *et al.*, 2002). De hecho, la VIC se ha recomendado como la muestra de elección para el diagnóstico de la paratuberculosis ovina y caprina en casos naturales (García-Marín *et al.*, 1992b; González, 1998; Tafti y Rashidi, 2000; Reyes, 2007). En cabras sanas de 5 semanas de vida (Valheim *et al.*, 2002), al igual que en ovinos de un mes de edad (Corpa *et al.*, 2001), se ha comprobado la existencia de una gran similitud morfológica entre el tejido linfoide organizado de las PPIC y PPYs, en comparación con la PPI. También se han encontrado diferencias en cuanto a la distribución de las diferentes poblaciones linfocitarias (Landsverk *et al.*, 1991; Griebel *et al.*, 1992; Begara-McGorum *et al.*, 1998; Corpa *et al.*, 2001), de forma que hay una mayor cantidad de células CD4+ y CD8+ en PPY, y el ratio CD4/CD8 es más elevado en PPIC, en comparación con la PPI (Corpa *et al.*, 2001). Es posible que estas diferencias hayan podido influir en la mayor presencia de lesiones en PPIC y PPY que en PPI. En el caso de los corderos de nuestro estudio, aunque el predominio de granulomas en PPYm y VIC fue muy evidente, en los animales sacrificados a los 100-120 dpi también se observaron lesiones a nivel de las PPIs. Este hecho podría explicarse por la edad de estos animales en el momento del primer sacrificio (aproximadamente 5 meses de edad), momento en el que el tejido linfoide de las PPIs aún es abundante y probablemente más inmaduro que a los 220 dpi, cuando el número de lesiones en esta localización disminuyó. Por otro lado, el predominio de las lesiones en los animales adultos a nivel de VIC en comparación con la PPYm en los animales jóvenes, podría indicar un diferente patrón funcional de ambos tejidos linfoides en función de la edad del animal. En cualquier caso, según estos hallazgos, además de la VIC, la sensibilidad

del diagnóstico histológico de la paratuberculosis se incrementaría tomando también muestras de PPY, preferentemente de la zona media.

El predominio de las lesiones iniciales en los nódulos linfáticos ileocecales o mesentérico caudal es un hecho conocido en la especie bovina (Payne y Rankin, 1961b; Larsen *et al.*, 1975a; González *et al.*, 2005) o en gamos (Balseiro *et al.*, 2008) y ciervos (Clark *et al.*, 2010). Sin embargo, en nuestro estudio, la afectación de los nódulos linfáticos ha sido menor que la del tejido linfoide intestinal, tanto en corderos como en ovejas. En los ovinos adultos, sólo se observaron escasas lesiones, muy focales, en 6 de las 13 ovejas infectadas con “dosis alta” de *Map* (Tablas IV.6 y 8), mientras que en los corderos, los granulomas se extendieron por la zona cortical de los nódulos linfáticos ileocecales, y por lo general más frecuentemente en el mesentérico caudal (Gráfico IV.12), en aquellos animales cuyas lesiones intestinales habían progresado hacia formas más avanzadas, con granulomas en lámina propia (corderos 48, 49, 51 y 54, clasificados como *multifocales b*). Estos hallazgos confirman otros ensayos realizados en la especie ovina donde se ha comprobado que las lesiones iniciales se instaurarían en el tejido linfoide intestinal, y no se extenderían hacia la LP, y posteriormente los nódulos linfáticos asociados, hasta fases más avanzadas de la infección (García-Marín *et al.*, 1992c; Chávez, 1993; Juste *et al.*, 1994; Pérez *et al.*, 1996; González, 1998; García-Marín *et al.*, 2000; Reyes, 2007).

Dentro de las ovejas adultas con lesiones, el animal 28, procedente del rebaño libre de paratuberculosis, constituye una excepción, al ser la única oveja adulta (9 años de edad en el momento de la infección) en la que se encontraron granulomas en la LP (*multifocal a*), sugiriendo que en este caso la infección estaría progresando hacia formas más graves. Si bien no puede descartarse que lesiones de esta naturaleza no hayan sido identificadas en otras ovejas con el muestreo empleado, hay que señalar que en este animal, algunos de los granulomas eran de gran tamaño y confluían a nivel de la PPIC y PPYd. Además, fue la oveja en la que mayor número de granulomas se pudo apreciar, junto con el animal 29 (Tabla IV.3 y 5). Por otra parte, también fue el único animal en el que se observaron escasas células gigantes multinucleadas, en bajo número, en el infiltrado inflamatorio. Este tipo celular no es muy frecuente en la paratuberculosis ovina, contrariamente a la especie bovina (Buergelt *et al.*, 1978; Pérez *et al.*, 2000; González *et al.*, 2005). Verna *et al.*, (2007) observaron un número significativo de

células gigantes en corderos infectados con un mes de edad, tanto con un inóculo procedente de raspados de mucosa intestinal como a partir de cepas de *Map* cultivadas en laboratorio, pero solamente con cepas tipificadas como bovinas. En casos naturales, la presencia de células gigantes se ha detectado en ovinos adultos (González, 1998), habiéndose asociado a formas lesionales de tipo difuso paucibacilar (Pérez *et al.*, 1996). En la oveja 28, la producción del IFN- γ no fue especialmente elevada a lo largo del experimento, alcanzando valores considerados como levemente positivos en los muestreos de los 90, 130, 145, 175 y 195 dpi (cocientes > 2 , siendo el cociente máximo de 3,13, a los 195 dpi), para volver a ser negativos en el momento del sacrificio (220 dpi) (Tabla X.3 de los anexos). No puede descartarse que en esta oveja, a diferencia del resto, la respuesta inmune no haya sido capaz de controlar la progresión de *Map*, con la consecuente formación de un mayor número de granulomas y su posterior extensión hacia la LP, de forma que si el animal hubiera vivido más tiempo, hubiera desarrollado lesiones más graves y con BAAR visibles.

La dosis de 10^{10} UFC de *Map* empleada en este estudio fue suficiente para la reproducción de lesiones características de paratuberculosis tanto en las ovejas como en los corderos del grupo de “dosis alta”. Dosis similares de *Map* ya habían sido empleadas anteriormente con éxito en numerosas infecciones experimentales en ovinos (Begara-McGorum *et al.*, 1998; Kurade *et al.*, 2004; Stewart *et al.*, 2004; Begg *et al.*, 2005; Stewart *et al.*, 2006; Reyes, 2007; Verna *et al.*, 2007; Begg *et al.*, 2009). En nuestro caso, esta dosis fue estimada en función del recuento microscópico, si bien el recuento posterior del inóculo tras 4 meses de cultivo en medios LJ y 7H11 fue inferior, del orden de 10^6 UFC de *Map*. No obstante, este último valor podría estar subestimado, debido a la ya conocida dificultad de crecimiento en cultivo de las cepas ovinas de *Map* (Taylor, 1945; Juste *et al.*, 1988; Carrigan y Seaman, 1990; Collins *et al.*, 1990; Juste *et al.*, 1991b; Huchzermeyer y Bastianello, 1992; Shulaw *et al.*, 1993). Se estima que la eliminación fecal de micobacterias en rebaños ovinos con paratuberculosis puede alcanzar los $1,09 \cdot 10^8$ microorganismos por gramo de heces, con una eliminación media diaria por oveja de hasta $8,36 \cdot 10^{10}$ bacterias viables (Whittington *et al.*, 2000c). Esto significa que en condiciones naturales, en explotaciones con paratuberculosis endémica, la contaminación del medio puede llegar a ser muy elevada, superando incluso la dosis empleada en este experimento. Por ello, la dosis elegida podría simular la cantidad que ingiere el ganado en un rebaño infectado por *Map* en condiciones naturales.

No se observaron lesiones granulomatosas compatibles con paratuberculosis en ninguna de las ovejas y corderos infectados con una “dosis baja” de *Map* (10^3 UFC). Tampoco se aisló ninguna colonia de *Map* a partir de tejido o heces de estos animales (Tabla IV.35), aunque sí se identificó su ADN mediante PCR. Además, la respuesta inmune celular periférica, determinada mediante la producción específica de IFN- γ , se mantuvo en niveles similares a la del grupo control (Gráfico IV.2). En cambio, el incremento de grosor del pliegue anocaudal tras la inoculación intradérmica de PPD aviar fue mayor en las ovejas de este mismo grupo en comparación con los animales adultos del grupo control, especialmente a los 195 dpi, si bien dicha reacción fue significativamente menor que la de las ovejas del grupo infectado con “dosis alta” de *Map* (Gráfico IV.6). Estos resultados indican que, aunque alguno de los animales de estos grupos se habría infectado, dicha infección no habría sido suficiente para inducir lesiones evidentes, de forma que la instauración de la infección, la formación de lesiones granulomatosas y su desarrollo tendrían una relación directa con la dosis de *Map* ingeridas. Esta hipótesis ya habría sido señalada por otros autores, quienes establecieron una asociación entre la dosis del inóculo y el grado de la infección inducida, tanto en la especie ovina (Brotherston *et al.*, 1961a; Nisbet *et al.*, 1962), bovina (Sweeney *et al.*, 2006) como en cérvidos (O’Brien *et al.*, 2006; Mackintosh *et al.*, 2007). No obstante, en la especie ovina, se han descrito resultados muy dispares según la dosis empleada. En nuestro caso, la dosis del orden de 10^3 UFC de *Map* resultó insuficiente para inducir la formación de granulomas detectables en el estudio histopatológico. En cambio, el grupo de Brotherston y Nisbet del Moredun Research Institute, tras infectar por vía oral 3 grupos de corderos con dosis crecientes de 10^3 , 10^6 y 10^9 UFC de una cepa bovina de *Map*, detectaron signos de infección tanto bacteriológica como histopatológicamente desde el primer mes tras la última toma en los 3 grupos, incluido el de menor dosis (Brotherston *et al.*, 1961a; Nisbet *et al.*, 1962). No obstante, las lesiones observadas así como el recuento de colonias aisladas a partir de tejido fueron mucho más numerosos en aquellos corderos infectados con 10^9 UFC que con 10^3 UFC de *Map*. Curiosamente, estos autores no percibieron muchas diferencias al incrementar la dosis desde 10^3 hasta 10^6 UFC de *Map*. Por lo contrario, y apoyando nuestros resultados, Reddacliff y Whittington (2003) comprobaron que dosis inferiores a 10^4 UFC eran incapaces de inducir una infección detectable histológica o bacteriológicamente en ovinos Merino, aunque la duración del estudio sólo fue de 14

semanas, y los autores no observaron lesiones granulomatosas ni siquiera en aquellos animales infectados con dosis elevadas de *Map* (10^8 UFC). El experimento de Brotherston y Nisbet se llevó a cabo con una cepa de origen bovino, mientras que en nuestro caso, así como en el de Reddacliff y Whittington (2003), se empleó una cepa tipificada como ovina, por lo que no debe descartarse que el tipo de cepa de *Map* podría haber influido en los resultados.

Un hallazgo interesante ha sido la detección de ácidos nucleicos de *Map* mediante PCR anidada en 7 de los 8 corderos del grupo infectado con “dosis baja” de *Map* (87,5%), así como en 6 y 7 de las 9 ovejas del mismo grupo (66,6% y 77,77%), a partir de tejido fresco e incluido en parafina, respectivamente (Gráficos IV.18 y 22). También se identificó la secuencia IS900 de *Map* en un cordero y una oveja de este grupo mediante PCR convencional (Gráfico IV.20). Dada la ausencia de la identificación de ADN de *Map* mediante esta misma técnica en los animales controles, parece muy probable que la micobacteria haya invadido el tejido de los animales tras la administración experimental de 10^3 UFC de *Map*, pero no haya sido capaz, hasta este momento, de provocar lesiones detectables con la metodología empleada, de manera que la sensibilidad de la PCR sería mayor, al emplear una cantidad más elevada de tejido que el estudio histológico, donde un granuloma focal de pequeño tamaño sería más difícil de detectar. Por otro lado, también debe reseñarse que mediante la técnica de PCR anidada, únicamente se pone de manifiesto la presencia de ácidos nucleicos de *Map*, que probablemente no hayan sido capaces de inducir una respuesta inflamatoria. La ausencia de una respuesta inmune periférica detectable, a excepción de cierta reacción a la IDR, a lo largo de los 210 días de duración del experimento (Gráfico IV.2), apoyaría esa falta de respuesta inflamatoria en estos animales. En este sentido, Begg *et al.*, (2009), en uno de sus experimentos en corderos infectados con cepas ovinas de *Map*, no detectaron respuesta al IFN- γ hasta los 11 meses posinfección. Los autores atribuyeron este retraso en la respuesta, en comparación con otros experimentos del mismo estudio, a la menor dosis inicial que habían recibido los animales, del orden de 10^5 UFC de *Map*. En nuestro estudio, de haberse alargado la duración de la infección experimental, quizás las ovejas y corderos del grupo de “dosis baja” hubieran acabado desarrollando una respuesta inmune celular detectable mediante la producción de IFN- γ , e incluso lesiones. Finalmente, tampoco puede descartarse que, en este grupo, se haya establecido una infección inicialmente, pero que los animales afectados hayan sido

capaces de eliminarla y de recuperarse antes del primer sacrificio (100-120 dpi), si bien esta alternativa parece poco probable. En cualquier caso, nuestros resultados parecen indicar que, a pesar de que existe la posibilidad de que se haya podido instaurar la infección en los tejidos de los animales infectados con 10^3 UFC de *Map* (“dosis baja”), parece ser que el posterior desarrollo de lesiones, junto con la formación de granulomas en reacción a la presencia de la micobacteria, estaría directamente relacionada con la dosis de *Map* ingerida.

Recientemente, en diversos estudios realizados en rebaños ovinos con paratuberculosis, algunos autores se han referido al grupo de animales en la fase inicial o subclínica de la infección como “asintomáticos” (Smeed *et al.*, 2007; Nalubamba *et al.*, 2008; Gillan *et al.*, 2010). Según estos autores, este grupo de animales se caracterizaría por no presentar signos clínicos ni lesiones de paratuberculosis; sin embargo se considerarían dichos ovinos como “infectados” según los resultados de la PCR, del cultivo y la presencia de anticuerpos anti-*Map*. De hecho, Nalumbamba *et al.*, (2008) seleccionaron para su estudio los grupos de ovinos clasificados como “asintomáticos”, basándose únicamente en la ausencia de lesiones en estos animales junto con la positividad a la identificación de *Map* mediante PCR IS900. Por lo tanto, según este criterio, las ovejas y corderos del grupo de “dosis baja” de nuestro estudio podrían ser considerados como animales “asintomáticos”. No obstante, hay que señalar que en nuestra opinión, esta terminología es confusa, debido a que el término “asintomático” implica la ausencia de “síntomas” o “signos clínicos”, hecho que también ocurre en los animales infectados con lesiones focales y multifocales, en los que estarían incluidos los corderos y ovejas infectados con “dosis alta” de *Map* de nuestro experimento, así como numerosos animales que presentarían la infección bajo estas formas en condiciones naturales (Pérez *et al.*, 1996; Corpa *et al.*, 2000a; González *et al.*, 2005).

Referente a la detección de BAAR y antígenos de *Map* mediante ZN e IHQ, éstos sólo se identificaron claramente en el intestino de aquellos corderos infectados con 10^{10} UFC de *Map* con lesión de tipo *multifocal*, caracterizada por presentar granulomas en la LP (Tablas IV. 9, 11 y 34). La única excepción fue el cordero 52, clasificado como MFa, en el que no se detectaron BAAR mediante ZN. En cambio, los corderos 50 y 53, con lesiones focales, así como la amplia mayoría de las ovejas del grupo de “dosis alta”,

también con lesiones leves, focales, y restringidas al tejido linfoide de las placas de Peyer, fueron negativos a ambas técnicas (Tablas IV.10, 12 y 34). Por otro lado, las técnicas de ZN e IHQ apenas evidenciaron escasos BAAR y antígenos de *Map*, respectivamente, en los nódulos linfáticos mesentéricos caudales, y, en menor medida, el ileocecal, de los corderos 49, 51 y 54, con lesiones intestinales multifocales. La baja sensibilidad de estas dos técnicas en lesiones focales de paratuberculosis, localizadas en tejido linfoide, ya ha sido señalada previamente en numerosos estudios, y se interpreta fundamentalmente por la escasa cantidad de BAAR presentes en este tipo de lesiones, en comparación con las lesiones situadas en la lámina propia, donde los BAAR se observan en el citoplasma de macrófagos (Chávez, 1993; Pérez *et al.*, 1996; Corpa *et al.*, 2000a; Valheim *et al.*, 2002; González, 2003; González *et al.*, 2005; Reyes, 2007) en mayor cantidad, especialmente en las denominadas formas multibacilares (García-Marín *et al.*, 1992c; Chávez, 1993; Pérez *et al.*, 1996; Corpa *et al.*, 2000a; Balseiro *et al.*, 2003; Huda y Jensen, 2003; González *et al.*, 2005; Brown *et al.*, 2007; Reyes, 2007; Kheirandish *et al.*, 2008). También debe tenerse en cuenta que la técnica del ZN únicamente puede teñir aquellos BAAR que poseen la pared celular intacta. Por ello, existe la posibilidad de que el bacilo, en los granulomas focales del tejido linfoide, se presente en su forma de pared celular defectuosa o esferoplastos, negativos a la tinción de ZN, tal y como comprobaron Condron *et al.*, (1994) mediante microscopía electrónica en macrófagos y células gigantes de bovinos con lesiones subclínicas leves de paratuberculosis. Sin embargo, la tinción IHQ, que sí sería capaz de detectar los bacilos cuando están presentes de forma degradada o previamente digerida (Pérez *et al.*, 1990; García-Marín *et al.*, 1992a; Thoresen *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 detectó los animales de este estudio clasificados como focales.

La presencia de granulomas de cuerpo extraño o parasitarios ha sido señalada anteriormente en animales adultos en la especie bovina (González, 2003; Huda y Jensen, 2003), ovina (Pérez *et al.*, 1996) y caprina (Sigurdardóttir *et al.*, 1999; Corpa *et al.*, 2000a). De la misma manera, en nuestro estudio, las diferentes características morfológicas de dichos granulomas, tales como la presencia de un infiltrado inflamatorio eosinofílico junto con algunas células multinucleadas de cuerpo extraño, así como una zona central de necrosis eosinofílica, estando el conjunto delimitado por

una cápsula conjuntiva en la mayoría de los casos, permitieron discriminar fácilmente entre lesiones paratuberculosas focales y granulomas parasitarios. Por otro lado, en el caso de las ovejas adultas, también se observaron pequeños grupos de células macrofágicas cuyo citoplasma en ocasiones se encontraba repleto de un pigmento parduzco o de pequeños cristales. Este tipo de células se encontraron más frecuentemente en la región cortical de los nódulos linfáticos mesentéricos, y ocasionalmente asociadas a la zona basal del tejido linfoide de las placas de Peyer yeyunales. Otros autores también describieron la presencia de pigmento ceroides, de hemosiderina o lipofuscina en células aisladas de morfología macrofágica (González, 1998; Buergelt y Ginn, 2000; González, 2003; Huda y Jensen, 2003), sin relacionarlos en ningún momento con la infección paratuberculosa. Coincidiendo con estos autores, en nuestro estudio, se encontraron este tipo de macrófagos tanto en ovejas infectadas como en las del grupo control, pudiendo diferenciarse claramente de los granulomas característicos de paratuberculosis. Estas lesiones se han considerado como granulomas “de cuerpo extraño”, frecuentes en animales adultos y relacionados con antiguos procesos parasitarios, infecciosos, o simplemente de fagocitosis de material inerte que circula por el tracto intestinal. En este sentido, Buergelt y Ginn (2000), en bisontes infectados subclínicamente de paratuberculosis, encontraron lesiones semejantes en los nódulos linfáticos, refiriéndose a las células que los formaban como “macrófagos-basura” (“garbage” macrophages), encargados de fagocitar los detritus intestinales. Lubis *et al.*, (1982) asociaron el mayor depósito de pigmentos en los nódulos linfáticos con la edad del animal, coincidiendo con nuestros hallazgos.

V.2. RESPUESTA INMUNE PERIFÉRICA

Como ya se ha señalado anteriormente, una de las hipótesis propuesta por Payne y Rankin (1961a) para tratar de explicar la mayor resistencia de los animales adultos a la infección por *Map* hacía referencia al mayor grado de maduración y desarrollo del sistema inmune en los animales adultos con respecto al de los jóvenes (Payne y Rankin, 1961a). Por ello, uno de los objetivos de la presente tesis doctoral fue conocer las posibles diferencias en la respuesta inmune desencadenada frente a *Map* entre las ovejas adultas y los corderos, tanto a nivel periférico como a nivel local. Tras el estudio estadístico, se observaron diferencias evidentes en la respuesta inmune periférica, tanto en función de la edad de los animales infectados como de la dosis de *Map* empleada. La

producción específica de IFN- γ en respuesta a la PPD aviar fue significativamente superior en todos los animales infectados con “dosis alta” de *Map* (10^{10} UFC) que en los infectados con “dosis baja” (10^3 UFC) y los del grupo control, sin diferencias entre ambos, a lo largo de todo el experimento (Gráfico IV.2). Por otro lado, dentro de los animales del grupo de “dosis alta”, la producción de IFN- γ fue superior y apareció de forma mucho más precoz en las ovejas adultas, incrementándose de forma significativa con respecto a los demás grupos desde el mes posinfección, mientras que en los corderos dicha respuesta celular adaptativa empezó a manifestarse de manera mucho más tardía (a partir de los 90 dpi), si bien el incremento fue más rápido, alcanzando los valores máximos a los 110 dpi. Desde entonces y en adelante, la tendencia general fue hacia la disminución paulatina en ambos grupos, a pesar de seguir manteniéndose siempre en niveles significativamente superiores a los de los animales controles o infectados con “dosis baja” de *Map* (Gráfico IV.2). El incremento significativo en la producción de IFN- γ a partir de los 90 dpi en los corderos del grupo infectado con “dosis alta” coincide con los hallazgos de otros estudios experimentales, en los que dicha respuesta se empezó a detectar alrededor de los 60 dpi (Muñoz *et al.*, 2006; Verna *et al.*, 2007), 77 dpi (11 semanas postinfección) (Storset *et al.*, 2001) o 90 dpi (Reyes, 2007; Begg *et al.*, 2009) en ovinos, bovinos y caprinos infectados no vacunados. Respecto a lo que sucede en animales adultos, y según la información disponible, no se han encontrado estudios experimentales con los que poder comparar nuestros hallazgos.

Estos resultados de la producción específica de IFN- γ apoyarían la hipótesis de Payne y Rankin, (1961a), por la que los animales adultos desencadenarían una respuesta inmune más eficaz, mientras que los corderos, infectados con tan sólo mes y medio de edad, no tendrían aún el sistema inmune lo suficientemente desarrollado para poder detener la infección, lo que explicaría la progresión de las lesiones granulomatosas hacia la LP, tal y como comentamos anteriormente. Los resultados de la prueba de la IDR coincidirían con los de la producción del IFN- γ , en el sentido de que únicamente se observó una reacción significativa frente a la PPD aviar en aquellos animales infectados con “dosis alta”, y de nuevo, dicha respuesta fue más precoz e intensa en las ovejas que en los corderos, con valores más elevados a los 90 dpi que a los 195 dpi en las primeras, mientras que en los corderos sucedió lo contrario (Gráficos IV.5 y 6), sugiriendo que en estos últimos la respuesta inmune de tipo celular aparecería de forma más tardía. En este sentido, se ha señalado reiteradamente que la respuesta inmune celular, de la cual la

producción de IFN- γ y la reacción a la IDR constituirían los principales indicadores, sería la más eficaz en controlar las infecciones por micobacterias, incluida la paratuberculosis (Modlin, 1994; Chiodini, 1996; Gwozdz *et al.*, 2000a; Stabel, 2000a; Storset *et al.*, 2001; Raja, 2004; Salgame, 2005; Stabel, 2006; Begg *et al.*, 2009). La influencia de la edad en el desencadenamiento de la respuesta inmune ya se ha puesto de manifiesto en estudios anteriores. Corpa *et al.*, (2000c) encontraron diferencias en la respuesta inmune inducida en corderos vacunados frente a paratuberculosis a los 15 días y a los 5 meses de edad, siendo más intensa y desencadenándose de forma más rápida en estos últimos. De manera similar, en un estudio reciente realizado para comprobar el efecto que tendría sobre la respuesta inmune el retraso de la edad de vacunación con BCG, aplicándose en niños recién nacidos o de 10 semanas de vida, se observó que la proporción de células CD4 específicas fue mayor, y la respuesta inmune protectora inducida fue más eficaz, en aquellos individuos vacunados con 10 semanas (Kagina *et al.*, 2009). Según los autores, estas diferencias se podrían atribuir a la “inmadurez” del sistema inmune en los recién nacidos en comparación con individuos mayores, lo que coincidiría con nuestra hipótesis en el caso de los corderos. En este sentido, Velilla *et al.*, (2006) señalaron que la falta de madurez del sistema inmune humano de los neonatos podría deberse, entre otros factores, a una funcionalidad aún ineficiente de las CPAs, así como a la menor producción de IL-12, en comparación con los adultos, lo que podría afectar el desarrollo normal de la respuesta inmune adaptativa. Apoyando estos hallazgos, también se ha señalado una mayor progresión en el desarrollo y “madurez” de la respuesta inmune frente al virus del sarampión en función de la edad, cuando la vacuna era administrada a los 6, 9 y 12 meses (Gans *et al.*, 1998).

Tradicionalmente, la inmunidad adaptativa celular se suele asociar con la producción de citoquinas de tipo Th1 y con el predominio de células T CD4+ y CD8+ (Kaufmann, 1991; Begara-McGorum *et al.*, 1998; Stabel, 2000a). Este tipo de respuesta tendría lugar en las fases iniciales y subclínicas de la infección por *Map* y se asociaría 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). El IFN- γ es considerado una de las principales citoquinas de tipo Th1 y desempeña un papel muy importante en la diferenciación de las células T así como en la activación de los macrófagos (Stabel, 2000a), que intervendrían en un control eficaz de la infección. La respuesta inmune celular más intensa y precoz en las ovejas adultas

explicaría la aparición de granulomas de carácter “regresivo”, más pequeños y mejor delimitados del tejido adyacente, que podrían indicar un mejor control de las lesiones y por lo tanto de la evolución de la infección, en estos animales. En cambio, el establecimiento más tardío de una respuesta inmune protectora en los corderos habría permitido a la micobacteria penetrar en los tejidos intestinales y evadir los mecanismos antimicrobianos de las CPAs (Astarie-Dequeker *et al.*, 1999; Cheville *et al.*, 2001; Hostetter *et al.*, 2002, 2003; Weiss *et al.*, 2004, 2005) antes de que empiecen a desencadenarse los mecanismos inmunológicos efectivos responsables del incremento de la producción específica de IFN- γ , de forma que las lesiones no queden demarcadas y puedan progresar. Un hallazgo similar ha sido encontrado en infecciones experimentales de corderos vacunados y no vacunados, donde se detectaron granulomas “regresivos” (encapsulados) a partir de los 120 dpi en aquellos animales vacunados, mientras que las lesiones en los no vacunados fueron más extensas (Juste *et al.*, 1994). En este mismo estudio, a los 220 dpi, los granulomas fueron más escasos, más pequeños y mejor delimitados del tejido adyacente en los corderos vacunados que en los no vacunados, recordando los granulomas observados en nuestro estudio en las ovejas adultas. Otros experimentos obtuvieron resultados muy similares, con la formación de lesiones granulomatosas focales más delimitadas y regresivas, incluso con aspecto fibroso y presencia escasa o nula de BAAR, en corderos vacunados frente a los no vacunados, atribuyendo estas diferencias a la capacidad de la vacunación de estimular la resistencia en los animales (Nisbet *et al.*, 1962; García-Marín *et al.*, 1997; Reyes, 2007). De hecho, Reyes (2007) describió la progresión de granulomas desde el tejido linfoide de la placa de Peyer hacia la mucosa intestinal y al nódulo linfático mesentérico únicamente en aquellos corderos infectados no vacunados, lo que recuerda la evolución de las lesiones observadas en los corderos de esta tesis doctoral. De la misma manera, Gwozdz *et al.*, (2000a) relacionaron la regresión de las lesiones observadas en el intestino de ovinos infectados experimentalmente con el efecto protector de la vacunación frente a *Map*. Estos últimos autores observaron que la menor progresión de las lesiones en el grupo de animales vacunados se asociaba a una respuesta humoral y celular periférica más precoz y más intensa en comparación con los ovinos no vacunados (Gwozdz *et al.*, 2000a; Reyes, 2007), coincidiendo con las observaciones del grupo de Juste *et al.*, (1994) en cuanto a la producción temprana de anticuerpos anti-*Map* en corderos previamente inmunizados. Según estos autores, las respuestas inmunes precoces e intensas inducidas en los animales vacunados les habrían proporcionado la

capacidad de limitar y controlar el desarrollo de las lesiones. Estas últimas observaciones apoyarían la hipótesis de que la sensibilización o inmunización previa frente a *Map* no evitaría la infección pero sí su evolución, induciendo una capacidad protectora en el hospedador capaz de provocar la regresión de las lesiones iniciales o incluso su eliminación, en fases precoces de la infección. Esta situación podría haber sucedido en el caso de las ovejas adultas de nuestro estudio, en las que los contactos previos con *Map* u otras micobacterias, habrían actuado a modo de “vacunación”. En este estudio, se han utilizado ovejas procedentes de dos rebaños, uno con casos registrados de paratuberculosis y otro aparentemente libre de esta enfermedad, sin que se hayan observado diferencias evidentes entre los animales de ambas explotaciones. En este sentido, hay que indicar que, a pesar de no tener constancia de casos clínicos en una de las explotaciones, no se excluye que *Map* no estuviera presente en ella, dado que numerosos estudios han puesto en evidencia la muy amplia distribución de esta bacteria en el medio ambiente (Lovell *et al.*, 1944; Larsen *et al.*, 1956; Hole, 1958; Jorgensen, 1977; Juste, 1984; Eamens *et al.*, 2001; Pillars *et al.*, 2009; Eisenberg *et al.*, 2010).

En la respuesta a la inoculación intradérmica tanto con PPD aviar como bovina, se encontraron incrementos de grosor cutáneos superiores en el grupo de ovejas adultas no infectadas respecto a los corderos con un tratamiento similar (Gráficos IV.5 y 6). Por un lado, este hallazgo podría apoyar la hipótesis planteada anteriormente según la cual estos animales tendrían un sistema inmune más maduro, o también significar que dichas ovejas tuvieron un contacto previo con antígenos de *Map* o de otras micobacterias ambientales, que hayan sensibilizado previamente sus linfocitos, ya que una de las características de la respuesta inmune adaptativa celular consiste en su capacidad de “memoria” de larga duración (Medzhitov y Janeway, 1997; Stabel, 2006). Se ha comprobado que tanto la especificidad de la prueba de IDR como la del IFN- γ puede verse comprometida por la posibilidad de producirse reacciones cruzadas por contactos previos con otras micobacterias (Pérez *et al.*, 1994b; Lauzi *et al.*, 2000; Olsen *et al.*, 2002). Sin embargo, en nuestro estudio, no se observaron tales diferencias en cuanto a la respuesta inmune celular entre las ovejas controles o infectadas con “dosis baja”, en comparación con los corderos de los mismos grupos, cuando ésta se valoró mediante la prueba de liberación de IFN- γ , a diferencia de la prueba de IDR. Una posible explicación de este fenómeno sería que la respuesta inmune e inflamatoria tras la inoculación intradérmica de PPD aviar en las ovejas adultas, con un sistema inmune

más maduro y probablemente ya sensibilizado en comparación con el de los corderos, estaría mediada por numerosas citoquinas, además del IFN- γ , que habrían contribuido a una amplia migración de células inflamatorias hacia la zona de inoculación, lo que justificaría el mayor incremento de la piel. En cambio, en la prueba de liberación de IFN- γ , sólo se valora esta citoquina (Pérez *et al.*, 1994b, 1999; Waters *et al.*, 2003), por lo que no reflejaría la respuesta inmune celular con la misma intensidad que en la IDR.

La tendencia a la disminución de la producción de IFN- γ hacia el final del experimento (Gráfico IV.2), podría indicar que estos animales han superado e eliminado toda o al menos gran parte de la infección mediante la supresión del estímulo antigénico de *Map* por debajo de un determinado umbral. Stewart *et al.*, (2004), tras encontrar estos mismos hallazgos en una infección experimental en ovinos, interpretaron que el descenso de la producción de IFN- γ se debería a la instauración de un estado de anergia frente a la exposición crónica de los antígenos de las micobacterias viables presentes en los tejidos. En nuestro caso, la primera opción parece más probable, al menos en el caso de las ovejas adultas, dado el carácter regresivo de las lesiones y su restricción al tejido linfóide de las placas de Peyer. En el caso de los corderos, la progresión de las lesiones granulomatosas hacia fases más avanzadas, en las que era posible detectar BAAR (lesiones *multifocales*), podría asociarse con la inhibición de la respuesta inmune celular debida a la presencia de citoquinas de tipo Th2, momento en el que empezaría a desarrollarse una respuesta de tipo humoral, de acuerdo al modelo establecido en las infecciones por micobacterias (Ridley, 1983; Chiodini *et al.*, 1984a; Clarke, 1997; García-Marín *et al.*, 2000; Stabel, 2000a; Coussens, 2001; Stabel, 2006).

Un hecho observado en este estudio es que los corderos infectados con “dosis alta” desarrollaron una producción media elevada de IFN- γ en sangre periférica, que sin embargo no fue lo suficientemente eficaz para contener el desarrollo y la progresión de las lesiones granulomatosas en sus formas focales más leves, contrariamente a lo que sucedió en las ovejas adultas. Anteriormente se ha señalado que quizás la falta de madurez del sistema inmune sea la responsable de que esta producción de IFN- γ se haya producido tan tarde, siendo incapaz de frenar la progresión de las lesiones. Estas observaciones sugieren que la presencia de elevadas concentraciones de IFN- γ específico en sangre por sí sola no sería suficiente para inducir una respuesta protectora. Para explicar estos fenómenos, recientemente, se ha atribuido la progresión de las

lesiones paratuberculosas a una respuesta inmune “alterada” por parte del hospedador (Geijo, 2007; Sohal *et al.*, 2008). Concretamente, según el modelo inmunopatogénico propuesto por Geijo (2007) en la especie bovina, basado en la respuesta inmune del hospedador y la presencia de *Map* en sangre en condiciones naturales, existiría una asociación entre una respuesta inmune innata intensa y descontrolada, y el desarrollo de lesiones intestinales; es decir, los niveles basales de IFN- γ , presentes sin necesidad de estímulo de la sangre con PPD (IFN- γ_0) podrían ser un indicador de la progresión a la enfermedad clínica, tal y como se propuso, de manera similar, en la enfermedad inflamatoria intestinal (IBD) de la especie humana (Juste *et al.*, 2009b). De acuerdo con Geijo (2007), la correcta modulación de dicha respuesta, como la que induciría la vacunación, limitaría la extensión y gravedad de las lesiones, aunque no evitaría la infección inicial. Aplicando este modelo a los resultados de nuestro estudio, el posible mayor desarrollo del sistema inmune en los ovinos adultos desde el inicio de la infección experimental, podría haber contribuido a mantener el equilibrio entre respuesta inmune innata e adaptativa, controlando la progresión de la infección. En cambio, la respuesta inmune de los corderos, aún “inmadura”, se habría desarrollado de forma inadecuada, por lo que la combinación de la respuesta inmune innata e adaptativa se habría producido de forma alterada, permitiendo la progresión lesional.

En nuestro estudio también hemos valorado la producción del IFN- γ_0 (Gráfico IV.3) inespecífico, el cual se ha señalado que podría ser un indicador de la respuesta inmune celular innata frente a *Map* (Olsen y Storset, 2001; Geijo, 2007). En este caso, la producción de IFN- γ_0 sería independiente de la interacción entre la CPA y los receptores de células T, habiéndose señalado las células NK (Natural Killers) como una posible fuente de producción innata de IFN- γ (Olsen y Storset, 2001; Olsen *et al.*, 2005). En nuestro estudio, se encontró que la inoculación experimental de *Map* no produjo ningún cambio significativo en los niveles de IFN- γ_0 en los corderos, ni siquiera en aquellos infectados con “dosis alta” de *Map*, mientras que se apreció un incremento significativo en las ovejas adultas de este último grupo entre los 60 y 110 dpi. Por lo tanto, la producción de IFN- γ_0 fue baja incluso en aquellos corderos con lesiones intestinales más avanzadas (*multifocales b*), mientras que dicha respuesta fue más elevada en aquellas ovejas con lesiones granulomatosas más restringidas, al menos hasta los 110 dpi, sin que se observaran diferencias evidentes en el componente celular inflamatorio de los tejidos que pudieran justificar la mayor secreción inespecífica de

IFN- γ_0 en los ovinos adultos. Por ello, resulta complicado encajar nuestros resultados dentro del modelo patogénico propuesto por Geijo (2007) en bovinos. Una posible explicación podría ser que, en condiciones experimentales, los modelos patogénicos no seguirían el mismo comportamiento que en condiciones naturales. Así, existe la posibilidad de que la respuesta inmune desarrollada por los animales infectados experimentalmente, ante la inoculación “repentina” y masiva de dosis tan elevadas de *Map*, se haya desencadenado de manera distinta a lo que habría sucedido en condiciones naturales tras la ingesta de dosis menores y de forma más continua. No obstante, el patrón de respuesta inmune adaptativa celular y humoral observado en los ovinos infectados con “dosis alta” en este experimento, parece corresponderse con lo señalado en la especie ovina en infecciones naturales, con una respuesta humoral débil junto con una elevada respuesta inmune celular en las primeras fases, en animales con lesiones iniciales y con una escasa cantidad de BAAR (Pérez *et al.*, 1997; 1999). Por otro lado, también debe contemplarse la posibilidad de que la respuesta inmune innata en estos animales no sólo dependa de la secreción inespecífica de IFN- γ , a pesar de ser considerada la principal citoquina implicada en la patogenia de la paratuberculosis, sino que también podrían haber estado involucrados otros mecanismos innatos no estudiados en esta tesis, dependientes de la interacción de *Map* con diversos TLRs, tales como la producción de reactivos nitrogenados intermediarios (Quesniaux *et al.*, 2004), por lo que quizás la estimación de la respuesta inmune innata, basándose únicamente en la producción inespecífica de esta citoquina, no sería suficiente. Además, el hecho ya comentado anteriormente de que las ovejas adultas puedan haber tenido contactos previos con los antígenos de *Map* o de otros diferentes agentes, podría implicar la existencia de unos niveles basales de esta citoquina de por sí más elevados que en los corderos. Sin embargo, no se apreciaron diferencias significativas en la producción de IFN- γ_0 entre ovejas y corderos en el inicio de este experimento (0 dpi) (Gráfico IV.3). En cualquier caso, la respuesta inmune innata y su modulación con la adaptativa no habría sido lo suficientemente eficiente, en el caso de los corderos jóvenes, para detener el crecimiento de *Map* ni la progresión de la infección.

Otro de los hallazgos de este estudio es que, en la inducción de la respuesta inmune periférica celular específica, influye no sólo la edad de los animales, sino también la dosis de *Map* inoculada, al no encontrar respuestas significativas en los grupos infectados con “dosis baja” (Gráfico IV.2). La hipótesis que parece más probable

para explicar este hecho es que la cantidad de *Map* haya sido insuficiente para inducir una respuesta inmune detectable, de forma que no se hayan expresado suficientes antígenos en las CPAs, tanto para desencadenar una respuesta inmune como inflamatoria. En el caso de la secreción inespecífica de IFN- γ (IFN- γ_0) sucedió un fenómeno similar, al haberse encontrado respuestas significativas únicamente en el grupo de ovinos adultos infectados con la mayor dosis inoculada en este estudio (10^{10} UFC de *Map*). Esta mayor producción inespecífica de IFN- γ también podría haber contribuido a limitar la progresión de la infección en este grupo de animales. El incremento de dicha secreción hasta los 110 dpi indicaría una mayor reacción inicial a la infección, coincidiendo con una respuesta celular específica precoz, mientras que la disminución de la producción específica e inespecífica de IFN- γ hasta el final del experimento, se correspondería con una posible resolución de la infección. En cualquier caso, nuestro ensayo no permitió analizar la evolución de la producción basal inespecífica de IFN- γ_0 en ovinos adultos y jóvenes con lesiones difusas multibacilares y linfocíticas, para poder compararlos también con el modelo propuesto por Geijo (2007). La existencia de resultados tan variables entre los animales y los distintos estudios, indicarían que los mecanismos inumopatológicos que regulan la respuesta a la infección por *Map*, en especial en animales adultos, son de gran complejidad, por lo que aún requerirían más estudios para resolver los numerosos interrogantes planteados, especialmente en cuanto al comportamiento de la respuesta inmune innata, así como a su modulación con la adaptativa.

Respecto a la inmunidad humoral, la respuesta serológica frente a *Map* no superó el umbral de positividad establecido para esta técnica en el caso de infecciones naturales, en ninguno de los animales hasta el último muestreo (Gráfico IV.1). Este resultado era esperable dada la corta duración de esta infección (210 dpi), y teniendo en cuenta que la respuesta humoral valorada en la prueba del ELISA normalmente aparece de forma más tardía que la respuesta inmune celular en las infecciones con *Map* (Chávez, 1993; Stewart *et al.*, 2004; Reyes, 2007; Verna *et al.*, 2007; Begg *et al.*, 2009). Además, la presencia de anticuerpos anti-*Map* se suele relacionar con animales con lesiones avanzadas, especialmente las difusas multibacilares, caracterizadas por la elevada presencia de BAAR (Clarke *et al.*, 1997; Pérez *et al.*, 1997; Corpa, 1999; García-Marín *et al.*, 1999; García-Marín *et al.*, 2000; Storset *et al.*, 2001; González, 2003). Los animales de nuestro estudio sólo desarrollaron lesiones focales, o en todo caso

multifocales en algunos corderos, asociadas a una respuesta humoral débil (Pérez *et al.*, 1997). En coincidencia con nuestros resultados, Kurade *et al.*, (2004) detectaron anticuerpos frente a *Map* desde los 90 dpi en corderos infectados con lesiones multibacilares (grado 3 y 4), mientras que no observaron respuesta serológica hasta los 210 y 330 dpi en aquellos con lesiones focales y multifocales, más iniciales (grado 1 y 2).

Sin embargo, sí que se apreciaron diferencias en cuanto al patrón de respuesta humoral observado en ovejas adultas y corderos (Gráfico IV.1). Por un lado, los niveles de anticuerpos anti-*Map* fueron significativamente superiores en los animales adultos en comparación con los corderos en el inicio del experimento, incluso en los del grupo control. Por otro lado, la respuesta humoral de las ovejas infectadas empezó a desmarcarse de los demás grupos de manera precoz, desde los 60 dpi, y de forma más significativa en el caso de las ovejas infectadas con “dosis alta” con respecto a los demás grupos a partir de los 110 dpi, mientras que los niveles séricos de anticuerpos frente a *Map* de los corderos de este mismo grupo no empezaron a diferenciarse del resto de los corderos y ovejas hasta los 110 dpi. Este patrón de respuesta más precoz en ovejas adultas coincide con el observado en la respuesta inmune periférica celular ya señalado anteriormente, apoyando la hipótesis de que el mayor grado de madurez del sistema inmune, o contactos previos con *Map*, inducirían una respuesta más intensa y de aparición más rápida en este tipo de animales, al igual que lo que sucede en corderos previamente inmunizados con una vacuna (Juste *et al.*, 1994; Gwozdz *et al.*, 2000a; Reyes, 2007).

Otro hallazgo destacable en los resultados serológicos ha sido la aparición de dos elevaciones puntuales en la producción de anticuerpos, en forma de “pico”, que afectaron a todos los grupos de este estudio experimental, tanto ovejas como corderos, en dos ocasiones, a los 110 y 210 dpi (Gráfico IV.1). Dichos incrementos fueron siempre mayores en los animales infectados con “dosis alta” de *Map*, especialmente en las ovejas adultas. De hecho, en el segundo pico (210 dpi), la respuesta humoral superó el umbral de positividad establecido para esta técnica (índice > 900) en la casi totalidad de las ovejas y corderos de este último grupo (Gráfico IV.1, Tablas X.1 y X.2 de los anexos). Ambas elevaciones de la producción de anticuerpos se produjeron entre 15 y 20 días después de realizar la prueba de la IDR, por lo que parece lógico pensar que la

sensibilización previa de todos los animales con la PPD aviar pudo ser la responsable de este incremento, hecho previamente descrito en tuberculosis caprina y bovina (Harboe *et al.*, 1990; Gutiérrez *et al.*, 1998) y en paratuberculosis bovina (Vargas *et al.*, 2009). Nuestros resultados parecen indicar que esta respuesta “anamnética” inducida por la inyección intradérmica con PPD aviar es proporcional a la dosis de *Map* inoculada, al haberse observado una mayor producción de anticuerpos en los animales infectados con “dosis alta” que los de “dosis baja”. Además, la secreción de anticuerpos séricos parece incrementar de manera más intensa tras la inoculación previa de tuberculina aviar en ovinos adultos en comparación con los corderos, apoyando la teoría de la mejor respuesta de su sistema inmune, posiblemente asociada a un mayor grado de maduración.

En cambio, existen discrepancias en cuanto al efecto de una inyección intradérmica previa de PPD sobre la secreción específica de IFN- γ en sangre circulante, al igual que sucedió en nuestro estudio. Mientras algunos autores afirman que el test del IFN- γ no se ve significativamente alterado por la inoculación previa de tuberculinas aviar o bovina en vacas infectadas con *M. bovis*, al menos entre los 8 y 28 días posteriores a la inyección (Doherty *et al.*, 1995; Ryan *et al.*, 2000) e incluso hasta los 65 días posinoculación (Gormley *et al.*, 2004), otros en cambio señalan que la sensibilización previa ejerce un efecto estimulador en la producción de esta citoquina en los días posteriores a la inoculación en tuberculosis y paratuberculosis bovina (Whipple *et al.*, 2001; Stabel *et al.*, 2007). Rothel *et al.*, (1992) observaron una marcada reducción de la producción específica de IFN- γ durante aproximadamente 7 días tras la IDR, seguida de un rápido incremento en la respuesta, en 2 terneros infectados con *M. bovis*. Recientemente, en un ensayo llevado a cabo en 6 cabras con y sin paratuberculosis, todas ellas infectadas experimentalmente de tuberculosis, se observó un incremento de la producción específica de IFN- γ estimulado con PPD bovina tras la IDR durante 23 días e incluso hasta los 74 días posinoculación en 4 cabras. Sin embargo, en una cabra coinfectada con paratuberculosis, no se observaron cambios en dicha secreción, mientras que en otra, libre de paratuberculosis, la secreción de dicha citoquina se vio reducida tras la IDR (Bezós *et al.*, 2010). En nuestro caso, la sensibilización con PPDs no pareció afectar a la secreción específica neta de IFN- γ de las ovejas adultas tras la primera IDR, aunque sí se observó una reducción significativa 15 días tras la segunda IDR, es decir desde los 195 a los 210 dpi, y únicamente en aquellas ovejas infectadas

con “dosis alta” (Gráfico IV.2). En cambio, la primera IDR, realizada a los 90 dpi, dio lugar a un leve incremento de la respuesta celular tras 20 días (110 dpi) en los corderos infectados con “dosis alta” de *Map*, seguido de una significativa disminución 40 días después (130 dpi). Tras la segunda IDR (195 dpi), la respuesta inmune celular disminuyó de manera similar a las ovejas del mismo grupo. Estos hallazgos se confirmaron al analizar la evolución de la producción bruta de IFN- γ (Gráfico IV.4), salvo en el caso de las ovejas, en las que dicha producción incrementó a los 110 dpi, antes de disminuir de forma significativa a los 130 dpi, al igual que en los corderos. Sin embargo, tras normalizar estos niveles con la producción inespecífica de dicha citoquina en los mismos muestreos, la producción neta resultante se mantuvo sin diferencias significativas tras la primera IDR en las ovejas (Gráfico IV.2). A la vista de la gran disparidad de resultados encontrados, resulta difícil encontrar una explicación plausible para los mismos. Es de destacar la gran variabilidad en la respuesta a la producción de esta citoquina, con marcadas fluctuaciones, lo cual aconseja ser cuidadoso en la interpretación de cualquiera de estas pruebas cuando se utilizan como métodos de diagnóstico.

V.3. RESPUESTA INMUNE LOCAL

Además de la respuesta inmune periférica, en este estudio también se ha valorado la respuesta inmune local frente a *Map*. Por un lado, se ha analizado la producción *in vitro* de IFN- γ en muestras de tejido y linfocitos extraídos de ILd (adyacente a la VIC), PPY y NLM, y por otro lado se ha determinado el nivel de expresión génica de 9 citoquinas, del factor de transcripción FoxP3 así como del receptor de respuesta inmune innata TLR2, en las mismas muestras, por cuantificación mediante PCR a tiempo real (qPCR).

En cuanto a la técnica de determinación de la producción *in vitro* de IFN- γ , no se observaron diferencias estadísticamente significativas a partir de la incubación de secciones completas de los propios tejidos estudiados en ninguno de los grupos experimentales de esta tesis doctoral (Gráficos IV.14 y 15). Estos resultados estarían en contradicción con los de Gwozdz y Thompson (2002), quienes encontraron que la secreción de IFN- γ analizada a partir de los sobrenadantes de pequeños trozos de nódulos linfáticos preescapulares incubados con PPD durante 24 y 48 horas, fue

significativamente mayor que a partir de muestras de sangre de corderos infectados experimentalmente con *Map*, contrariamente a nuestros resultados. De hecho, estos autores detectaron una mayor proporción de animales infectados mediante esta técnica a partir de tejido que de sangre (Gwozdz y Thompson, 2002). No obstante, cabe destacar que en dicho estudio emplearon una mayor concentración de PPD johnina para estimular las muestras de tejido que las de sangre, mientras que nosotros utilizamos las mismas cantidades de PPD aviar para ambos. Por otro lado, los fragmentos de tejido empleados por Gwozdz y Thompson (2002) fueron algo más finos (2 mm de gruesos y 5 mm de diámetro) que los que utilizamos para esta técnica (5 mm³). Por ello, la ausencia de diferencias encontrada en nuestro estudio podría ser debida a que el antígeno no hubiera podido penetrar lo suficiente y entrar en contacto con todas las CPAs presentes en las muestras de tejido en tan sólo 24 horas de incubación. Gwozdz y Thompson (2002) observaron un mayor incremento en la producción *in vitro* de IFN- γ específico tras 48 horas de incubación en comparación con las 24 horas en los ovinos infectados por lo que, en nuestro caso, quizás un mayor período de incubación de los tejidos hubiera permitido detectar diferencias entre los grupos experimentales.

En cambio, tras analizar la producción *in vitro* de IFN- γ a partir de los linfocitos aislados de dichos tejidos, se observó un incremento de los niveles de esta citoquina en aquellas células aisladas de la PPY de los corderos infectados con “dosis alta”, así como del NLMC de aquellos del grupo control, sacrificados a los 100-120 dpi (Gráfico IV.14). También se detectó un incremento significativo en los linfocitos del NLMC de las ovejas adultas infectadas con “dosis alta” de *Map*, en ambos sacrificios (Gráfico IV.15). Dentro de las ovejas de este último grupo, el NLMC fue precisamente una de las localizaciones en las que menos lesiones granulomatosas se desarrollaron en respuesta a la infección con *Map* (apartado IV.2.2.1.2, Tabla IV.8). La mayor producción de esta citoquina Th1, mediador de la respuesta inmune celular de carácter protector, podría haber contribuido a la limitación de la infección en este tejido. En cambio, la mayor secreción *in vitro* de dicha citoquina en los linfocitos de la PPY de los corderos de este mismo grupo a los 100-120 dpi, coincide con una localización donde se formaron numerosos granulomas. Debe tenerse en cuenta que este incremento medio se debe en gran medida a la elevada producción local de IFN- γ del cordero 47 en comparación con los otros dos sacrificados en este grupo, siendo éste el animal con menos lesiones granulomatosas y menor cantidad de BAAR observados, por lo que, al igual que en las

ovejas, dicha citoquina podría haber contribuido en parte a la limitación de las lesiones de este animal. La mayor producción local de IFN- γ en el NLMC de los corderos controles sacrificados a los 100-120 dpi resulta más complicada de interpretar, al no haber mostrado estos animales ningún signo de infección por *Map*. En cualquier caso, se trata de un número muy bajo de animales, por lo que es arriesgado extraer conclusiones de estos resultados.

Begara-McGorum *et al.*, (1998) encontraron niveles insignificantes de IFN- γ tras la incubación de linfocitos con PPD johnina, en corderos jóvenes, tanto en los infectados experimentalmente como en los controles. Tal y como comentamos anteriormente, los linfocitos de los ovinos adultos de nuestro estudio podrían haber tenido contactos previos con antígenos de *Map*, lo que implicaría una sensibilización de los mismos, pudiendo haber contribuido en ambos sacrificios a la mayor producción de IFN- γ específico tras entrar en contacto con la PPD aviar, a diferencia de los corderos. Por otro lado, el hecho de que la mayoría de los incrementos significativos de la citoquina se hayan detectado en los linfocitos aislados del NLMC, podría deberse a su mayor concentración en dicho tejido, al haberse incubado siempre 1 ml de linfocitos extraídos tanto de ILd, PPY como NLMC, independientemente de la cantidad neta de linfocitos viables presentes en el medio.

Otro hallazgo destacable consistió en que los resultados de la producción *in vitro* de IFN- γ en los cultivos celulares no se correspondieron con los niveles de expresión del ARNm de dicha citoquina cuantificados mediante qPCR (Gráfico IV.17). Así, cuando se consideró de forma global el nivel de expresión génica del IFN- γ , éste fue más intenso en los ovinos infectados que no desarrollaron lesiones (Gráfico IV.16), es decir, en los 3 corderos analizados procedentes del grupo de infectados con “dosis baja” de *Map* (Tabla III.23), mientras que no se observaron tales diferencias en los cultivos celulares de aquellos ovinos procedentes del mismo grupo. Por otro lado, esa mayor expresión génica en los individuos infectados sin lesión, estaría de acuerdo con la mayor secreción de dicha citoquina en el NLMC de las ovejas, donde apenas se observaron lesiones (Gráfico IV.15). No obstante, hay que tener en cuenta que es posible que la comparación entre ambas pruebas no pueda llevarse a cabo, ya que la producción *in vitro* de IFN- γ se determinó directamente a partir de los linfocitos aislados de los diferentes tejidos, mientras que en el caso de la qPCR, la cuantificación

del ARNm se llevó a cabo a partir de trozos de tejido de 0,5 cm³, que incluían diferentes tipos celulares y no sólo linfocitos. Además, en el caso de la qPCR, se detectó el nivel de expresión génica, que no tiene por qué correlacionarse directamente con la cantidad real de la citoquina expresada, ya que puede haber sufrido modificaciones postranscripcionales.

En relación con lo anterior, los resultados obtenidos en esta tesis doctoral en cuanto a la determinación del nivel de expresión génica de los diversos mediadores analizados, reflejan la extrema complejidad de las interacciones entre citoquinas, el receptor de respuesta inmune innata TLR2 y el factor de transcripción FoxP3 en respuesta a la infección por *Map*. Por razones técnicas, no se pudieron analizar los tejidos de todos los 51 animales de este estudio, por lo que se seleccionaron 18 ovinos, sumando ovejas con corderos, tomando como criterio diferenciador, además de la infección, el tipo lesional inducido en los animales (Tabla III.23). Así, aunque el bajo número de animales estudiados no nos permitió analizar el nivel de expresión de los 11 genes en ovejas adultas y corderos por separado, se pudo determinar dicha expresión génica en conjunto en ovinos, y tratar de conocer y entender la relación entre la respuesta inmune local y los diferentes cambios patológicos que ocurren a medida que progresa la infección por *Map* así como la cantidad de BAAR presentes en las lesiones.

La mayoría de los estudios llevados a cabo en paratuberculosis para determinar el perfil génico de expresión de citoquinas mediante qPCR, han analizado animales con signos clínicos y lesiones difusas (Smeed *et al.*, 2007; Nalubamba *et al.*, 2008; Rossi *et al.*, 2009; Gillan *et al.*, 2010). En nuestro estudio, nos hemos centrado en conocer dicho perfil en las lesiones asociadas a las fases iniciales de la infección, de tipo focal, en tejido linfoide, o multifocal. Una de las mayores dificultades encontradas para discutir nuestros resultados ha sido la falta de estandarización en la clasificación de las lesiones asociadas a la paratuberculosis ovina. Mientras las lesiones “multibacilares” no suelen dar lugar a dudas e implican animales con signos clínicos y con lesiones intestinales con una elevada carga micobacteriana, existe controversia con las denominadas formas “paucibacilares” y “tuberculoides”. De acuerdo con la clasificación establecida por Clarke y Little (1996), las lesiones “paucibacilares” se asocian únicamente a animales con signos clínicos y lesiones difusas con un infiltrado rico en linfocitos y escasos grupos de macrófagos y células gigantes (tipo 3c, según la clasificación de Pérez *et al.*,

1996). Las formas “tuberculoides”, de acuerdo con el espectro tradicional de la paratuberculosis, estarían relacionadas con lesiones iniciales subclínicas focales y multifocales (Chiodini *et al.*, 1984a; Clarke, 1997; Pérez *et al.*, 1997, 1999; García-Marín *et al.*, 2000). En este sentido, la descripción de las lesiones que Rossi *et al.*, (2009) denominan “tuberculoides” coinciden con una lesión “paucibacilar” según la definición anterior. Sin embargo, según de Silva *et al.*, (2010), la categoría “paucibacilar” incluiría tanto a las lesiones multifocales como a las linfocíticas, al relacionarlas con las de tipo 2, 3a y 3c de la clasificación de Pérez *et al.*, (1996), pero estos autores clasifican las lesiones granulomatosas focales, (del tipo 1 según Pérez *et al.*, 1996) dentro de la categoría de “negativa al estudio histológico”. Por otro lado, para algunos autores, las denominadas formas “asintomáticas” en ovinos constituirían un grupo diferenciado de las formas clínicas en las que no se apreciarían lesiones pero sí se detectaría la presencia de la infección por *Map* mediante cultivo, PCR o serología. En cambio, de acuerdo con Tanaka *et al.*, (2005), las formas “asintomáticas” en la especie bovina sí se acompañarían de lesiones subclínicas (Smeed *et al.*, 2007; Nalubamba *et al.*, 2008; Gillan *et al.*, 2010). Taylor *et al.*, (2008) diferenciaron los animales de su estudio en aquellos “no expuestos” de los “expuestos” a *Map*, y dentro de estos últimos, distinguieron los “expuestos no infectados” (procedentes de rebaños con paratuberculosis, pero negativos al cultivo y sin lesiones), de los ovinos infectados con lesiones “paucibacilares precoces”, que relacionaron con las de tipo 3a de la clasificación de Pérez *et al.*, (1996), y “multibacilares”, asociadas a las de tipo 3b de esta última clasificación. Por otra parte, hay que considerar que los trabajos mencionados anteriormente estudiaron animales infectados de forma natural (Smeed *et al.*, 2007; Nalubamba *et al.*, 2008; Taylor *et al.*, 2008; Rossi *et al.*, 2009; Gillan *et al.*, 2010) mientras que en nuestro caso, los ovinos seleccionados procedieron todos de la misma infección experimental.

De los once genes analizados mediante qPCR en esta tesis doctoral, la gran mayoría (ocho) se expresaron de forma homogénea en las cinco categorías estudiadas, cuando se valoraron de forma global, sin distinguir entre los tejidos, a pesar del diferente grado lesional y cantidad de BAAR en las lesiones granulomatosas (Gráfico IV.16). Sólo se apreció un incremento en el nivel de expresión de las citoquinas proinflamatorias IL-6, IL-12 e IFN- γ , las tres implicadas en la respuesta de tipo celular de tipo Th1 (Stabel, 2000a; Coussens, 2001; Kidd, 2003; Stabel, 2006), en animales con

lesiones focales o infectados sin lesiones. Este hallazgo estaría en consonancia con los resultados de las pruebas de IFN- γ e IDR en las ovejas y corderos con lesiones focales, por lo que estos individuos se situarían dentro de las formas “tuberculoides” del espectro, con escasos BAAR y una elevada respuesta protectora proinflamatoria celular.

Se ha atribuido un papel crucial a la IL-12 en la inducción de la producción del IFN- γ por parte de los linfocitos T, B, macrófagos y células dendríticas (Cooper *et al.*, 1995, 1997; Fukao *et al.*, 2000). En nuestro caso, el nivel de expresión de la IL-12 fue significativamente mayor en los ovinos con lesiones focales, en comparación con aquellos con lesiones más avanzadas, especialmente con las MFb, caracterizadas por presentar abundantes BAAR en los granulomas (Gráfico IV.16). De manera similar, en el NLM, las formas MFb fueron las que menos cantidad de IL-12 expresaron (Gráfico IV.17). Se ha relacionado la infección micobacteriana de los macrófagos con una disminución progresiva de la producción *in vivo* e *in vitro* de esta citoquina (Wagner *et al.*, 2002; Weiss *et al.*, 2002), lo que apoyaría nuestros resultados, de forma que su menor expresión se relacionaría con la inhibición de la respuesta inmune celular frente a la infección, resultando en una menor limitación de la replicación de *Map*.

El IFN- γ está considerado como la principal citoquina efectora de tipo Th1, desempeña un papel muy importante en la inducción de la activación de los macrófagos (Stabel, 2000a, 2006), y niveles elevados de la misma se han encontrado en animales con la infección subclínica y escasos BAAR en las lesiones (Stabel, 1996; Sweeney *et al.*, 1998; Pérez *et al.*, 1999; Stabel, 2000b). Rossi *et al.*, (2009) evidenciaron una mayor expresión de IFN- γ e IL-12 en las formas tuberculoides frente a las multibacilares en el intestino, mediante qPCR. En nuestro caso, la cuantificación del ARNm del IFN- γ fue mayor en aquellos corderos infectados en los que no se apreciaron lesiones tras el estudio histopatológico, en comparación con los demás grupos (Gráficos IV.16 y IV.17), sugiriendo que este mediador químico pudo haber sido el responsable de la falta de desarrollo de lesiones inflamatorias granulomatosas, probablemente por haber destruido de forma eficaz a las bacterias que llegaron a esos tejidos. Además, estos resultados confirmarían los resultados de Begara-McGorum *et al.*, (1998), según los cuales la respuesta periférica no reflejaría siempre de forma adecuada la respuesta inmune que se desarrolla en el tejido linfoide intestinal, al no haberse detectado una producción significativa de IFN- γ en sangre periférica de los corderos de este grupo

(infectados con “dosis baja” de *Map*, sin lesión detectable) en comparación con los demás (Gráfico IV.2). De hecho, Robinson *et al.*, (2010) señalan que la respuesta inmune protectora a nivel local, especialmente la inmunidad de mucosas, podría tener mayor peso que la periférica, en un estudio con ciervos infectados experimentalmente. Tampoco puede excluirse la posibilidad de que los niveles de expresión génica no reflejen exactamente los niveles reales de la citoquina producida.

La IL-6, al igual que otras citoquinas, parece tener efectos pleiotrópicos. Aunque se suele considerar como de tipo Th1 o proinflamatoria (Begara-McGorum *et al.*, 1998; Coussens *et al.*, 2004), también se han encontrado niveles elevados en animales con formas multibacilares, tradicionalmente asociadas a una respuesta antiinflamatoria de tipo Th2 (Alzuherri *et al.*, 1996). Smeed *et al.*, (2007) hallaron una mayor expresión de dicha citoquina en los animales con signos clínicos (pauci y multibacilares) en comparación con aquellos “asintomáticos”. En nuestro caso, la IL-6 se expresó en mayor cantidad en las formas focales (Gráfico IV.16) y, concretamente en el NLM, su expresión génica fue menor en las MFb (Gráfico IV.17), apoyando su papel como citoquina proinflamatoria. De la misma manera, se encontró una mayor cantidad de los genes que codifican para la citoquina proinflamatoria IL-1 β en el ILd de aquellos ovinos con formas focales, en comparación con aquellos infectados sin lesión o con formas multifocales (Gráfico IV.17), a pesar de que esta citoquina también se ha relacionado en algunas ocasiones con lesiones lepromatosas (Alzuherri *et al.*, 1996; Rossi *et al.*, 2009). Por otro lado, en nuestro estudio, se obtuvieron resultados contradictorios en cuanto a la expresión génica de TNF- α entre los diferentes tejidos, al detectarse un mayor nivel de expresión de esta citoquina en los individuos controles frente a los demás en el ILd, mientras que en el NLM, la mayor cantidad de ARNm de TNF- α se encontró en los ovinos con lesiones MFa (Gráfico IV.17). El TNF- α es una de las citoquinas críticas para la correcta formación y persistencia de los granulomas (Saunders y Cooper, 2000), y su deficiencia se ha relacionado con una mayor susceptibilidad a la infección por *M. tuberculosis* o *M. avium* (Ehlers *et al.*, 2000; Roach *et al.*, 2002). Smeed *et al.*, (2007) relacionaron los ovinos asintomáticos de su estudio con una mayor expresión génica de TNF- α , aunque en contra de lo esperado, no encontraron lesiones ni presencia de BAAR. Coincidiendo con nuestros resultados, Begara-McGorum *et al.*, (1998) encontraron una disminución en los niveles génicos de TNF- α en la PPI y PPY de los corderos infectados experimentalmente, que presentaron lesiones focales sin BAAR, en

comparación con los animales controles; en cambio, en el NLM, la expresión génica de dicha citoquina fue significativamente mayor en los individuos infectados. También se han relacionado las lesiones multibacilares de la paratuberculosis con una mayor expresión génica del TNF- α (Alzuherri *et al.*, 1996). Estos hallazgos reflejan la gran complejidad y variación que experimentan estas citoquinas en respuesta a la exposición a *Map*. En cualquier caso, parece claro que dichos mediadores pueden ser tanto beneficiosos como resultar perjudiciales para el hospedador, dependiendo de la cantidad secretada y de su interacción con las demás citoquinas.

En cuanto a las citoquinas Th2 analizadas en nuestro estudio, sólo se observó un incremento significativo en la expresión génica de la IL-10 en el ILd de los ovinos con lesión MFb en comparación con los demás animales infectados, y unos niveles génicos de IL-13 mayores en la PPY de aquellos con lesiones focales y escasos *Map*, con respecto a los demás, si bien las cantidades de ARNm de IL-13 detectadas fueron siempre bajas (Gráfica IV.17). Coincidiendo con nuestros resultados, Khalifeh y Stabel (2004a) detectaron una mayor expresión de IL-10 y TGF- β en el íleon de vacas con lesiones multifocales y elevado número de micobacterias, en comparación con vacas sanas o en fase iniciales de la enfermedad. En nuestro caso, la elevada concentración de ARNm que codifica para la IL-10 en el ILd de los ovinos con lesiones MFb y abundantes BAAR, coincide con la baja expresión génica de IFN- γ , lo que podría haber inducido a la progresión de la infección y la multiplicación bacteriana, en consonancia con el papel inhibitorio que se ha adjudicado a la IL-10 sobre el IFN- γ (Ito *et al.*, 1999).

El papel del factor de transcripción FoxP3, asociado a las células T reguladoras (Treg) CD4+CD25+ (Hori *et al.*, 2003), así como la citoquina proinflamatoria IL-17, relacionada con la subpoblación linfocitaria Th17 (Curtis y Way, 2009), ha sido muy poco estudiado en las diferentes formas inmunopatológicas de la paratuberculosis. Los niveles de ARNm de IL-17 detectados en el NLM, a pesar de expresarse en mayor cantidad en las formas MFb, fueron muy bajos en todos los grupos estudiados, e incluso no se llegó a detectar su presencia en aquellos ovinos infectados sin lesión o con lesiones focales (Tabla X.17 de los anexos), sugiriendo que esta citoquina no tendría el mismo peso que las demás analizadas en este estudio en cuanto a la respuesta inmune frente a *Map*. Los niveles de expresión génica del FoxP3 en ILd fueron significativamente superiores en aquellos ovinos con lesiones MFa frente a los demás, si

bien cabe tener en cuenta que no se detectó dicho gen en los individuos controles ni en aquellos infectados sin lesión (Tabla X.15 de los anexos). De manera similar, se ha encontrado una mayor cantidad del gen FoxP3 en el íleon de vacas con infección subclínica en comparación con vacas sanas o con paratuberculosis clínica (De Almeida *et al.*, 2008). Las células Treg actuarían inhibiendo la respuesta inmune de la mucosa, favoreciendo la progresión de la enfermedad (Stabel, 2006; Weiss *et al.*, 2006; Sohal *et al.*, 2008). En nuestro caso, podría interpretarse que la mayor expresión en el ILd del gen FoxP3 en las formas MFa, podría haber limitado la capacidad protectora de la respuesta inmune de tipo Th1, lo que coincidiría con la baja expresión de las citoquinas proinflamatorias IFN- γ , IL-1 β o TNF- α en la misma localización y grupo lesional, y explicaría la progresión de las lesiones granulomatosas hacia la LP. Si esto fuera cierto, hubiera sido esperable una mayor expresión de FoxP3 también en las lesiones MFb, lo que no se ha encontrado. En nuestro estudio, probablemente el empleo de un mayor número de animales por cada tipo lesional hubiera sido deseable para una mejor valoración de los resultados.

Finalmente, se analizó el patrón de la respuesta inmune innata en respuesta a la exposición a *Map* a través del estudio de la variación génica del receptor de membrana TLR2 (Gráfico IV.17). Se ha descrito una cantidad significativamente superior de dicho receptor en ovinos con lesiones multibacilares, donde los macrófagos se encuentran incapacitados para contener la diseminación de *Map*, frente a los paucibacilares o a los animales controles procedentes de rebaños no expuestos a *Map* (Nalubamba *et al.*, 2008; Taylor *et al.*, 2008), sugiriendo que la interacción de *Map* con el TLR2 inhibiría la respuesta macrofágica antimicrobiana. Nuestros resultados seguirían la misma tendencia en el ILd, con una mayor expresión génica de TLR2 en las formas MFa con respecto a los animales control y a los ovinos infectados sin lesión o con lesión focal, con escasos o nulos BAAR, pero no en el caso de las lesiones MFb, con mayor cantidad de BAAR, donde la expresión de este receptor fue menor. Este último hallazgo estaría de acuerdo con otros estudios que adjudican un papel protector a la interacción del TLR2 y TLR4 con diversos componentes micobacterianos (Thoma-Uszynski *et al.*, 2000; Stenger y Modlin, 2002; Quesniaux *et al.*, 2004).

Dentro de los tres tejidos estudiados, la zona de ILd adyacente a la VIC sería la localización que más variación experimentó en cuanto a la expresión de los genes

relacionados con la respuesta inmune en las diferentes formas patológicas de paratuberculosis evaluadas, siendo la PPY el tejido más homogéneo (Gráfico IV.17). Esto implicaría que los acontecimientos inmunológicos desencadenados frente a la presencia de *Map* en el intestino no se desarrollarían de la misma manera en las diferentes localizaciones, y sugeriría que las diferencias observadas en la intensidad lesional y la presencia de *Map* en los diferentes tramos intestinales y nódulos linfáticos mesentéricos podrían ser debidas a una distinta respuesta inmune local (Tablas IV. 7, 8, y IV.9 a 12; Gráfico IV.10).

La gran variabilidad encontrada en la expresión génica de los distintos mediadores evaluados entre los diferentes grupos de animales y localizaciones en este estudio hace difícil elaborar una interpretación de los resultados. Si bien es posible que en cada caso, la función de las distintas citoquinas varíe según como interaccionen entre ellas, es posible que la inclusión de un mayor número de individuos dentro de cada grupo de animales pudiera arrojar resultados más clarificantes sobre el papel de estos mediadores. Por otra parte, y como ya se ha indicado, aunque se asume que los niveles de ARNm detectados en cada muestra reflejarían la cantidad de proteínas codificadas posteriormente, no se ha podido confirmar la presencia *in situ* de cada citoquina, TLR2 o FoxP3 mediante tinción inmunohistoquímica u otro tipo de ensayos, por lo que no se puede garantizar con certeza que un incremento en la expresión génica se traduzca necesariamente en una mayor síntesis de proteínas.

V.4. ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE MÉTODOS DE DETECCIÓN DEL AGENTE ETIOLÓGICO

V.4.1. DETECCIÓN EN TEJIDO FRESCO Y HECES

Referente a los estudios bacteriológicos para la detección de *Map* en tejido fresco y heces, el cultivo resultó ser una técnica muy poco sensible en el caso de los corderos y más aún en las ovejas (Tablas IV.14, IV.27 a 29, y IV.34). Así, sólo se aislaron colonias viables de *Map* en VIC y/o ILd de 4 de los 8 corderos infectados con “dosis alta” (50%), de los cuales 2 se clasificaron como MFb y otros 2 como focales, mientras que no se identificó el bacilo mediante cultivo en ninguno de los tejidos de los demás corderos de este estudio (a pesar de observarse lesiones e incluso BAAR en algunos animales), ni en ninguna de las ovejas adultas, aunque la última lectura se

realizó a los 10 meses posinoculación. Además, en los casos positivos, la cantidad de colonias de *Map* aisladas siempre fue escasa. Estos pobres resultados estarían de acuerdo con otros estudios que señalan la dificultad de aislamiento de cepas ovinas de *Map* (Juste *et al.*, 1988; Carrigan y Seaman, 1990; Huchzermeyer y Bastianello, 1992; Shulaw *et al.*, 1993; Kurade *et al.*, 2004). En otros estudios, los resultados del cultivo a partir de tejidos han sido mejores, detectando incluso *Map* a partir de muestras donde no se habían observado lesiones (Brotherston *et al.*, 1961a; Nisbet *et al.*, 1962; Pérez *et al.*, 1996). En nuestro caso, sumando los 16 corderos y 22 ovejas infectados y tomando como referencia los tipos lesionales, sólo 2 de los 13 ovinos (15,38%) con lesiones focales, el 50% de los animales con lesiones MFb y ninguno con lesiones MFa o sin lesiones (0%) fueron positivos al cultivo (Tabla IV.29). En un estudio similar pero utilizando ovinos adultos procedentes de rebaños con paratuberculosis, Pérez *et al.*, (1996) aislaron *Map* en el 47,5% de animales con lesiones focales (lesión tipo 1), el 87,5% de los multifocales (lesión tipo 2) e incluso en 3 ovejas en las que no observaron lesiones de paratuberculosis, porcentajes superiores a los obtenidos por nosotros.

Con respecto al cultivo fecal, no se identificó la presencia de *Map* a los 15 ni a los 90 dpi, lo que concuerda con los resultados obtenidos en los mismos plazos en otras infecciones experimentales realizadas en la especie ovina (Reddacliff y Whittington, 2003; Begg *et al.*, 2009), bovina (Rankin, 1961a; Muñoz *et al.*, 2006) o caprina (Sigurdardóttir *et al.*, 1999; Munjal *et al.*, 2005). En el cordero 51 (Tabla IV.34) sí que se identificaron colonias viables de *Map* en heces en el primer sacrificio (100-120 dpi), hecho esperable ya que mostraba lesiones avanzadas (MFb), con presencia de numerosos BAAR en las lesiones. En estudios previos, se ha señalado que la eliminación de bacterias en heces estaría directamente relacionada con el tipo lesional, siendo mayor y continua en animales con signos clínicos y lesiones de carácter multibacilar (Whittington *et al.*, 2000c). Por el contrario, sorprendió más el aislamiento logrado en el cordero 53, tanto en heces como en muestras de tejido de VIC e ILd, al tratarse de un animal con lesiones leves focales, en las que no se apreciaron BAAR ni antígenos de *Map* en el estudio histológico. Es probable que este animal mostrara lesiones más avanzadas en otros tramos de intestino no examinados microscópicamente. En cualquier caso, este resultado respalda las observaciones de Whittington *et al.*, (2000c), quienes advirtieron del riesgo de transmisión que podían suponer los animales

infectados subclínicamente, con lesiones leves, capaces de excretar los bacilos de forma intermitente a pesar de no presentar signos clínicos.

La mayor falta de identificación de *Map* mediante cultivo en las ovejas en comparación con los corderos podría deberse a la dificultad de aislamiento de algunas cepas ovinas, sobre todo si están en menor cantidad en los tejidos como se ha podido observar en el estudio histopatológico de estos animales, que presentaban granulomas de pequeño tamaño, focales y de tipo regresivo, donde fue difícil evidenciar BAAR. Como ya se ha señalado, la respuesta inmune protectora de las ovejas habría sido capaz de contener el crecimiento de *Map* en el interior de los granulomas, e incluso fagocitar y destruir los bacilos eficazmente mediante la puesta en marcha de numerosos mecanismos antimicrobianos (Fratuzzi *et al.*, 1999; Stabel, 2000a; Coussens, 2001; Hostetter *et al.*, 2002, 2005; Stabel, 2006; Simutis *et al.*, 2007; Khalifeh *et al.*, 2009). Así, nuestros resultados estarían de acuerdo con la menor sensibilidad obtenida en los ensayos experimentales llevados a cabo entre bovinos adultos y jóvenes, donde el rendimiento del cultivo de tejidos y heces en animales adultos fue siempre inferior al de los jóvenes, a pesar de haberse empleado las mismas condiciones de procesado de muestras (Taylor, 1953a; Payne y Rankin, 1961a; Larsen *et al.*, 1975a).

El cultivo es considerado como la prueba de referencia (el “gold standard”) en el diagnóstico de la paratuberculosis y en concreto el cultivo fecal, ha sido utilizado para la identificación de animales infectados en algunos programas de control (Chiodini *et al.*, 1984a; Merkal, 1984; Bakker *et al.*, 2000; Garrido *et al.*, 2000a; Brown *et al.*, 2007). Nuestros resultados, que muestran la falta de aislamiento de colonias de *Map* en ninguno de los tejidos de las ovejas adultas y sólo en un número bajo de corderos, a pesar de presentar lesiones e incluso detectarse BAAR mediante ZN, IHQ y PCR en los tejidos, llevan a concluir que un resultado negativo en el aislamiento bacteriológico no implicaría necesariamente la ausencia de infección por *Map* en ovinos. Algo similar se ha observado en la enfermedad de Crohn, donde en numerosos trabajos se ha puesto en evidencia la presencia de ADN de *Map* asociada a las lesiones, mientras el aislamiento se ha mostrado mucho más dificultoso (Moss *et al.*, 1992; Collins *et al.*, 2000; El-Zaatari *et al.*, 2001; Kirkwood *et al.*, 2009).

Las muestras en las que crecieron colonias de *Map* fueron todas sembradas en el medio Middlebrook 7H11, mientras que no se consiguió aislar la presencia de dicho agente en ninguno de los tubos con el medio Löwenstein-Jensen (LJ). Contrariamente a nuestros hallazgos, este último medio, a base de huevo, ha demostrado tener un elevado rendimiento para el crecimiento de cepas ovinas de *Map* en comparación con el medio de Herrold (Juste *et al.*, 1991b). Pérez *et al.*, (1996) también obtuvieron buenos resultados en el aislamiento de cepas de *Map* procedentes de ovinos en el medio LJ. No obstante, y de acuerdo con nuestros resultados, Adúriz *et al.*, (1995) señalaron que las cepas ovinas aisladas en el medio LJ daban lugar a colonias de muy pequeño tamaño, muy difíciles de visualizar, incluso con lupa estereoscópica, mientras que se aislaron con mayor facilidad en el medio sintético Middlebrook 7H11. Whittington *et al.*, (1999) también recomendaron el uso del medio de cultivo Middlebrook 7H10 y 7H11, además del cultivo radiométrico, para aislar *Map* a partir de ovejas en Australia, pero en este último caso, se requería la adición de huevo al medio. Sevilla *et al.*, (2007) aislaron algunas de las cepas S con mayor facilidad en el medio 7H11 sin micobactina J, otras en el mismo medio con micobactina J añadida, y otras en el LJ con mayores tiempo de incubación, indicando que cepas de diferente procedencia pueden cultivarse mejor en unos medios de cultivo que en otros.

En comparación con el cultivo, la PCR anidada en tejido fresco ofreció una sensibilidad mayor, detectando la presencia de la secuencia de inserción IS900 característica de *Map* en el 87,5% y 100% de los corderos de los grupos de “dosis baja” y “alta”, así como en el 66,6% y 84,61% de las ovejas de los mismos grupos, respectivamente (Gráfico IV.18; Tablas IV.15 a 18). Además, al analizar y comparar los rendimientos de la PCR anidada y del cultivo en función de las formas patológicas encontradas en este estudio en las ovejas y corderos, la PCR anidada fue más sensible en cada categoría (Tabla IV.29; Gráfico IV.24). Por tanto, estos resultados permitirían destacar la mayor eficacia de esta técnica molecular en la detección del agente etiológico de la paratuberculosis en muestras de tejido fresco. No obstante, cabe tener en cuenta que la PCR se caracteriza por identificar únicamente fragmentos de ácidos nucleicos de *Map*, por lo que un resultado positivo a dicha técnica no necesariamente implica la presencia del microorganismo entero, sino que también podría incluir los ácidos nucleicos de bacilos que ya no son viables en el tejido o que hayan sido fagocitados por los macrófagos, mientras que el cultivo tiene la ventaja de que permite

aislar al microorganismo viable (Garrido *et al.*, 2000a), lo que podría explicar en parte las diferencias de sensibilidad obtenidas en este estudio (Tablas IV.27 a 29). Desde el descubrimiento de la secuencia de inserción específica de *Map* IS900 (Green *et al.*, 1989), la PCR ha sido destacada por ser una técnica de elevada especificidad y sensibilidad (Garrido *et al.*, 2000a). En este trabajo, se ha utilizado una PCR anidada, habiendo demostrado su eficacia en la detección de ácidos nucleicos de *Map* en tejidos donde no se pudieron visualizar BAAR o sus antígenos. Esta mayor sensibilidad de este tipo de PCR ya había sido puesta de manifiesto en otros estudios, especialmente en la detección de *Map* en biopsias intestinales de pacientes con lesiones de la enfermedad de Crohn (Bull *et al.*, 2003; Romero *et al.*, 2005; Kirkwood *et al.*, 2009). En nuestro caso, además, la PCR anidada fue capaz de identificar ADN de *Map* en animales donde no se habían encontrado lesiones (Gráfico IV.24). Otra ventaja que ofreció la PCR anidada fue la posibilidad de obtener resultados positivos a partir de tan sólo 0,5 gramos de tejido fresco, frente a los 2 gramos necesarios para el cultivo. Sin embargo, se hace preciso señalar la laboriosidad de este procedimiento, ya que el riesgo de contaminaciones durante su ejecución es muy elevado.

En nuestro estudio, la VIC y el NLMC fueron los tejidos en los que la secuencia IS900 se identificó con mayor frecuencia mediante PCR en tejido fresco (Gráfico IV.19), coincidiendo con los resultados obtenidos a partir de tejido incluido en parafina (Gráficos IV.23 y 26). Además, el aislamiento bacteriológico de *Map* mediante cultivo también ofreció el mejor rendimiento a partir de muestras de VIC (Tabla IV.14), por lo que esta última sería la región de elección para evaluar la presencia de *Map* a partir de tejido fresco mediante estas dos técnicas, coincidiendo con los hallazgos de otros autores (Chiodini y Van Kruiningen, 1986; Gwozdz *et al.*, 1997; Huda y Jensen, 2003) y con lo recomendado anteriormente para el estudio histopatológico. En cambio sorprenden los bajos rendimientos de la PPY, especialmente en el cultivo, a pesar de tratarse de una de las muestras con mayor cantidad de lesiones y presencia de BAAR en algunos corderos (Tablas IV.9 y IV.11). Una posible explicación estaría en que la muestra de partida era diferente en los dos análisis, ya que el número de placas de Peyer yeyunales es elevado, habiendo sido siempre mayor el número de placas examinadas histológicamente que el utilizado para el cultivo. En cualquier caso, esta falta de concordancia entre la presencia de lesiones y la identificación bacteriológica del agente

ya ha sido señalada en las fases iniciales de la infección paratuberculosa en otros estudios (Sigurdardóttir *et al.*, 1999).

V.4.2.DETECCIÓN EN TEJIDO INCLUIDO EN PARAFINA

En cuanto a la detección de *Map* en tejido incluido en parafina, se emplearon las técnicas de ZN, IHQ, PCR convencional y anidada, resultando esta última la más sensible, y la más eficaz para detectar las ovejas y corderos con formas focales y escasos BAAR, así como aquellos en los que no se apreciaron lesiones tras el estudio histopatológico (Tablas IV.32 a 34; Gráficos IV.25 y 26). Además, esta técnica resultó especialmente útil en el caso de las ovejas adultas, donde la identificación de BAAR o antígenos de *Map* mediante ZN e IHQ daba lugar a resultados dudosos, por la presencia de pigmentos dentro de los granulomas. La PCR anidada permitió confirmar la invasión de *Map* en los tejidos en un 60,87% de los animales adultos con lesiones focales, e incluso en el 32,26% de aquellos en los que no se detectaron lesiones granulomatosas (Tabla IV.32). Según estos resultados, la PCR anidada en tejido incluido en parafina sería un buen complemento del estudio histológico, permitiendo el diagnóstico etiológico en aquellas lesiones compatibles con paratuberculosis en las que no se puede demostrar la presencia de BAAR mediante técnicas microscópicas convencionales.

Una posible explicación a esta diferente sensibilidad entre la PCR anidada y los métodos de ZN e IHQ, estaría en que estos últimos sólo detectan proteínas de *Map* y no ácidos nucleicos, de forma que si las primeras no están presentes, el resultado será negativo. Además, también hay que considerar que para la realización de las tinciones de ZN e IHQ se emplean secciones de 4 µm de espesor, frente a los 10 µm requeridos para la extracción de ADN en la PCR anidada. Este aumento en la cantidad de tejido analizada podría haber contribuido también a incrementar la sensibilidad de la PCR.

Un factor importante a la hora de analizar tejidos incluidos en parafina mediante PCR es que su prolongada fijación en formol puede comprometer la posterior amplificación del ADN, reduciendo la sensibilidad de la PCR (Greer *et al.*, 1991; Plante *et al.*, 1996; Benavides *et al.*, 2006). En nuestro estudio, este problema ha sido obviado porque ninguna de las muestras permaneció en formol más de 24 h. Tomando los resultados de la PCR anidada en tejido fresco, se ha podido identificar la presencia de la

secuencia IS900 de *Map* en el 93,75% y el 37,5% de las muestras de los corderos infectados con “dosis alta” y “baja”, respectivamente, así como en el 52,08% y 25% de las ovejas de los mismos grupos (apartado IV.4.2.1). En cambio, cuando dicha técnica se aplicó en secciones de tejido fijado en formol e incluido en parafina, se detectaron el 87,5% y el 37,5% de las secciones analizadas de los corderos infectados con “dosis alta” y “baja”, respectivamente, así como el 47,06% y el 27,77% de las ovejas de los mismos grupos (apartado IV.4.2.2.2), por lo que el rendimiento fue muy similar en ambos casos. Estos resultados indicarían que, siempre y cuando no se superen las 24 horas de fijación en formol, se podría detectar la presencia de *Map* mediante PCR anidada con una sensibilidad muy similar a partir de tejido fresco o incluido en parafina.

En las muestras de tejido incluidas en parafina, únicas en las que se emplearon ambas técnicas de PCR, la sensibilidad de la PCR anidada fue mayor que la convencional, aunque debe tenerse en cuenta que no se utilizaron los mismos cebadores. La mayor sensibilidad de la PCR anidada es un hecho señalado repetidamente (Collins *et al.*, 1993b; Englund *et al.*, 1999; Erume *et al.*, 2001; Buergelt y Williams, 2004; Gao *et al.*, 2009; Soumya *et al.*, 2009), especialmente cuando se trata de identificar ADN de *Map* cuando las bacterias aparecen en muy baja cantidad. De todas formas, la PCR convencional permitió identificar ácidos nucleicos de *Map* en un mayor número de secciones que las técnicas de ZN e IHQ en aquellos ovinos con un número bajo o nulo de BAAR en los tejidos, aunque llamó la atención su menor sensibilidad en las formas “multifocales”, con una mayor cantidad de bacilos (Tabla IV.34; Gráfico IV.25). No obstante, hay que tener en cuenta que el número de secciones de tejido analizadas con lesiones “multifocales” fue menor al de los otros grupos. Además, y como se ha señalado, ambos tipos de métodos están detectando diferentes estructuras: bacilos enteros en el ZN, proteínas en el caso de la IHQ o ácidos nucleicos en la PCR. De hecho, el grado de concordancia entre dichas tinciones y ambas PCR fue siempre escaso o débil (Tablas IV.35 y 36).

En cuanto a los métodos de tinción de ZN e IHQ, en nuestro estudio, ambas técnicas fueron más efectivas en la detección de *Map* o sus antígenos cuanto más avanzadas eran las lesiones (Gráfico IV.25), como ya se ha señalado por diferentes autores (Pérez *et al.*, 1996; Corpa *et al.*, 2000a; González *et al.*, 2005; Verna *et al.*, 2007). El grado de concordancia para ambas pruebas fue “significativo” al considerar

tanto las secciones con lesiones granulomatosas (“con lesión”) como las procedentes de animales infectados (“infectados”) (Tabla IV.35). No obstante, en aquellas secciones de tejido con lesiones focales, la sensibilidad fue levemente superior para el ZN en comparación con la IHQ, tanto en ovejas como en corderos (Tablas IV.32 a 34; Gráfico IV.25), lo que estaría en contradicción con la mayoría de los estudios, que señalan su mayor sensibilidad en tejidos con lesiones focales y difusas linfocíticas o cuando los bacilos están presentes de forma degradada, tanto en la especie ovina (Pérez *et al.*, 1990, 1996; García-Marín *et al.*, 1992a; Verna *et al.*, 2007; Kheirandish *et al.*, 2008), caprina (Thoresen *et al.*, 1994; Corpa *et al.*, 2000a) o bovina (Plante *et al.*, 1996; Stabel *et al.*, 1996; Coetsier *et al.*, 1998; Brees *et al.*, 2000; Balseiro *et al.*, 2003; González *et al.*, 2005; Delgado *et al.*, 2009). Apoyando nuestros hallazgos, Sigurdardóttir *et al.*, (1999) encontraron que la tinción IHQ no reveló la presencia de antígenos de *Map* en algunas lesiones granulomatosas en las que el ZN había dado resultados positivos. Se trata de diferencias muy sutiles que pudieran ser debidas sin más al empleo de diferentes secciones de tejido. El anticuerpo empleado en esta tesis doctoral ya había sido utilizado anteriormente en la especie bovina (Balseiro *et al.*, 2003, Balseiro, 2004) así como en gamos (Balseiro *et al.*, 2008), ofreciendo sensibilidades notablemente superiores con respecto al ZN, especialmente en las lesiones focales.



VI. Conclusiones, Conclusions

Conclusiones

1^a- Los ovinos adultos, mayores de 3 años, son capaces de infectarse por *Map* en condiciones experimentales, al igual que los corderos de 1 mes de edad. En ambos casos, la infección induce la aparición de lesiones en el intestino. No obstante, existen diferencias en cuanto a la evolución de la infección, de forma que en las ovejas las lesiones aparecen casi exclusivamente en el tejido linfoide intestinal y tienen un carácter focal y regresivo, mientras que en los corderos, éstas progresan hacia formas más graves, diseminándose hacia áreas de la mucosa no relacionadas con la placa de Peyer y nódulos linfáticos regionales.

2^a- La dosis de *Map* administrada a los animales en condiciones experimentales influye en la instauración de la infección. La inoculación por vía oral de una cantidad elevada de *Map* fue capaz de inducir lesiones visibles en los tejidos, así como una respuesta inmune local y periférica detectable, tanto en corderos como en ovejas adultas. En cambio, en los animales infectados con una dosis más baja, pese a que no se desarrollaron lesiones visibles, se pudo detectar ADN de *Map* en los tejidos, así como una mayor producción local de IFN- γ , que podría haber contribuido a la ausencia de alteraciones tisulares.

3^a- Existen diferencias en la respuesta inmune celular periférica, evaluada mediante la producción de IFN- γ e IDR, en función de la edad de infección de los animales, siendo ésta más precoz e intensa en los ovinos adultos que en los corderos. Este hecho podría haber influido en la aparición de las diferencias encontradas en el desarrollo posterior de la infección y de las lesiones.

4^a- La respuesta inmune innata, valorada por la producción de IFN- γ basal (IFN- γ_0), es más intensa en los ovinos adultos infectados con una dosis alta de *Map*, pudiendo haber contribuido, junto con la respuesta adaptativa, a causar una limitación de las lesiones en estos animales, a diferencia de los corderos jóvenes.

5^a- El diferente grado de expresión local observado en la mayoría de las citoquinas examinadas, así como en el receptor de respuesta inmune innata TLR2 y el factor de transcripción FoxP3, está en relación con el tipo lesional, la cantidad de BAAR

presentes en el tejido, así como con la localización anatómica estudiada, en las fases iniciales de la infección por *Map* en ovinos. En este sentido, las citoquinas proinflamatorias IL-6, IL-12 e IFN- γ se expresaron más en las lesiones focales y en los tejidos sin lesiones de los animales infectados, lo que sugiere que podrían actuar en la limitación o eliminación de la infección. Además, la inmunidad celular periférica, valorada mediante la producción de IFN- γ , no siempre se corresponde con la desencadenada a nivel local.

6^a- La inoculación intradérmica de PPD aviar en la prueba de IDR produce un efecto estimulante en la producción de anticuerpos séricos frente a *Map* a los 15-20 días posinoculación. Sin embargo, su influencia sobre la producción de IFN- γ no muestra un patrón definido ni homogéneo. Este hecho debería tenerse en cuenta a la hora de valorar las pruebas de diagnóstico de paratuberculosis.

7^a- La técnica de PCR anidada ha demostrado ser la más sensible en la identificación de la presencia de *Map* en secciones de tejido, tanto fresco como incluido en parafina, en comparación con la PCR convencional, el cultivo bacteriológico o las técnicas histológicas de ZN e IHQ. En los tejidos incluidos en parafina, es especialmente útil en el diagnóstico etiológico de lesiones granulomatosas compatibles con paratuberculosis.

8^a- El método de cultivo empleado ha mostrado una sensibilidad baja en la detección de *Map*, inferior a las demás técnicas empleadas. Según estas observaciones, un resultado negativo en el aislamiento bacteriológico no implicaría necesariamente la ausencia de infección inicial por *Map* en ovinos.

9^a- El tejido linfoide intestinal ha mostrado ser de gran importancia en la instauración de las lesiones iniciales en la infección por *Map* en ovinos, tanto en animales jóvenes como adultos, siendo la válvula ileocecal y las placas de Peyer aisladas yeyunales las áreas más afectadas, mientras que únicamente se observan lesiones en el nódulo linfático mesentérico cuando el intestino ya está afectado.

Conclusions

1st- Adult sheep, older than 3-year-old, can get infected by experimental exposure of *Map*, as do one-month-old lambs. In both cases, the infection leads to the establishment of lesions in the intestine. However, there are differences regarding the evolution of the infection by *Map*, in such a way that in the ewes, the lesions appear almost exclusively in the intestinal lymphoid tissue and are characterized to be focal and regressive, whereas in the lambs, they progress into more advanced forms, spreading into areas of mucosa not related to the Peyer's patches, and to the regional lymph nodes.

2nd- The dose of *Map* inoculum administered to the animals in experimental conditions has an influence on the establishment of the infection. The oral inoculation of high levels of *Map* was able to induce visible lesions in the tissues, as well as a detectable local and peripheral immune response, either in lambs or in ewes. However, in the animals infected with the lowest dose, despite the lack of any visible lesions, *Map* DNA could be detected in the tissues, as well as a higher local IFN- γ production, which could have contributed to the lack of tissue changes.

3th- There are differences in the peripheral cell-mediated immunity, assessed by the IFN- γ production and the intradermal skin test (IST), depending on the age of infection of the animals, in such a way that it appears earlier and more intensely in the ewes than in the lambs. This phenomenon could have influenced the appearance of the differences observed later in the development of the infection and lesions.

4th- The innate immune response, assessed by the basal IFN- γ (IFN- γ_0) production measurement, is more intense in the adult sheep infected with a high dose of *Map*, and could have contributed, together with the adaptive immunity, to the control and limitation of the lesions in these adult animals, unlike in the lambs.

5th- The different *in situ* gene expression observed in the majority of the examined cytokines, as well as in the innate receptor TLR2 and transcription factor FoxP3, depends on the lesional form, the number of AFB present in the tissues, and the

anatomical site analyzed, in the initial stages of the ovine *Map* infection. In this sense, an increased expression of the proinflammatory IL-6, IL-12 and IFN- γ cytokines was observed in the tissues of the infected animals showing focal or no lesions, which suggests that they could have contributed to the limitation or elimination of the infection. Besides, the peripheral cell-mediated immunity, evaluated by the IFN- γ production, does not always reflect what occurs at the local level.

6th- The intradermal inoculation of the avian PPD in the skin test has a potent stimulating effect in the formation of blood serum antibody against *Map* about 15-20 days post-inoculation. However, its influence on the IFN- γ production does not follow a clearly defined and homogeneous pattern. Both effects should be taken into account when evaluating paratuberculosis immunological diagnostic assays.

7th- The nested PCR has proven to be the most sensitive technique in detecting the presence of *Map* in the sections from fresh and paraffin wax-embedded tissues, compared to the conventional PCR, the bacteriological culture or the ZN and immunohistochemistry histological methods. Among the paraffin wax-embedded tissues, it would be especially useful in the aetiological diagnostic of the granulomatous lesions consistent with paratuberculosis,

8th- The culture method used has shown a low sensitivity in *Map* detection, less than the other techniques used. According to these observations, a negative result in the bacteriological isolation would not necessarily imply the lack of initial infection by *Map* in ovine.

9th- The intestinal lymphoid tissue has proven to be extremely important in the establishment of the initial lesions in ovine *Map* infection, both in adult and young sheep. The ileocaecal valve and the isolated jejunal Peyer's patches are the most severely affected sites, whereas the mesenteric lymph nodes only show some lesions when these have already appeared in the intestine.

Conclusions

1^{ère}- Les ovins adultes, âgés de plus de 3 ans, peuvent s'infecter par *Map* en conditions expérimentales, de même que les agneaux d'un mois. Dans les deux cas, l'infection induit l'apparition de lésions dans l'intestin. Cependant, il existe des différences quant à l'évolution de l'infection par *Map*, de sorte que chez les moutons, les lésions apparaissent presque exclusivement dans le tissu lymphoïde intestinal et ont un caractère focal et régressif, tandis que dans le cas des agneaux, elles progressent vers des formes plus sévères et se disséminent jusqu'à la muqueuse non associée à la plaque de Peyer, ainsi que jusqu'aux nodules lymphatiques régionaux.

2^{ème}- La dose de *Map*, administrée expérimentalement aux animaux influe sur l'instauration de l'infection. L'inoculation par voie orale d'une grande quantité de *Map* a provoqué des lésions visibles dans les tissus, ainsi qu'une réponse immunitaire locale et périphérique détectable, autant chez les agneaux comme chez les adultes. En revanche, chez les animaux infectés avec une plus faible dose, bien qu'ils n'aient pas développé de lésions visibles, de l'ADN de *Map* a pu être détecté ainsi qu'une plus grande production locale d'IFN- γ , qui aurait pu contribuer à l'absence d'altérations tissulaires.

3^{ème}- Il existe des différences dans la réponse immunitaire cellulaire périphérique, évaluée par la production d'IFN- γ et le test d'intradermotuberculation (IDT), en fonction de l'âge d'infection des animaux. Ainsi, cette réponse est plus précoce et plus intense chez les ovins adultes que chez les agneaux. Ce phénomène pourrait avoir contribué à l'apparition des différences observées en ce qui concerne le développement postérieur de l'infection et des lésions.

4^{ème}- La réponse immunitaire innée, évaluée grâce à la mesure de la production basale d'IFN- γ (IFN- γ_0), se manifeste de façon plus intense chez les ovins adultes infectés avec une dose élevée de *Map*, ce qui pourrait contribuer, avec la réponse adaptative, à la limitation des lésions chez ces animaux, contrairement aux agneaux.

5^{ème}- La variation d'expression locale observée parmi la plupart des cytokines examinées, ainsi que du récepteur de réponse innée TLR2 et du facteur de

transcription FoxP3, est en relation avec le type de lésion, la quantité de BAAR présents dans le tissu, ainsi qu'avec la localisation anatomique étudiée, dans les phases initiales de l'infection ovine par *Map*. Ainsi, les cytokines proinflammatoires IL-6, IL-12 et IFN- γ s'exprimeraient davantage parmi les lésions focales, et aussi dans les tissus sans lésions des animaux infectés, suggérant que cela pourrait avoir contribué à la limitation ou à l'élimination de l'infection. De plus, l'immunité cellulaire périphérique, évaluée par la production d' IFN- γ , ne correspondrait pas toujours avec la locale.

6^{ème}- L'inoculation intradermique de PPD aviaire dans le test d'IDT stimule la production d'anticorps envers *Map* durant les 15-20 jours post-inoculation. En revanche, son influence sur la production d' IFN- γ ne montre pas de patron bien défini ni homogène. Ce phénomène devrait être pris en compte lorsqu'on analyse les tests diagnostics de paratuberculose.

7^{ème}- La technique de PCR niché fut la plus sensible pour identifier la présence de *Map* dans les sections de tissus frais et inclus en paraffine, en comparaison avec la PCR conventionnelle, la culture bactériologique ou les techniques histologiques de ZN et immunohistochimiques. Sur les tissus inclus en paraffine, cette technique est particulièrement utile pour le diagnostic étiologique des lésions granulomateuses compatibles avec la paratuberculose.

8^{ème}- La méthode de culture employée a fait preuve d'une sensibilité faible, inférieure aux autres techniques utilisées pour détecter *Map*. D'après ces observations, un résultat négatif à l'isolement bactériologique n'impliquerait pas forcément l'absence d'infection initiale par *Map* chez les ovins.

9^{ème}- Le tissu lymphoïde intestinal a dévoilé une grande importance quant à la formation de lésions initiales lors de l'infection par *Map* chez les ovins, aussi bien les agneaux que les moutons. La valve iléocœcale et les plaques de Peyer jéjunales isolées ont été les zones les plus affectées, tandis que le nodule lymphatique mésentérique n'a présenté de lésions que lorsque l'intestin a auparavant manifesté des altérations tissulaires.



*VII. Resumen,
Summary, Résumé*

VII.1. RESUMEN

La paratuberculosis es una enfermedad infecciosa crónica causada por *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* (*Map*), que afecta a los rumiantes, tanto domésticos como silvestres, en los que provoca una enteritis y linfadenitis granulomatosas. Se ha señalado que la infección se produciría en animales jóvenes, si bien los síntomas no aparecen hasta la edad adulta. Sin embargo, existen evidencias lesionales en animales adultos que podrían sugerir que la infección de éstos sería posible. Esta eventualidad se ha señalado en bovinos y cérvidos, si bien los animales adultos serían menos sensibles a la infección. Este fenómeno de resistencia asociada a la edad no ha sido estudiado en la especie ovina, desconociéndose además los diferentes mecanismos inmunopatogénicos que pueden establecerse tras la infección de jóvenes o adultos.

El principal objetivo de este trabajo es contribuir a un mejor conocimiento de la patogenia de la paratuberculosis estudiando, en condiciones experimentales, la influencia que la edad de los animales y la dosis administrada van a tener sobre la infección por *Map*, la evolución lesional y la respuesta inmune inducida, tanto local como periférica.

Se ha realizado una infección experimental utilizando un total de 30 ovejas adultas de entre 2 y 11 años, así como 24 corderos de un mes de edad, todos ellos de raza Churra. Estos animales fueron divididos en tres grupos: 1- grupo control no infectado (7 ovejas y 8 corderos), 2- animales infectados con “dosis baja” ($1,1 \times 10^3$ UFC) de *Map* (10 ovejas y 8 corderos), 3- animales infectados con “dosis alta” ($1,1 \times 10^{10}$ UFC) de *Map* (13 ovejas y 8 corderos). Para llevar a cabo esta infección experimental, se empleó una cepa ovina de *Map* de campo, obtenida a partir de raspados de mucosa intestinal de tres ovejas afectadas clínicamente de paratuberculosis, y con lesiones de tipo multibacilar. El inóculo se administró por vía oral. Cada 15 días, durante los 210 días de duración del experimento, se valoró la respuesta inmune humoral mediante un test de ELISA indirecto, y se analizó la respuesta inmune periférica celular, tanto específica como inespecífica, mediante la prueba de liberación del Interferón gamma (IFN- γ). Además, en los 15-20 días previos a cada sacrificio, se

llevó a cabo la prueba de intradermorreacción (IDR) comparada, para completar el estudio de dicha respuesta inmune celular. También se cultivaron muestras de heces de los días 15 y 90 posinfección, así como del momento de sacrificio, de todos los animales del experimento. Un primer grupo de 16 animales infectados y 5 controles fueron sacrificados a los 100-120 dpi, y el resto a los 210-220 dpi. Se tomaron sistemáticamente diferentes muestras 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 función de las lesiones que presentaban y de la cantidad de bacilos ácido-alcohol resistentes (BAAR) detectados mediante Ziehl-Neelsen (ZN) y métodos inmunohistoquímicos. También se llevó a cabo el estudio bacteriológico para la detección de *Map* en dichas muestras mediante cultivo, PCR convencional y anidada. Finalmente, se valoró la respuesta inmune local mediante el análisis de la secreción *in vitro* del IFN- γ , así como cuantificando los niveles de expresión de varias citoquinas y otros parámetros inmunológicos mediante PCR a tiempo real (qPCR).

No se observaron lesiones macroscópicas asociadas a paratuberculosis en ningún animal. En cambio, todos los corderos y 12 de las 13 ovejas infectados con “dosis alta” de *Map* presentaron lesiones histológicas compatibles con paratuberculosis, que no se observaron en los animales con “dosis baja” ni en los controles, confirmando el papel que tiene la dosis infectante sobre el desarrollo de lesiones. Por otro lado, dentro de los ovinos infectados con “dosis alta”, las lesiones fueron diferentes entre corderos y ovejas. Estas últimas presentaron lesiones de tipo *focal*, caracterizadas por la formación de granulomas de pequeño tamaño, de morfología más esférica y bien delimitados del tejido adyacente, que se observaban casi exclusivamente en el tejido linfoide de las placas de Peyer, donde no se identificaron BAAR. En cambio, en los corderos, dichos granulomas fueron mucho más numerosos, más grandes y peor delimitados del tejido adyacente. Además presentaban una cantidad de BAAR entre escasa y abundante según el animal, y se localizaban tanto en el tejido linfoide como en la lámina propia, adyacente o no al mismo. En estos últimos casos, la lesión se clasificó como *multifocal*, de tipo *a* y *b*, respectivamente, la cual se encontró en 6 corderos. Según estos resultados, los ovinos adultos podrían infectarse con dosis elevadas de *Map*, pero serían más resistentes a la progresión de la infección, a diferencia de los corderos. Por otro lado, este estudio confirmó la importancia del tejido linfoide intestinal en el establecimiento

de las lesiones granulomatosas iniciales de la paratuberculosis, ya que éstas siempre se observaron en dicha localización, principalmente en la placa de Peyer ileocecal y yeyunal, observándose linfadenitis granulomatosa únicamente en aquellos corderos con lesiones multifocales intestinales más avanzadas.

En cuanto a la respuesta humoral periférica, los niveles de anticuerpos frente a *Map* permanecieron en niveles bajos durante todo el transcurso del experimento, pero fueron más elevados en las ovejas adultas que en los corderos, especialmente en los infectados con “dosis alta”. Esto podría ser debido a un posible contacto previo de estos animales con *Map* u otras micobacterias. Además, se observó un incremento en dicha respuesta en todos los grupos experimentales a los 110 y 210 dpi, probablemente debido a la sensibilización previa llevada a cabo los 15-20 días previos en la prueba de la IDR. Por otro lado, sólo los animales infectados con “dosis alta” de *Map*, tanto corderos como ovejas, mostraron un incremento significativo de la producción específica de IFN- γ que, sin embargo, fue más intensa y apareció de forma más precoz en las ovejas adultas que en los corderos. Un hecho similar se observó en la respuesta a la IDR, con una mayor reacción a los 90 dpi en las ovejas infectadas con “dosis alta” frente a los corderos del mismo grupo. Según estos hallazgos, se plantea la hipótesis de que el sistema inmune de los animales adultos, bien por su mayor grado de maduración o por haber tenido contactos previos con micobacterias, sería capaz de inducir una respuesta precoz e intensa frente a la infección por *Map*, capaz de controlar la progresión de las lesiones y de la infección de forma más rápida y eficaz que en los animales jóvenes, explicando de esta forma la mayor resistencia a la infección de las ovejas adultas.

También se valoró la producción basal de IFN- γ_0 como un marcador de la respuesta inmune innata inespecífica, que también mostró un patrón diferente de respuesta entre animales adultos y jóvenes. Mientras en los corderos permaneció siempre en niveles bajos, en las ovejas adultas infectadas con “dosis alta” fue más elevada entre los días 60 y 110 posinfección, pudiendo haber contribuido, junto con la respuesta específica, a la limitación de la diseminación de *Map* en los animales adultos.

En cuanto al estudio de la respuesta inmune local, la secreción *in vitro* de IFN- γ fue mayor principalmente en los nódulos linfáticos mesentéricos de las ovejas adultas infectadas con “dosis alta”. Tras cuantificar la expresión génica de dicha citoquina

mediante qPCR, se encontró una mayor cantidad en el íleon y placa de Peyer yeyunal de los corderos infectados con “dosis baja”, en los que no se apreciaron lesiones tras el estudio histopatológico. En ambos casos, estos resultados apoyarían el papel protector del IFN- γ frente a la infección por *Map*. Por otro lado, los genes analizados en el presente trabajo se expresaron de forma distinta según la localización en el intestino o nódulos linfáticos asociados, y en función de la forma lesional estudiada y de la cantidad de BAAR presentes. Se observó una mayor producción de citoquinas proinflamatorias (IL-6, IL-12 e IFN- γ) en tejidos de animales infectados sin lesión o con lesiones focales. El papel que juegan estos mediadores químicos de la respuesta inmune e inflamatoria, y las interacciones que tienen lugar entre ellos, son complejos, y precisan de estudios con mayor número de animales y diferentes tipos lesionales.

Por último, en cuanto a la determinación de la presencia de *Map* en las muestras de tejido fresco, sólo se aislaron colonias en los tejidos y heces de 4 corderos infectados con “dosis alta”, en el medio de Middlebrook 7H11, siendo negativos el resto de animales. Esto confirmaría la dificultad de crecimiento de las cepas ovinas de *Map* e indica que un resultado negativo en el cultivo bacteriológico no implica la ausencia de infección. En cambio, la PCR anidada a partir de tejido fresco mostró un mejor rendimiento, siendo capaz de identificar ADN de *Map* en un 84,61% de animales con lesiones focales e incluso en un 77,77% de aquellos en los que no se apreciaron lesiones. Por otro lado, tras comparar las pruebas de detección de *Map* a partir de tejido incluido en parafina, tanto la tinción ZN como la técnica inmunohistoquímica frente a antígenos de *Map* fueron más sensibles cuanto más avanzadas eran las lesiones. La PCR convencional y anidada fueron capaces de identificar ADN de *Map* en un buen número de secciones de tejido con lesiones focales, negativas a la presencia de BAAR mediante técnicas convencionales, e incluso en muestras donde no se encontraron lesiones granulomatosas. La PCR anidada fue la técnica más sensible entre las cuatro analizadas, por lo que podría considerarse una buena alternativa, aún teniendo en cuenta su laboriosidad, para la detección de *Map* en tejido fresco o incluido en parafina y para poder realizar un diagnóstico etiológico en muestras con lesiones granulomatosas donde no se observan BAAR.

VII.2. SUMMARY

Paratuberculosis is a chronic infectious disease caused by *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (*Map*), which affects both domestic and wild ruminants, and causes a granulomatous enteritis and lymphadenitis. It is traditionally assumed that animals get infected early in life, but the clinical signs do not appear until they are adult. However, there are some lesional evidences which could suggest that these adult individuals could also get infected. This possibility has been pointed out in bovine and red deer although adult animals would be more resistant to infection. The effect of age upon susceptibility to paratuberculosis has not been investigated in the ovine species. Besides, little is known concerning the different immunopathogenic mechanisms responsible of the establishment and progression of infection in young and adults.

The main objective of this thesis consists in contributing to a better knowledge of the pathogenesis of paratuberculosis, by studying in experimental conditions the influence of the age of the animals as well as the dose administered, upon *Map* infection, the lesional evolution and the immune response induced, both local and peripheral.

An experimental infection was carried out with a total of 30 adult sheep between 2- and 11-year-old, as well as 24 one-month-old lambs, all belonging to the Churra breed. These animals were divided into three groups: 1- control uninfected group (7 ewes and 8 lambs), 2- animals challenged with a “low dose” ($1,1 \times 10^3$ UFC) of *Map* (10 ewes and 8 lambs), 3- animals inoculated with a “high dose” ($1,1 \times 10^{10}$ UFC) of *Map* (13 animals ewes and 8 lambs). For this experimental infection, all animals were orally challenged with an ovine field strain of *Map*, obtained from intestinal mucosa scrapings of three clinically affected sheep, with lesions of the multibacillary form. Fortnightly, during the 210 days of the experiment, the peripheral humoral response was assessed by an indirect ELISA test, and the cell-mediated specific and non-specific immune responses were evaluated with the interferon- γ (IFN- γ) release test. Besides, a comparative intradermal skin test (IDT) was also performed 15-20 days prior to each slaughter, to complete the study of the cell-mediated immune response. *Map* faecal shedding was also assessed at 15 and 90 days post-infection (dpi) and at slaughter from each animal of the experiment.

A first group of 16 challenged and 5 control animals were slaughtered at 100-120 dpi, and the remaining at 210-220 dpi. Samples of intestine and related lymphoid tissue (Peyer's patches and lymph nodes) were systematically taken and routinely processed for the histological study. Animals were classified according to their lesions and the number of acid-fast bacteria (AFB) detected by Ziehl-Neelsen (ZN) and immunohistochemical methods. Bacteriological studies were also conducted in order to detect *Map* in these samples by culture, nested and conventional PCR. Finally, the local immune response was assessed measuring the *in vitro* IFN- γ secretion, as well as quantifying the expression of different cytokines and other immunological parameters by real time PCR (qPCR).

No gross lesions consistent with paratuberculosis were observed in any of the animals. However, all the lambs and 12 out of 13 ewes from the high dose-challenged group showed granulomatous lesions, which were not observed in the low dose-infected animals nor in the controls, confirming the dose influence upon the development of the lesions. On the other hand, among the high dose-challenged animals, the lesions were different between lambs and ewes. The latter showed *focal* type lesions, characterized by the formation of small, round shaped and well demarcated granulomas, almost exclusively restricted to the intestinal lymphoid tissue of the Peyer's patches, where no AFB were detected. In the lambs, the granulomas were more numerous, larger in size and worst demarcated from the adjacent tissue. Besides, they were related to a few to high number of AFB, depending on the animal, and either involved the lymphoid tissue or spread into the lamina propria associated or not to the Peyer's patches. In the latter cases, the lesions were classified as *multifocal a* or *b*, respectively, which were found in 6 lambs. According to these results, adult ovine could be susceptible to initial infection with high doses of *Map*, but would be more resistant to the progression of this infection, unlike the lambs. Besides, this study confirmed the importance of the intestinal lymphoid tissue in the establishment of the initial granulomatous lesions in paratuberculosis, as these were always observed in this site, especially in the ileocaecal and jejunal Peyer's patches. Furthermore, a granulomatous lymphadenitis was only observed in those lambs with the multifocal, more advanced intestinal lesions.

Regarding the humoral immune response, the anti-*Map* antibody level remained low during the whole experiment, but was significantly higher in the adult sheep than in

lambs, especially in the high dose-challenged group. This could possibly be due to previous contacts of these animals with *Map* or other mycobacteria. Besides, there was an increase in the humoral response at 110 and 210 dpi in all the experimental groups, probably due to the previous sensitization performed 15-20 days earlier with the IDT. On the other hand, only the high dose-challenged animals, both ewes and lambs, showed a significant increase in the specific IFN- γ production which, however, was more intense and appeared earlier in the adult sheep than in the lambs. A similar finding was observed in the response to the IDT, with the highest reaction at 90 dpi in the high dose-infected ewes compared to the lambs from the same group. According to these results, we hypothesize that the immune system of adult sheep, either because of its higher degree of maturity, or for having had previous contacts with mycobacteria, would be able to control the progression of the lesions and the infection more quickly and efficiently than the young animals, which would then explain the highest resistance to paratuberculosis in the adult animals.

The basal IFN- γ_0 production was assessed as a marker of the non-specific innate immunity, which also showed different patterns between young and adult animals. Whereas the IFN- γ_0 secretion remained low in the lambs, it was significantly higher in the high dose-challenged ewes, especially between 60 and 110 dpi, which could have also contributed, together with the specific immune response, to the limitation of the spread of *Map* in the adult animals.

As for the local immune response study, the *in vitro* IFN- γ secretion appeared higher mainly in the caudal mesenteric lymph nodes from the high dose-challenged ewes. The quantification of this cytokine expression by qPCR showed higher levels of IFN- γ genes in the ileum and jejunal Peyer's patches of the low dose-infected lambs, in which no lesions were detected by histopathology. In both cases, these findings would support the protector role of IFN- γ against *Map* infection.

The gene expression analyzed in the present work was different depending on the intestinal sites or associated lymph nodes evaluated, as well as on the lesional form studied and the number of AFB present. A higher production of the proinflammatory cytokines (IL-6, IL-12 and IFN- γ) was detected in the tissues of the infected animals with focal or no lesions at all. The role of the different chemical mediators of the

immune and inflammatory responses, and the interactions among them, are very complex, and would require some more studies with a higher number of animals and different lesional forms.

Finally, regarding the detection of *Map* in the fresh tissue samples, colonies of this mycobacteria were isolated only from tissue and faeces of 4 high dose-challenged lambs, in the Middlebrook 7H11 medium, being negative all the rest of animals. This would confirm again the difficulties in culturing some ovine strains of *Map* and points out the fact that a negative result in the bacteriological culture does not exclude the possibility of the animals being infected. On the other hand, the nested PCR from fresh tissue showed better results in detecting *Map*, being able to identify *Map* DNA in a 84,61% of the animals with focal lesions, and even a 77,77% of those in which no lesions could be appreciated. Furthermore, among the *Map* detection tests in paraffin wax-embedded tissues, both the ZN and the immunohistochemical technique against *Map* antigens had a higher sensitivity in the more advanced lesions. The conventional and nested PCR were able to identify *Map* DNA in a high number of tissue sections with focal lesions, negative to the presence of AFB according to the conventional techniques, and even in some of the samples where no granulomatous lesions were observed. The nested PCR was the most sensitive technique within the four evaluated in this study, in such a way that it could be considered as a good alternative, taking into account its laboriousness, to detect the presence of *Map* in fresh and paraffin-embedded tissues and to carry out an etiologic diagnostic in samples with granulomatous lesions where no AFB are observed.

VII.3. RÉSUMÉ

La paratuberculose est une maladie infectieuse chronique causée par *Mycobacterium avium* sous-espèce *paratuberculosis* (*Map*), qui affecte les ruminants, tant domestiques que sauvages, provoquant chez eux une entérite et une lymphadénite granulomateuse. Les animaux s'infecteraient normalement lorsqu'ils sont jeunes, tandis qu'ils ne manifesteraient pas la maladie avant d'atteindre l'âge adulte. Cependant, le fait d'avoir observé certaines lésions chez les animaux adultes pourrait suggérer que l'infection de ces derniers est bel et bien possible. Cette éventualité a été indiquée parmi les bovins et les cervidés, bien que les animaux adultes soient moins sensibles à l'infection. Ce phénomène de résistance en fonction de l'âge n'a pas été étudié chez les ovins. De plus, les mécanismes immuns et pathogéniques mis en marche après l'infection par *Map* chez les jeunes et les adultes n'ont pas encore été élucidés.

L'objectif principal de cette thèse consiste à contribuer à une plus ample connaissance au sujet de la pathogénie de la paratuberculose en étudiant de façon expérimentale l'influence que l'âge des animaux et la dose d'inoculum administrée peuvent avoir sur l'infection par *Map*, l'évolution des lésions et la réponse immunitaire induite, tant locale que périphérique.

Pour cela nous avons réalisé une infection expérimentale avec un total de 30 moutons adultes âgés entre 2 et 11 ans, ainsi que 24 agneaux d'un mois, tous de la race autochtone « Churra ». Nous avons divisé ces animaux en trois groupes: 1- groupe contrôle non infecté (10 moutons et 8 agneaux), 2- animaux infectés avec une « faible dose » ($1,1 \times 10^3$ UFC) de *Map* (10 moutons et 8 agneaux), 3- animaux infectés avec une « dose élevée » ($1,1 \times 10^{10}$ UFC) de *Map* (13 moutons et 8 agneaux). Pour mener à bien cette infection expérimentale, une souche ovine *in vivo* de *Map* a été obtenue à partir de raclages de muqueuse intestinale de trois moutons atteints de paratuberculose clinique, possédant des lésions de type multibacillaire. L'inoculum fut administré ensuite par voie orale. Tous les quinze jours durant les 210 jours de l'expérience, nous avons évalué la réponse immunitaire à médiation humorale à l'aide d'un test ELISA indirect, et nous avons analysé la réponse immune à médiation cellulaire, spécifique et non spécifique, avec le test de production d'Interféron gamma (IFN- γ). De plus, 15 à 20 jours avant chaque sacrifice, des tests d'intradermotuberculinations comparées (IDT) ont été

pratiqués afin de compléter l'étude de la réponse immunitaire cellulaire. Des échantillons de fèces ont aussi été recueillis et cultivés lors des jours 15 et 90 post-infection (pi), ainsi qu'au moment du sacrifice, de chaque animal de cette expérience. Un premier groupe de 16 animaux infectés et 5 contrôles ont été sacrifiés entre les jours 100-120 pi, et le reste entre les jours 210 et 220 pi. Divers prélèvements d'intestins et de tissu lymphatique associé (plaque de Peyer et nodules lymphatiques) ont été effectués de façon systématique et traités de façon conventionnelle pour l'étude histopathologique. Tous les animaux ont été classifiés en fonction des lésions qu'ils ont présenté, ainsi que de la quantité de bacilles acides-alcool résistants (BAAR) détectés à l'aide de la coloration de Ziehl-Neelsen (ZN) et de méthodes immunohistochimiques. Un examen bactériologique a été également réalisé afin de détecter la présence de *Map* à partir de ces derniers prélèvements par culture, PCR conventionnelle et niché. Finalement, la réponse immunitaire locale a été évaluée grâce à l'analyse de la sécrétion *in vitro* d'IFN- γ , ainsi qu'en quantifiant la variation d'expression de diverses cytokines et autres paramètres immunologiques par PCR à temps réel (qPCR).

Aucun animal n'a présenté de lésions macroscopiques en rapport avec la paratuberculose. En revanche, tous les agneaux ainsi que 12 des 13 moutons du groupe infecté avec une « dose élevée » de *Map* ont présenté des lésions histologiques compatibles avec une infection par *Map*, tandis qu'aucune lésion n'a pu être observée chez les animaux contrôles ni chez ceux du groupe infecté avec une « faible dose » de *Map*, ce qui confirmerait l'effet de la dose infectante sur le développement des lésions. D'autre part, parmi les ovins infectés avec une « dose élevée » de *Map*, des différences ont été observées entre les lésions formées chez les agneaux et celles des moutons. En effet, ces derniers ont présenté des lésions de type *focal*, caractérisées par la formation de petits granulomes, de morphologie plus sphérique et bien délimités du tissu adjacent, disposés uniquement entre le tissu lymphoïde des plaques de Peyer, où aucuns BAAR n'ont été détectés. Par contre, chez les agneaux, ces granulomes furent beaucoup plus nombreux, plus étendus et moins bien délimités du tissu adjacent. De plus, ils s'accompagnèrent d'une quantité de faible à abondante de BAAR selon l'animal, et ont montré une tendance à se disséminer depuis le tissu lymphoïde jusqu'à la *lamina propria* adjacente ou non à ce tissu. Dans ces derniers cas, les lésions ont été classifiées comme *multifocales a* ou *b*, respectivement, et ont été observées parmi 6 agneaux. Selon ces résultats, les ovins adultes seraient ainsi sensibles à l'infection initiale à la

suite de l'ingestion de doses élevées de *Map*. Cependant, à la différence des agneaux, ils seraient beaucoup plus résistants à la progression de cette infection. D'autre part, cette étude a confirmé l'importance du tissu lymphoïde intestinal en ce qui concerne l'instauration initiale des lésions granulomateuses, puisque ces dernières ont été observées dans cette localisation, principalement au niveau des plaques de Peyer iléocæcales et jéjunales, tandis qu'il ne s'est développé de lymphadenite granulomateuse que chez les agneaux avec les lésions intestinales multifocales les plus sévères

Quant au développement de la réponse immunitaire humorale périphérique, la production d'anticorps anti-*Map* s'est maintenue faible durant tout le long de l'expérience, mais fut plus élevée parmi les moutons adultes que chez les agneaux, particulièrement chez ceux infectés avec une « dose élevée » de *Map*. Cela pourrait suggérer un certain contact préalable avec des antigènes de *Map* ou d'autres mycobactéries chez ces premiers animaux. Par ailleurs, le développement de cette réponse immunitaire a subi une augmentation significative au sein de tous les groupes expérimentaux lors des jours 110 et 210 pi, probablement due à la sensibilisation préalable provoquée 15 à 20 jours auparavant lors du test d'IDT. D'un autre côté, la production spécifique d'IFN- γ a augmenté de façon significative uniquement parmi les animaux infectés avec une « dose élevée » de *Map*, tant chez les moutons que chez les agneaux, mais de façon beaucoup plus précoce et intense dans le cas des ovins adultes en comparaison avec les jeunes. Un phénomène similaire a pu être observé en ce qui concerne la réponse au test d'IDT, après avoir obtenu les plus importantes réactions aux tuberculines au jour 90 pi chez les moutons infectés avec une « dose élevée » de *Map* face aux agneaux du même groupe. D'après ces résultats, nous proposons une hypothèse selon laquelle le système immunitaire des adultes, soit grâce à un meilleur niveau de maturation, soit par le fait d'avoir maintenu un certain contact préalable avec des mycobactéries, aurait une meilleure capacité d'induire une réponse immunitaire précoce et intense face à l'infection par *Map*. Il serait ainsi capable de contrôler la progression des lésions et de l'infection de façon bien plus rapide et efficace que chez les agneaux, ce qui expliquerait cette résistance supérieure observée chez les moutons adultes.

Nous avons aussi évalué la production basale d' IFN- γ_0 en tant que marqueur de la réponse immunitaire innée non spécifique, qui a aussi expérimenté un patron de réponse différent selon l'âge des animaux. Tandis que les agneaux ont montré une faible production non spécifique de cette cytokine, dans le cas des moutons infectés avec une « dose élevée » de *Map*, celle-ci fut beaucoup plus élevée entre les jours 60 et 110 pi, ce qui pourrait avoir contribué, avec la réponse adaptative, à la restriction de la dissémination de *Map* parmi les ovins adultes.

Quant à l'étude de la réponse immunitaire locale, la sécrétion *in vitro* d' IFN- γ fut supérieure principalement chez les nodules lymphatiques mésentériques des moutons infectés avec une « dose élevée » de *Map*. Après avoir quantifié la variation d'expression de cette même cytokine par qPCR, nous avons trouvé une plus grande expression au niveau de l'iléon et de la plaque de Peyer jéjunale des agneaux infectés avec une « faible dose » de *Map*, chez qui aucune lésion ne fut détectée lors de l'examen histopathologique. Dans les deux derniers cas, ces résultats soutiendraient le rôle protecteur de l'IFN- γ face à l'infection par *Map*. D'un autre côté, la variation d'expression des gènes analysés dans cette étude fut différente selon la localisation dans l'intestin ou les nodules lymphatiques associés, et en fonction de la forme lésionnelle étudiée ainsi que de la quantité de BAAR présents. Nous avons obtenu une plus grande expression des cytokines pro-inflammatoires (IL-6, IL-12 et IFN- γ) parmi les tissus des animaux infectés avec des lésions focales, ainsi que chez ceux où aucune lésion n'a été détectée d'après l'étude histopathologique. Le rôle et les interactions entre les différents médiateurs chimiques de la réponse immunitaire et inflammatoire sont extrêmement complexes, et d'autres études avec un plus grand nombre d'animaux et de différents types de lésions seraient nécessaires.

Finalement, en ce qui concerne la détermination de la présence de *Map* à partir de tissus frais, des colonies de ce bacille n'ont pu être isolées par culture qu'à partir de tissus et fèces de 4 agneaux infectés avec une « dose élevée » de *Map*, dans le milieu de culture Middlebrook 7H11, tandis que le reste des animaux de cette infection expérimentale ont été négatifs à cette technique. Cela confirmerait la grande difficulté de croissance de certaines souches ovines de *Map*, et indique qu'un résultat négatif au culture bactériologique n'implique pas forcément l'absence d'infection. En revanche, la PCR niché à partir de tissus frais a permis d'obtenir de meilleurs résultats, notamment

en identifiant de l'ADN de *Map* parmi 84,61% des ovins avec des lésions focales, ainsi que chez 77,77% des animaux infectés chez qui aucune lésion n'a été détectée. D'autre part, après avoir comparé les méthodes de diagnostic employées dans cette étude à partir de tissus inclus en paraffine, nous avons remarqué que le ZN tout comme la technique d'immunohistochimie face aux antigènes de *Map*, ont montré une sensibilité supérieure lorsque les lésions étaient plus sévères. De plus, la PCR conventionnelle et la niché ont permis d'identifier de l'ADN de *Map* dans un nombre élevé de sections de tissu avec des lésions focales, négatives à la présence de BAAR d'après les techniques conventionnelles, ainsi que dans certains échantillons où aucune lésion granulomateuse n'a pu être détectée. La PCR niché fut la plus sensible parmi les quatre techniques utilisées ; on pourrait donc la considérer comme une bonne alternative, bien que laborieuse, pour la détection de *Map* à partir de tissus frais ou inclus en paraffine, et pour réaliser un diagnostic étiologique à partir d'échantillons avec des lésions granulomateuses montrant peu, voire aucun BAAR.



VIII. Bibliografía *References*

- 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.
- 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.
- ADEREM, A.; UNDERHILL, D.M. (1999). Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu. Rev. Immunol.*, 17: 593-623.
- ADURIZ, J.J. (1993). Epidemiología, 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.; 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.; CORTABARRIA, N. (1995). Lack of mycobactin dependence of mycobacteria isolated on Middlebrook 7H11 from clinical cases of ovine paratuberculosis. *Vet. Microbiol.*, 45: 211-217.
- ADURIZ, G.; JUSTE, R.A.; GARRIDO, J.M.; GEIJO, M.V. (2000). Epidemiología y control de la paratuberculosis bovina. En: Juste Editor. Paratuberculosis. *BOVIS*, Aula Veterinaria, vol. n° 93, pp. 63-93.
- 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.
- 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.
- 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 *paratuberculosis* in fallow deer and wild boar in Spain. *Vet. Rec.*, 156: 212-213.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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). Türkiye genelinde sgr paratuberkulozu prevalansnn ELISA ile araştrılması. *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.
- BADIOLA, J.J.; GARCÍA DE JALÓN, J.A.; CUERVO, L. (1979).** Paratuberculosis ovina. *An. Fac. Vet. Zaragoza*, XIV-XV: 299-308.
- BAKKER, D.; WILLEMSSEN, P.T.; VAN ZIJDERVELD, F.G. (2000).** Paratuberculosis recognized as a problem at last: a review. *Vet. Q.*, 22: 200-204.
- BALDWIN, C.L.; SATHIVASEELAN, T.; ROCCHI, M.; McKEEVER, D. (2000).** Rapid changes occur in the percentage of circulating bovine WC1(+) γ delta Th1 cells. *Res. Vet. Sci.*, 69: 175-180.
- 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.; 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.
- 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.
- BANAIEE, N.; KINCAID, E.Z.; BUCHWALD, U.; JACOBS, W.R. Jr; ERNST, J.D. (2006).** Potent inhibition of macrophage responses to IFN- γ by live virulent *Mycobacterium tuberculosis* is independent of mature mycobacterial lipoproteins but dependent on TLR2. *J. Immunol.*, 176: 3019-3027.
- 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.; 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.; 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.
- 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.
- 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 γ delta T cells and CD1 in *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 77: 311-319.
- BEARD, P.M.; DANIELS, M.J.; HENDERSON, D.; PIRIE, A.; RUDGE, K.; BUXTON, D.; RHIND, S., GREIG, A.; HUTCHINGS, M.R.; McKENDRICK, I., STEVENSON, K.; SHARP, J.M. (2001a).** Paratuberculosis infection of nonruminant wildlife in Scotland. *J. Clin. Microbiol.*, 39: 1517-1521.
- BEARD, P.M.; RHIND, S.M., BUXTON, D.; DANIELS, M.J.; HENDERSON, 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.; 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.; JONES, D.G. (1997).** Early immune events following experimental infection of lambs with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Biochem. Soc. Trans.*, 25: 279S.
- 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.
- 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.; 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.; 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.; DE SILVA, K.; DI FIORE, L.; TAYLOR, D.L.; BOWER, K.; ZHONG, L.; KAWAJI, S.; EMERY, D.; WHITTINGTON, R.J. (2009). Experimental infection model for Johne's disease using a lyophilised, pure culture, seedstock of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Vet. Microbiol.*, 141: 301-311.
- BEISSERT, S.; SCHWARZ, A.; SCHWARZ, T. (2006). Regulatory T cells. *J. Invest. Dermatol.*, 126: 15-24.
- 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.
- 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.
- 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.; BOSMA, J. (1985). Paratuberculosis: a surgical methods of diagnosis in practice. *Vet. Quart.*, 7, 217-221.
- 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.
- BENEDICTUS, G.; DIJKHUIZEN, A.A.; STELWAGEN, J. (1985). Economic losses to farms due to paratuberculosis in cattle. *Tijdschr. Diergeneesk.*, 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.; 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.
- 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.
- 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.
- BEZOS, J.; DE JUAN, L.; ROMERO, B.; ALVAREZ, J.; MAZZUCHELLI, 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.
- 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 avium* subsp. *paratuberculosis* infection. *BMC Genet.*, 10: 21.
- BILLMAN-JACOB, 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.
- BLOOD, D.C.; RADOSTITS, O.M.; GAY, C.C. (1989). Paratuberculosis (Johne's disease). En: *Veterinary Medicine*. 7th ed. Ballière and Tiddall. 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.; BERKVEN, D., GODFROID, J. (2000).** Prevalence of paratuberculosis (Johne's disease) in the Belgian cattle population. *Vet. Microbiol.*, 77: 269-281.
- 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.
- 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.
- 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, 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.
- 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.; 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.
- 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.; HALL, C.; McENTEE, K.; DUNCAN, J.R. (1978).** Pathological evaluation of paratuberculosis in naturally infected cattle. *Vet. Pathol.*, 15: 196-207.
- 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.
- 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.; 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.; 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.
- 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.
- 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.; WITWER, C.T. (2009). The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin. Chem.*, 55: 611-622.
- 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.
- 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. (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.
- 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.; 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.; 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.; THAYER, 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.

References

- CHIODINI, R.J.; VAN KRUIINGEN, H.J.; THAYER, W.R.; COUTU, J.A. (1986). Spheroplastic phase of mycobacteria isolated from patients with Crohn's disease. *J. Clin. Microbiol.*, 24 : 357-363.
- 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. (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.
- COCITO, C.; GILOT, P.; COENE, M.; DE KESEL, M.; POUPART, P.; VANNUFFEL, P. (1994). Paratuberculosis. *Clin. Microbiol. Rev.*, 7: 328-345.
- COETSIER, C.; HAVAUX, X.; MATTELARD, F.; SADATTE, S.; CORMONT, F.; BUERGELT, K.; LIMBOURG, B.; LATINNE, D.; BAZIN, H.; DENEFF, 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.; DENEFF, J.F.; COCITO, C.; GALA, J.L. (2000). Duplex PCR for differential identification of *Mycobacterium bovis*, *M. avium*, and *M. avium* subsp. *paratuberculosis* in formalin- fixed paraffin-embedded tissues from cattle. *J. Clin. Microbiol.*, 38: 3048-3054.
- 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, 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. (1990). 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.; DE ZOETE, M.; CAVAINAC, 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, 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.; 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.; 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.; 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.; 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, 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.
- CONDON, 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.; 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.
- 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.
- CORPA, J.M. (1999). Aspectos inmunopatológicos de la paratuberculosis de los pequeños ruminantes. 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.; 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.
- 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.
- 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 IS900 insertion sequences in bulk-tank milk samples obtained from different regions throughout Switzerland. *BMC Microbiol.*, 2: 15.
- COUSINS, D.; WHITTINGTON, R.; MASTERS, A.; MARSH, I.; EVANS, R.J.; KLUVER, P. (1999a). Investigation of false-positives in the IS900 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.; 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 IS900-like sequences detectable by IS900 polymerase chain reaction: implications for the diagnosis. *Mol. Cell. Probes.*, 13: 431-442.
- COUSINS, D.; WILLIAMS, S.N.; HOPE, A., EAMENS, G.J. (2000). DNA fingerprinting of Australian isolates of *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* using IS900 RFLP. *Aust. Vet. J.*, 78: 184-190.
- 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.
- CRANWELL, M.P. (1993). Control of Johne's disease in a flock of sheep by vaccination. *Vet. Rec.*, 133: 219-220.
- CROHN, B.B.; GINZBURG, I.; OPPENHEIMER, G.D. (1932). Regional ileitis: a pathologic and clinical entity. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 99: 1323-1328.
- 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.
- 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.; 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.
- 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 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.; 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 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 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.
- 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.
- 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.; 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). IS900 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.
- 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). Blutserologische Untersuchungen zur Verbreitung von *Mycobacterium avium* spp. *paratuberculosis* in sächsischen Rinderbeständen. *Tieraerzliche Umschau.*, 60: 497-501.
- DOYLE, T.M. (1945). Vaccination against Johne's disease. *Vet. Rec.*, 57: 385-387.
- DOYLE, T.M. (1953). Susceptibility to Johne's disease in relation to age. *Vet. Rec.*, 65: 363-365.
- DOYLE, T.M. (1956). Johne's disease. *Vet. Rec.*, 68: 869-878.
- DOYLE, T.M. (1964). Vaccination against Johne's disease. *Vet. Rec.*, 76: 73-77.
- DOYLE, T.M.; SPEARS, H.N. (1951). A Johne's disease survey. *Vet. Rec.*, 20: 355-363.

- 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.
- EAMENS, G.; SPENCE, S.; TURNER, M. (2001). Survival of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in amitraz cattle dip fluid. *Aust. Vet. J.*, 79: 703-706.
- 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.
- 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.
- 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, 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. (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.
- 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.; 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 IS900 gene. *Vet. Microbiol.*, 81: 257-271.
- ENGLUNG, S.; BÖLSKE, G.; JOHANSSON, K.E. (2002). An IS900-like sequence found in a *Mycobacterium* sp. other than *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 209: 267-271.
- ERNST, J.D. (1998). Macrophage receptors for *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Immun.*, 66: 1277-1281.
- ERUME, J.; SPERGSE, 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)
- 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.
- 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.
- 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.

- 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.
- FISCHER, O. A.; MÁTLOVÁ, L.; DVORSKÁ, L.; SVÁSTOVÁ, P.; PAVLÍK, I. (2003). 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). Beetles as possible vectors of infections caused by *Mycobacterium avium* species. *Vet. Microbiol.*, 102: 247-255.
- 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.
- FRANCIS, J. (1943). Infection of laboratory animals with *Mycobacterium johnei*. *J. Comp. Pathol.*, 53: 140-150.
- 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.
- 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.
- 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.; PERIS, B.; JUSTE, R.A.; BADIOLA, J.J. (1988). Study of a trial of vaccinated and non-vaccinated lambs experimentally infected with *M. paratuberculosis* I. Pathology. En: Thorel, M.F.; Merkal, R.S. (Eds.). *Proc 2nd Int. Coll. PTBC*. IAP. Paris. Francia. pp 136.
- 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.; 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.; 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 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.

- 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.M.; CORPA, M.; GUTIÉRREZ, M.; PEREZ, V. (1999). 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 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-PARIENTE, C.; GONZÁLEZ, J.; FERRERAS, M.C.; FUERTES, M.; BENAVIDES, J.; REYES, L.E.; MORENO, O.; GARCIA-MARÍN, J.F.; PÉREZ, V. (2003). 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. Madison, EEUU 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. (2006). 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, 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.; CORTABARRÍA, N.; ADÚRIZ, G.; JUSTE, R.A. (1998). 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.; 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.; 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.
- 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.
- GILLAN, S.; O'BRIEN, R.; HUGHES, A.D.; GRIFFIN, J.F. (2010). 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.; 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.; 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. (1965a). Studies of immunity to *Mycobacterium johnei* in sheep. *J. Comp. Pathol.*, 75: 165-173.
- GILMOUR, N.J.; NISBET, D.I.; BROTHERSTON, J.G. (1965b). Experimental oral infection of calves with *Mycobacterium johnei*. *J. Comp. Pathol.*, 75: 281-286.
- GODFROID, J.; BOELAERT, F.; HEIER, A.; CLAVAREAU, C.; WELLEMAN, 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.
- 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.; 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.
- 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.; 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.; 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.
- 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 IS900, an insertion element identified in a human Crohn's disease isolate of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Nucleic Acid. Res.*, 17: 9063-9073.
- 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.; 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.; 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.
- 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.
- 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.; PÉREZ, V.; PIRIE, A.A.; GRANT, J.M. SHARP, J.M. (1997). Paratuberculosis in wild rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). *Vet. Rec.*, 140: 141-143.
- GREIG, A.; STEVENSON, K.; HENDERSON, D.; 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.
- GRIEBEL, P.J.; HEIN, W.R. (1996). Expanding the role of Peyer's patches in B-cell ontogeny. *Immunol. Today*, 17: 30-39.
- 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.
- 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.
- 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.
- GUNNARSSON, E.; FODSTAD, F.H. (1979). Cultural and biochemical characteristics of *Mycobacterium paratuberculosis* isolated from goats in Norway. *Acta. Vet. Scand.*, 20 (1): 122-134.
- 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.; 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.

- GWÓZDZ, 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.
- GWÓZDZ, 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 *paratuberculosis*. *Aust. Vet. J.*, 78: 560-566.
- GWÓZDZ, 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.
- GWÓZDZ, 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.
- GWÓZDZ, 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.
- HAGAN, W.A. (1938).** Age as a factor in susceptibility to Johne's disease. *Cornell Vet.*, 28: 34-40.
- 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.
- 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.
- 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: 913-921.
- 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.
- 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.
- 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.; MACKAY, C.R. (1991).** Prominence of gamma delta T cells in the ruminant immune system. *Immunol. Today*, 12: 30-34.
- 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.
- 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, S.H.; DUFFIELD, T.E.; KELTON, D.E.; LESLIE, K.E.; LISSEMORE, K.D.; ARCHAMBAULT, M. (2005).** 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.
- 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.
- 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.; 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. (2007).** Experimental challenge models for Johne's disease: a review and proposed international guidelines. *Vet Microbiol.*, 122: 197-222.
- 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.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.
- 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.; 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.
- HOSTETTER, J.; STEADHAM, E.; HAYNES, J.; BAILEY, T.; CHEVILLE, N. (2003).** Phagosomal maturation and intracellular survival of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in J774 cells. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, 26: 269-283.
- 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.
- HUCHZERMEYER, H.F.; BASTIANELLO, S.S. (1992).** Serological, microscopic, 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.
- 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.; JUNGENSEN, 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- HUTYRA, F.; MAREK, J. (1930).** Enteritis paratuberculosa de los bóvidos. En: *Patología y terapéutica especiales de los animales domésticos*. Ed. Revista veterinaria de España, 1^o ed., pp. 613-620. Barcelona. España.
- 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.
- 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.
- ITO, S.; ANSARI, P.; SAKATSUME, M.; DICKENSHEETS, H.; VAZQUEZ, N.; DONNELLY, R.P.; LARNER, A.C.; FINBLOOM, D.S. (1999).** Interleukin-10 inhibits expression of both interferon alpha- and interferon gamma- induced genes by suppressing tyrosine phosphorylation of STAT1. *Blood*, 93: 1456-1463.

- IWASAKI, A.; MEDZHITOV, R. (2004). Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat. Immunol.*, 5: 987-995.
- 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.; 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.
- JOHNE, H.A.; FROTHINGHAM, L. (1895). Ein eigenthümlicher Fall von Tuberkulose beim Rind. *Dtsch. Ztschr. Tiermed. Path.*, 21: 438-454.
- 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, 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, 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. *Epidemiol. Infect.*, 134: 49-56.
- JORGENSEN, J.B. (1969). Paratuberculosis in pigs. Experimental infection by oral administration of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Acta. Vet. Scand.*, 10: 275-287.
- JORGENSEN, J.B. (1977). Survival of *Mycobacterium paratuberculosis* in slurry. *Nord. Vet. Med.*, 29: 267-270.
- JORGENSEN, J.B. (1983). The effect of vaccination on the excretion of *Mycobacterium paratuberculosis*. *En: Merkmal, R.S. (Ed.). Proc 1st Int. Coll. PTBC. IAP. Ames. EEUU.* pp 249-254. Ames. EEUU.
- JÖRGENSEN, 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.
- 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. (1984). Paratuberculosis: una revisión. *Med. Vet.*, 1: 197-216.
- 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.; 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.; 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.; 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.; 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.
- 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.; 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.; 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. (2000a).** El agente causal de la paratuberculosis y su situación taxonómica. En: Juste Editor. Paratuberculosis. *BOVIS*, Aula Veterinaria, vol. n° 93, pp. 13-28.
- 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.; GEIJO, M.; ELQUEZABAL, N.; ADURIZ, G.; ATZAERANDIO, R.; SEVILLA, I. (2005).** Comparison of blood polymerase chain reaction and enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in cattle and sheep. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 17: 354-359.
- JUSTE, R.A.; ELQUEZABAL, 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.; 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.; ELQUEZABAL, 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.
- 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.; 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.; HESSELINK, J.W.; RUSSCHEN, E.W.; BARKEMA, H.W.; COLLINS, M.T.; VISSER, I.J. (1999).** Factors influencing the isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from bovine fecal samples. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 11: 345-351.
- 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.; 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.; 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.
- 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.
- KAUFMANN, S.H. (1991).** Role of T-cell subsets in bacterial infections. *Curr. Opin. Immunol.*, 3: 465-470.

- 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.
- 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.; 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.
- KHADER, S.A.; COOPER, A.M. (2008).** IL-23 and IL-17 in tuberculosis. *Cytokine*, 41: 79-83.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- KIDD, P. (2003).** Th1/Th2 balance: the hypothesis, its limitations, and implications for health and disease. *Altern. Med. Rev.*, 8: 223-246.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.; 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.; 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.; 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.; 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.; 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.
- 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.
- 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. (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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.; KOPECKY, K.E. (1970). *Mycobacterium paratuberculosis* in reproductive organs and semen of bulls. *Am. J. Vet. Res.*, 31: 255-258.
- 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.; MOON, H.W. (1972). Experimental *Mycobacterium paratuberculosis* infection in chickens. *Am. J. Vet. Res.*, 33: 1231-1235.
- 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.; BAISDEN, L.A.; MERKAL, R.S. (1955). A comparison of regular intradermic Johnin and a purified protein derivative of intradermic Johnin on artificially and naturally sensitized ruminants. *Am. J. Vet. Res.*, 58: 35-37.
- 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.; 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.; 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.; 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.; 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., 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.; 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.; 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.; 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.

- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.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.; 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.; 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.
- MAEDA, H.; KUWAHARA, H.; ICHIMURA, Y.; OHTSUKI, M.; KURAKATA, S.; SHIRAIISHI, A. (1995). TGF-beta enhances macrophage ability to produce IL-10 in normal and tumor-bearing mice. *J. Immunol.*, 155: 4926-4932.
- 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.
- 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.
- MARSH, I.; WHITTINGTON, R.; COUSINS, D. (1998). PCR-restriction endonuclease analysis for identification and strain typing of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and *Mycobacterium avium* subsp. *avium* based on polymorphisms in IS1311. *Mol. Cell. Probes.*, 13: 115-126.
- 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.
- 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.
- McEWEN, A.D. (1939). Investigations on Johne's disease of sheep. *J. Comp. Pathol.*, 52, 69-87.
- McKENNA, S.L.; KEEFE, G.P.; TIWARI, A.; VANLEEUEWEN, 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.
- MEDZHITOV, R.; JANEWAY, C.A. Jr. (1997). Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Curr. Opin. Immunol.*, 9: 4-9.
- 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, 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.; CURRAN, B.J. (1974). Growth and metabolic characteristics of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Appl. Microbiol.*, 28: 276-279.
- 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.; WHIPPLE, D.L. (1982). Effectiveness of disinfectants on *Mycobacterium paratuberculosis*. *Proc. 86th Annu. Meet. USAHA*, pp: 514-518.
- MERKAL, R.S.; KOPECKY, K.E.; LARSEN, A.B.; THURSTON, J.R. (1964). Improvements in the techniques for primary cultivation of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Am. J. Vet. Res.*, 25: 1290-1294.
- 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.; BOOTH, G.D. (1975). Analysis of the effect of inapparent bovine paratuberculosis. *Am. J. Vet. Res.*, 36: 837-838.
- 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.
- MEYER, K.F. (1913). Johne's disease of cattle. *J. Med. Res.*, 29, 147.
- 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.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.; 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. (1989). A modified ELISA for the detection of goats infected with *Mycobacterium paratuberculosis*. *Aust. Vet. J.*, 66: 305-307.
- 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.
- MODLIN, R.L. (1994). Th1-Th2 paradigm: insights from leprosy. *J. Invest. Dermatol.*, 102: 828-832.
- 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.
- MOMOTANI, E.; WHIPPLE, D.L.; THIERMANN, A.B.; CHEVILLE, N.F. (1988). Role of M cells and macrophages in the entrance of *Mycobacterium paratuberculosis* into domes of ileal Peyer's patches in calves. *Vet. Pathol.*, 25: 131-137.

- MONAGHAN, M.L.; DOHERTY, M.L.; COLLINS, J.D.; KAZDA, J.F.; QUINN, P.J. (1994). The tuberculin test. *Vet. Microbiol.*, 40: 11-124.
- 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). Overvåkings- og kontrollprogrammer for landdyr, fisk og skjell i Norge med vekt på BSE-, salmonella- og paratuberkuloseprogrammene. *Norsk Veterinaertidsskrift*, 115: 707-717.
- 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.
- 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.
- 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.
- MUÑOZ, M.; GARCÍA MARÍN, J.F.; GARCÍA-PARIENTE, C.; REYES, L.E.; VERNA, A.; MORENO, O.; FUERTES, M.; DOCE, J.; PUENTES, E.; GARRIDO, J.; PÉREZ, V. (2006). Efficacy of a killed vaccine (SILIRIUM®) in calves challenged with *Map*. En: Manning, E.B.; Nielsen, S.S. (Eds.). *Proc 8th Int. Coll. PTBC*. IAP. Madison, EEUU. pp. 208-217.
- MUÑOZ, M.; DELGADO, L.; VERNA, A.; BENAVIDES, J.; GARCÍA-PARIENTE, C.; FUERTES, M.; FERRERAS, M.C.; GARCÍA-MARIN, J.F.; PÉREZ, V. (2008). Expression of transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta1) in different types of granulomatous lesions in bovine and ovine paratuberculosis. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, 32: 239-252.
- MUÑOZ, M.; DELGADO, L.; VERNA, A.; GARCIA-PARIENTE, C.; FERRERAS, M.C.; GARCIA-MARIN, J.F.; PEREZ, V. (2009). Immunohistochemical expression of iNOS in different types or paratuberculosis granulomatous lesions. *Proc. 10th Int. Coll. PTBC*. p137. Minneapolis, Minnesota. EEUU.
- 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.; VAN ZIJDERVELD, F.; EGER, A.; BAKKER, D. (2002). Evaluation of the long-term immune response in cattle after vaccination against paratuberculosis in two Dutch dairy herds. *Vet Microbiol.*, 86: 269-278.
- MUSKENS, J.; ELBERS, A.R.; 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.
- 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 pathophysiological changes in beige/scid mice. *Comp. Med.*, 51: 538-544.
- 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.
- 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 IS900 gene in *Mycobacterium avium* complex derived from HIV patients. *Moll. Cell Probes*, 13: 367-372.
- NASER, S.A.; HULTEN, K.; SHAFRAN, I.; GRAHAM, D.Y.; EL-ZAATARI, F.A. (2000). 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.; 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.
- 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.; THAMSBORG, S.M.; HOUE, H.; BITSCH, V. (2000). Bulk-tank milk ELISA antibodies for estimating the prevalence of paratuberculosis in Danish dairy herds. *Prev. Vet. Med.*, 44: 1-7.
- 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.
- OCEPEK, M.; POSEDI, J.; PISLAK, M. (1999). Prevalence of bovine paratuberculosis in Slovenia in 1997 and 1998. *Zbornik Veterinarske Fakultete Univerza Ljubljana*, 36: 111-119.
- OCEPEK, M.; KRT, B.; POGACNIK, M. (2002). Seroprevalence of paratuberculosis in Slovenia between 1999 and 2001. *Slov. Vet. Res.*, 39: 179-185.
- 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.; 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.; 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.; LANGE GEGGEN, 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.
- OLSEN, I.; SIGURDARDÓTTIR, G.; DJONNE, B. (2002). Paratuberculosis with special reference to cattle. A review. *Vet. Q.* 24: 12-28.
- OLSEN, I.; BOYSEN, P.; KULBERG, S.; HOPE, J.C.; JUNGENSEN, 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.; 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- PALIWAL, O.P.; RAJYA, B.S. (1982). Evaluation of paratuberculosis in goats: pathomorphological studies. *Indian J. Vet. Pathol.*, 6: 29-34.
- 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.
- PAVLÍK, I.; BEICKOVÁ, L.; PAVLAS, M.; ROZSYPALOVÁ, Z.; KOSKOVÁ, S. (1995). Characterization by restriction endonuclease analysis and DNA hybridization using IS900 of bovine, ovine, caprine and human dependent strains of *Mycobacterium paratuberculosis* isolated in various localities. *Vet. Microbiol.*, 45: 311-318.
- PAVLIK, I.; BARTL, A.; HORVATHOVA, L.; DVORSKA, L.; MATLOVA, O.; FISCHER, R.; DU MAINE, R.; ROZSYPALOVA, Z. (1999a). Study of differing *Mycobacterium avium* 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.
- PÁVLIK, 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 eradication and control programme. En: Manning, E.J.B.; Collins, M.T. (Eds.). *Proc 6th Int. Coll. PTBC. IAP. Madison, EEUU.* pp. 371-383.
- PAVLÍK, I.; BARTL, J.; DVORSKA, L.; SVASTOVA, P.; DU MAINE, R.; MACHACKOVA, M.; YAYO AYELE, W.; HORVATHOVA, A. (2000). Epidemiology of paratuberculosis in wild ruminants studied by restriction fragment length polymorphism in the Czech Republic during the period 1995-1998. *Vet. Microbiol.*, 77: 231-251.
- PAYNE, J.M., RANKIN, J.D. (1961a). A comparison of the pathogenesis of experimental Johne's disease in calves and cows. *Res. Vet. Sci.*, 2:175-179.
- PAYNE, J.M., RANKIN, J.D. (1961b). The pathogenesis of experimental Johne's disease in calves. *Res. Vet. Sci.*, 2:167-174.
- PELEMAN, R.; WU, J.; FARGEAS, C.; DELESPESE, G. (1989). Recombinant interleukin 4 suppresses the production of interferon gamma by human mononuclear cells. *J. Exp. Med.*, 170: 1751-1756.
- PÉREZ, V. (1992). Estudio de la paratuberculosis en la especie ovina. *Tesis doctoral. Universidad de Zaragoza.*
- 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 avidina-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.; 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.; GARCÍA MARÍN, J.F.; BRU, R.; MORENO, B.; BADIOLA, J.J. (1995). Resultados obtenidos en la vacunación de animales adultos frente a paratuberculosis. *Med. Vet.*, 12: 196-201.

- 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.; 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.
- 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.; 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- RAJA, A. (2004).** Immunology of tuberculosis. *Indian J. Med. Res.*, 120: 213-232.
- 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. (1958a).** The experimental infection of cattle with *Mycobacterium johnei*. I. Calves inoculated intravenously. *J. Comp. Pathol.*, 68: 331-337.
- RANKIN, J.D. (1958b).** The experimental production of Johne's disease in laboratory rabbits. *J. Pathol. Bacteriol.*, 75: 363-366.
- RANKIN, J. D. (1959).** Experimental infection. *Vet. Rec.*, 71: 1157-1167.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- REDDACLIFF, L.A.; WHITTINGTON, R.J. (2003).** Experimental infection of weaner sheep with S strain *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Vet. Microbiol.*, 96: 247-258.
- 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.; 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.
- 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.
- RICHARDS, W.D.; THOEN, C.O. (1977).** Effect of freezing on the viability of *Mycobacterium paratuberculosis* in bovine feces. *J. Clin. Microbiol.*, 6: 392-395.
- RIDGE, S.E.; HARKIN, J.T.; BADMAN, R.T.; MELLOR, A.M.; LARSEN, J.W. (1995).** Johne's disease in alpacas (*Lama pacos*) in Australia. *Aust. Vet. J.*, 72: 150-153.

- 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.; RUPPNER, 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.
- 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.*, En prensa.
- ROGERS, A.N.; VANBUREN, D.G.; HEDBLUM, 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 IS900 *in 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.
- 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.
- 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. (2010b). 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.
- 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. ; REYNAUD, F. ; LACOSTE, F. ; BRUN, A. (1992). Vaccination against paratuberculosis : new perspectives. En: Chiadini, R.J.; Kreeger, J.M. (Eds.). *Proc 3rd Int. Coll. PTBC*. IAP. Providence. EE.UU. pp. 469-474.
- SALGAME, P. (2005). Host innate and Th1 responses and the bacterial factors that control *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Curr. Opin. Immunol.*, 17: 374-380.
- 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.
- 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 IS900 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.
- SCANDURRA, G.M.; DE LISLE, G.W.; CAVAINAC, 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.
- 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. Microbiol.*, 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.
- SEAMAN, J.T.; GARDNER, I.A.; DENT, C.H. (1981). Johne's disease in sheep. *Aust. Vet. J.*, 57: 102-103.
- 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.; 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.; 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.; 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.
- 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.
- SHERMAN, D.M. (1985). Current concepts in Johne' s disease. *Med. Vet. Small Anim. Clin.*, 80: 77-84.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.; APPELYARD, G.D.; ELKIN, B. (2007). *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in Bison (*Bison bison*) from Northern Canada. *J. Wildl., Dis.*, 43: 775-779.
- 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.; 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.; 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.
- 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.
- SIMPSON, C.F. (1966).** Electron microscopy of arteriosclerosis in cows with Johne's disease. *Am. J. Vet. Res.*, 27: 1197-1204.
- 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. *paratuberculosis*-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 IS900 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.
- 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.
- 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, R.D. (1995).** Veterinary clinical epidemiology. 2nd Ed. CRC Press. Boca Ratón.
- SOCKETT, D.C.; CONRAD, T.A.; THOMAS, C.B.; COLLINS, M.T. (1992).** 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*. *Immunobiology*, 213: 585-598.
- 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 IS900 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.; 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.
- SPANGLER, E.; BECH-NIELSEN, S.; HEIDER, L.E. (1992).** Diagnostic performance of two serologic tests and fecal culture for subclinical paratuberculosis, and associations with production. *Prev. Vet. Med.*, 13: 185-195.
- 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 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.
- 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.
- 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. (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. (2006). Host responses to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: a complex arsenal. *Anim. Health Res. Rev.*, 7: 60-70.
- 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.; KHALIFEH, M.S. (2008). Differential expression of CD5 on B lymphocytes in cattle infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 126: 211-219.
- STABEL, J.R.; 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.; 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.; 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.; 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.; 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.; PALMER, M.V.; WHITLOCK, 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.; 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.; PALMER, M.V.; HARRIS, B.; PLATTNER, B.; HOSTETTER, J.; ROBBE-AUSTERMAN, S. (2009). Pathogenesis of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in neonatal calves after oral or intraperitoneal experimental infection. *Vet. Microbiol.* 136: 306-313.
- STACKEBRANDT, E.; RAINEY, F.A.; WARD-RAINEY, N.L. (1997). Proposal for a New Hierarchic Classification System, *Actinobacteria. Classis. Nov. Int. J. Syst. Bacteriol.*, 47: 479-491.
- STAMP, J.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.
- 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.
- STEHMAN, S.M. (1996). Paratuberculosis in small ruminants, deer, and South American camelids. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.*, 12: 441-455.
- 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.; SHARP, J.M. (1997). The contribution of molecular biology to *Mycobacterium avium* subspecies *Paratuberculosis* research. *Vet. J.*, 153: 269-286.

- 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.; HUGHES, V.M.; DE JUAN, L.; INGLIS, N.F.; WRIGHT, F.; SHARP, J.M. (2002). Molecular characterization of pigmented and nonpigmented isolates of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.*, 40: 1798-1804.
- STEVENSON, K.; ALVAREZ, J.; BAKKER, D.; BIET, F.; DE JUAN, L.; DENHAM, S.; DIMARELI, Z.; DOHMANN, K.; GERLACH, G.F.; HERON, I.; KOPECNA, M.; MAY, L.; PAVLIK, I.; SHARP, J.M.; THIBAUT, V.C.; WILLEMSEN, P.; ZADOCKS, R.N.; GREIG, A. (2009). Occurrence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* across host species and European countries with evidence for transmission between wildlife and domestic ruminants. *BMC Microbiol.*, 9: 212.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.; 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, R.W. (1996). Transmission of paratuberculosis. *Vet. Clin. North. Am. Food Anim. Pract.*, 12: 305-312.
- SWEENEY, R.W.; WHITLOCK, R.H.; HAMIR, A.N.; ROSENBERGER, A.E.; HERR, S.A. (1992). Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* after oral inoculation in uninfected cattle. *Am. J. Vet. Res.*, 53: 1312-1314.
- 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. EE.UU. pp 133-135.
- 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.; 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. (2006). 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.
- 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 (1): 518-526.
- 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.
- TANAKA, S.; SATO, M.; TANIUCHI, 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.
- TANAKA, S.; ITOHARA, S.; SATO, M.; TANIUCHI, 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.
- 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. (1953b). The experimental infection of cattle with varieties of *Mycobacterium johnei* isolated from sheep. *J. Comp. Pathol.*, 63: 368-373.
- TAYLOR, A.W. (1957). Varieties of *Mycobacterium johnei* isolated from sheep. *J. Path. Bact.*, 63: 333-336.
- 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, 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.
- 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.
- THOEN, C.O.; BAUM, K.H. (1988). Current knowledge on paratuberculosis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 192: 1609-1611.
- THOEN, C.O.; MUSCOPLAT, C.C. (1979). Recent developments in diagnosis of paratuberculosis (Johne's disease). *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 174: 838-840.
- THOMAS, G.A.; SWIFT, G.L.; GREEN, J.T.; NEWCOMBE, R.G.; BRANIFF-MATHEWS, C.; RHODES, J.; WILKINSON, S.; STROHMEYER, 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.
- 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.

- 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.; OLSAKER, I. (1994).** Distribution and hybridization patterns of the insertion element IS900 in clinical isolates of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Vet. Microbiol.* 40: 293-303.
- 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.
- 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.; VANLEEUEWEN, 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.; 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.; STORSET, A.K.; ALEKSANDERSEN, M.; BRUN-HANSEN, H.; PRESS, C.M. (2002).** Lesions in subclinical paratuberculosis of goats are associated with persistent gut-associated lymphoid tissue. *J. Comp. Pathol.*, 127: 194-202.
- 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.
- VALLÉE, H.; RINJARD, P. (1926).** Etude sur l'entérite paratuberculeuse des bovidés. *Revue Générale de Médecine Vétérinaire.*, 409 : 1-9.
- VAN DER GIESSEN, J.W.; HARING, R.M.; VAUCLARE, E.; EGER, A.; HAAGSMA, J.; VAN DER ZEIJST, B.A. (1992).** 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; Basse, E.O.E. (Eds.). *Proc 4th Int. Coll. PTBC*. IAP. Providence. EEUU.pp 61-66.
- 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 SCHAİK, 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.
- 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, 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.
- 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 paratuberculosis* *in 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.
- 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.
- VEAZEY, R.S.; HOROHOV, D.W.; KRAHENBUHL, J.L.; TAYLOR, H.W.; OLIVER, J.L. 3RD.; SNIDER, T.G. 3RD. (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, J.L. 3RD.; SNIDER, T.G. 3RD. (1995b). Histopathology of C57BL/6 mice inoculated orally with *Mycobacterium paratuberculosis*. *J. Comp. Pathol.*, 113: 75-80.
- VELILLA, P.A.; RUGELES, M.T.; CHOUGNET, C.A. (2006). Defective antigen-presenting 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.
- 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 Società Italiana di Buiatria*, 31: 277-281.
- 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.
- 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.
- 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.; STABEL, J.R.; SACCO, R.E.; HARP, J.A.; PESCH, B.A.; WANNEMUEHLER, M.J. (1999). Antigen-specific B-cell unresponsiveness induced by chronic *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection of cattle. *Infect. Immun.*, 67: 1593-1598.

- WATERS, W.R.; MILLER, J.M.; PALMER, M.V.; STABEL, J.R.; JONES 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.
- 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.
- 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.; DENG, M.; ABRAHAMSEN, M.S. (2004). 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.; 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.
- 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.
- WENTLIK, 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.; 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.
- 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.
- 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.; 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 diagnosis of tuberculosis in cattle. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 13: 117-122.
- 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.
- 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. EEUU. pp 1-11.
- WHITLOCK, R.H. (1999). Enfermedad de Johne (Paratuberculosis): Tests diagnósticos individuales y a nivel de rebaño. *ANEMBE Boletín Informativo*, 21: 24-26.

- 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.; 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. EE.UU. 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, 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.
- 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 IS900 PCR. *J. Clin. Microbiol.*, 36: 701-707.
- WHITTINGTON, R.J.; REDDACLIFF, L.; MARSH, I.; SAUNDERS, V. (1999). Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in formalin-fixed paraffin-embedded intestinal tissue by IS900 polymerase chain reaction. *Aust. Vet. J.*, 77: 392-397.
- WHITTINGTON, R.J.; FELL, S.; WALKER, D.; McALLISTER, S.; MARSH, I.; SERGEANT, E.; TARAGEL, C.A.; MARSHALL, D.J.; LINKS, I.J. (2000a). Use of pooled fecal culture for sensitive and economic detection of *mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in flocks of sheep. *J. Clin. Microbiol.*, 38: 2550-2556.
- WHITTINGTON, R.J.; HOPE, A.F.; MARSHALL, D.J.; TARAGEL, C.A.; MARSH, I. (2000b). Molecular epidemiology of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: IS900 restriction fragment length polymorphism and IS1311 polymorphism analyses of isolates from animals and a human in Australia. *J. Clin. Microbiol.*, 38: 3240-3248.
- WHITTINGTON, R.J.; 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.; 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.B.; WHITLOCK, R.H. (2001b). Typing of IS1311 polymorphisms confirms that bison (*Bison bison*) with paratuberculosis in Montana are infected with a strain of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* distinct from that occurring in cattle and other domesticated livestock. *Moll. Cell. Probes.*, 15: 139-145.
- 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.; 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.; REDDACLIFF, L.A. (2005). Survival of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in dam water and sediment. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71: 5304-5308.
- 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.; 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.
- 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. EE.UU. pp. 151-158.

References

- WINDSOR, P.; WHITTINGTON, R.J. (2010). Evidence for age susceptibility to cattle to Johne's disease. *Vet. J.* 184: 37-44.
- WINDSOR, P.; EPPELSTON, J.; WHITTINGTON, R.; JONES, S.; BRITTON, A. (2003). Efficacy of a killed *Mycobacterium avium* subsp. *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.
- WITHERS, F.W. (1959). II. Incidence of the disease. *Vet. Rec.*, 71: 1150-1153.
- 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.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.
- WU, C.W.; LIVESEY, M.; SCOLLER, 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.
- YAMAMURA, M.; UMEMURA, 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.; 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.; 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.
- 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.
- 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.



IX. Iconografía
Iconography

MATERIAL Y MÉTODOS



Figura IX.1. Imagen donde se muestra la realización de la prueba de intradermorreacción (IDR). Se está procediendo a la inyección intradérmica de 0,1 ml de PPD bovina en el pliegue anocaudal.



Figura IX.2. Aislamiento positivo de *Map*. Colonias de morfología compatible con una cepa ovina, cultivadas en medio Middlebrook 7H11.

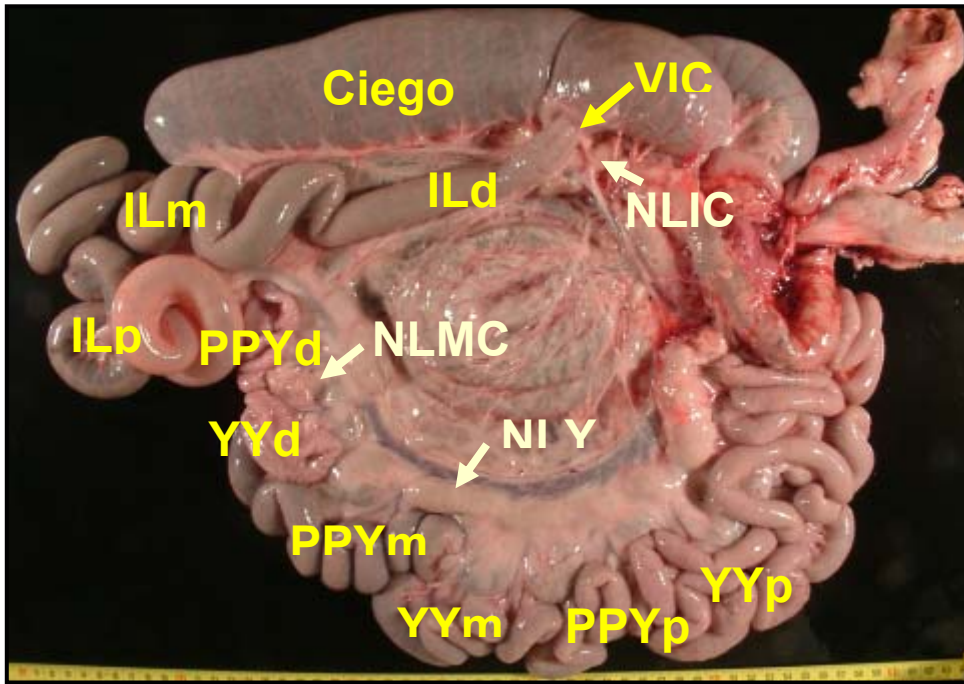


Figura IX.3. Localización de las muestras de intestino y nódulos linfáticos seleccionadas para los diferentes estudios. VIC: válvula ileocecal; ILd, ILM e ILp: Ileon distal, medio y proximal, respectivamente; YYd, YYm y YYp: Yeyuno distal, medio y proximal, respectivamente; PPYd, PPYm y PPYp: Placa de Peyer yeyunal distal, media y proximal, respectivamente; NLIC, NLMC y NLY: nódulos linfáticos ileocecales, mesentérico caudal, y yeyunal, respectivamente.

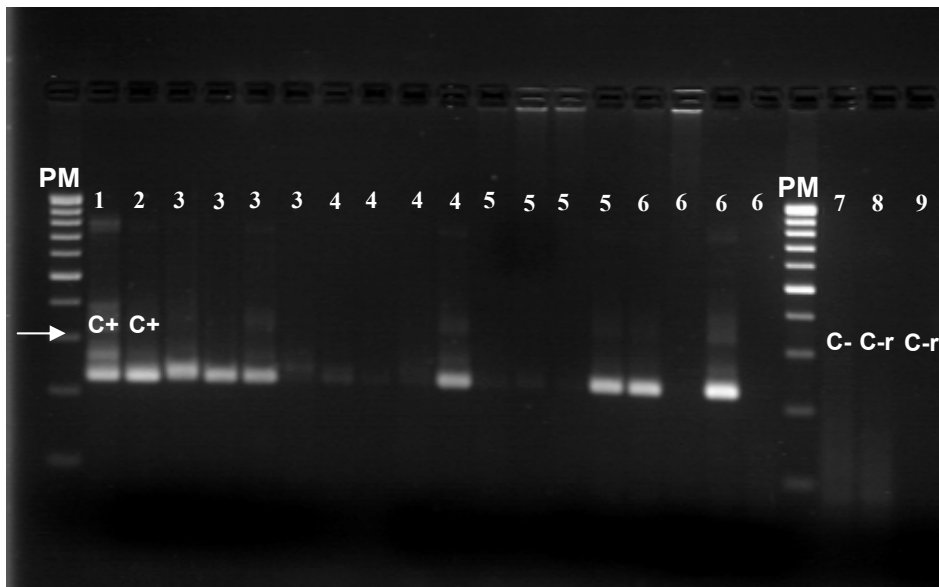


Figura IX.4. Revelado de PCR anidada en un gel de agarosa con muestras positivas a la secuencia de inserción IS900 de *Map*. PM: Peso Molecular; Carril 1: Control positivo de la extracción de ADN; Carril 2: Control positivo de la reacción de PCR. Las muestras aparecen desde el carril 3 hasta el 6 en el siguiente orden: válvula ileocecal, ileon, placa de Peyer yeyunal y nódulo linfático mesentérico, perteneciendo los números 3, 4, 5 y 6 a los corderos 40, 46, y ovejas 10 y 11, respectivamente. Carril 7: Control negativo de la extracción de ADN; Carril 8: Control negativo de reacción de la primera ronda de PCR; Carril 9: Control negativo de reacción de la segunda ronda de PCR; → Banda de 226 pb.

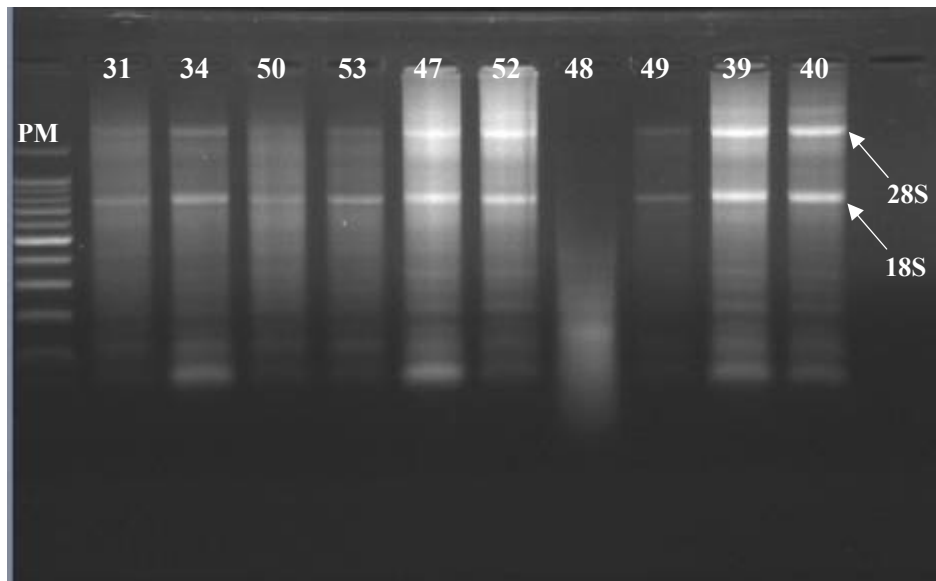


Figura IX.5. Examen visual de la calidad e integridad del ARN total extraído de muestras de NLMC de varios **corderos** en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. Las 2 bandas se corresponden con las dos subunidades ribosomales 28S y 18S; su clara visualización confirma la integridad del ARN total. El número a la altura de cada pocillo se corresponde con la identificación del cordero. Se puede observar la degradación del ARN del NLMC del cordero 48. **PM:** Peso Molecular.

RESULTADOS:



Figura IX.6. Incremento marcado de grosor del pliegue anocaudal (—>) del lado derecho del operador, evidenciable mediante palpación a las 72 horas posinoculación, relacionado con una respuesta más intensa a la PPD aviar que a la PPD bovina

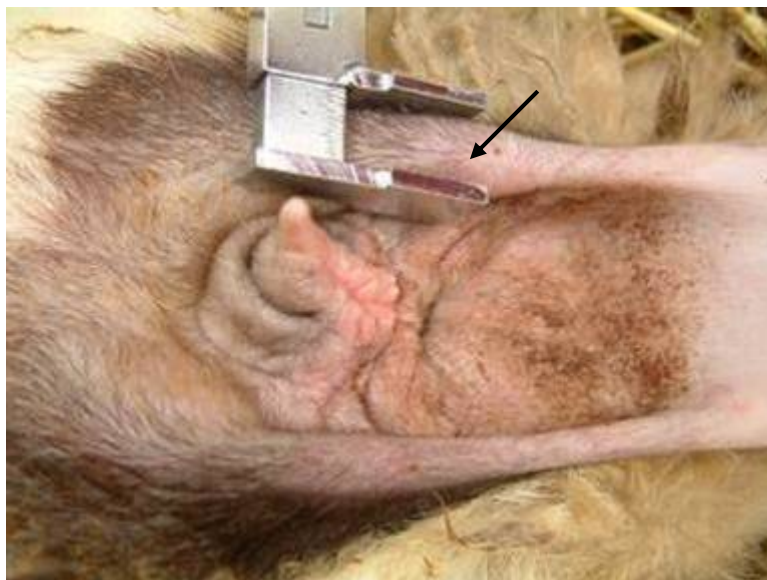


Figura IX.7. Incremento de grosor del pliegue anocaudal del lado derecho (—>) del operador medido con la ayuda de un cutímetro a las 72 horas posinoculación e indicando una respuesta más intensa a la PPD aviar que a la PPD bovina.

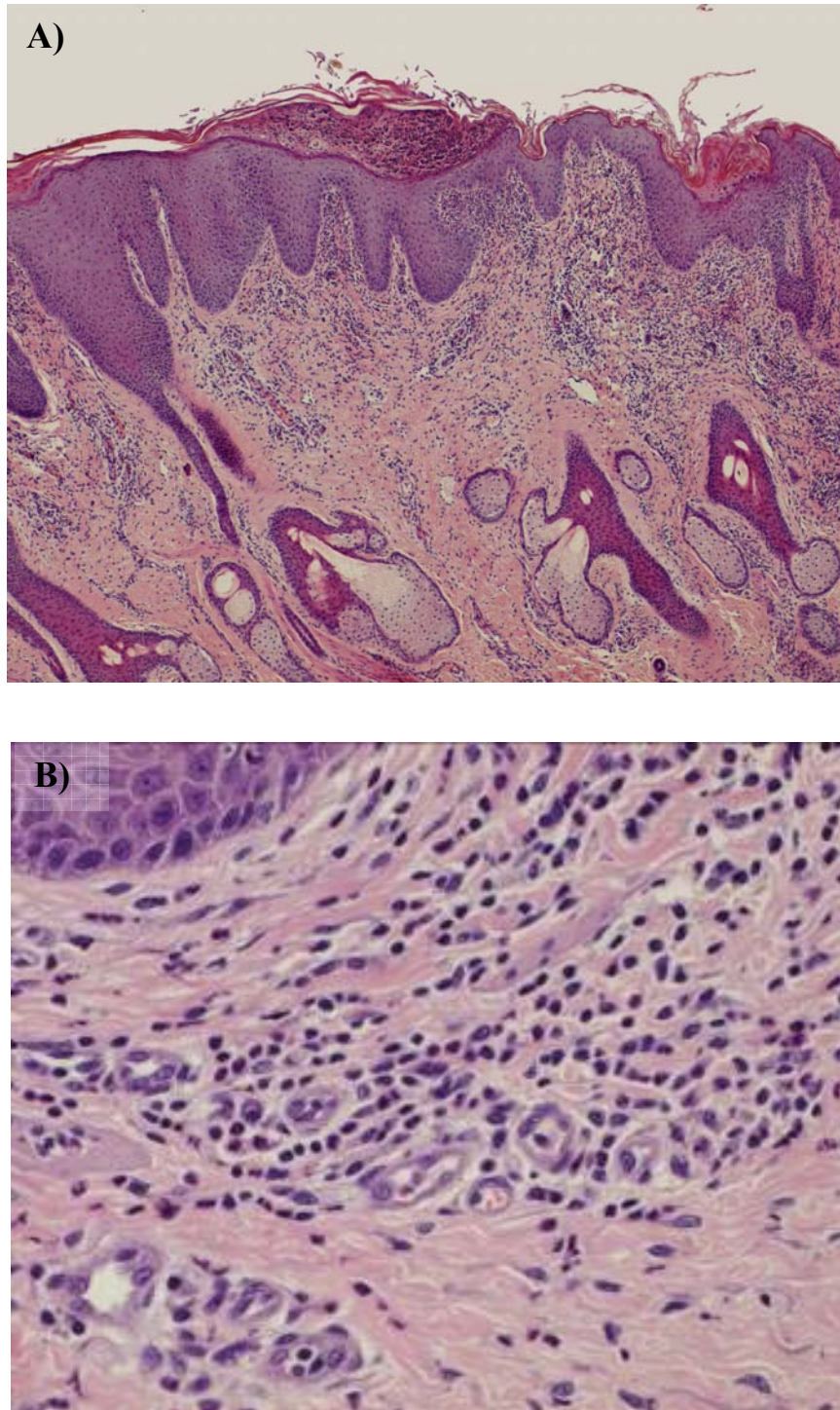


Figura IX.8. Secciones cutáneas de la zona de tuberculinización con la PPD aviar. Se observa una dermatitis superficial (A), formada por un infiltrado de células mononucleares, principalmente linfocitos, junto con células plasmáticas y escasos macrófagos, así como algunos neutrófilos, en localización perivascular. Además, se aprecia una costra adherida a la epidermis, compuesta por células necróticas. Cordero 50, piel del pliegue anocaudal. HE. 40X. En la imagen B, detalle de la anterior, se aprecia más claramente la distribución perivascular del infiltrado inflamatorio, principalmente linfoplasmocitario, junto con macrófagos y escasos neutrófilos. Cordero 50, piel del pliegue anocaudal. HE. 300X.



Figura IX.9. Placa de Peyer ileal continua de uno de los **corderos** tras el 2º sacrificio, a los 100-120 dpi (5 meses de edad). Se observa el abundante tejido linfoide haciendo prominencia, en forma de placa, sobre la mucosa intestinal.

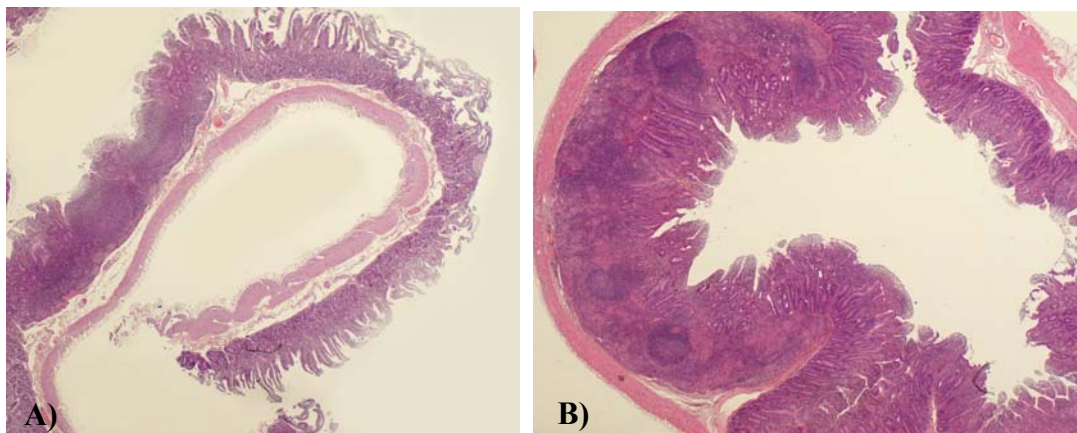


Figura IX.10. Placas de Peyer yeyunales de una **oveja adulta de 8 años de edad** (Oveja 25. 1er sacrificio (100-120 dpi). HE. 10X.) **(A)** y de un **cordero de 5 meses** (Cordero 51. 1er sacrificio (100-120 dpi). HE. 10X.) **(B)**. Se aprecia la mayor densidad del tejido linfoide en las placas correspondientes al cordero, en relación con el tejido linfoide organizado intestinal de la oveja adulta.

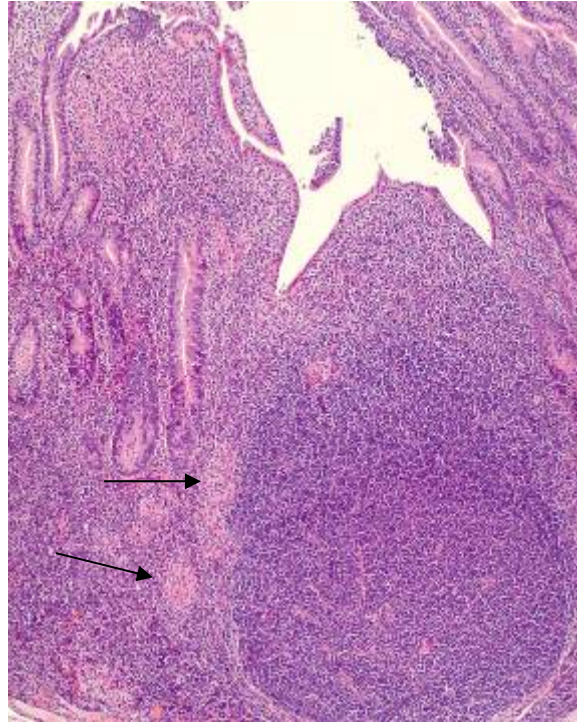


Figura IX.11. Lesión focal. Cordero infectado con “dosis alta” de *Map*. Granulomas de pequeño tamaño (→), con distribución focal, situados exclusivamente en el espacio interfollicular del tejido linfoide de la placa de Peyer yeyunal. Cordero 51. 1er sacrificio (100-120 dpi). HE. 50X

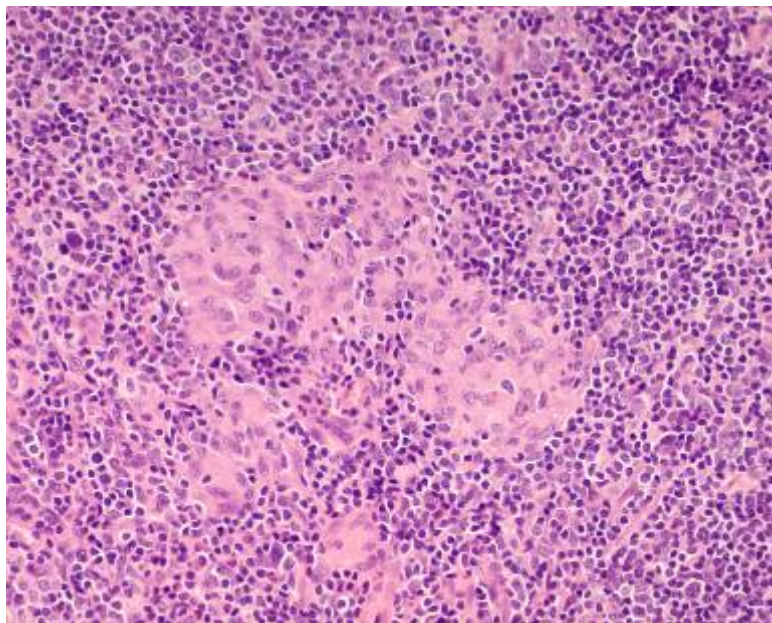


Figura IX.12. Lesión focal. Cordero infectado con “dosis alta” de *Map*. Detalle de la imagen anterior. Se observa un granuloma localizado en el espacio interfollicular, formado por macrófagos con abundante citoplasma eosinófilo, y escasos linfocitos. Cordero 51. 1er sacrificio (100-120 dpi). HE. 200X

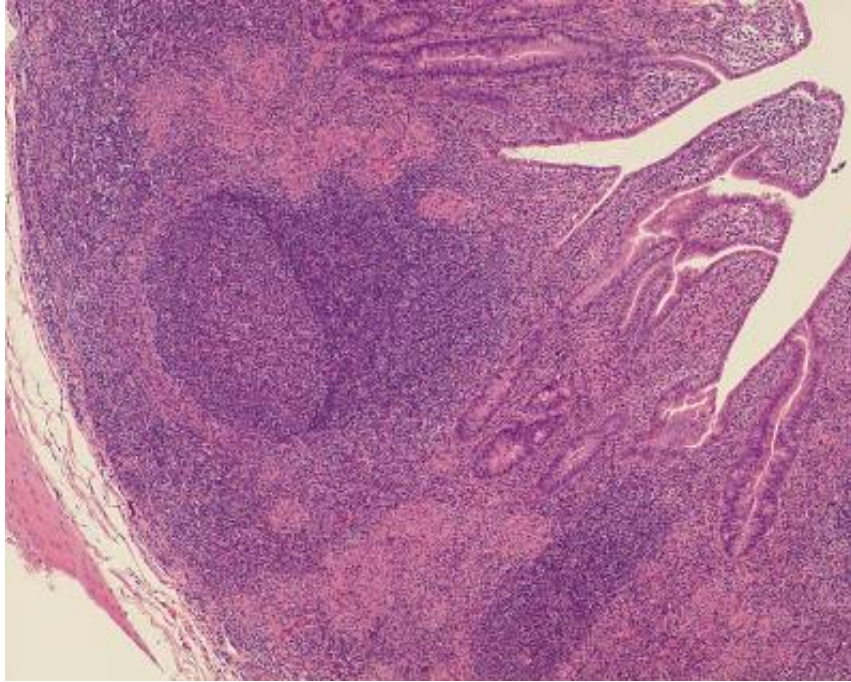


Figura IX.13. Lesión focal. Cordero infectado con “dosis alta” de *Map*. Presencia de varios granulomas, que confluyen en el tejido linfoide de la zona interfolicular de la placa de Peyer yeyunal, desde su zona basal hasta la apical, sin llegar a afectar a la lámina propia. Cordero 51. 1er sacrificio (100-120 dpi). HE. 40X.

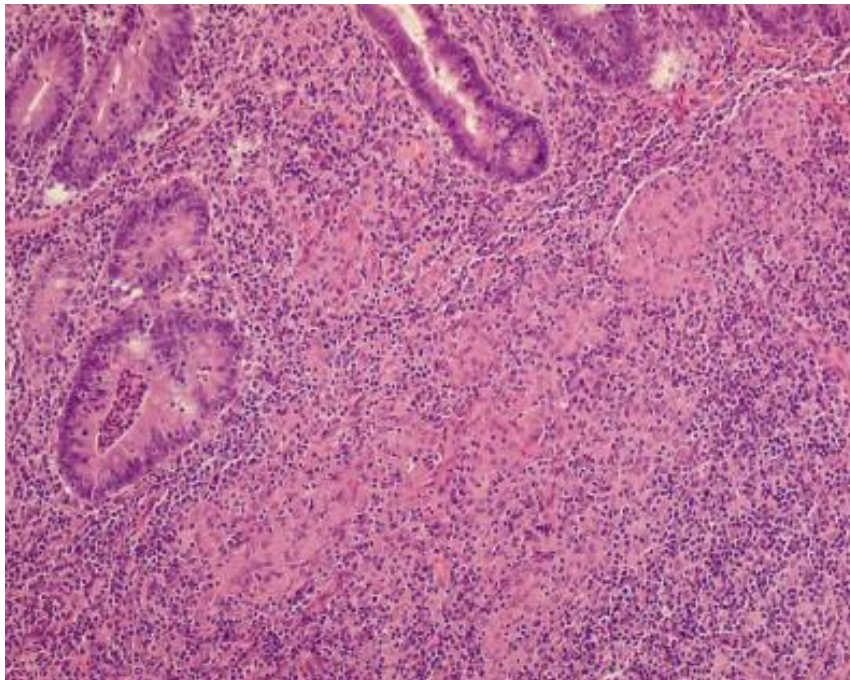


Figura IX.14. Lesión multifocal a. Cordero infectado con “dosis alta” de *Map*. Los granulomas, de mayor tamaño, confluyen y ocupan un espacio mayor de tejido, llegando a alcanzar el extremo de la lámina propia asociada. Cordero 51. 1er sacrificio (100-120 dpi). HE. 100X.

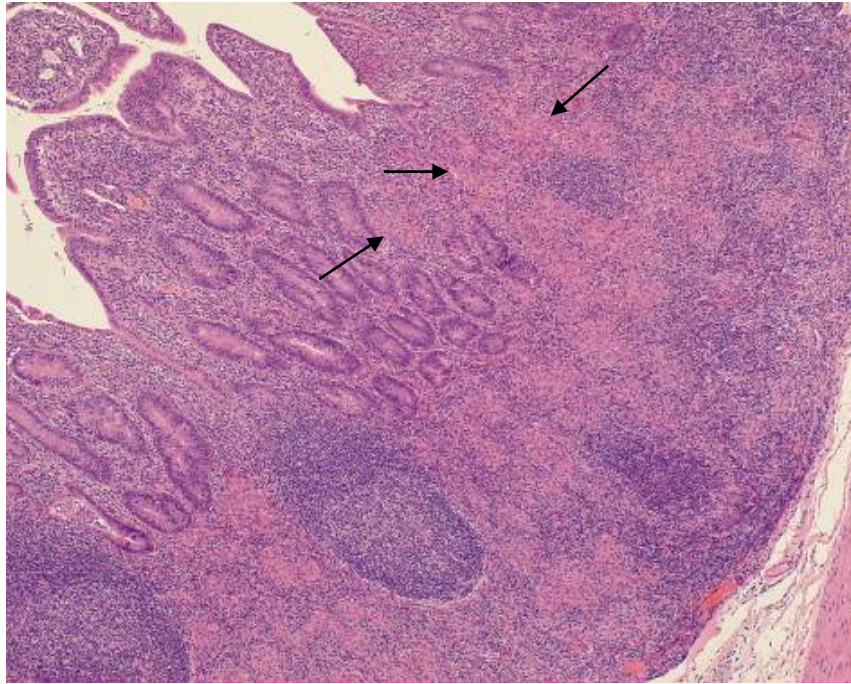


Figura IX.15. Lesión multifocal a. Cordero infectado con “dosis alta” de *Map*. Se observa una lesión granulomatosa grave en el tejido linfoide, con abundantes granulomas ocupando la mayor parte de las zonas interfolliculares, llegando a afectar a la lámina propia asociada al tejido linfoide (→) sin alterar notablemente la arquitectura de esta zona. Cordero 54, placa de Peyer yeyunal media. 1er sacrificio (100-120 dpi). HE. 60X.

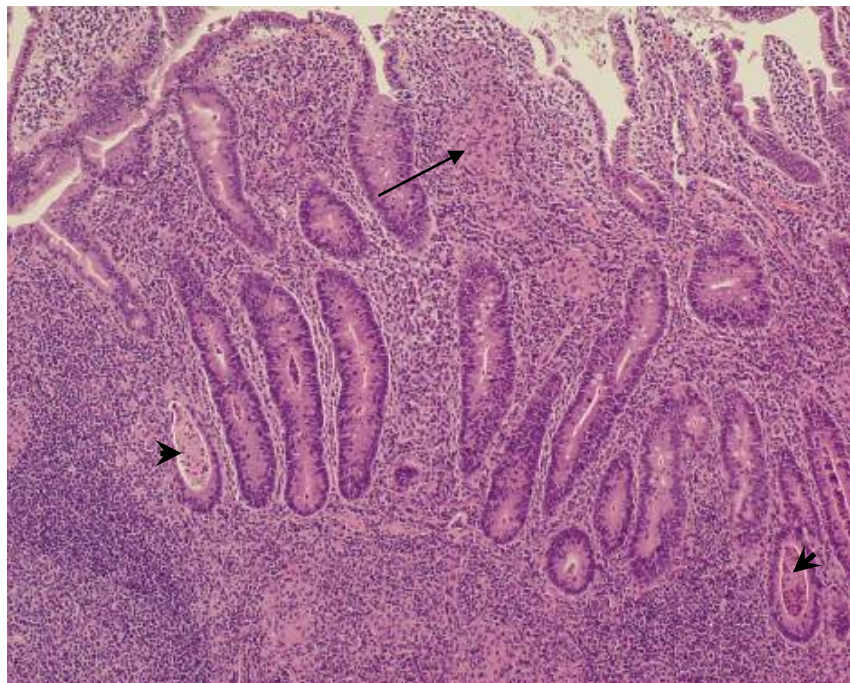


Figura IX.16. Lesión multifocal a. Cordero infectado con “dosis alta” de *Map*. Presencia de granulomas en lámina propia asociada al tejido linfoide, provocando el engrosamiento de la vellosidad (→). También se aprecian lesiones en el tejido linfoide, así como dos criptas dilatadas conteniendo material necrótico (➤). Cordero 54, 1er sacrificio (100-120 dpi). Placa de



Figura IX.17. Lesión multifocal b. Cordero infectado con “dosis alta” de *Map*. Presencia de lesiones granulomatosas en la lámina propia no relacionada con el tejido linfoide. La lesión se localiza principalmente en el ápice de las vellosidades, causando su engrosamiento (→). Cordero 49, Ileon medio. 2° sacrificio (210-220 dpi). HE. 60X.

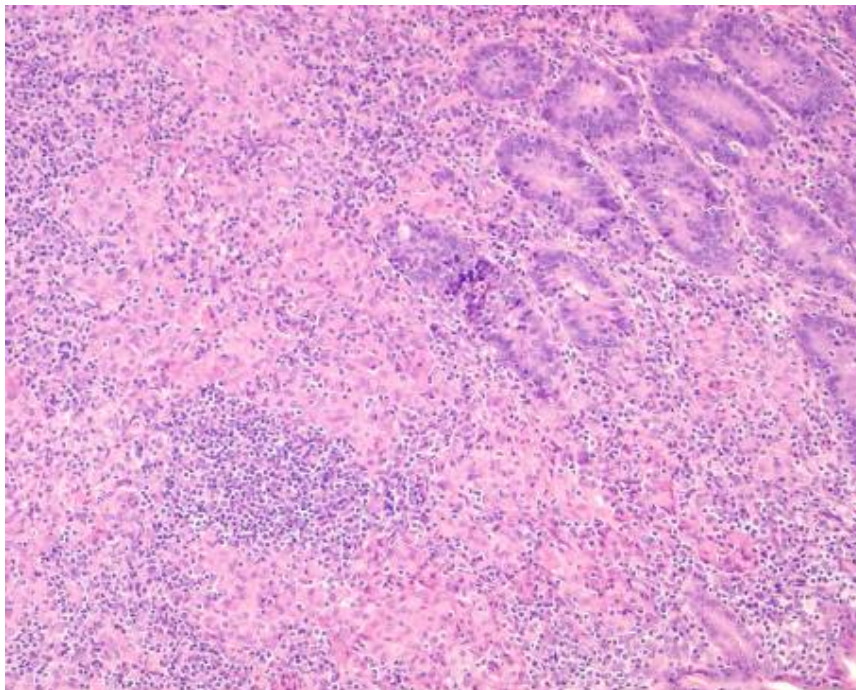


Figura IX.18. Lesión multifocal b. Cordero infectado con “dosis alta” de *Map*. La lesión está formada por numerosos granulomas, que se extienden por la lámina propia, causando su ensanchamiento y alterando su estructura histológica. Dichos granulomas están formados por numerosos macrófagos y algunos linfocitos dispersos entre ellos. Cordero 51, placa de Peyer yeyunal media. 1er sacrificio (100-120 dpi). HE. 100X.

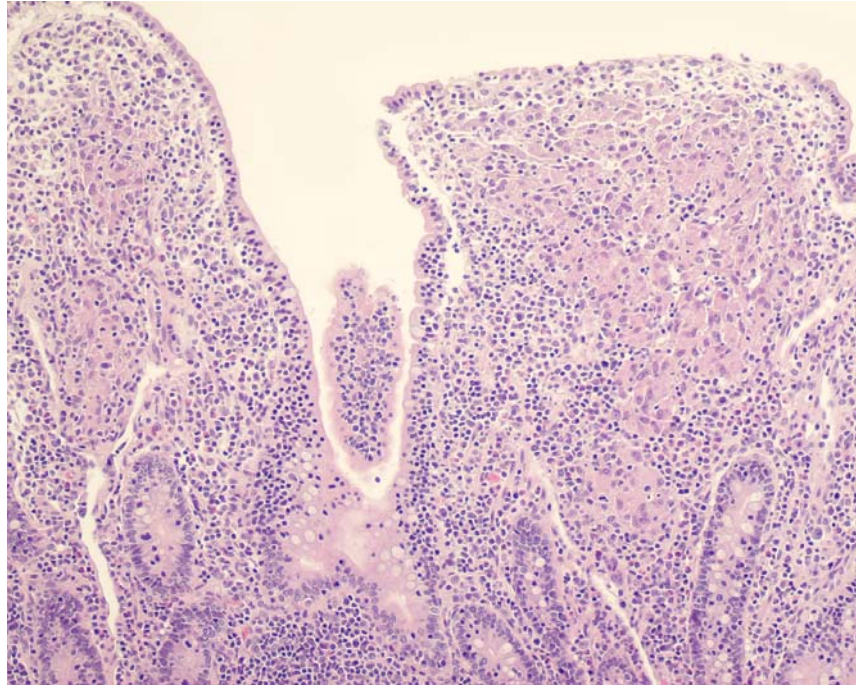


Figura IX.19. Lesión *multifocal b.* Cordero infectado con “dosis alta” de *Map.* Infiltrado inflamatorio, formado principalmente por macrófagos y localizado mayoritariamente en el ápice de las vellosidades, ocasionando su engrosamiento focal. Cordero 49, Ileon distal. 2º sacrificio (210-220 dpi). HE. 100X.

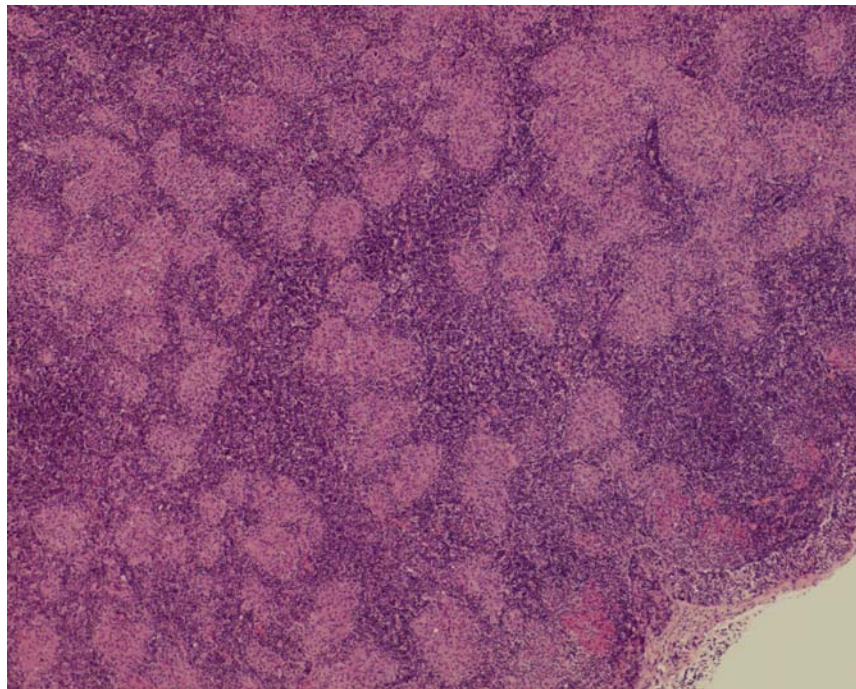


Figura IX.20. Lesión de distribución *multifocal* en nódulo linfático mesentérico caudal. Cordero infectado con “dosis alta” de *Map.* Los granulomas confluyen y se extienden por el área interfolicular de la zona cortical y la paracortical. Cordero 51, con lesiones intestinales de tipo *multifocal b.* 1er sacrificio (100-120 dpi). HE. 40X.

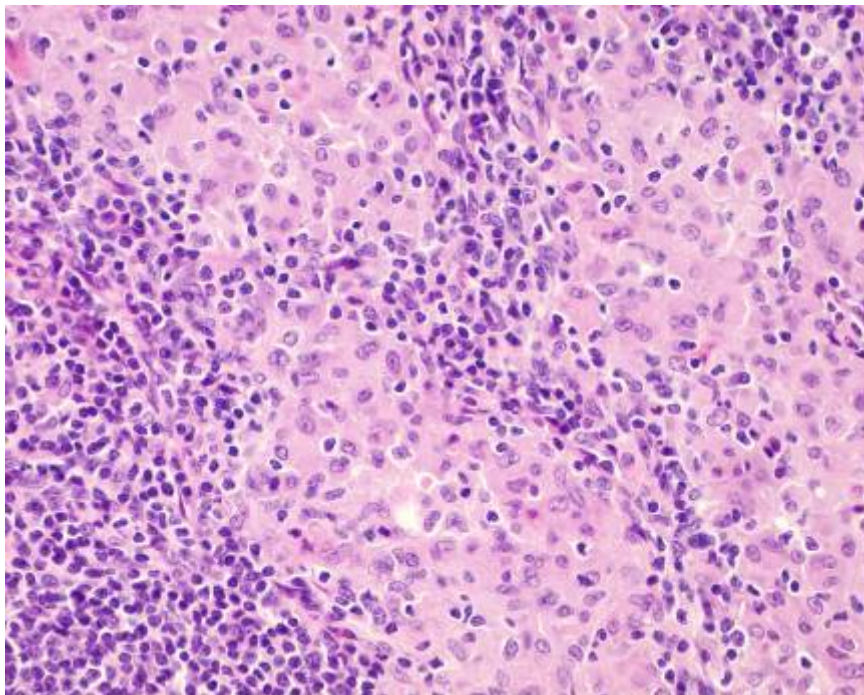


Figura IX.21. Nódulo linfático mesentérico caudal. Cordero infectado con “dosis alta” de *Map*. Detalle de los granulomas, donde se observa que están formados por macrófagos de abundante citoplasma eosinófilo y algunos linfocitos dispersos entre ellos. Cordero 51. 1er sacrificio (100-120 dpi). HE. 250X.

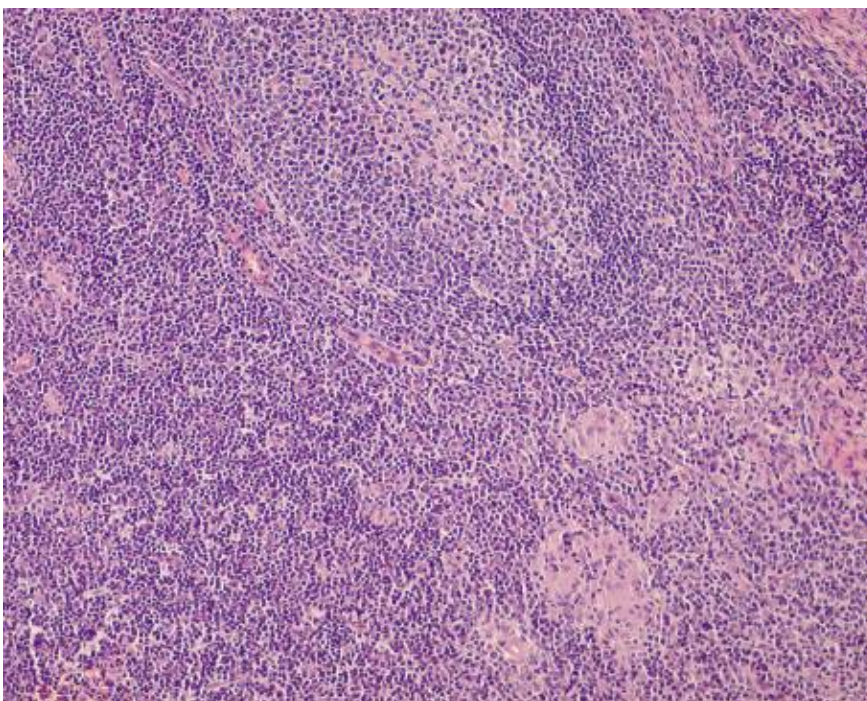


Figura IX.22. Nódulo linfático yeyunal. Cordero infectado con “dosis alta” de *Map*. Presencia de escasos granulomas, de pequeño tamaño, en el espacio interfolicular de la zona cortical. Cordero 49. 2º sacrificio (210-220 dpi). HE. 100X.

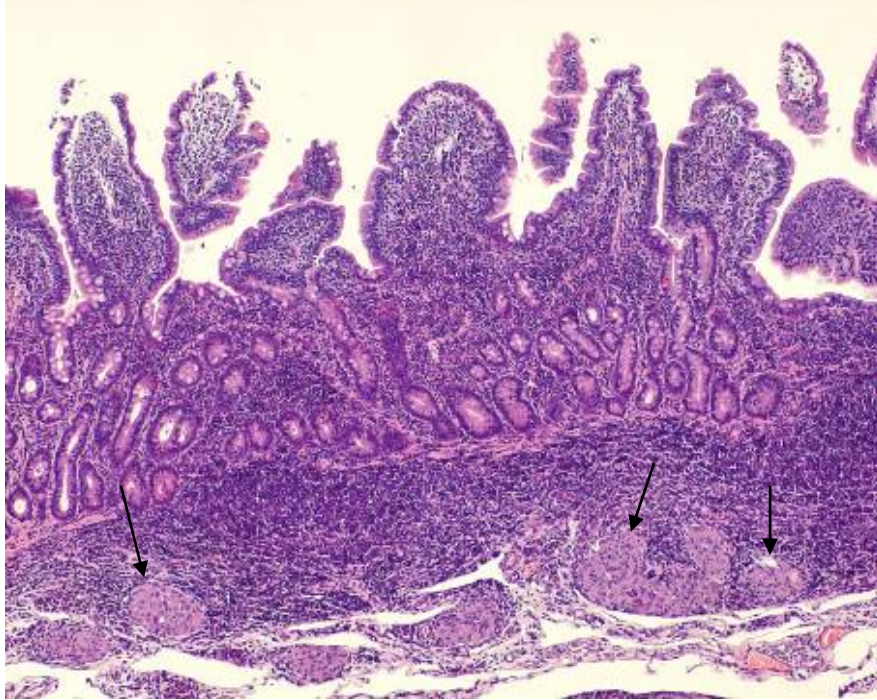


Figura IX.23. Lesión focal. Oveja infectada con “dosis alta” de *Map*. Presencia de varios granulomas de pequeño tamaño (—→), bien definidos y localizados exclusivamente en el espacio interfollicular del tejido linfoide de la placa de Peyer ileocecal, principalmente en la zona basal. Oveja 22. 1er sacrificio (100-120 dpi). HE. 50X.

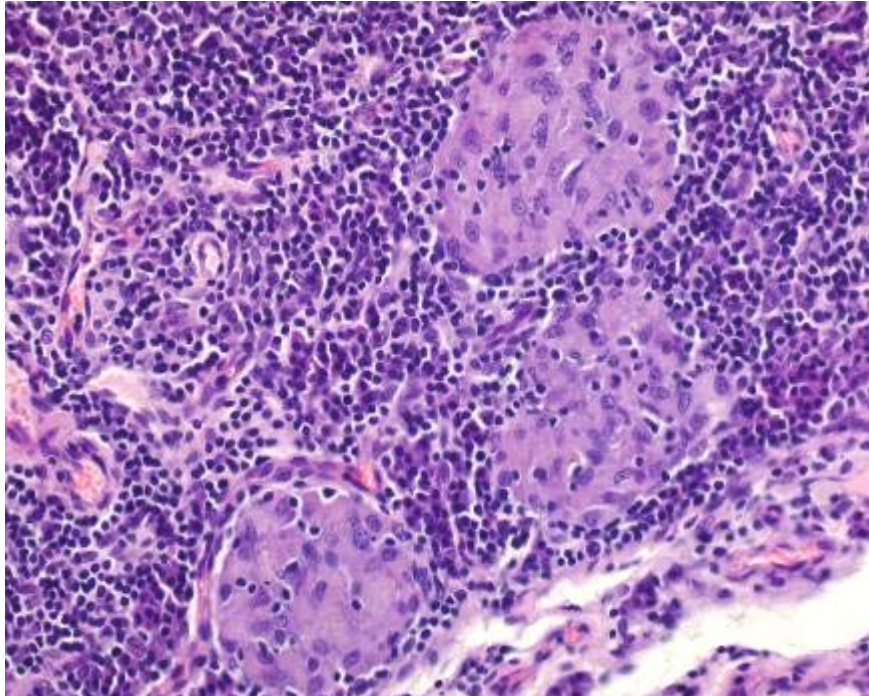


Figura IX.24. Lesión focal. Oveja infectada con “dosis alta” de *Map*. Granulomas de pequeño tamaño, formados por macrófagos y escasos linfocitos, localizados en el tejido linfoide. Se observa su forma redondeada y la neta delimitación del tejido adyacente. Oveja 22, válvula ileocecal. 1er sacrificio (100-120 dpi). HE. 200X.

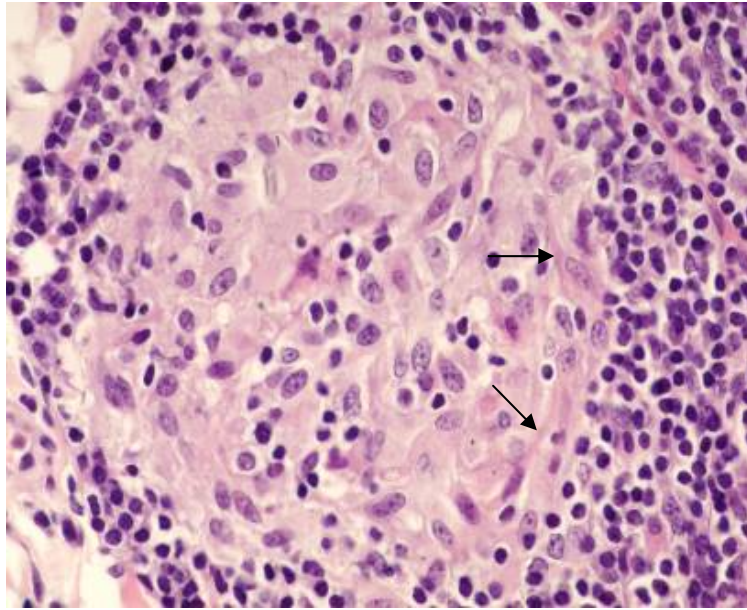


Figura IX.25. Lesión *focal*. Oveja infectada con “dosis alta” de *Map*. Granuloma de tipo regresivo. Se observa su forma redondeada y la presencia de fibroblastos y fibras de colágeno (—→) entremezcladas alrededor de los macrófagos. Oveja 21, placa de Peyer yeyunal distal. 2º sacrificio (210-220 dpi). HE. 400X.

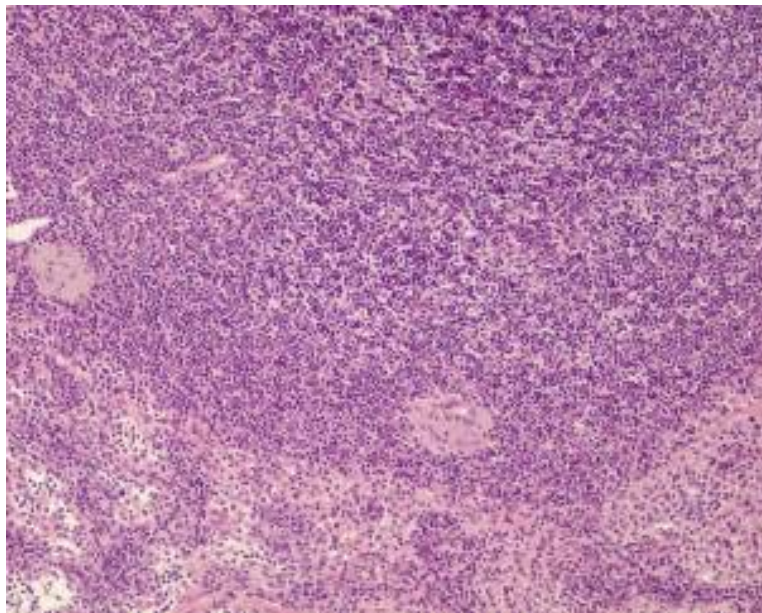


Figura IX.26. Lesión de distribución *focal* en nódulo linfático ileocecal. Oveja infectada con “dosis alta” de *Map*. Escasos granulomas, bien delimitados, formados por 5-10 células macrófagicas, dispersos en la zona paracortical. Oveja 25. 1er sacrificio (100-120 dpi). HE. 100X.

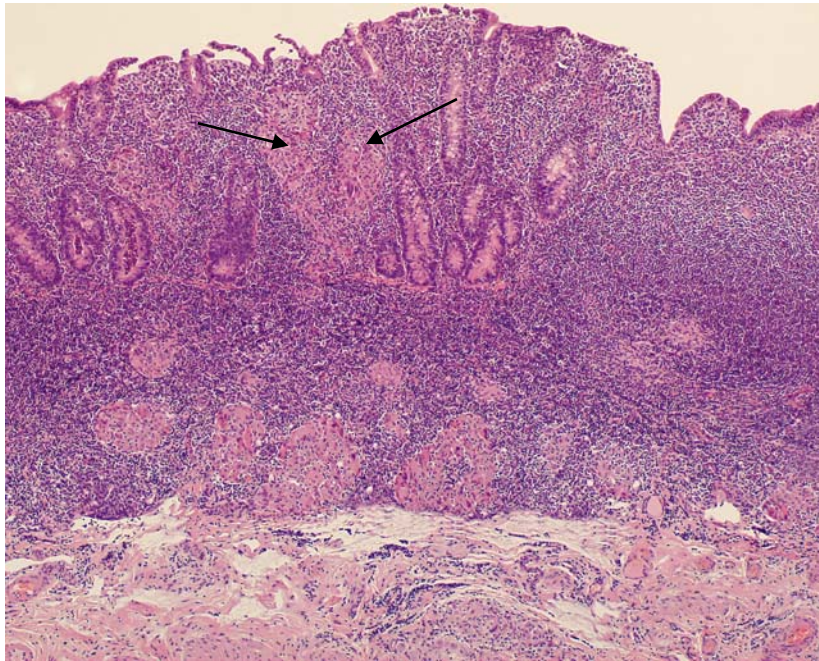


Figura IX.27. Lesión multifocal a. Oveja 28 infectada con “dosis alta” de *Map*. Varios granulomas de gran tamaño, que se observan tanto en el tejido linfoide de la placa de Peyer como en la lámina propia asociada (—>). Oveja 28, válvula ileocecal. 2º sacrificio (210-220 dpi). HE. 50X.

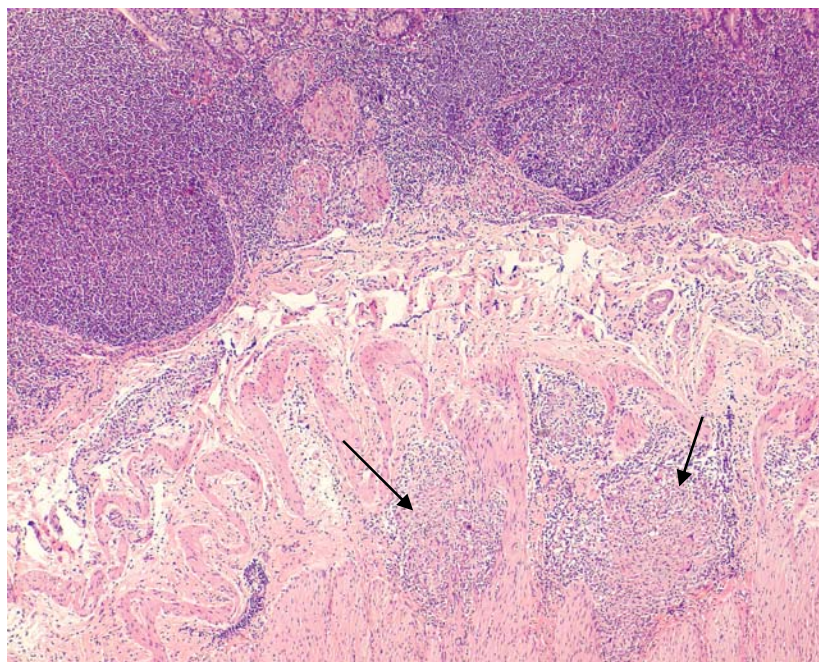


Figura IX.28. Lesión multifocal a. Oveja 28 infectada con “dosis alta” de *Map*. Linfangitis granulomatosa en la capa muscular de la válvula ileocecal (—>) con abundante infiltrado de macrófagos y linfocitos. También se observan granulomas en el tejido linfoide. 2º sacrificio (210-220 dpi). HE.100X.

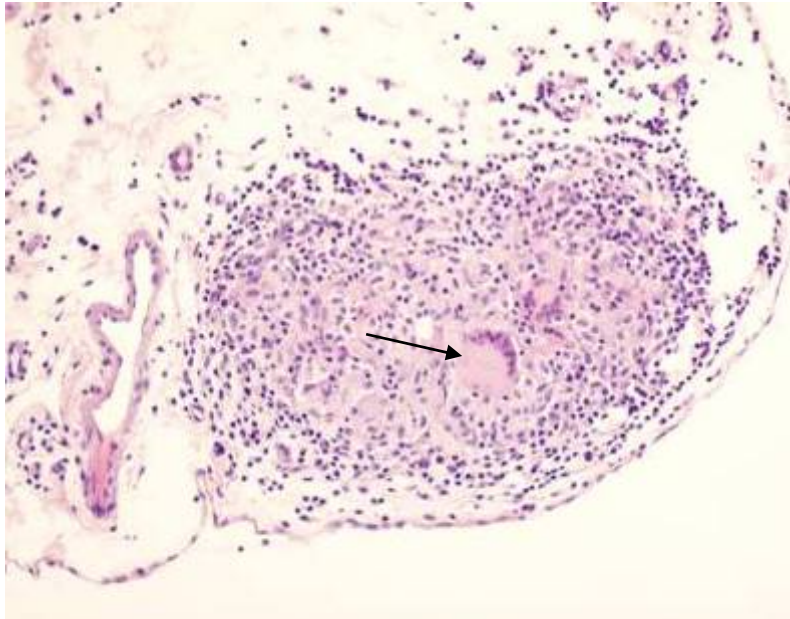


Figura IX.29. Lesión *multifocal a.* Oveja 28 infectada con “dosis alta” de *Map.* Detalle de la linfangitis granulomatosa formada por abundantes linfocitos, algunos macrófagos y células gigantes (→), en la serosa de la válvula ileocecal. 2° sacrificio (210-220 dpi). HE. 150X.

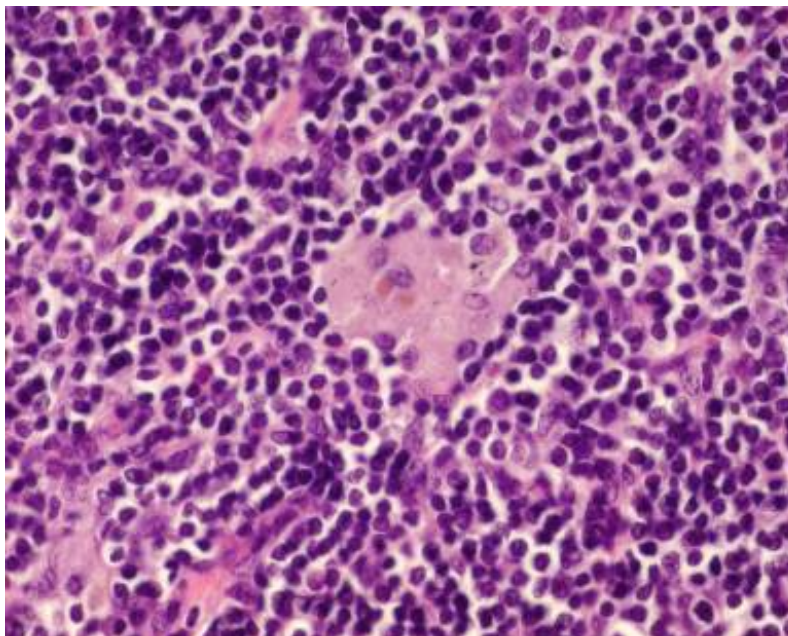


Figura IX.30. Oveja adulta. Granuloma inespecífico de “cuerpo extraño”, formado por unas 5-6 células macrófagicas y con presencia de pigmento parduzco en su citoplasma. Oveja 13, nódulo linfático mesentérico caudal. 1er sacrificio (100-120 dpi). HE. 400X.

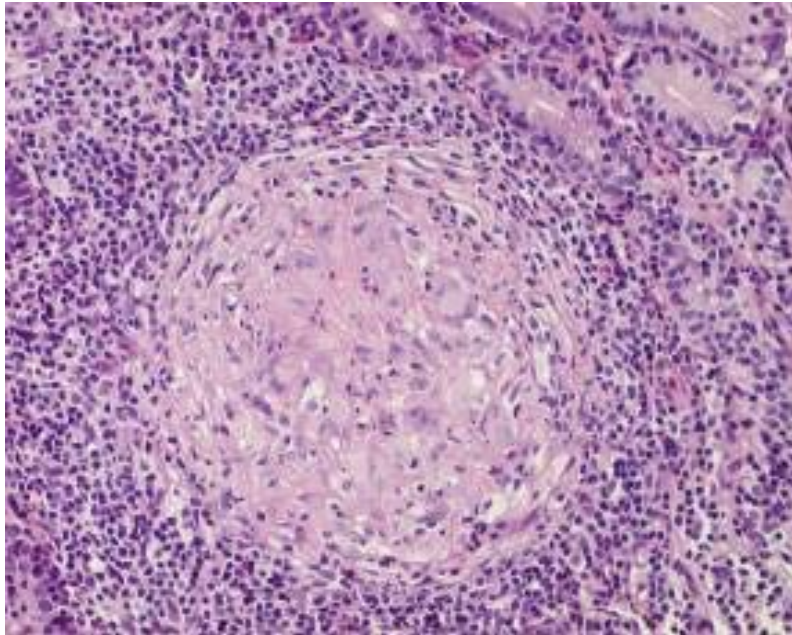


Figura IX.31. Oveja adulta. Granuloma parasitario localizado en lámina propia de una placa de Peyer yeyunal media. Se observa una mezcla de macrófagos y células gigantes de “cuerpo extraño” y algún linfocito, rodeados por una fina capa de tejido conjuntivo delimitando del tejido adyacente. Nótese la reacción linfoplasmocitaria rodeando dicho granuloma. Oveja 25. 1er sacrificio (100-120 dpi). HE. 200X.

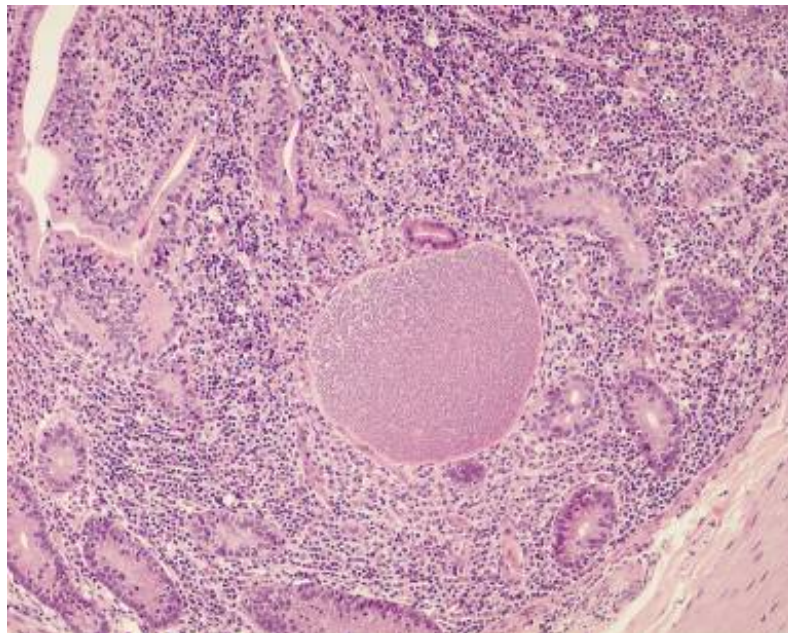


Figura IX.32. Oveja adulta. Forma parasitaria, compatible con un esquizonte de protozoos del género *Eimeria*, localizado en la lámina propia del yeyuno distal. Oveja 29. 2º sacrificio (210-220 dpi) HE. 100X.

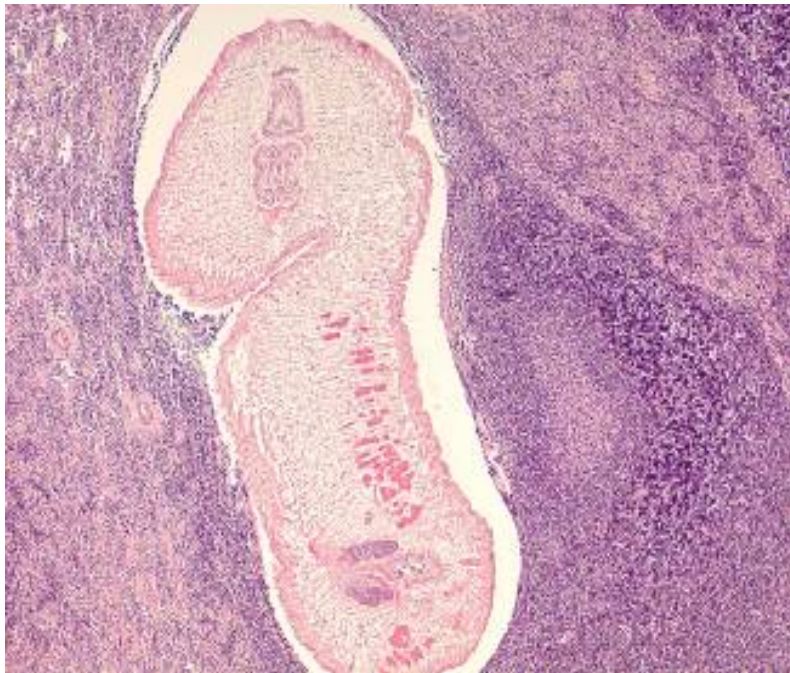


Figura IX.33. Oveja adulta. Forma parasitaria compatible con *Linguatula serrata* en el nódulo linfático yeyunal. Oveja 24. 2º sacrificio (210-220 dpi). HE. 40X.

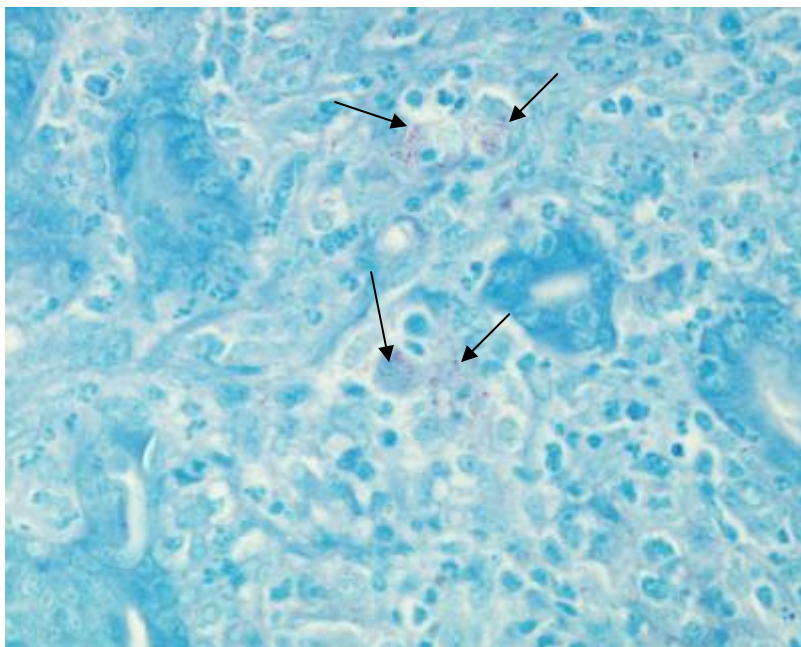


Figura IX.34. Cordero “dosis alta”. Escasa cantidad (+) de BAAR (→) en el citoplasma de macrófagos localizados en la lámina propia del íleon medio. Cordero 51. 1er sacrificio (100-120 dpi). ZN. 300X.

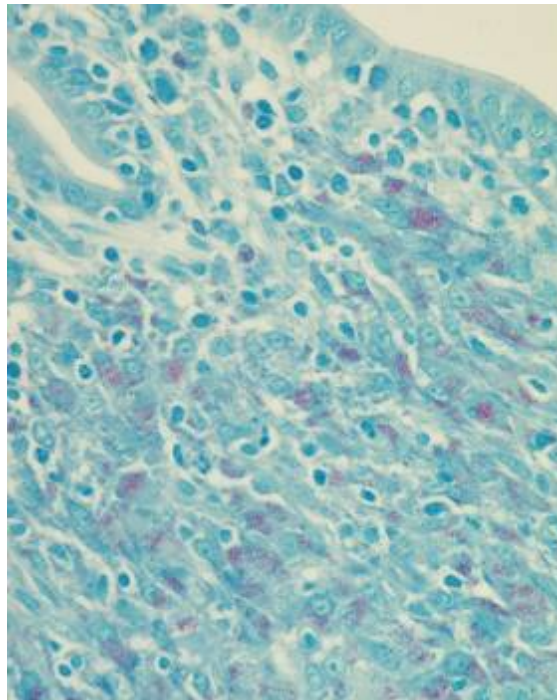


Figura IX.35. Cordero “dosis alta”. Presencia de abundantes BAAR (+++) en lesiones de tipo *multifocal b*, ocupando la casi totalidad del citoplasma de los macrófagos. Cordero 49. Ileón medio. 2° sacrificio (210-220 dpi). ZN. 400X.

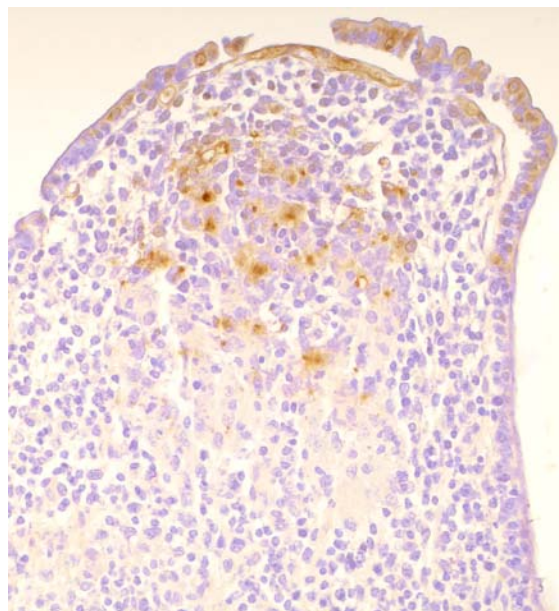


Figura IX.36. Cordero “dosis alta”. Presencia de inmunotinción positiva (++) en el citoplasma de macrófagos localizados en el ápice de una vellosidad del íleon proximal. Lesión de tipo *multifocal b*. Cordero 49. 2° sacrificio (210-220 dpi). IHQ frente a antígenos de *Man*. 200X.

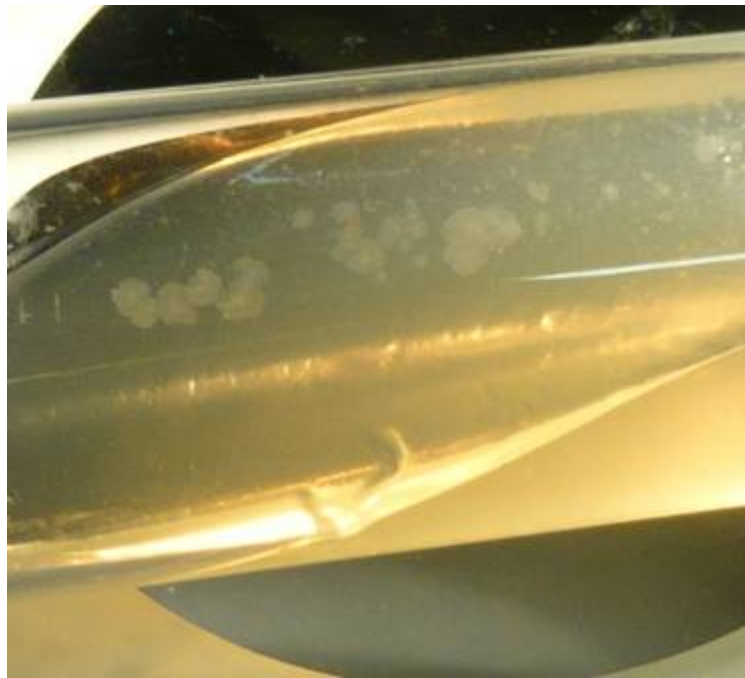


Figura IX.37. Colonias de morfología característica de una cepa ovina de *Map* crecidas sobre la superficie de un medio de cultivo sólido Middlebrook 7H11, procedente de una muestra de heces del cordero 53 infectado con “dosis alta” de *Map*.

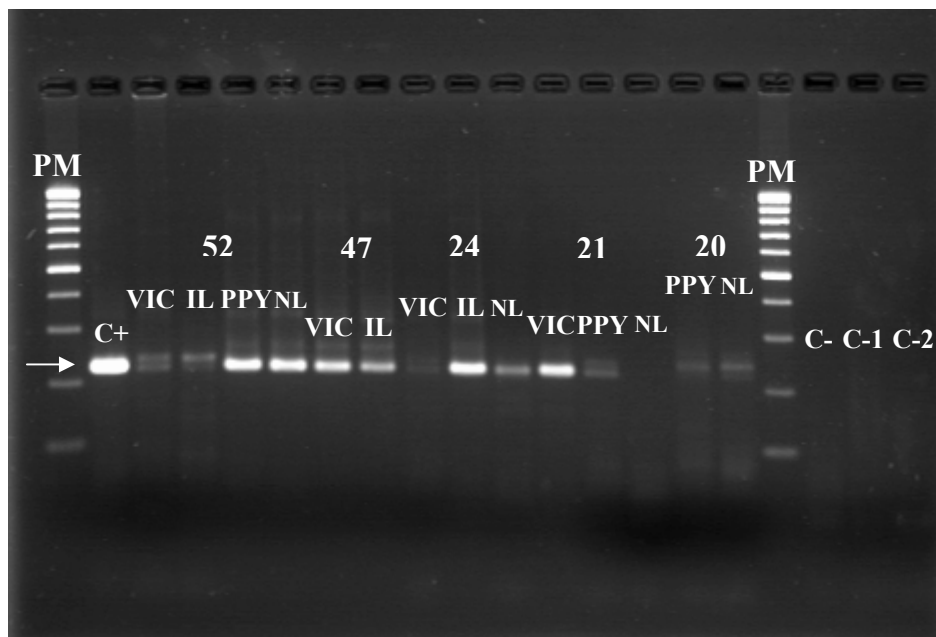


Figura IX.38. Resultados de la PCR anidada a la secuencia de inserción IS900 de *Map* en muestras de tejido fresco de los corderos 47 y 52, y de las ovejas 20, 21 y 24. PM: Peso Molecular; C+: Control positivo de la reacción de PCR; C-: Control negativo de la extracción de ADN; C-1: Control negativo de reacción de la primera ronda de PCR; C-2: Control negativo de reacción de la segunda ronda de PCR; La reacción positiva se observa en forma de una banda de 226 pb (→); VIC: válvula ileocecal; IL: Ileon; PPY: placa de Peyer yeyunal; NL: Nódulo linfático mesentérico



X. Anexos
Appendix

TABLAS DE RESULTADOS

Grupo	Iden.	ELISA							
		0 dpi	15 dpi	30 dpi	45 dpi	60 dpi	75 dpi	90 dpi	110 dpi
Control	1	390	429	459	492	540	556	474	749
	2	435	449	442	418	473	451	600	/
	3	268	338	248	199	284	361	327	/
	5	169	163	301	83	113	113	191	299
	6	300	268	247	327	196	266	301	/
	7	290	254	199	219	230	255	235	/
	Media	308,66	316,83	316	289,67	306	333,67	354,67	524
"Dosis baja"	8	551	540	390	542	571	634	538	507
	10	457	399	292	814	491	521	552	/
	11	593	498	454	567	538	558	613	/
	12	315	290	354	337	409	418	309	/
	13	380	369	396	326	523	542	390	431
	14	429	375	400	418	668	570	284	576
	15	206	173	413	127	184	587	244	/
	16	213	285	213	120	287	213	200	/
	17	364	254	292	210	475	364	266	372
Media	389,78	353,68	356	384,56	460,67	489,67	377,34	471,5	
"Dosis alta"	18	466	358	542	492	726	675	615	/
	19	236	187	168	227	307	375	340	754
	20	447	457	317	235	538	567	419	/
	21	376	329	216	507	386	415	291	/
	22	255	216	158	229	378	346	247	854
	23	315	332	228	487	526	590	435	865
	24	231	268	209	167	524	739	609	/
	25	403	526	552	593	703	637	655	1021
	26	254	328	269	329	305	426	385	/
	27	353	346	342	315	406	463	394	805
	28	222	241	199	221	283	201	264	/
	29	229	207	151	141	187	268	282	/
	30	600	531	475	502	623	508	579	861
Media	337,46	332,77	294,31	341,92	453,23	477,69	424,23	860	

Tabla X.1. Resultados del test ELISA en las ovejas adultas. 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. Iden: Identificación. (Continúa).

Grupo	Iden.	ELISA					
		130 dpi	145 dpi	160 dpi	175 dpi	195 dpi	210 dpi
Control	1	/	/	/	/	/	/
	2	469	486	417	484	433	537
	3	347	349	273	286	218	358
	5	/	/	/	/	/	/
	6	375	278	262	268	187	251
	7	275	211	249	261	207	279
	Media	366,50	331	300,25	324,75	261,25	356,25
"Dosis baja"	8	/	/	/	/	/	/
	10	665	689	514	467	345	908
	11	607	512	461	412	503	701
	12	488	406	370	382	416	551
	13	/	/	/	/	/	/
	14	/	/	/	/	/	/
	15	227	146	155	221	189	374
	16	387	170	190	336	262	679
	17	/	/	/	/	/	/
Media	474,80	384,60	338	363,60	343	642,60	
"Dosis alta"	18	1085	806	631	879	792	1245
	19	/	/	/	/	/	/
	20	803	470	485	337	530	1185
	21	365	338	354	417	470	1072
	22	/	/	/	/	/	/
	23	/	/	/	/	/	/
	24	975	498	687	575	573	1201
	25	/	/	/	/	/	/
	26	1049	690	617	536	323	1086
	27	/	/	/	/	/	/
	28	502	246	312	252	202	959
	29	574	336	293	280	184	1011
	30	/	/	/	/	/	/
Media	764,71	483,43	482,72	468	439,14	1108,43	

Tabla X.1. Resultados del test ELISA en las ovejas adultas. 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. Iden: Identificación. (Continuación).

Grupo	Iden.	ELISA							
		0 dpi	15 dpi	30 dpi	45 dpi	60 dpi	75 dpi	90 dpi	110 dpi
Control	31	75	100	107	121	108	118	252	376
	32	667	447	268	265	170	149	167	568
	34	194	145	132	194	119	159	222	530
	35	125	112	139	166	127	165	332	529
	36	103	82	100	152	127	251	143	184
	37	112	114	128	232	185	413	371	757
	38	83	143	159	180	135	92	167	490
	Media	194,14	163,29	147,57	187,14	138,71	192,43	236,29	490,57
"Dosis baja"	39	89	99	131	147	294	106	151	368
	40	112	151	151	148	93	87	135	147
	41	94	107	109	136	128	103	200	528
	42	73	90	120	175	245	223	328	437
	43	133	131	205	210	158	236	304	519
	44	72	80	118	121	191	264	373	523
	45	256	165	143	171	221	373	458	453
	46	134	145	158	106	173	242	138	454
Media	120,37	121	141,87	151,75	187,87	204,25	260,87	428,62	
"Dosis alta"	47	82	95	125	312	109	341	398	827
	48	94	109	201	117	150	117	351	665
	49	155	147	155	317	731	291	579	696
	50	68	95	137	121	102	127	483	704
	51	143	155	167	142	117	124	396	911
	52	71	96	123	129	173	188	423	911
	53	232	247	156	164	149	143	149	276
	54	448	361	224	181	169	245	160	394
Media	161,62	163,12	161	185,37	212,5	197	367,37	673	

Tabla X.2. Resultados del test ELISA en los corderos. 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. Iden: Identificación. (Continúa).

Grupo	Iden.	ELISA					
		130 dpi	145 dpi	160 dpi	175 dpi	195 dpi	210 dpi
Control	31	/	/	/	/	/	/
	32	/	/	/	/	/	/
	34	362	276	211	205	222	278
	35	/	/	/	/	/	/
	36	126	187	173	191	196	398
	37	716	734	524	455	437	670
	38	387	238	325	273	231	488
	Media	397,75	358,75	308,25	281	271,5	458,5
"Dosis baja"	39	/	/	/	/	/	/
	40	165	161	133	150	134	193
	41	/	/	/	/	/	/
	42	369	353	273	236	199	710
	43	379	360	327	345	293	443
	44	246	469	390	336	278	422
	45	/	/	/	/	/	/
	46	205	175	205	265	215	751
Media	272,8	303,6	265,6	266,4	223,8	503,8	
"Dosis alta"	47	/	/	/	/	/	/
	48	373	567	684	905	784	958
	49	438	491	316	317	382	949
	50	647	331	248	224	222	1058
	51	/	/	/	/	/	/
	52	862	1020	702	837	771	1162
	53	277	119	204	199	213	363
	54	/	/	/	/	/	/
Media	519,4	505,6	430,8	496,4	474,4	898	

Tabla X.2. Resultados del test ELISA en los corderos. 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. Iden: Identificación. (Continuación).

Grupo	Iden.	IFN- γ : cociente D.O. aviar / D.O. PBS							
		0 dpi	15 dpi	30 dpi	45 dpi	60 dpi	75 dpi	90 dpi	110 dpi
Control	1	0,98	0,93	0,54	1,08	1,06	1,1	0,69	1,32
	2	0,89	0,87	1,11	1,16	1,09	0,99	0,99	/
	3	1,15	1,69	1,09	1,22	1,05	0,83	1,01	/
	5	1,15	1,2	0,69	1,09	0,69	0,63	1	1,3
	6	0,99	1,16	1,06	1,01	1,03	1,58	1,28	/
	7	1,18	1,04	1,13	1,04	1,13	0,45	1,12	/
	Media	1,057	1,148	0,937	1,100	1,008	0,930	1,015	1,31
"Dosis baja"	8	1,1	1	0,94	0,96	1,91	0,99	1,47	1,05
	10	1,03	1,43	0,81	1,02	0,93	1,3	1,14	/
	11	1,2	0,88	1,06	1,18	1,21	1,22	0,92	/
	12	0,94	1,22	1,12	0,84	1,01	1	1,15	/
	13	1,65	0,86	1,01	1,48	1,01	1,14	1,05	2,88
	14	1,16	1,53	1,16	1,1	0,97	1,08	1,06	1,11
	15	0,75	0,76	1,07	1,34	0,99	1	1,26	/
	16	0,93	1,06	1,19	1,17	1,16	1,11	1,03	/
	Media	1,076	1,096	1,0344	1,127	1,140	1,033	1,114	1,463
"Dosis alta"	18	7,72	3,72	5,31	9,15	21,72	16,08	13,47	/
	19	0,72	0,95	1,42	3,78	2,08	5,7	10,18	4,84
	20	1,76	2,28	14,93	21,94	17,05	14,81	12,17	/
	21	0,98	1,04	1,12	1,39	2,76	4,05	3,66	/
	22	1,46	1,36	1,17	1,84	2,9	1,94	2,11	3,63
	23	0,93	0,89	1,22	4,55	2,02	4,25	4	10,19
	24	1,87	2,54	3,56	6,13	6,31	3,82	9,86	/
	25	1,11	1,11	1,19	1,32	1,22	2,6	1,27	3,22
	26	0,82	1,6	3,38	3,56	6,88	8,54	3,83	/
	27	1,58	1,47	5,46	7,92	6,37	8,67	7,38	9,46
	28	1,07	1,26	1,38	0,97	1,54	1,7	2,25	/
	29	1,22	2,03	10,81	8,74	8,65	7,9	5,1	/
	30	1,09	1,16	1,76	1,97	1,21	1,25	1,01	1,74
Media	1,718	1,647	4,055	5,635	6,208	6,255	5,868	5,513	

Tabla X.3. Resultados de la prueba de liberación del IFN- γ en las ovejas adultas. Valores de cada animal y media de los diferentes grupos experimentales en los diferentes muestreos. El nivel del IFN- γ producido se obtuvo dividiendo el valor de la absorbancia de cada plasma es simulado con PPD aviar entre la DO del mismo plasma incubado con PBS. Iden: Identificación. D.O.: Densidad Óptica. (Continúa).

Grupo	Iden.	IFN- γ : cociente D.O. aviar / D.O. PBS					
		130 dpi	145 dpi	160 dpi	175 dpi	195 dpi	210 dpi
Control	1	/	/	/	/	/	/
	2	1,15	0,99	0,81	1,58	0,65	0,81
	3	0,9	1,19	1,11	0,83	1,06	0,95
	5	/	/	/	/	/	/
	6	1,13	1,17	0,89	1,01	1,04	0,99
	7	1,03	1,25	1,08	1,31	1,13	0,91
	Media	1,053	1,150	0,973	1,183	0,97	0,915
"Dosis baja"	8	/	/	/	/	/	/
	10	1,06	1,04	1,18	0,9	1,13	0,84
	11	0,94	0,96	0,92	0,76	0,96	1,01
	12	1,16	1,13	1,06	1,3	1,64	1,08
	13	/	/	/	/	/	/
	14	/	/	/	/	/	/
	15	1,29	1,13	1,06	1,16	1,03	1,05
	16	1,32	1,14	1,08	0,85	0,92	1,31
	17	/	/	/	/	/	/
Media	1,154	1,080	1,06	0,994	1,136	1,058	
"Dosis alta"	18	9,77	9,97	9,19	3,86	7,71	3,29
	19	/	/	/	/	/	/
	20	10,77	7,28	4,57	5,08	7,32	2,81
	21	5,22	2,19	2,14	1,86	2,04	1,3
	22	/	/	/	/	/	/
	23	/	/	/	/	/	/
	24	6,98	4,8	6,04	3,71	6,72	2,01
	25	/	/	/	/	/	/
	26	3,57	2,38	3,51	2,43	3,24	1,43
	27	/	/	/	/	/	/
	28	2,38	2,47	1,91	2,01	3,13	1,54
	29	2,47	2,57	4,06	2,02	3,96	1,59
	30	/	/	/	/	/	/
Media	5,880	4,523	4,489	2,996	4,874	1,996	

Tabla X.3. Resultados de la prueba de liberación del IFN- γ en las ovejas adultas. Valores de cada animal y media de los diferentes grupos experimentales en los diferentes muestreos. El nivel del IFN- γ producido se obtuvo dividiendo el valor de la absorbancia de cada plasma esimulado con PPD aviar entre la DO del mismo plasma incubado con PBS. Iden: Identificación. D.O.: Densidad Óptica. (Continuación).

Grupo	Iden.	IFN- γ : cociente D.O. aviar / D.O. PBS							
		0 dpi	15 dpi	30 dpi	45 dpi	60 dpi	75 dpi	90 dpi	110 dpi
Control	31	0,99	1,06	0,98	1,01	1,37	0,91	1,08	1,05
	32	1,05	1,25	1,03	1,02	1,03	1	1,08	1,23
	34	0,97	0,98	0,99	0,97	1,09	1,01	1	1,08
	35	0,87	1,07	0,98	0,84	0,89	1,03	1,01	1,04
	36	0,96	0,97	0,96	1,17	0,93	0,91	1,12	0,96
	37	1,01	0,93	0,96	0,94	0,65	0,95	0,95	1,03
	38	1,03	0,98	0,97	0,94	0,92	1,03	0,96	1,04
	Media	0,983	1,034	0,981	0,984	0,983	0,977	1,029	1,061
"Dosis baja"	39	1,01	1,08	1,14	0,98	1,01	1,01	0,95	0,93
	40	0,97	1,1	1,01	1,03	1,15	1,02	0,96	0,76
	41	1,09	1,07	1,48	0,93	1,58	1,09	1,14	1
	42	0,93	0,98	1,02	0,99	0,94	0,99	1,08	1,09
	43	1,1	1,08	0,99	1,03	1,01	1,02	1,07	0,99
	44	1,12	1	0,99	0,93	0,91	1,02	1,03	0,95
	45	1,04	1,03	0,96	0,99	1,02	0,94	1,09	0,95
	Media	1,022	1,05	1,08	0,986	1,072	1,0137	1,085	0,921
"Dosis alta"	47	0,94	1,12	0,99	0,98	0,96	1,14	1,74	2,23
	48	1,03	0,88	0,89	1,09	0,99	0,97	0,83	2,07
	49	1,09	1,45	1,08	0,82	1,12	1,04	1,97	2,92
	50	1,05	0,93	0,83	1,01	1,38	1,69	5,82	3,08
	51	1,12	0,93	0,99	0,98	1,26	1,53	20,76	22,33
	52	0,96	0,9	0,84	1,02	1,19	1,19	8,45	19,2
	53	0,9	1,04	1,04	1,03	1,05	1,15	1,26	1,86
	54	0,93	0,73	0,88	1,16	1,26	1,48	6,68	5,42
Media	1,002	0,997	0,942	1,0112	1,151	1,274	5,938	7,388	

Tabla X.4. Resultados de la prueba de liberación del IFN- γ en los corderos. Valores de cada animal y media de los diferentes grupos experimentales en los diferentes muestreos. El nivel del IFN- γ producido se obtuvo dividiendo el valor de la absorbancia de cada plasma esimulado con PPD aviar entre la DO del mismo plasma incubado con PBS. Iden: Identificación. D.O.: Densidad Óptica. (Continúa).

Grupo	Iden.	IFN- γ : cociente D.O. aviar / D.O. PBS					
		130 dpi	145 dpi	160 dpi	175 dpi	195 dpi	210 dpi
Control	31	/	/	/	/	/	/
	32	/	/	/	/	/	/
	34	1,17	1,14	1,19	0,48	0,86	0,95
	35	/	/	/	/	/	/
	36	1,13	1,03	0,99	1,01	0,93	0,84
	37	0,94	1,05	1,74	1,06	1	0,93
	38	1,1	0,88	0,87	1,37	1,05	1,13
	Media	1,085	1,025	1,198	0,980	0,960	0,962
"Dosis baja"	39	/	/	/	/	/	/
	40	1,01	0,8	1,09	1,07	1,1	1,04
	41	/	/	/	/	/	/
	42	1,04	0,92	0,75	1	1,07	1,05
	43	1	1,09	1	1,02	1,1	0,97
	44	0,97	1,11	2,83	1,97	0,9	0,75
	45	/	/	/	/	/	/
	46	1,16	0,92	1,13	1,06	1,18	1,01
	Media	1,036	0,968	1,36	1,224	1,07	0,964
"Dosis alta"	47	/	/	/	/	/	/
	48	1,88	2,37	1,56	2,09	3,24	2,22
	49	1,97	1,37	7,51	3,74	9,76	4,04
	50	1,5	1,73	1,63	1,8	1,59	2,22
	51	/	/	/	/	/	/
	52	6,53	13,68	8,57	7,65	7,9	5,49
	53	1,79	1,31	4,66	3,71	2,96	3,14
	54	/	/	/	/	/	/
	Media	2,734	4,092	4,786	3,798	5,09	3,422

Tabla X.4. Resultados de la prueba de liberación del IFN- γ en los corderos. Valores de cada animal y media de los diferentes grupos experimentales en los diferentes muestreos. El nivel del IFN- γ producido se obtuvo dividiendo el valor de la absorbancia de cada plasma esimulado con PPD aviar entre la DO del mismo plasma incubado con PBS. Iden: Identificación. D.O.: Densidad Óptica. (Continuación).

Grupo	Iden.	IFN- γ_0 : D.O. PBS							
		0 dpi	15 dpi	30 dpi	45 dpi	60 dpi	75 dpi	90 dpi	110 dpi
Control	1	0,04	0,043	0,122	0,036	0,113	0,128	0,134	0,039
	2	0,073	0,046	0,049	0,154	0,045	0,048	0,043	/
	3	0,107	0,044	0,104	0,116	0,038	0,131	0,103	/
	5	0,036	0,084	0,121	0,069	0,058	0,091	0,102	0,039
	6	0,039	0,035	0,07	0,038	0,128	0,105	0,096	/
	7	0,034	0,037	0,034	0,041	0,034	0,109	0,089	/
	Media	0,0548	0,0482	0,0833	0,0757	0,0693	0,1020	0,0945	0,0390
"Dosis baja"	8	0,082	0,105	0,077	0,109	0,107	0,037	0,082	0,087
	10	0,115	0,088	0,1	0,088	0,102	0,116	0,033	/
	11	0,087	0,101	0,07	0,083	0,079	0,043	0,037	/
	12	0,093	0,096	0,106	0,097	0,036	0,046	0,037	/
	13	0,098	0,111	0,074	0,096	0,038	0,044	0,037	0,089
	14	0,086	0,097	0,099	0,035	0,038	0,124	0,109	0,092
	15	0,129	0,112	0,068	0,089	0,037	0,06	0,133	/
	16	0,042	0,043	0,037	0,097	0,034	0,036	0,035	/
	Media	0,0913	0,0878	0,0743	0,0903	0,0564	0,0663	0,0689	0,0783
"Dosis alta"	18	0,08	0,036	0,035	0,044	0,095	0,1	0,035	/
	19	0,116	0,037	0,04	0,038	0,036	0,044	0,088	0,037
	20	0,103	0,113	0,098	0,085	0,085	0,058	0,036	/
	21	0,11	0,119	0,039	0,042	0,041	0,048	0,041	/
	22	0,083	0,042	0,133	0,083	0,098	0,042	0,109	0,091
	23	0,1	0,042	0,039	0,091	0,087	0,052	0,034	0,081
	24	0,094	0,096	0,131	0,035	0,074	0,107	0,089	/
	25	0,087	0,087	0,116	0,038	0,085	0,089	0,125	0,036
	26	0,124	0,1	0,036	0,099	0,095	0,096	0,124	/
	27	0,11	0,111	0,102	0,084	0,118	0,105	0,117	0,089
	28	0,124	0,094	0,043	0,1	0,036	0,044	0,099	/
	29	0,105	0,114	0,089	0,119	0,111	0,043	0,034	/
	30	0,454	0,327	0,395	0,509	0,882	0,772	0,868	0,916
Media	0,1300	0,1014	0,0997	0,1052	0,1418	0,1231	0,1384	0,2083	

Tabla X.5. Resultados de la producción basal inespecífica del IFN- γ_0 en las ovejas adultas. Valores de cada animal y media de los diferentes grupos experimentales en los diferentes muestreos. El nivel del IFN- γ_0 producido se obtuvo de la absorbancia de cada plasma incubado con PBS. Iden: Identificación. D.O.: Densidad Óptica. (Continúa).

Grupo	Iden.	IFN- γ_0 : D.O. PBS					
		130 dpi	145 dpi	160 dpi	175 dpi	195 dpi	210 dpi
Control	1	/	/	/	/	/	/
	2	0,053	0,038	0,049	0,058	0,062	0,227
	3	0,127	0,076	0,088	0,078	0,089	0,072
	5	/	/	/	/	/	/
	6	0,082	0,075	0,074	0,072	0,084	0,08
	7	0,104	0,079	0,093	0,079	0,08	0,075
	Media	0,0915	0,0670	0,0760	0,0718	0,0788	0,1135
"Dosis baja"	8	/	/	/	/	/	/
	10	0,07	0,08	0,087	0,084	0,078	0,086
	11	0,105	0,085	0,08	0,089	0,086	0,057
	12	0,099	0,072	0,088	0,067	0,08	0,065
	13	/	/	/	/	/	/
	14	/	/	/	/	/	/
	15	0,111	0,079	0,081	0,07	0,083	0,055
	16	0,107	0,081	0,1	0,081	0,099	0,054
	17	/	/	/	/	/	/
Media	0,0984	0,0794	0,0872	0,0782	0,0852	0,0634	
"Dosis alta"	18	0,049	0,081	0,09	0,066	0,035	0,06
	19	/	/	/	/	/	/
	20	0,035	0,077	0,087	0,072	0,097	0,071
	21	0,085	0,122	0,12	0,115	0,125	0,081
	22	/	/	/	/	/	/
	23	/	/	/	/	/	/
	24	0,123	0,082	0,086	0,075	0,08	0,071
	25	/	/	/	/	/	/
	26	0,102	0,094	0,082	0,075	0,096	0,062
	27	/	/	/	/	/	/
	28	0,09	0,076	0,038	0,07	0,098	0,063
	29	0,108	0,086	0,096	0,083	0,112	0,064
	30	/	/	/	/	/	/
Media	0,0846	0,0883	0,0856	0,0794	0,0919	0,0674	

Tabla X.5. Resultados de la producción basal inespecífica del IFN- γ_0 en las ovejas adultas. Valores de cada animal y media de los diferentes grupos experimentales en los diferentes muestreos. El nivel del IFN- γ_0 producido se obtuvo de la absorbancia de cada plasma incubado con PBS. Iden: Identificación. D.O.: Densidad Óptica. (Continuación).

Grupo	Iden.	IFN- γ_0 : D.O. PBS							
		0 dpi	15 dpi	30 dpi	45 dpi	60 dpi	75 dpi	90 dpi	110 dpi
Control	31	0,068	0,074	0,082	0,037	0,035	0,04	0,036	0,039
	32	0,085	0,079	0,087	0,07	0,039	0,04	0,036	0,04
	34	0,076	0,071	0,077	0,081	0,049	0,072	0,038	0,04
	35	0,078	0,066	0,079	0,082	0,057	0,072	0,037	0,038
	36	0,068	0,068	0,077	0,072	0,07	0,079	0,037	0,04
	37	0,07	0,067	0,078	0,082	0,101	0,083	0,041	0,04
	38	0,063	0,072	0,08	0,076	0,052	0,058	0,058	0,039
	Media	0,0726	0,0710	0,0800	0,0714	0,0576	0,0634	0,0404	0,0394
"Dosis baja"	39	0,064	0,075	0,108	0,089	0,051	0,07	0,04	0,041
	40	0,066	0,062	0,081	0,079	0,051	0,065	0,052	0,051
	41	0,078	0,067	0,085	0,082	0,056	0,075	0,055	0,039
	42	0,07	0,083	0,079	0,104	0,059	0,073	0,037	0,037
	43	0,067	0,078	0,079	0,079	0,051	0,064	0,056	0,039
	44	0,063	0,069	0,082	0,083	0,052	0,089	0,036	0,04
	45	0,076	0,068	0,094	0,089	0,048	0,071	0,038	0,04
	46	0,075	0,085	0,076	0,096	0,057	0,067	0,049	0,058
	Media	0,0699	0,0734	0,0855	0,0876	0,0531	0,0718	0,0454	0,0431
"Dosis alta"	47	0,079	0,067	0,095	0,098	0,053	0,077	0,041	0,037
	48	0,072	0,082	0,11	0,092	0,054	0,07	0,073	0,037
	49	0,068	0,088	0,1	0,092	0,055	0,069	0,064	0,043
	50	0,064	0,074	0,126	0,082	0,052	0,059	0,04	0,038
	51	0,068	0,082	0,1	0,091	0,056	0,066	0,039	0,041
	52	0,084	0,082	0,111	0,102	0,056	0,061	0,064	0,051
	53	0,093	0,075	0,101	0,085	0,056	0,057	0,037	0,046
	54	0,076	0,102	0,105	0,082	0,054	0,064	0,037	0,04
	Media	0,076	0,082	0,106	0,091	0,055	0,065	0,049	0,042

Tabla X.6. Resultados de la producción basal inespecífica del IFN- γ_0 en los corderos. Valores de cada animal y media de los diferentes grupos experimentales en los diferentes muestreos. El nivel del IFN- γ_0 producido se obtuvo de la absorbancia de cada plasma incubado con PBS. Iden: Identificación. D.O.: Densidad Óptica. (Continúa).

Grupo	Iden.	IFN- γ_0 : D.O. PBS					
		130 dpi	145 dpi	160 dpi	175 dpi	195 dpi	210 dpi
Control	31	/	/	/	/	/	/
	32	/	/	/	/	/	/
	34	0,038	0,049	0,04	0,08	0,04	0,0595
	35	/	/	/	/	/	/
	36	0,036	0,049	0,038	0,036	0,036	0,055
	37	0,049	0,044	0,037	0,035	0,038	0,0435
	38	0,041	0,045	0,044	0,032	0,04	0,042
	Media	0,0410	0,0468	0,0398	0,0458	0,0385	0,0500
"Dosis baja"	39	/	/	/	/	/	/
	40	0,035	0,05	0,035	0,035	0,036	0,04
	41	/	/	/	/	/	/
	42	0,038	0,042	0,046	0,036	0,036	0,041
	43	0,039	0,037	0,035	0,037	0,042	0,0485
	44	0,039	0,038	0,035	0,039	0,039	0,055
	45	/	/	/	/	/	/
	46	0,041	0,039	0,036	0,034	0,036	0,042
	Media	0,0384	0,0412	0,0374	0,0362	0,0378	0,0453
"Dosis alta"	47	/	/	/	/	/	/
	48	0,035	0,038	0,037	0,037	0,06	0,0385
	49	0,037	0,039	0,036	0,038	0,056	0,038
	50	0,037	0,045	0,034	0,036	0,037	0,0395
	51	/	/	/	/	/	/
	52	0,037	0,037	0,033	0,046	0,051	0,038
	53	0,035	0,036	0,038	0,036	0,038	0,033
	54	/	/	/	/	/	/
	Media	0,036	0,039	0,036	0,039	0,048	0,037

Tabla X.6. Resultados de la producción basal inespecífica del IFN- γ_0 en los corderos. Valores de cada animal y media de los diferentes grupos experimentales en los diferentes muestreos. El nivel del IFN- γ_0 producido se obtuvo de la absorbancia de cada plasma incubado con PBS. Iden: Identificación. D.O.: Densidad Óptica. (Continuación).

Grupo	Iden.	IFN- γ : D.O. PPD aviar							
		0 dpi	15 dpi	30 dpi	45 dpi	60 dpi	75 dpi	90 dpi	110 dpi
Control	1	0,039	0,040	0,066	0,039	0,120	0,141	0,092	0,051
	2	0,065	0,041	0,055	0,179	0,049	0,047	0,042	/
	3	0,123	0,074	0,113	0,141	0,040	0,109	0,104	/
	5	0,041	0,101	0,083	0,075	0,040	0,057	0,102	0,051
	6	0,039	0,041	0,074	0,038	0,132	0,166	0,123	/
	7	0,040	0,038	0,038	0,043	0,038	0,049	0,100	/
	Media	0,058	0,056	0,072	0,086	0,070	0,095	0,094	0,051
"Dosis baja"	8	0,090	0,105	0,072	0,105	0,204	0,037	0,121	0,091
	10	0,118	0,126	0,081	0,090	0,095	0,151	0,038	/
	11	0,104	0,089	0,074	0,098	0,096	0,052	0,034	/
	12	0,087	0,117	0,119	0,081	0,036	0,046	0,043	/
	13	0,162	0,095	0,075	0,142	0,038	0,050	0,039	0,256
	14	0,100	0,148	0,115	0,039	0,037	0,134	0,116	0,102
	15	0,097	0,085	0,073	0,119	0,037	0,060	0,168	/
	16	0,039	0,046	0,044	0,113	0,039	0,040	0,036	/
	17	0,083	0,041	0,036	0,125	0,040	0,042	0,111	0,036
	Media	0,098	0,095	0,077	0,101	0,069	0,068	0,078	0,122
"Dosis alta"	18	0,618	0,134	0,186	0,403	2,063	1,608	0,471	/
	19	0,084	0,035	0,057	0,144	0,075	0,251	0,896	0,179
	20	0,181	0,258	1,463	1,865	1,449	0,859	0,438	/
	21	0,108	0,124	0,044	0,058	0,113	0,194	0,150	/
	22	0,121	0,057	0,156	0,153	0,284	0,081	0,230	0,330
	23	0,093	0,037	0,048	0,414	0,176	0,221	0,136	0,825
	24	0,176	0,244	0,466	0,215	0,467	0,409	0,878	/
	25	0,097	0,097	0,138	0,050	0,104	0,231	0,159	0,116
	26	0,102	0,160	0,122	0,352	0,654	0,820	0,475	/
	27	0,174	0,163	0,557	0,665	0,752	0,910	0,863	0,842
	28	0,133	0,118	0,059	0,097	0,055	0,075	0,223	/
	29	0,128	0,231	0,962	1,040	0,960	0,340	0,173	/
	30	0,495	0,379	0,695	1,003	1,067	0,965	0,877	1,594
Media	0,193	0,157	0,381	0,497	0,632	0,536	0,459	0,648	

Tabla X.7. Resultados de la secreción específica bruta del IFN- γ en las ovejas adultas. Valores de cada animal y media de los diferentes grupos experimentales en los diferentes muestreos. El nivel del IFN- γ producido que se muestra es el valor de la absorbancia de cada plasma incubado con PPD aviar. Iden: Identificación. D.O.: Densidad Óptica. (Continúa).

Grupo	Iden.	IFN- γ : D.O. PPD aviar					
		130 dpi	145 dpi	160 dpi	175 dpi	195 dpi	210 dpi
Control	1	/	/	/	/	/	/
	2	0,061	0,038	0,040	0,092	0,040	0,184
	3	0,114	0,090	0,098	0,065	0,094	0,068
	5	/	/	/	/	/	/
	6	0,093	0,088	0,066	0,073	0,087	0,079
	7	0,107	0,099	0,100	0,103	0,090	0,068
	Media	0,094	0,079	0,076	0,083	0,078	0,100
"Dosis baja"	8	/	/	/	/	/	/
	10	0,074	0,083	0,103	0,076	0,088	0,072
	11	0,099	0,082	0,074	0,068	0,083	0,058
	12	0,115	0,081	0,093	0,087	0,131	0,070
	13	/	/	/	/	/	/
	14	/	/	/	/	/	/
	15	0,143	0,089	0,086	0,081	0,085	0,058
	16	0,141	0,092	0,108	0,069	0,091	0,071
	Media	0,114	0,086	0,093	0,076	0,096	0,066
"Dosis alta"	18	0,479	0,808	0,827	0,255	0,270	0,197
	19	/	/	/	/	/	/
	20	0,377	0,561	0,398	0,366	0,710	0,200
	21	0,444	0,267	0,257	0,214	0,255	0,105
	22	/	/	/	/	/	/
	23	/	/	/	/	/	/
	24	0,859	0,394	0,519	0,278	0,538	0,143
	25	/	/	/	/	/	/
	26	0,364	0,224	0,288	0,182	0,311	0,089
	27	/	/	/	/	/	/
	28	0,214	0,188	0,073	0,141	0,307	0,097
	29	0,267	0,221	0,390	0,168	0,444	0,102
	Media	0,429	0,380	0,393	0,229	0,405	0,133

Tabla X.7. Resultados de la secreción específica bruta del IFN- γ en las ovejas adultas. Valores de cada animal y media de los diferentes grupos experimentales en los diferentes muestreos. El nivel del IFN- γ producido que se muestra es el valor de de la absorbancia de cada plasma incubado con PPD aviar. Iden: Identificación. D.O.: Densidad Óptica. (Continuación).

Grupo	Iden.	IFN- γ : D.O. PPD aviar							
		0 dpi	15 dpi	30 dpi	45 dpi	60 dpi	75 dpi	90 dpi	110 dpi
Control	31	0,067	0,078	0,080	0,037	0,048	0,036	0,039	0,041
	32	0,089	0,099	0,090	0,071	0,040	0,040	0,039	0,049
	34	0,074	0,070	0,076	0,079	0,053	0,073	0,038	0,043
	35	0,068	0,071	0,077	0,069	0,051	0,074	0,037	0,040
	36	0,065	0,066	0,074	0,084	0,065	0,072	0,041	0,038
	37	0,071	0,062	0,075	0,077	0,066	0,079	0,039	0,041
	38	0,065	0,071	0,078	0,071	0,048	0,060	0,056	0,041
	Media	0,071	0,074	0,079	0,070	0,053	0,062	0,041	0,042
"Dosis baja"	39	0,065	0,081	0,123	0,087	0,052	0,071	0,038	0,038
	40	0,064	0,068	0,082	0,081	0,059	0,066	0,050	0,039
	41	0,085	0,072	0,126	0,076	0,088	0,082	0,063	0,039
	42	0,065	0,081	0,081	0,103	0,055	0,072	0,040	0,040
	43	0,074	0,084	0,078	0,081	0,052	0,065	0,060	0,039
	44	0,071	0,069	0,081	0,077	0,047	0,091	0,037	0,038
	45	0,079	0,070	0,090	0,088	0,049	0,067	0,041	0,038
	46	0,069	0,090	0,080	0,097	0,055	0,068	0,067	0,041
	Media	0,071	0,077	0,093	0,086	0,057	0,073	0,049	0,039
"Dosis alta"	47	0,074	0,075	0,094	0,096	0,051	0,088	0,071	0,083
	48	0,074	0,072	0,098	0,100	0,053	0,068	0,061	0,077
	49	0,074	0,128	0,108	0,075	0,062	0,072	0,126	0,126
	50	0,067	0,069	0,105	0,083	0,072	0,100	0,233	0,117
	51	0,076	0,076	0,099	0,089	0,071	0,101	0,810	0,916
	52	0,081	0,074	0,093	0,104	0,067	0,073	0,541	0,979
	53	0,084	0,078	0,105	0,088	0,059	0,066	0,047	0,086
	54	0,071	0,074	0,092	0,095	0,068	0,095	0,247	0,217
	Media	0,075	0,081	0,099	0,091	0,063	0,083	0,267	0,325

Tabla X.8. Resultados de la secreción específica bruta del IFN- γ en los corderos. Valores de cada animal y media de los diferentes grupos experimentales en los diferentes muestreos. El nivel del IFN- γ producido que se muestra es el valor de de la absorbancia de cada plasma incubado con PPD aviar. Iden: Identificación. D.O.: Densidad Óptica. (Continúa).

Grupo	Iden.	IFN- γ : D.O. PPD aviar					
		130 dpi	145 dpi	160 dpi	175 dpi	195 dpi	210 dpi
Control	31	/	/	/	/	/	/
	32	/	/	/	/	/	/
	34	0,044	0,056	0,048	0,038	0,034	0,057
	35	/	/	/	/	/	/
	36	0,041	0,050	0,038	0,036	0,033	0,046
	37	0,046	0,046	0,064	0,037	0,038	0,041
	38	0,045	0,040	0,038	0,044	0,042	0,048
	Media	0,044	0,048	0,047	0,039	0,037	0,048
"Dosis baja"	39	/	/	/	/	/	/
	40	0,035	0,040	0,038	0,037	0,040	0,042
	41	/	/	/	/	/	/
	42	0,040	0,039	0,035	0,036	0,039	0,043
	43	0,039	0,040	0,035	0,038	0,046	0,047
	44	0,038	0,042	0,099	0,077	0,035	0,042
	45	/	/	/	/	/	/
	46	0,048	0,036	0,041	0,036	0,042	0,043
	Media	0,040	0,039	0,049	0,045	0,040	0,043
"Dosis alta"	47	/	/	/	/	/	/
	48	0,066	0,090	0,058	0,077	0,194	0,086
	49	0,073	0,053	0,270	0,142	0,547	0,154
	50	0,056	0,078	0,055	0,065	0,059	0,088
	51	/	/	/	/	/	/
	52	0,242	0,506	0,283	0,352	0,403	0,209
	53	0,063	0,047	0,177	0,134	0,112	0,104
	54	/	/	/	/	/	/
	Media	0,100	0,155	0,169	0,154	0,263	0,128

Tabla X.8. Resultados de la secreción específica bruta del IFN- γ en los corderos. Valores de cada animal y media de los diferentes grupos experimentales en los diferentes muestreos. El nivel del IFN- γ producido que se muestra es el valor de de la absorbancia de cada plasma incubado con PPD aviar. Iden: Identificación. D.O.: Densidad Óptica. (Continuación).

Grupo	Iden.	90 dpi		195 dpi	
		PPD aviar	PPD bovina	PPD aviar	PPD bovina
Control	1	2	1	/	/
	2	0,5	0	1	1
	3	0,5	0	2	1,5
	5	2	1	/	/
	6	2	1	2	2
	7	0	1	1	1
Valor medio		1,16	0,66	1,5	1,375
"Dosis baja"	8	2	0,5	/	/
	10	1,5	0	1,5	0,5
	11	2	0	0,5	0,5
	12	3	1,5	3	0
	13	2	0,5	/	/
	14	2	0,5	/	/
	15	3	1	1,5	1,5
	16	1	2,5	5,5	2,5
17	0,5	0	/	/	
Valor medio		2,11	0,72	2,4	1
"Dosis alta"	18	5,5	1,5	5,5	3,5
	19	7	1,5	/	/
	20	7	3	4	2
	21	5,5	1	3	0,5
	22	4,5	3	/	/
	23	9	1	/	/
	24	5	2	5,5	1,5
	25	5,5	2	/	/
	26	12	1	6	0,5
	27	9	2	/	/
	28	6	0	2	2
	29	7,5	0	6	0,5
30	7,5	1,5	/	/	
Valor medio		7	1,5	4,57	1,786

Tabla X.9. Test de IDR comparada en ovejas a los 90 y 195 dpi. Valores del incremento de grosor (en mm) del pliegue anocaudal a las 72 horas de la inoculación con PPD aviar y PPD bovina, respectivamente, y promedio de cada grupo experimental.

Grupo	Iden.	90 dpi		195 dpi	
		PPD aviar	PPD bovina	PPD aviar	PPD bovina
Control	31	0	0	/	/
	32	0,5	0	/	/
	34	0,5	0,5	0,5	0,5
	35	0	0	/	/
	36	0,5	0	0	0
	37	0	0	0,5	0,5
	38	0	0	0,5	0
Valor medio		0,2143	0,0714	0,375	0,25
"Dosis baja"	39	0	0	/	/
	40	0	0	1	1
	41	0	0	/	/
	42	0	0	0	0
	43	0	0	1,5	1,5
	44	0	0	0	0
	45	0	0,5	/	/
46	0	0	0	0	
Valor medio		0	0,0625	0,5	0,5
"Dosis alta"	47	2	0,5	/	/
	48	1,5	0,5	3	2
	49	2	0	5	2,5
	50	6	2,5	5,5	2
	51	7	2,5	/	/
	52	3,5	1,5	5,5	2
	53	2	1	2	2,5
	54	3	1	/	/
Valor medio		3,375	1,1875	4,2	2,2

Tabla X.10. Test de IDR comparada en corderos a los 90 y 195 dpi. Valores del incremento de grosor (en mm) del pliegue anocaudal a las 72 horas de la inoculación con PPD aviar y PPD bovina, respectivamente, y promedio de cada grupo experimental.

Grupo	Fecha	Iden.	Cociente D.O. PPD aviar/ D.O. PBS					
			Linfocitos			Tejidos		
			ILd	PPY	NLMC	ILd	PPY	NLMC
Control	100-120 dpi	31	0,55	0,55	2,64	0,78	0,96	1,07
		32	0,99	0,92	0,94	0,99	0,94	0,79
		35	0,68	0,68	3,03	0,95	1,06	1,01
	Valor medio		0,753	0,716	2,203	0,906	0,986	0,956
	210-220 dpi	34	0,9	0,8	1,17	1	0,96	0,96
		36	1,3	0,51	0,94	1,06	1,02	1,05
		37	0,58	0,87	0,97	0,9	0,88	1,14
		38	0,75	0,1	0,96	0,8	1	0,83
	Valor medio		0,882	0,57	1,01	0,94	0,965	0,995
	"Dosis baja"	100-120 dpi	39	1,03	0,95	0,97	0,53	0,98
41			0,69	0,69	0,97	0,95	1,02	0,94
45			1,29	1,17	1,04	1,04	0,88	0,88
Valor medio		1	0,936	0,993	0,84	0,96	0,813	
210-220 dpi		40	0,31	1,10	0,42	0,86	0,93	0,89
		42	0,13	0,77	0,82	1,30	1,06	1,11
		43	1,13	0,96	0,94	0,87	1,12	0,86
		44	0,97	0,83	1	0,84	1,02	1,01
		46	1,28	0,61	0,02	1,10	0,96	1,02
Valor medio		0,764	0,854	0,64	0,994	1,018	0,978	
"Dosis alta"	100-120 dpi	47	1,08	11,26	1,04	0,8	0,88	0,97
		51	0,98	0,5	0,94	0,93	0,97	1,16
		54	1,03	0,89	0,87	1,05	0,96	0,73
	Valor medio		1,03	4,22	0,95	0,93	0,94	0,95
	210-220 dpi	48	0,86	0,56	0,59	0,97	0,95	0,86
		49	0,88	0,8	0,06	1,11	1	0,85
		50	1,03	0,93	0,89	1,08	0,97	0,9
		52	0,75	2,21	1,6	1,08	1,04	/
		53	0,27	0,74	0,66	1,11	1,16	1,11
	Valor medio		0,758	1,05	0,76	1,07	1,024	0,93

Tabla X.11. Secreción *in vitro* de IFN- γ por los linfocitos y tejidos propio de ILd, PPY y NLMC de los corderos. Valores obtenidos mediante el cociente de densidad óptica entre el pocillo estimulado con PPD aviar y el mismo estimulado con PBS, así como valor promedio de cada grupo experimental en cada sacrificio. Iden: Identificación. D.O.: Densidad Óptica. ILd: Ileon distal; PPY: Placa de Peyer yeyunal; NLMC: Nódulo linfático mesentérico caudal.

Grupo	Fecha	Iden.	Cociente D.O. PPD aviar / D.O. PBS						
			Linfocitos			Tejidos			
			ILd	PPY	NLMC	ILd	PPY	NLMC	
Control	100-120 dpi	1	0,68	0,71	1,14	1,04	0,97	0,92	
		5	0,85	0,41	0,72	0,96	1,13	0,75	
	Valor medio		0,765	0,56	0,93	1	1,05	0,83	
	210-220 dpi	2	1,1	0,91	0,92	0,85	1,06	0,93	
		3	1,10	0,58	0,56	0,76	0,97	1,06	
		6	1,06	0,94	0,03	1,02	1,02	1,02	
		7	1,28	1,04	0,03	0,88	1,04	1,06	
	Valor medio		1,135	0,867	0,385	0,877	1,022	1,017	
	"Dosis baja"	100-120 dpi	8	0,97	1,03	1	0,91	0,94	1,30
			13	1,13	0,8	1,02	0,87	0,95	0,64
14			0,97	0,83	0,04	1,14	1,06	0,84	
17			1,03	0,93	0,45	1,02	1,21	0,68	
Valor medio		1,025	0,897	0,627	0,985	1,04	0,38		
210-220 dpi		10	1,04	0,99	0,43	0,99	1,11	0,90	
		11	0,79	0,84	0,58	0,95	1,03	0,64	
		12	0,81	0,98	0,20	1,05	0,91	0,76	
		15	0,65	0,86	0,15	0,83	0,95	0,79	
16		0,86	1,03	0,07	0,95	0,45	0,89		
Valor medio		0,83	0,94	0,286	0,954	0,89	0,796		
"Dosis alta"		100-120 dpi	19	0,87	1,04	0,25	0,83	0,99	5,71
			22	0,98	0,93	7,89	0,89	0,84	0,93
			23	0,75	0,17	0,33	1,04	0,92	0,97
	25		1	0,91	0,13	1,01	0,75	0,7	
	27		1,21	0,94	10,95	1,05	0,87	0,94	
	30		0,96	1,03	4,33	0,92	1	0,93	
	Valor medio		0,96	0,84	3,98	0,96	0,895	1,7	
	210-220 dpi	18	1,08	0,47	0,29	1,01	0,52	1,05	
		20	1,1	1,69	0,17	0,78	0,77	1,4	
		21	0,9	0,96	0,7	0,72	0,96	4,82	
		24	1,01	0,68	4,16	1,14	1,29	0,93	
		26	1,01	1,06	0,75	1,28	1,03	0,98	
		28	1,04	0,77	25,77	0,92	0,92	0,22	
		29	0,42	1,07	1,28	1,04	0,93	0,92	
Valor medio		0,94	0,96	4,73	0,98	0,917	1,47		

Tabla X.12. Secreción *in vitro* de IFN- γ por los linfocitos y tejidos propio de ILd, PPY y NLMC de las ovejas. Valores obtenidos mediante el cociente de densidad óptica entre el pocillo estimulado con PPD aviar y el mismo estimulado con PBS, así como valor promedio de cada grupo experimental en cada sacrificio. Iden: Identificación. D.O.: Densidad Óptica; ILd: Ileon distal; PPY: Placa de Peyer yeyunal; NLMC: Nódulo linfático mesentérico caudal.

Grupo:	Iden:	Tej:	Nivel de expresión génica: valores netos						
			TLR2	IL17	TNF γ	IL1 β	IL6	IL12	
C	31	ILd	0,91	0	1,10	0,15	0	0,14	
		PPY	0,44	0	0,64	0,57	0	0	
		NLM	1,51	0,08	1,80	1,56	2,60	3,87	
	34	ILd	0,80	0,15	2,18	1,72	0,58	0,54	
		PPJ	0,19	0	0,39	1,24	0,16	0,46	
		NLM	1,29	0	1,97	0,35	0,82	3,43	
	38	ILd	1,51	0	0,88	0,76	0,43	0,38	
		PPJ	0,37	0,46	0,28	0,18	0,62	0,66	
		NLM	0,72	0	0,95	0,98	0,57	0,55	
SL	39	PPJ	1,60	0	1,33	0	0	0	
		NLM	0,52	0	1,48	0,65	0,85	2,96	
	40	ILd	1,12	0	1,27	0,58	0	0,44	
		PPY	0,17	0	0,31	0,12	0	0,15	
		NLM	0,71	0	1,61	0,58	0,46	2,94	
	44	ILd	1,80	0	0,37	0	0,53	0,52	
		PPJ	2,33	0	0	1,69	0	0	
		NLM	0,00	0	0	0	0	0	
	F	50	ILd	1,27	0,21	0,79	1,07	0,84	0,59
PPJ			0,87	0	1,11	0,52	0,41	1,04	
NLM			1,15	0,00	0,68	0,34	0,25	1,20	
53		ILd	0,40	0,10	0,70	0,76	0,25	0,29	
		PPJ	0,57	0	1,23	0,65	0,00	0,57	
		NLM	0,43	0	1,10	0,44	1,44	3,29	
22		ILd	0,74	0,36	0,83	2,18	1,13	1,18	
		PPJ	0,27	0,00	0,46	1,22	0	0,66	
		NLM	2,15	0	1,41	0,68	1,47	2,37	
23		NLM	1,81	0	1,23	0,46	0,34	5,85	
29		ILd	4,97	0	0	0,72	0,82	5,74	
		PPJ	1,03	0	0,87	0,12	0,83	1,33	
		NLM	3,25	0	0,84	0,27	2,06	2,90	
MFa		47	ILd	4,82	0	0	0	0	0
			PPJ	0,50	0	0,74	0,45	0,12	0,29
	NLM		0,41	0	1,17	0,56	0,50	1,83	
	52	ILd	0,23	0	0,44	0,31	0,41	0,52	
		PPJ	0,31	0	0,29	0,49	0,00	0,41	
		NLM	1,05	0	3,12	0,40	0,81	2,61	
	28	ILd	2,40	0	0,45	0,72	0	0	
		NLM	1,47	0	1,73	0,55	1,56	6,13	
	MFb	48	ILd	0,84	0	1,01	0,44	0,44	0,51
NLM			0,52	0	0,91	0,00	0,53	0,93	
49		ILd	0,59	0,04	0,65	0,54	0,22	0,22	
		PPJ	0,77	0,26	1,26	0,35	0,46	0,63	
		NLM	0,29	0	0,29	0,08	0,26	0,53	
51		NLM	1,80	0,83	3,04	0,71	0	1,58	
54		ILd	0,40	0	1,06	0,45	0,32	0,14	
		PPJ	0,72	0	0,54	0,56	0	0,70	

Tabla X.13. Valor individual neto del nivel de expresión génica de cada muestra en cada gen, tras su cuantificación mediante qPCR, normalización con los genes de referencia GAPDH, HPRT y HK5.1 y posterior análisis mediante el programa Qbaseplus (Biogazelle©, Gante, Bélgica). Iden: Identificación. Tej: Tejido estudiado; C: Grupo control; SL: Grupo de animales infectados sin lesión; F: Lesión focal; MFa: Lesión Multifocal a; MFb: Lesión multifocal b; ILd: Ileon distal; PPY: Placa de Peyer yeyunal; NLM: Nódulo linfático mesentérico caudal. (Continúa).

Grupo:	Iden:	Tej:	Nivel de expresión génica: valores netos					
			IFN γ	IL13	IL4	IL10	FoxP3	
C	31	ILd	0,08	0	0,18	0,44	0	
		PPY	0,31	0	0,56	0	0	
		NLM	0,31	0,09	0,73	2,11	0,91	
	34	ILd	0,44	0,14	1,43	1,81	0	
		PPJ	0,65	0	0,32	0,80	0	
		NLM	1,71	0	6,93	0	0	
	38	ILd	2,50	0	1,19	0,57	0	
		PPJ	1,58	0	0,51	0	0	
		NLM	0,21	0	0,96	1,30	0,21	
SL	39	PPJ	1,26	0	6,97	1,24	0	
		NLM	0,72	0	2,18	1,20	0	
	40	ILd	2,22	0	0,96	0	0	
		PPY	2,03	0	0,98	0,23	0	
		NLM	1,39	0,26	1,77	1,45	0,12	
	44	ILd	1,32	0	1,90	0	0	
		PPJ	2,76	0	0	0	0	
		NLM	0,67	0	0	0	0	
	F	50	ILd	0,72	0,05	0,52	0,94	0
PPJ			0,69	0,75	0,95	0,73	0	
NLM			0,49	0,24	3,07	0,55	0	
53		ILd	0,46	0,00	0,26	0,00	0,09	
		PPJ	1,10	0,32	1,07	0,42	0	
		NLM	1,33	0	2,85	0,15	0	
22		ILd	1,08	0	0,31	1,06	0	
		PPJ	0,90	0	0,53	0	0	
		NLM	0,87	0	1,81	2,04	0	
23		NLM	0,88	0	1,21	1,79	0	
29		ILd	0,70	0	1,12	0,00	0	
		PPJ	1,54	0	0,79	0,61	0	
		NLM	1,08	0	3,07	0,51	0	
MFa		47	ILd	1,28	0	0	0	8,87
			PPJ	0,27	0	0,62	0,85	0
	NLM		0,32	0,26	0,61	1,52	0,23	
	52	ILd	0,85	0	0,94	0,47	0	
		PPJ	0,52	0	0,23	0,33	0	
		NLM	0,96	0	3,20	0,81	0	
	28	ILd	0,83	0	1,01	0,64	0	
		NLM	1,32	0	3,50	0,59	0	
	MFb	48	ILd	1,14	0	1,13	0,54	0
NLM			0,64	0	3,16	0	0	
49		ILd	0,31	0	0,13	2,17	0,03	
		PPJ	1,76	0	1,08	0	0	
		NLM	0,86	0	1,02	0,29	0	
51		NLM	2,27	0,19	2,34	0,43	0	
54		ILd	0,42	0	0,11	1,85	0	
		PPJ	1,42	0	0,66	0,13	0	

Tabla X.13. Valor individual neto del nivel de expresión génica de cada muestra en cada gen, tras su cuantificación mediante qPCR, normalización con los genes de referencia GAPDH, HPRT y HK5.1 y posterior análisis mediante el programa Qbaseplus (Biogazelle©, Gante, Bélgica). Iden: Identificación. Tej: Tejido estudiado; C: Grupo control; SL: Grupo de animales infectados sin lesión; F: Lesión focal; MFa: Lesión Multifocal a; MFb: Lesión multifocal b; ; ILd: Ileon distal; PPY: Placa de Peyer yeyunal; NLM: Nódulo linfático mesentérico caudal. (Continuación).

Grupo:	Nivel de expresión génica: media de los valores netos										
	TLR2	IL17	TNF γ	IL1 β	IL6	IL12	IFN γ	IL13	IL4	IL10	FoxP3
C	0,86	0,08	1,13	0,83	0,64	1,11	0,87	0,02	1,42	0,78	0,12
SL	1,03	0	0,80	0,45	0,23	0,88	1,54	0,03	1,84	0,51	0,01
F	1,45	0,05	0,86	0,73	0,76	2,08	0,91	0,11	1,35	0,67	0,01
MFa	1,40	0,01	0,99	0,44	0,43	1,47	0,79	0,03	1,26	0,65	1,14
MFb	0,74	0,14	1,09	0,39	0,28	0,65	1,10	0,02	1,20	0,67	0,01

Tabla X.14. Media geométrica de los valores netos del nivel de expresión génica de cada grupo estudiado, en cada gen, tras su cuantificación mediante qPCR, normalización con los genes de referencia GAPDH, HPRT y HK5.1 y posterior análisis mediante el programa Qbaseplus (Biogazelle©, Gante, Bélgica). Se consideraron todas las muestras estudiadas dentro de cada grupo, sin distinguir entre los diferentes tejidos. C: Grupo control; SL: Grupo de animales infectados sin lesión; F: Lesión focal; MFa: Lesión Multifocal a; MFb: Lesión multifocal b.

Ileon distal											
Grupo:	Nivel de expresión génica: media de los valores netos										
	TLR2	IL17	TNF γ	IL1 β	IL6	IL12	IFN γ	IL13	IL4	IL10	FoxP3
C	1,07	0,05	1,39	0,88	0,34	0,35	1,01	0,05	0,93	0,94	0,00
SL	1,46	0,00	0,82	0,29	0,26	0,48	1,77	0,00	1,43	0,00	0,00
F	1,85	0,17	0,58	1,18	0,76	1,95	0,74	0,01	0,55	0,50	0,02
MFa	2,48	0,00	0,30	0,35	0,14	0,17	0,99	0,00	0,65	0,37	2,96
MFb	0,61	0,01	0,90	0,48	0,33	0,29	0,62	0,00	0,46	1,52	0,01

Tabla X.15. Media geométrica de los valores netos del nivel de expresión génica de cada grupo estudiado en el **Ileon distal**, en cada gen, tras su cuantificación mediante qPCR, normalización con los genes de referencia GAPDH, HPRT y HK5.1 y posterior análisis mediante el programa Qbaseplus (Biogazelle©, Gante, Bélgica). C: Grupo control; SL: Grupo de animales infectados sin lesión; F: Lesión focal; MFa: Lesión Multifocal a; MFb: Lesión multifocal b.

Placa de Peyer yeyunal											
Grupo:	Nivel de expresión génica: media de los valores netos										
	TLR2	IL17	TNF γ	IL1 β	IL6	IL12	IFN γ	IL13	IL4	IL10	FoxP3
C	0,33	0,15	0,43	0,66	0,26	0,37	0,85	0,00	0,46	0,27	0,00
SL	1,36	0,00	0,55	0,61	0,00	0,05	2,01	0,00	2,65	0,49	0,00
F	0,69	0,00	0,92	0,63	0,31	0,90	1,06	0,27	0,84	0,44	0,00
MFa	0,41	0,00	0,51	0,47	0,06	0,35	0,40	0,00	0,43	0,59	0,00
MFb	0,75	0,13	0,90	0,46	0,23	0,66	1,59	0,00	0,87	0,06	0,00

Tabla X.16. Media geométrica de los valores netos del nivel de expresión génica de cada grupo estudiado en la **placa de Peyer yeyunal**, en cada gen, tras su cuantificación mediante qPCR, normalización con los genes de referencia GAPDH, HPRT y HK5.1 y posterior análisis mediante el programa Qbaseplus (Biogazelle©, Gante, Bélgica). C: Grupo control; SL: Grupo de animales infectados sin lesión; F: Lesión focal; MFa: Lesión Multifocal a; MFb: Lesión multifocal b.

Nódulo linfático mesentérico caudal											
Grupo:	Nivel de expresión génica: media de los valores netos										
	TLR2	IL17	TNFγ	IL1β	IL6	IL12	IFNγ	IL13	IL4	IL10	FoxP3
C	1,18	0,03	1,57	0,96	1,33	2,62	0,74	0,03	2,87	1,14	0,37
SL	0,41	0,00	1,03	0,41	0,44	1,96	0,92	0,09	1,32	0,89	0,04
F	1,76	0,00	1,05	0,44	1,12	3,12	0,93	0,05	2,40	1,01	0,00
MFa	0,98	0,02	2,00	0,51	0,96	3,52	0,87	0,09	2,44	0,97	0,08
MFb	0,87	0,28	1,41	0,26	0,26	1,02	1,25	0,06	2,17	0,24	0,00

Tabla X.17. Media geométrica de los valores netos del nivel de expresión génica de cada grupo estudiado en el **nódulo linfático mesentérico caudal**, en cada gen, tras su cuantificación mediante qPCR, normalización con los genes de referencia GAPDH, HPRT y HK5.1 y posterior análisis mediante el programa Qbaseplus (Biogazelle©, Gante, Bélgica). C: Grupo control; SL: Grupo de animales infectados sin lesión; F: Lesión focal; MFa: Lesión Multifocal a; MFb: Lesión multifocal b.