



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y LA
SALUD ANIMAL

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

EVALUACIÓN DE LA PROTEÍNA P35 COMO INMUNÓGENO EN
CONEJOS INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE CON
MYCOBACTERIUM AVIUM SUBESPECIE *PARATUBERCULOSIS*

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

M. en C. EDITH MALDONADO CASTRO

TUTOR: DR. CARLOS G. GUTIÉRREZ AGUILAR
(FMVZ-UNAM)

COMITÉ TUTORAL: DRA. BEATRIZ ARELLANO REYNOSO
(FMVZ-UNAM)

DRA. MARTA ALONSO-HEARN
(NEIKER, ESPAÑA)

CIUDAD DE MÉXICO, JUNIO DE 2024



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas

Tesis Digitales

Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



**PROTESTA UNIVERSITARIA DE INTEGRIDAD Y
HONESTIDAD ACADÉMICA Y PROFESIONAL
(Graduación con trabajo escrito)**

De conformidad con lo dispuesto en los artículos 87, fracción V, del Estatuto General, 68, primer párrafo, del Reglamento General de Estudios Universitarios y 26, fracción I, y 35 del Reglamento General de Exámenes, me comprometo en todo tiempo a honrar a la Institución y a cumplir con los principios establecidos en el Código de Ética de la Universidad Nacional Autónoma de México, especialmente con los de integridad y honestidad académica.

De acuerdo con lo anterior, manifiesto que el trabajo escrito titulado:

Evaluación de la proteína P35 como inmunógeno en conejos infectados experimentalmente con *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis*.

que presenté para obtener el grado de ----Doctorado---- es original, de mi autoría y lo realicé con el rigor metodológico exigido por mi programa de posgrado, citando las fuentes de ideas, textos, imágenes, gráficos u otro tipo de obras empleadas para su desarrollo.

En consecuencia, acepto que la falta de cumplimiento de las disposiciones reglamentarias y normativas de la Universidad, en particular las ya referidas en el Código de Ética, llevará a la nulidad de los actos de carácter académico administrativo del proceso de graduación.

Atentamente

Edith Maldonado Castro

No de cuenta: **096230413**

(Nombre, firma y Número de cuenta de la persona alumna)

DEDICATORIA

A mis hijos Bruno e Hiram, porque son mi más grande motor e inspiración. Gracias por todo su apoyo, paciencia y amor. Por todos los momentos que implicó invertir tiempo, esfuerzo, dedicación y no poder estar al 100 con ustedes. Para ustedes y por ustedes. Los amo.

A Jaime por estar, por tu apoyo y amor. Gracias por hacer lo necesario para mantener a tu familia unida. Vencimos momentos difíciles y aquí seguimos, trabajando en una mejor versión de nosotros mismos.

A mis padres por todo su cariño, apoyo, acompañamiento y palabras de aliento. Son un gran ejemplo para mí.

A Iveth, Alejandro y Ricardo que siempre han estado conmigo incentivándome, apoyándome en todos los sentidos, por su cariño, celebrando cada logro y por su disposición a siempre ayudarme cuando más lo necesito.

AGRADECIMIENTOS

A mi Comité tutorial: Dra. Beatriz Arellano R y la Dra. Marta Alonso Hearn; por todas las valiosas aportaciones que realizaron a este trabajo y a mi formación académica. Aprecio todo su apoyo, facilidades para concluir este proyecto y hacer más allá de lo que estuvo en sus posibilidades para llegar a este momento.

Al Dr. Carlos G Gutiérrez A, porque sin conocerme confió en mí, aceptó ser mi tutor y me ayudó a realizar este trabajo de doctorado con sus invaluable observaciones y aportaciones en mi formación profesional. Fue muy grata y enriquecedora la experiencia.

Al Dr. Gilberto Chávez Gris, por ser el autor intelectual de este trabajo, por sus aportaciones, por ayudarme a vencer los retos enfrentados durante este proyecto que me ha dejado mucho aprendizaje y satisfacciones, por tu amistad.

Al Dr. Karen Manoutcharyan, Dr. Juan Antonio Montaraz y Dr. Alfredo Sahagun por sus valiosas revisiones y aportaciones a este trabajo.

Al Dr. Karen Manoutcharyan, a la MB María Elena Zamudio y al Ing. Abel Blancas por su apoyo, colaboración y facilidades otorgadas para la realización del inmunógeno P35 expresado en el fago M13.

Al M. en C. Adolfo Ortiz R, por el diseño de las sondas y de las secuencias de los genes empleados en la técnica PCR tiempo real cuantitativa.

Al Dr. Edgar Meraz R y al Dr. Angel Pulido A, por su ayuda en el análisis estadístico y la edición de las gráficas.

A mi amiga y confidente Dra Carolina Segundo Z, por motivarme a hacer el doctorado, por todos los momentos que me escuchaste y me alentaste a seguir.

Al Dr Antonio Verdugo R, que de alguna u otra forma ha estado presente en mi formación desde su asesoría en la maestría.

A todo el personal de la USEDICO que me apoyó en la realización de los experimentos y en darme una palabra de aliento. Gracias también a quienes en su momento me ayudaron a cuidar a los

conejos. Gracias Olga y Brenda por su amistad y ser mi soporte cuando más lo necesité.

A tod@s mis compañer@s y amig@s del CEIEPAA por que siempre estuvieron animándome, por su acompañamiento y amistad en esta etapa.

Gracias a tod@s mis amig@s que tuve y sigo conservando en cada una de las etapas de mi vida. Son parte importante de mi red de apoyo. Gracias por hacer mis días más llevaderos con su amistad y todos los buenos momentos. Me siento bendecida al tenerl@s.

Gracias a mi amada casa de estudios, la Universidad Nacional Autónoma de México que me ha dado tanto!!!!.

Agradezco al Programa de Apoyos para la Superación del Personal Académico de la UNAM (PASPA)-DGAPA por otorgarme una beca para realizar mis estudios de doctorado.

Agradezco al
PROYECTO PAPIIT IT201221
“Evaluación de estrategias de control e impacto económico
empleando el inmunógeno P35 en rumiantes infectados
naturalmente con *Mycobacterium avium* subespecie
paratuberculosis”

Por el financiamiento otorgado para realizar esta tesis de doctorado.

“DETRÁS DE ALGUIEN QUE LLEGA LEJOS,
HAY UNA RED DE APOYO QUE MOTIVA”

“LA DISTANCIA ENTRE LOS SUEÑOS Y LA
REALIDAD, SE LLAMA DISCIPLINA”

“SOLO CON EL CORAZÓN SE PUEDE VER
BIEN, LO ESENCIAL ES INVISIBLE A LOS
OJOS”

El principito.

CARPE DIEM

Tabla de contenido

1. REVISIÓN DE LITERATURA	1
1.1. ANTECEDENTES HISTÓRICOS	1
1.2. ETIOLOGÍA.....	1
1.2.1 TIPOS DE CEPA DE MAP	2
1.2.3 CEPAS DESCRITAS EN MÉXICO	4
1.3 HOSPEDEROS DE MAP.....	5
1.3.1 INFECCIÓN NATURAL EN CONEJOS	5
1.4. TRANSMISIÓN.....	6
1.5 PATOGENIA	7
1.5.1 ENTRADA DE MAP EN EL HOSPEDERO.	7
1.5.2 SUPERVIVENCIA DE MAP DENTRO DE LOS MACRÓFAGOS.	7
1.5.3 FORMACIÓN DE LA LESIÓN GRANULOMATOSA	8
1.6 RESPUESTA INMUNE	11
1.6.1 RESPUESTA INMUNE INNATA DESARROLLADA FRENTE A MAP... 11	
1.6.2 RESPUESTA INMUNE ESPECÍFICA DESARROLLADA FRENTE A MAP.	12
1.7. SIGNOS CLÍNICOS.....	16
1.8. HALLAZGOS MACROSCÓPICOS	17
1.8.1 HALLAZGOS MICROSCÓPICOS.....	17
1.9 ENFERMEDAD DE CROHN	19
1.9.1 MAP Y SU RELACIÓN CON OTRAS ENFERMEDADES AUTOINMUNES EN HUMANOS.	20
1.10 DIAGNÓSTICO DE MAP	20
MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO DIRECTOS	21
1.10.1 CULTIVO BACTERIANO	21
1.10.1.2 IMPORTANCIA DE LA MICOBACTINA PARA EL CULTIVO DE MAP	22
1.10.2 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)	22
1.10.3 MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO INDIRECTOS	23
1.10.4 INTRADERMOREACCIÓN	24
1.10.5 INMUNOENSAYO ENZIMÁTICO (ELISA)	24

1.10.6 INMUNODIFUSIÓN EN GEL DE AGAROSA (IDGA) Y FIJACIÓN DEL COMPLEMENTO.....	25
1.11 IMPACTO ECONÓMICO.....	26
1.13. VACUNACIÓN CONTRA LA PARATUBERCULOSIS	27
1.13.1 SITUACIÓN DE LA VACUNACIÓN COMO ESTRATEGIA DE CONTROL DE PARATUBERCULOSIS EN MÉXICO	29
1.13.2 SISTEMAS EMPLEADOS PARA EL DESARROLLO DE VACUNAS ..	29
1.13.3 PROTEÍNAS ESPECÍFICAS E INMUNOGÉNICAS PRESENTES EN MAP Y EN <i>M. AVIUM</i> SUBESP. <i>AVIUM</i>	31
1.13.4 PROTEÍNA P35 de MAP	33
1.13.5 EMPLEO DE P35 COMO INMUNÓGENO.....	34
1.14.1 INFECCIÓN EN CONEJOS COMO MODELO EXPERIMENTAL	35
2. JUSTIFICACIÓN	55
2.1 HIPÓTESIS	55
2.2 OBJETIVO GENERAL	55
2.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	55
3. INTRODUCCIÓN.....	58
3.1 MATERIAL Y MÉTODOS	59
3.1.1 OBTENCIÓN DEL INMUNÓGENO P35 MEDIANTE EL SISTEMA DESPLIEGUE EN FAGO	59
3.1.2 CONEJO COMO MODELO ANIMAL PARA LA EVALUACIÓN DE LA P35	60
3.1.3 TRATAMIENTOS EXPERIMENTALES PARA LA EVALUACIÓN DE P35	61
3.1.4 INMUNIZACIÓN CON P35 Y FAGO M13 SIN LA PROTEÍNA P35.....	62
3.1.5 INFECCIÓN EXPERIMENTAL CON MAP CEPA C	62
3.1.6 TOMA DE MUESTRAS.....	62
3.1.7 DETECCIÓN DE IFN γ EN LEUCOCITOS.....	63
3.1.8 EXTRACCIÓN DE ADN A PARTIR DE MUESTRAS DE HECES.....	63
3.1.9 PCRq F57 A PARTIR DE HECES	64
3.1.10 DETECCIÓN DE ARNm PARA LA EXPRESIÓN DE TNF, IL-8, IL-10 E IL-12 A PARTIR DE SANGRE.....	64
3.1.10.1 OBTENCIÓN DE CÉLULAS MONONUCLEARES PERIFÉRICAS EN SANGRE	64
3.1.10.2 EXTRACCIÓN DE ARN TOTAL	65
3.1.10.3 SÍNTESIS DEL ADN COMPLEMENTARIO.....	65
3.1.10.4 CUANTIFICACIÓN DE ARNm MEDIANTE PCRq	65

3.1.11 ENSAYO INMUNOENZIMÁTICO (ELISA P35)	66
3.1.12 EUTANASIA DE LOS CONEJOS EN LOS GRUPOS EXPERIMENTALES	67
3.1.13 ESTUDIO ANATOMOPATOLÓGICO	67
3.1.14 CULTIVO BACTERIOLÓGICO	68
3.1.15 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	69
4. RESULTADOS	70
4.1 PRODUCCIÓN DEL INMUNÓGENO P35	70
DETECCIÓN DE IFN γ EN PLASMA	70
4.3 DETECCIÓN DE ARNm DE TNF α EN SANGRE.....	71
4.4 DETECCIÓN DE ARNm DE IL-8 EN CÉLULAS MONONUCLEARES EN SANGRE	72
4.5 DETECCIÓN DE ARNm DE IL-12 A PARTIR DE CÉLULAS MONONUCLEARES EN SANGRE.....	74
4.6 DETECCIÓN DE ARNm DE IL-10 EN CÉLULAS MONONUCLEARES EN SANGRE	75
4.7 CUANTIFICACIÓN DE LA EXCRECIÓN DE MICOBACTERIAS EN HECES	76
4.8 DETERMINACIÓN DE IgG TOTALES EN PLASMA	77
4.9 ESTUDIO ANATOMOPATOLÓGICO	78
4.10 CULTIVO BACTERIOLÓGICO A PARTIR DE TEJIDO	80
5. DISCUSIÓN	80
6. CONCLUSIONES GENERALES	91
7. BIBLIOGRAFÍA.....	93

INDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE EVENTOS QUE SE PRESENTAN DURANTE LA INFECCIÓN CON MAP Y LA RESPUESTA INMUNE EVOCADA.	10
FIGURA 2. DETERMINACIÓN DE IFN EN SANGRE DE GRUPOS EXPERIMENTALES INMUNIZADOS E INFECTADOS CON MAP CEPA C. (*) DIFERENCIAS ESTADÍSTICAMENTE SIGNIFICATIVAS (P<0.05).	71
FIGURA 3. DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE TNF α EN SANGRE DE GRUPOS EXPERIMENTALES INMUNIZADOS E INFECTADOS CON MAP CEPA C.	72
FIGURA 4. DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE IL-8 EN SANGRE DE GRUPOS EXPERIMENTALES INMUNIZADOS E INFECTADOS CON MAP CEPA C.	73
FIGURA 5. <i>DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE IL-12 EN SANGRE DE GRUPOS EXPERIMENTALES INMUNIZADOS E INFECTADOS CON MAP CEPA C.</i>	74
FIGURA 6. DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE IL-10 EN SANGRE DE GRUPOS EXPERIMENTALES INMUNIZADOS E INFECTADOS CON MAP CEPA C.	75
FIGURA 7. DETECCIÓN DE MAP EN HECES MEDIANTE PCRq F57 EN GRUPOS EXPERIMENTALES INMUNIZADOS CON P35 E INFECTADOS CON MAP CEPA C.	77
FIGURA 8. DETECCIÓN DE ANTICUERPOS TOTALES (DESCRITO EN DENSIDAD ÓPTICA) MEDIANTE ELISA P35 EN GRUPOS EXPERIMENTALES INMUNIZADOS CON P35 E INFECTADOS CON MAP CEPA C.	78
FIGURA 9. AISLAMIENTO BACTERIOLÓGICO DONDE SE OBSERVAN COLONIAS COMPATIBLES CON MAP.	80

INDICE DE CUADROS

CUADRO 1. CARACTERÍSTICAS LESIONALES DESCRITAS EN OVINOS, BOVINOS Y CONEJOS SILVESTRES INFECTADOS NATURALMENTE CON MAP.	18
CUADRO 2. ANTÍGENOS DESCRITOS EN MAP Y OTRAS MICOBACTERIAS, SIN REACCIÓN CRUZADA CON EL COMPLEJO TUBERCULOSIS.....	32
CUADRO 3. ESTUDIOS DE INFECCIÓN EXPERIMENTAL DE PARATUBERCULOSIS EN CONEJOS.	37
CUADRO 4. IDENTIFICACIÓN DE MUESTRAS TOMADAS DURANTE LA NECROPSIA DE CONEJOS PARA EL ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO Y CULTIVO BACTERIOLÓGICO.	68

ABREVIATURAS

ARNr: ácido ribonucleico ribosomal
BAAR: bacilo ácido alcohol resistente
CARD15: Caspase associated recruitment domain containing protein 15
ELISA: Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
HEYMJ: Herrold adicionado con yema de huevo y micobactina J
HPC: Hexadecilpiridinium cloruro
IFN: Interferon
JAK-STAT: Janus family kinase-signal transducer and activator of transcription
LPS: Lipopolisacárido
LSP: Large sequence polymorphisms
LTc: Linfocitos T citotóxicos
LTh: Linfocitos T helper
MAP: *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis*
MHC: Major histocompatibility complex
MIRU-VNTR: Mycobacterial interspersed repetitive units-Variable number tandem repeat
PAMPs: Pathogen-associated molecular patterns
PCR-REA: PCR-Restriction endonuclease analysis
PCR: Polymerase chain reaction
PFGE: Pulsed field gel electrophoresis
PI3P: Fosfatidil inositol 3 fosfato
PRRs: Pattern recognition receptors
PTB: Paratuberculosis
RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism
SNP: Single nucleotide polymorphism
SOCS: Supressor of cytokine signaling
TGF: Transforming growth factor
TLRs: Toll-like receptor
TNF: Tumor necrosis factor
UFC: Unidades Formadoras de Colonia
ZN: Ziehl Neelsen

RESUMEN

La paratuberculosis (PTB) es una enfermedad infecciosa de curso crónico causada por *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* (MAP). Su control es complicado debido a la limitada comprensión de su patogenia, el largo periodo de incubación, la dificultad en el diagnóstico y falta de modelos animales adecuados para la experimentación. Existe la necesidad de contar con un modelo animal que pueda reproducir eficiente y económicamente los signos clínicos de PTB, como la diarrea y las lesiones asociadas, similar a lo que ocurre con los rumiantes domésticos que son los hospederos naturales. A nivel experimental, los ratones y conejos, han sido las especies más empleadas como modelos animales. Sin embargo, los conejos han mostrado varias ventajas sobre el ratón, como el desarrollo de lesiones granulomatosas principalmente en *sacculus rotundus* y apéndice vermiforme tras la infección oral. Además, los conejos se infectan naturalmente con MAP y a diferencia de los ratones, tienen presentación de lesiones y signos clínicos. Por lo que el primer objetivo de este trabajo fue evaluar la capacidad de infección de la cepa C de MAP origen de oryx cimitarra (*Oryx dammah*) en conejos como modelo animal y desarrollar lesiones granulomatosas asociadas a PTB. Dos semanas después de la infección oral la MAP fue detectada por PCR IS900 en el 66.6% (2/3) de animales. El 100% fue positivo en muestras de intestino (PCR IS900) y heces (PCR F57) a las 29 semanas post infección. También se observó el desarrollo de lesiones granulomatosas en apéndice vermiforme y *sacculus rotundus*, así como cultivo bacteriológico positivo en el 100% de los casos (3/3) en apéndice vermiforme. Con estos resultados, se demostró la capacidad de infección de MAP cepa C de origen oryx en conejos y sugieren la posibilidad de la transmisión interespecie.

Por otra parte, las vacunas basadas en el empleo de MAP completo estimulan tanto la respuesta inmune celular como la humoral. Estas vacunas disminuyen la mortalidad, la excreción de micobacterias en heces y ocasiona un menor desarrollo de lesiones granulomatosas asociadas a PTB. Sin embargo, la respuesta inmunológica puede interferir con la campaña de control de tuberculosis bovina, por lo que aún existe la necesidad de contar con inmunógenos específicos

a MAP que no causen reacción cruzada contra *Mycobacterium* presente en el complejo tuberculosis. En el caso de PTB, se recomienda vacunar a los animales jóvenes antes de que entren en contacto con MAP. No obstante, también se ha demostrado que la inmunización de animales adultos infectados puede tener un efecto terapéutico.

El segundo objetivo fue evaluar la P35 de MAP como inmunógeno, de forma preventiva como terapéutica en conejos infectados experimentalmente con MAP cepa C. Para ello, se emplearon 5 grupos: 4INM-INF= inmunizados con P35 e infectados con MAP cepa C, 5INF-INM= infectados con MAP cepa C e inmunizados con P35 y 3M13= inmunizados con M13 e infectados con MAP cepa C, compuestos por 4 conejos cada uno y los grupos testigo, 1CON= sin tratamiento y grupo 2INF= infectados con MAP cepa C, con 3 conejos cada uno. Se observó que la mayor producción de IFN γ se dio en los grupos 4INM-INF y 5INF-INM a las 14 semanas post inmunización. La mayor expresión de TNF α fue en el grupo 4INM-INF, mientras que la expresión de IL-12 fue mayor en el grupo 5INF-INM. La expresión de IL-8 fue mayor en los grupos 4INM-INF y 5INF-INM a las 12 semanas post infección. En contraste, la expresión de IL-10 fue mayor en todos los grupos a las 28 semanas post inmunización, a excepción del grupo 1CON, consistente con el incremento en la detección de anticuerpos contra P35. Además, la excreción de micobacterias fue menor en los grupos 4INM-INF y 5INF-INM a las 22 semanas post inmunización. Finalmente, las lesiones granulomatosas en intestino fueron focales sin presencia de BAAR y sin aislamiento bacteriológico, en los grupos 4INM-INF y 5INF-INM. Esto demuestra la capacidad del inmunógeno P35 para generar una respuesta inmune tanto celular como humoral en conejos infectados experimentalmente. Por lo tanto, la P35 podría ser empleado como un candidato vacunal en rumiantes, sin interferir con el diagnóstico de tuberculosis bovina.

Palabras clave: Paratuberculosis, P35, infección experimental conejos, MAP cepa C, oryx, inmunización.

ABSTRACT

Paratuberculosis (PTB) is a chronic infectious disease caused by *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (MAP). Its control is complicated due to the limited understanding of its pathogenesis, the long incubation period, the difficulty in diagnosis and the lack of suitable animal models for experimentation. There is a need for an animal model that can efficiently and economically reproduce the clinical signs of PTB, such as diarrhea and associated lesions, similar to what occurs with domestic ruminants, which are natural hosts. At an experimental level, mice and rabbits have been the species most used as animal models. However, rabbits have shown several advantages over mice, such as the development of granulomatous lesions mainly in the *sacculus rotundus* and vermiform appendix after oral infection. Furthermore, rabbits are naturally infected with MAP and, unlike mice, have lesions and clinical signs. Therefore, the first objective of this work was to evaluate the infection capacity of MAP origin strain C of scimitar oryx (*Oryx dammah*) in rabbits as an animal model and to develop granulomatous lesions associated with PTB. Two weeks after oral infection, MAP was detected by PCR IS900 in 66.6% (2/3) of animals. 100% were positive in samples of intestine (PCR IS900) and feces (PCR F57) at 29 weeks post infection. The development of granulomatous lesions in the vermiform appendix and *sacculus rotundus* was also observed, as well as a positive bacteriological culture in 100% of the cases (3/3) in the vermiform appendix. With these results, the infection capacity of MAP strain C of oryx origin in rabbits was demonstrated and they suggest the possibility of interspecies transmission.

On the other hand, vaccines based on the use of complete MAP stimulate both the cellular and humoral immune responses. These vaccines reduce mortality, the excretion of mycobacteria in feces and cause less development of granulomatous lesions associated with PTB. However, the immune response can interfere with the bovine tuberculosis control campaign, so there is still a need for MAP-specific immunogens that do not cause cross-reaction against *Mycobacterium* present in the tuberculosis complex. In the case of PTB, it is recommended to vaccinate

young animals before they come into contact with MAP. However, it has also been shown that immunization of infected adult animals can have a therapeutic effect. The second objective was to evaluate the P35 of MAP as an immunogen, preventively and therapeutically in rabbits experimentally infected with MAP strain C. For this, 5 groups were used: 4INM-INF= immunized with P35 and infected with MAP strain C, 5INF-INM= infected with MAP strain C and immunized with P35 and 3M13= immunized with M13 and infected with MAP strain C, composed of 4 rabbits each and the control groups, 1CON= without treatment and group 2INF= infected with MAP strain C, with 3 rabbits each. It was observed that the highest production of IFN occurred in the 4INM-INF and 5INF-INM groups at 14 weeks post-immunization. The highest expression of TNF α was in the 4INM-INF group, while the expression of IL-12 was higher in the 5INF-INM group. The expression of IL-8 was higher in the 4INM-INF and 5INF-INM groups at 12 weeks post-infection. In contrast, IL-10 expression was higher in all groups at 28 weeks post-immunization, except for the 1CON group, consistent with the increase in the detection of antibodies against P35. Furthermore, the excretion of mycobacteria was lower in the 4INM-INF and 5INF-INM groups at 22 weeks post-immunization. Finally, the granulomatous lesions in the intestine were focal without the presence of AFB and without bacteriological isolation, in the 4INM-INF and 5INF-INM groups. This demonstrates the ability of the P35 immunogen to generate both a cellular and humoral immune response in experimentally infected rabbits. Therefore, P35 could be used as a vaccine candidate in ruminants, without interfering with the diagnosis of bovine tuberculosis.

Keywords:Paratuberculosis, P35, experimental rabbit infection, MAP strain C, oryx, immunization.

1. REVISIÓN DE LITERATURA

1.1. ANTECEDENTES HISTÓRICOS

En 1895 H. A. Johne y L. Frothingham observaron lesiones granulomatosas en intestino de una vaca afectada y al observar microorganismos ácido alcohol resistentes en secciones de la mucosa intestinal pensaron que se trataba de un caso atípico de tuberculosis aviar. Posteriormente, Bang en 1906 propuso que esta enfermedad fuera llamada enteritis pseudotuberculosa. En 1912, F. W. Twort identificó el agente etiológico en medios de cultivo y en 1914 logró reproducir la enfermedad de forma experimental nombrando a la bacteria *Mycobacterium enteritidis chronicae pseudotuberculosis bovis Johne*. Posteriormente, al observar que afectaba a otras especies además de los bovinos, fue designada como *Mycobacterium Johnei* y después como *Mycobacterium paratuberculosis* (Chiodini,1993). Finalmente, se determinó que era otra micobacteria distinta pero relacionada genéticamente con *M. avium*, por lo cual fue nombrada como *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* (MAP) que ocasiona la infección conocida como paratuberculosis (PTB) o en el caso de la presentación clínica se conoce como enfermedad de Johne, en honor a la primera persona que describió la enfermedad (Clarke, 1977; Juste *et al.*, 2000). Actualmente, esta micobacteria está incluida en el Complejo avium, junto con *M. avium* subsp. *avium* y *M. avium* subsp. *Silvaticum* (Thorel, Krichevsky & Levy-Frebault, 1990), posteriormente se incluyó a *M. avium* subsp. *hominissuis* (Turenne & Alexander, 2010).

1.2. ETIOLOGÍA

Las micobacterias pertenecen al Orden Actinomycetales y a la Familia Mycobacteriaceae, donde se incluyen a más de 120 especies, aunque la mayoría de éstas no son patógenas y son consideradas como bacterias habituales en el ambiente (Rue-AlbrechtK *et al.*, 2014). Las distintas especies que conforman el género *Mycobacterium* se clasifican en cuatro grupos, de acuerdo a la capacidad de producir pigmento y su velocidad de crecimiento: Grupo I: Fotocromógenas, las que producen pigmento en presencia de la luz; grupo II: Escotocromógenas, producen pigmento en ausencia de luz; grupo III: No cromógenas y de crecimiento

lento, mayor a 7 días y el grupo IV: No cromógenas y de crecimiento rápido, menor a 7 días (Runyon,1959). MAP pertenece al grupo III (no cromógenas), ya que por lo general produce colonias rugosas sin pigmentos (Quinn *et al.*, 2002); sin embargo, existen colonias provenientes de borregos que producen un pigmento en medios de cultivo sólido y en la mucosa intestinal que le da una pigmentación amarilla a naranja (Stevenson *et al.*, 2002).

Cabe mencionar que la clasificación de Runyon (1959), tiene validez a nivel microbiológico. Sin embargo, debido a la aparición constante de nuevas especies con diferentes características fenotípicas, se prefiere realizar una caracterización que toma en cuenta tanto la velocidad de crecimiento y el análisis basado en genes ARN ribosomal (ARNr) (Quinn *et al.*, 2002). En esta clasificación las bacterias del género *Mycobacterium* quedaron divididas en dos grupos: aquellas de crecimiento rápido, donde están representadas las micobacterias ambientales no patógenas y las micobacterias de crecimiento lento, donde se ubican la mayoría de las micobacterias patógenas (Wayne & Kubica, 1986). Dentro de las micobacterias patógenas se encuentra *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis*. MAP, como causante de la enfermedad de Johne, con implicaciones en la salud de los rumiantes domésticos y silvestres generando una enteritis granulomatosa. MAP es un patógeno intracelular, considerado como Gram positivo, aunque por sus características estructurales y afinidad a la tinción Ziehl Neelsen (ZN) como bacilo ácido alcohol resistente (BAAR) (Whittington *et al.*, 2019).

1.2.1 TIPOS DE CEPA DE MAP

Mediante las técnicas de polimorfismo de la longitud de fragmentos de restricción (*Restriction Fragment Length Polymorphism*, RFLP), Reacción en cadena de la polimerasa (*Polymerase chain reaction*, PCR) tipo específico y con la técnica PCR más el empleo de endonucleasas de restricción (*PCR-Restriction endonuclease analysis*, PCR-REA) (Pavlik *et al.*, 1999; Pavlik *et al.*, 2000; Whittington *et al.*, 2000; Chávez *et al.*, 2004; Collins *et al.*, 2002), fue posible la identificación de cepas de MAP, las cuales fueron clasificadas en tres grupos: las de tipo I (o S por *sheep*), tipo II (o C por *cattle*) y tipo III (o I de intermedia), ya que presenta

patrones de hibridación intermedio entre la S y la C. Estas cepas fueron nombradas así por el hospedero en el que fueron aisladas por primera vez, actualmente se considera que las cepas no son exclusivas de un hospedero (Stevenson, 2010; Stevenson, 2015). Pavlik en 1999, empleando la técnica de RFLP, identificó y clasificó a MAP en 18 grupos usando la enzima PstI, mientras que la digestión con BstEII generó 3 subgrupos: C1 a C32, S1 a S3 así como I1 e I2 (Pavlik, *et al.*, 1999).

Otra clasificación fue realizada con el empleo de técnicas de tipificación más discriminatorias con el uso de Unidades repetitivas intercaladas micobacterianas- Número variable de repetición en tandem (*Mycobacterial interspersed repetitive units-Variable number tandem repeat*, MIRU-VNTR), Polimorfismo de nucleótido único (*Single nucleotide polymorphism*, SNP) y Electroforesis en gel de campo pulsado (*Pulsed field gel electrophoresis*, PFGE) (Sohal *et al.*, 2019), que permitió dividir las cepas tipo S en dos subtipos denominados subtipo I y subtipo II, mientras que la cepa intermedia, fue considerada un tercer subtipo de la cepa tipo S, por lo que se designó como subtipo III (Bryant *et al.*, 2016). Mientras que la cepa tipo II, la consideraron equivalente a la cepa tipo C (Biet *et al.*, 2012). De igual forma, la cepa C o tipo II, se subclasificó en dos subtipos de cepas, una cepa aislada a partir de bisontes y cabras presentes en la India y América, conocida ahora como cepa B y el otro subtipo es la cepa aislada de camélidos (Whittington *et al.*, 2001; Stevenson, 2015; Yadav *et al.*, 2007).

1.2.2 PATOGENICIDAD ENTRE CEPAS DE MAP

La cepa C se ha reportado en diversos países y en un amplio rango de hospederos, como bovinos y animales silvestres (Hutchings *et al.*, 2010; Gioffré *et al.*, 2015; Stevenson, 2015; Hernández *et al.*, 2022). Las colonias bacterianas de la cepa C tienen mejor desarrollo en medio de cultivo Herrold adicionado con piruvato de sodio y su crecimiento es rápido, tomando entre 4 a 16 semanas. En contraste, la cepa S ha sido aislada principalmente en borregos y cabras domésticos (Motiwala *et al.*, 2004) y su crecimiento es más lento entre 4 meses y un año, prefiriendo el medio Löweisten Jensen, mientras que las cepas I o

intermedias pueden crecer en ambos medios de cultivo (De Juan *et al.*, 2006; Florou *et al.*, 2009; Stevenson, 2015).

Genéticamente también se han visto diferencias entre las cepas, se ha descrito, que las proteínas: AhpC, AhpD, DesA2, Ppa, FabG, MAP2411 y MAP1885c, son constitutivas, específicas de MAP y se expresan en mayor cantidad cuando la bacteria está en estrés oxidativo o en cepas resistentes a isoniazida y son reguladas de forma diferente entre las cepas tipo S y tipo C, dependiendo si las bacterias se encuentran en situaciones de hipoxia. AhpD y FabG, están asociadas a factores de resistencia en las cepas tipo C, lo que les da mejor adaptación para crecer bajo condiciones de estrés. Se observó que la restricción nutricional inhibió el crecimiento de ambas cepas, pero esta fue letal para la cepa S después de 12 semanas, mientras que la cepa C sin mutación de AhpD y FabG logró sobrevivir (Gumber *et al.*, 2009). Además, se sabe que la patogenicidad de la cepa C con respecto a la S es diferente, debido a la presencia de polimorfismos de secuencia grande (*large sequence polymorphisms*, LSP) que incluyen inserciones, deleciones, inversiones, translocaciones y duplicaciones en el genoma que contribuyen en la composición genotípica confiriéndole a la cepa C mayor patogenicidad que la cepa S (Alexander *et al.*, 2009; Bannantine *et al.*, 2012; Stevenson, 2015). Estas composiciones genéticas le dan a la cepa C mayor capacidad de sobrevivir en el ambiente y también de persistir en los macrófagos, evadiendo la respuesta inmune. Similarmente, con base en infecciones experimentales se observó que la cepa C produjo un mayor porcentaje de animales infectados y el desarrollo de lesiones granulomatosas multifocales a difusas a nivel intestinal, en comparación con la cepa S que solo ocasionó lesiones granulomatosas focales menos agresivas aun cuando la dosis infectante para ambas bacterias fue la misma (O'Brien *et al.*, 2006; Fernández *et al.*, 2014).

1.2.3 CEPAS DESCRITAS EN MÉXICO

La cepa C, es la que se ha identificado con mayor frecuencia en México, aunque también se ha visto la presencia de la cepa I y S en cabras (Chávez *et al.*, 2004; Estévez, 2007). Mediante la técnica de RFLP, se determinó en cabras 2 patrones de C e I, así como coinfecciones mixtas, donde los tipos más comunes de MAP

fueron C1 e I3 (Estévez *et al.*, 2007). La cepa C ha sido identificada tanto en bovinos, caprinos y en rumiantes silvestres; lo que sugiere, es la que se encuentra con mayor frecuencia en los casos de PTB presentes en México, así como ocurre en otros países (Chávez *et al.*, 2004; Estévez *et al.*, 2007; Castillo *et al.*, 2015; Hernández *et al.*, 2022).

1.3 HOSPEDEROS DE MAP

PTB afecta tanto a los rumiantes domésticos como silvestres. Las especies afectadas son vacas, borregos y cabras; dentro de las especies silvestres, se encuentran venados, antílopes, cabras de la montaña, bisontes, camellos, llamas y oryx (Manning, 2011; Pigoli *et al.*, 2020; Hernández *et al.*, 2022). También se ha reportado la presencia de MAP en monogástricos como caballos y burros, los cuales actúan como reservorios (Larsen *et al.*, 1972; Stief *et al.*, 2012). Además, el conejo es un hospedero que se infecta de forma natural en vida silvestre y es considerado un transmisor de la enfermedad, sobre todo en pastizales o praderas contaminados con heces de conejos infectados donde se alimenta el ganado (Daniels *et al.*, 2001; Daniels *et al.*, 2003a).

1.3.1 INFECCIÓN NATURAL EN CONEJOS

En diversos estudios se ha demostrado que el conejo es un animal que se infecta de forma natural con MAP y ayuda a la diseminación de la bacteria en praderas donde cohabitan otras especies domésticas, ya que cepas aisladas de bovinos y conejos, tienen el mismo patrón de caracterización, complicando el control de PTB debido a la transmisión interespecie (Stevenson *et al.*, 2009). Daniels y colaboradores en el 2003, determinaron un 17% de prevalencia de infección por MAP mediante aislamiento bacteriológico en 83 conejos que fueron analizados en 4 granjas distintas en Escocia, logrando incluso aislar MAP en la orina de 2 conejos. El número detectado de Unidades Formadoras de Colonia (UFC) por gramo de heces en los conejos infectados fue de 5.2×10^5 a 7.6×10^5 y en algunos hasta 1×10^6 UFC/g, considerados como altos excretores. Demostrando que los conejos pueden contribuir a la transmisión de PTB en los rumiantes que

pastorean en praderas contaminadas con heces de conejos infectados (Daniels *et al.*, 2003a; Daniels *et al.*, 2003b).

Mientras que Judge y colaboradores (2006) determinaron las rutas de transmisión intraespecies de MAP en conejos y estimaron la probabilidad de la vía de transmisión en cada ruta. Se muestrearon 487 conejos en 2 diferentes sitios en Perthshire, Escocia; obteniendo prevalencias de 39.7 y 23 %, mediante aislamiento bacteriológico a partir de testículos, útero, placenta, fetos y leche. Las rutas analizadas fueron: vertical, a través del estudio de placenta y fetos; pseudovertical, a través del consumo de leche contaminada con heces que contenían MAP y horizontal mediante la presencia de MAP en útero, testículos y heces. Lo anterior sugiere que estas rutas de transmisión ayudan a mantener la infección por MAP en las poblaciones de conejos y por lo tanto en el ambiente, debido a que los conejos tienen una tasa de reproducción alta que inicia entre los 7 y 9 meses de edad, un periodo de gestación corto y en promedio, un conejo silvestre vive arriba de los 18 meses (Judge *et al.*, 2006). En otro estudio también se demostró la presencia de MAP en el tracto gastrointestinal en conejos criados para el consumo humano (Arrazuria *et al.*, 2015).

1.4. TRANSMISIÓN

La principal vía de transmisión es fecal-oral, ya que esta micobacteria es eliminada de forma intermitente a través de las heces y puede provocar la contaminación de praderas y comederos donde los animales se alimentan. Los neonatos y animales jóvenes, pueden infectarse con MAP al ingerir bacterias presentes en la leche, calostro o glándula mamaria contaminada con heces que contienen a MAP (Harris & Barleta, 2001).

También se ha mencionado la transmisión intrauterina en fetos provenientes de hembras con un estado muy avanzado de la enfermedad (Sweeney, 1996; Whittington & Windsor, 2009). MAP se ha aislado de tejidos fetales y cotiledones (Verin *et al.*, 2016). En toros infectados, MAP se ha aislado de muestras de semen, túbulos seminíferos y próstata, por lo que se asume que los sementales participan en la diseminación de la enfermedad (Ayele *et al.*, 2004).

1.5 PATOGENIA

1.5.1 ENTRADA DE MAP EN EL HOSPEDERO.

El mecanismo natural de entrada de MAP en el hospedador es por vía oral y la primera línea de defensa contra MAP, son los mecanismos de protección y resistencia de la inmunidad innata, como la lisozima presente en la saliva y pH ácido del abomaso, así como los procesos ruminales (Gómez Lucía *et al.*, 2006). Una vez que logra vencerlos, MAP penetra en el organismo a través del tejido linfóide del intestino delgado o placas de Peyer. Ahí MAP se une a las integrinas $\beta 1$ de las células M mediante la proteína de unión a fibronectina, a través de un puente de unión con la fibronectina; aunque también se menciona que MAP puede ingresar a través de los enterocitos, siendo esta vía menos relevante que la participación de las células M (Mabbott *et al.*, 2013). Las células M, son células epiteliales especializadas que presentan múltiples pliegues superficiales. Las células M capturan a MAP cuando llega a la luz intestinal, la cual es transportada a través de la célula mediante transcitosis para que sea presentada directamente a las células dendríticas y macrófagos presentes a nivel subepitelial (Bermúdez *et al.*, 2010).

1.5.2 SUPERVIVENCIA DE MAP DENTRO DE LOS MACRÓFAGOS.

Una vez que MAP es fagocitada por los macrófagos, es capaz de sobrevivir evitando la acidificación del fagosoma, lo que impide su fusión a los lisosomas, mediante la secreción de una proteína fosfoesterasa, que impide la actividad de fosfatidil inositol 3 fosfato (PI3P), el cual es necesario para regular el tráfico de lípidos en la membrana del fagosoma y así evita que adquiera los constituyentes lisosomales (Brumell & Scidmore, 2007).

MAP también interfiere con los mecanismos bactericidas como enzimas lisosómicas y el óxido nítrico que producen los macrófagos, debido a su envoltura lipídica micobacteriana, en especial por el lipoarabinomano, el cual posee capacidad de inhibir la acidificación (Zhao, Collins & Czuprynski, 1997; Harris & Barletta, 2001).

1.5.3 FORMACIÓN DE LA LESIÓN GRANULOMATOSA

1.5.3.1 FASE SUBCLÍNICA

La presencia de MAP en la submucosa intestinal atrae a más macrófagos y linfocitos al área afectada, de esta forma comienza la lesión granulomatosa la cual en un principio logra contener la infección, que se caracteriza por infiltrado inflamatorio organizado y compuesto por macrófagos, células epitelioides y algunas células gigantes multinucleadas tipo Langhans como en caso de las lesiones granulomatosas en conejos, además también hay infiltrado de linfocitos T y B (Ramakrishnan, 2012). Los granulomas se consideran un mecanismo de defensa del hospedador para contener a la micobacteria, prevenir su multiplicación y difusión hacia otras zonas del organismo (Sweeney, 2011).

La activación de los macrófagos está dada por citocinas como el $\text{IFN}\gamma$, producido por los linfocitos T, provocando la destrucción de los microorganismos intracelulares, se ha observado que esto ocurre en las primeras horas de iniciada la infección. Esto sucede en etapas iniciales de la enfermedad donde las lesiones son focales y se conoce como fase silenciosa. De igual forma, las células T $\gamma\delta$ tienen una importante participación en la respuesta inmune contra MAP, puesto que el aumento de células T $\gamma\delta$ a nivel de lámina propia del intestino, favorece la secreción de $\text{TNF}\alpha$ (*Tumor necrosis factor*) e $\text{IFN}\gamma$, provocando una mayor acumulación de macrófagos y células dendríticas (Charavaryamath *et al.*, 2013). Además, hay un efecto positivo y regulador sobre las células T CD4^+ , ya que se ha visto atraen más células de esta subpoblación hacia el sitio de infección (Plattner *et al.*, 2014).

Así mismo, en esta etapa subclínica, que se considera una infección temprana "controlada" por la respuesta inmune celular, es importante la producción de $\text{TNF}\alpha$, ya que está implicada en el mantenimiento del granuloma (Palmer *et al.*, 2015). Los macrófagos normalmente son capaces de controlar la propagación de MAP, sin embargo, si las cantidades de micobacterias aumentan provocan la apoptosis de las células fagocíticas ocasionando la liberación de MAP y la infección de otros macrófagos (Bannantine y Stabel, 2002).

1.5.3.2 FASE CLÍNICA

Durante la fase clínica muchos animales infectados no tienen éxito en la eliminación de MAP y persiste dentro de los macrófagos. MAP sale del granuloma, infecta otros macrófagos que diseminan las micobacterias viajando tanto por vía linfática como sanguínea hacia otras partes del organismo, formando nuevos focos granulomatosos, como en linfonodos mesentéricos e incluso el hígado. Por otro lado, la diseminación de MAP en glándula mamaria, puede ocasionar la eliminación de las micobacterias en la leche. En esta etapa MAP provoca en el hospedero la activación de la respuesta inmune antagónica a la respuesta Th1 y la producción masiva de anticuerpos, respuesta inmune conocida como Th2 o respuesta inmune anti inflamatoria. En esta respuesta generada frente a la infección con MAP, se ha observado que, en los macrófagos, se potencializa la proliferación de linfocitos Th2, la expresión de citocinas antiinflamatorias como IL-10 y el factor de crecimiento transformante β (TGF β), ocasionando también la proliferación y diferenciación de células B en células plasmáticas para la producción de inmunoglobulinas como IgM e IgG (Waters *et al.*, 2003; Stabel *et al.*, 2011).

Estos eventos favorecen la sobrevivencia de la bacteria, posiblemente asociado a la reducción en la expresión de la actividad pro apoptótica de TNF α , donde la expresión de citocinas antiinflamatorias sobre todo IL- 10 se incrementa en las fases finales de PTB (Bannantine & Stabel, 2002; Abendaño *et al.*, 2013).

Las lesiones en la mucosa de yeyuno e íleon, que iniciaron como focales se vuelven multifocales y cuando no se logra contener a MAP, el infiltrado granulomatoso se vuelve difuso con carga bacteriana multibacilar, afectando incluso el ciego y colon. Estas lesiones se vuelven más evidentes debido a la infiltración celular masiva, las vellosidades intestinales se acortan y engrosan reduciendo su capacidad de absorción, donde ésta inflamación granulomatosa también provoca linfangiectasia (Manning & Collins, 2001). Lo anterior se traduce en una mala absorción intestinal, pérdida de peso e hipoproteinemia y se caracteriza por las manifestaciones clínicas, como caquexia y diarrea, con excreción de micobacterias en heces. Esta fase clínica puede presentarse

después de un año a dos en pequeños rumiantes y hasta 5 años en bovinos (Sweeney, 2011). La asociación de la respuesta inmunológica con la presentación de signos clínicos asociados a PTB, se muestra en la figura 1.

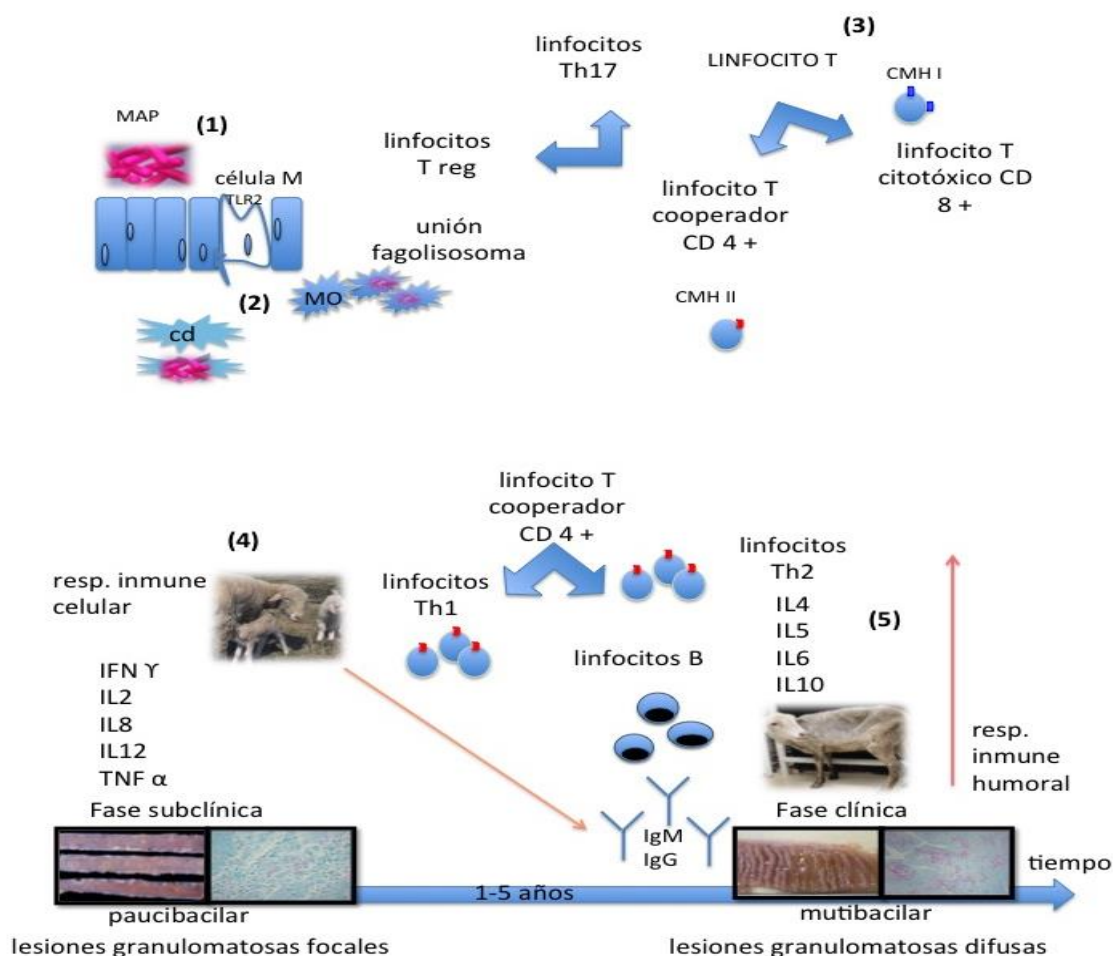


Figura 1. Representación esquemática de eventos que se presentan durante la infección con MAP y la respuesta inmune evocada.

1) Adhesión de MAP en células M, 2) Fagocitosis de MAP, 3) Proliferación y expansión clonal linfocitos T, ante el reconocimiento de MAP, 4) Respuesta inmune celular desarrollada por infección con MAP en fase subclínica, 5) Respuesta inmune humoral desarrollada en fase clínica por infección con MAP. cd: Célula dendrítica, CMH: Complejo mayor de histocompatibilidad, MO: macrófago.

1.6 RESPUESTA INMUNE

1.6.1 RESPUESTA INMUNE INNATA DESARROLLADA FRENTE A MAP.

La respuesta inmune innata es la primera línea de defensa del sistema inmunológico que actúa para destruir un microorganismo o un agente extraño. Esta respuesta inmune inicia con la unión de PAMPs (*pathogen-associated molecular patterns*) como las regiones deoxicitidilato-fosfato-deoxiguanilato (CpG) de forma no metilada presentes en el ADN bacteriano (Hess *et al.*, 2017), los cuales se unen a los receptores de reconocimiento de patrones PRRs (*pattern recognition receptors*) presentes en las células fagocíticas, dentro de estos los *Toll-like receptor* (TLRs) como el TLR-9, donde este receptor reconoce el motivo CpG metilado en DNA de bacterianas (Chang *et al.*, 2017; Oakes *et al.*, 2019), mientras que el TLR-4 además de estar involucrado en el reconocimiento del LPS de bacterias Gram negativas, está involucrado en la patogénesis de la enfermedad de Johne, debido a la activación de señales intracelulares que promueven la activación de proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK) y el factor NF-κB, ocasionando la producción de IL-10, inhibiendo la liberación de citocinas proinflamatorias y propiciando la proliferación de MAP dentro del macrófago; de forma similar, el TLR-2 se activa por su unión con lipoarabinomano manósido (Man-LAM) a través de la vía de señalización MAPK-p38 (Thirunavukkarasu *et al.*, 2013). Otro tipo de PRRs son los receptores NLR (*NOD like receptors*), los cuales también están implicados en el reconocimiento en la respuesta inmune innata contra micobacterias, como la CARD15 (*caspase associated recruitment domain containing protein 15*), que se ha empleado como biomarcador en animales resistentes a PTB (Ruiz-Larrañaga *et al.*, 2010). Posteriormente, una vez que MAP es ingerida, atravesando la mucosa y submucosa de las placas de Peyer presentes en el intestino, mediante las células M, MAP se une con el receptor DC-SIGN (*Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin*) presente en las células dendríticas y después es internalizada por los macrófagos subepiteliales mediante los receptores del complemento CR1, CR3 y CR4, así como CD11b/CD18, receptores de inmunoglobulinas FcR, receptor de manosa y receptores *scavenger* logrando la entrada de MAP al monocito o

macrófago. Una vez que son reclutados los macrófagos hacia el sitio de infección, éstos se activan ocasionando lisis de la micobacteria dentro de la vacuola fagocítica y mediante el procesamiento antigénico son presentados en el complejo principal de histocompatibilidad (Major histocompatibility complex, MHC). Una vez ocurrido esto, inicia la respuesta inmune específica (Kleinnijenhuis *et al.*, 2011; Guirado *et al.*, 2013).

1.6.2 RESPUESTA INMUNE ESPECÍFICA DESARROLLADA FRENTE A MAP.

La respuesta inmune adaptativa o específica se caracteriza por ser efectiva contra los antígenos que fueron procesados y presentados en el MHC. Este tipo de respuesta es mediada por la participación de linfocitos T y B, para lograr la producción de células de memoria tanto de la respuesta inmune celular como humoral para mejorar la capacidad de destrucción de microorganismos ante exposiciones futuras. Entra en acción la respuesta inmune específica cuando el macrófago o célula presentadora de antígeno (CPA) interactúa con los linfocitos cooperadores (T helper, Th) presentando el marcador CD4 (LTCD4+) y pueden tener receptores $\gamma\delta$ o $\alpha\beta$, los cuales reconocen antígenos en el MHC clase II presente en el macrófago infectado con MAP, ocasionando la producción de citocinas y por consecuencia la proliferación de más linfocitos específicos (Urdahl *et al.*, 2011). Mientras que los linfocitos citotóxicos (Tc) presentan el marcador CD8 (LTCD8+) reconocen antígenos asociados al MHC clase I, (Purdie *et al.*, 2012), figura 1. Dentro de los linfocitos Th, existen 2 perfiles de producción de citocinas, Th1 y Th2. Th1 es caracterizada por la producción de interleucinas proinflamatorias implicadas en la respuesta inmune celular, como IL-2, IL-8, IFN γ y TNF α , las cuales se regulan mediante la IL-12; esto está relacionado con fases iniciales de la enfermedad de PTB, donde los animales pueden estar en una fase subclínica y presentar lesiones granulomatosas focales con una baja carga bacteriana (Coussens *et al.*, 2012; Magombedze *et al.*, 2014), figura 1. El IFN γ es una de las principales citocinas que caracterizan a la respuesta inmune Th1 y se describe que esta respuesta es la más efectiva para el control de microorganismos patógenos intracelulares, incluyendo las micobacterias (Dorman & Holland, 1998). El IFN γ actúa favoreciendo la actividad de los macrófagos, ya sea induciendo

respuestas bactericidas como la inducción de oxígeno reactivo, producción de intermediarios del oxígeno y maduración del fagosoma. El IFN γ activa las células diana uniéndose a un receptor de IFN γ de alta afinidad para la activación de la vía *Janus kinase-Signal Transducer and Activator of Transcription* (JAK-STAT), de forma contraria, se ha visto que Man-LAM promueve la activación de tirosin fosfatasa-1, un inhibidor de la señalización JAK/STAT. También se ha observado que los genes *supressor of cytokine signaling* SOCS1 y SOCS3, tienen una actividad reguladora negativa sobre el receptor de IFN γ (Bach *et al.*, 1997; Arsenault *et al.*, 2012). Algunos trabajos han indicado la detección de altos niveles de expresión de IL-6, IL-12, TNF e IFN γ en animales con infección subclínica, mientras que en la fase clínica estas citocinas disminuyen a nivel local y periférico (Coussens, 2001; Park *et al.*, 2018; Stabel & Bannantine, 2019). En otros estudios se ha visto una respuesta detectable de IFN γ asociadas a lesiones multifocales y difusas, pero no en focales, donde este cambio de Th1 a Th2 no parece ser tan marcado, ya que en los animales con lesiones difusas también se ha detectado producción de IFN γ y aunque no se sabe de forma cierta como ocurre, se sabe que se desarrollan ambas respuestas inmunológicas independientemente de la progresión de la enfermedad. Los niveles de IFN γ , así como el de anticuerpos, parecen estar mejor relacionados con la gravedad de la lesión y con la carga bacteriana presente en estas lesiones, esto comparado cuando solo se mide al IFN γ , ya que no muestra una buena correlación con el grado de lesión (Vázquez *et al.*, 2013; Alonso-Hearn *et al.*, 2019).

Se ha visto en que una vez que MAP se internaliza en macrófagos *in vitro*, esto durante las primeras horas de infección e iniciada la respuesta Th1, se producen citocinas pro inflamatorias como IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12 y TNF α , siendo una respuesta breve donde MAP favorece la inhibición de estas citocinas y de forma antagónica produce interleucinas anti inflamatorias como IL-10 para ayudar a la persistencia de MAP y regular el daño tisular evocado por la producción de interleucinas pro inflamatorias (Shu *et al.*, 2011).

Para regular el daño ocasionado por MAP, también se producen linfocitos T reguladores (T reg), que son un subconjunto de células T $\gamma\delta$ que tienen

marcadores CD4+, y FoxP3+, pero a diferencia de las derivadas del timo pueden ser CD25+ negativos. Los T reg suelen expresar CD45RO, los cuales tienen función inmunosupresora, además los que producen IL-10 se denominan Tr1, mientras los que producen TGF β se denominan TH3 (Coussens *et al.*, 2012). Los Tr1 expresan el receptor de localización periférica/inflamación $\alpha 4\beta 1$, mientras que los TH3 expresan el receptor de localización en mucosa $\alpha 4\beta 7$ (Stassen *et al.*, 2004). En vacas con PTB subclínica, existe un aumento de linfocitos, sobre todo de células CD4+ CD25+ FoxP3+ mientras que en vacas con PTB clínica existe un aumento de células T CD 4+ $\gamma\delta$, inhibiendo la respuesta inmune celular (Koets *et al.*, 2002; Roussey *et al.*, 2014).

Debe considerarse que la respuesta Th1 tiene un papel importante en el control de microorganismos patógenos. Una respuesta Th1 excesiva puede ocasionar un daño tisular excesivo, por ello para regularla se produce la respuesta inmune Th2 con la producción de IL-10 (Macdonald *et al.*, 2012). La IL-10 es producida por monocitos, macrófagos, linfocitos T y B; esta citocina inhibe la producción de citocinas proinflamatorias y disminuye la presentación de antígenos por los macrófagos y células dendríticas. Se ha observado que en los casos de PTB con presentación clínica, están relacionados con niveles altos detectados de IL-10 (Stabel & Bannantine, 2019), por lo que la neutralización de esta citocina ocasiona incremento en la expresión de CMH II, TNF α , IL-12, IL-8, acidificación de fagosomas, apoptosis de macrófagos y producción de óxido nítrico (Borutaite & Brown, 2003). De forma contraria, mediante un análisis de secuenciación masiva de ARN (RNA-Seq) de células de la válvula ileocecal y sangre periférica de bovinos infectados con MAP, se observó regulación negativa en la expresión de CXCL8/IL8 en vacas con lesiones focales comparado con el control negativo, lo que puede reflejar una incapacidad del reclutamiento de neutrófilos, favoreciendo la sobrevivencia de MAP y ocasionando que éstas lesiones focales progresen hacia multifocales y/o difusas (Alonso-Hearn *et al.*, 2019).

Actualmente se conoce un tercer tipo de células T CD4+, llamadas Th17. Esta población es caracterizada por la producción de IL-17, IL-22 e IL-23. Estos linfocitos Th17 son importantes en la eliminación de ciertos patógenos, como

hongos y micobacterias que no fueron eliminados mediante las respuestas inmunológicas Th1 y Th2 (Shu *et al.*, 2011). Se ha observado que, en vacas con lesiones avanzadas, el aumento en la expresión de IL-17 a medida que avanza la enfermedad, prevalece este tipo de respuesta inmune celular provocando apoptosis de las células infectadas y diseminación de MAP a otros macrófagos (Dudemaine *et al.*, 2014). Se ha visto que el IFN γ y la IL-4 inhiben la diferenciación de Th17 y aunque no está claro el papel exacto que desempeñan las células Th17 tanto en el control de la infección como en el desarrollo de la enfermedad. Ya que por un lado la secreción de IL-17a podría evocar una respuesta inflamatoria inicial que ayude a limitar la infección, existe evidencia de que tanto las células T CD 4+ $\alpha\beta$ como las $\gamma\delta$, podrían participar en esta respuesta temprana y de forma contraria, la expresión continua de IL-17a, IL-1 β e IL-23 puede provocar una inflamación progresiva y la presentación del cuadro clínico de PTB (Chen & O'Shea, 2008; Dekuiper & Coussens, 2019)

1.6.2.1 RESPUESTA INMUNE HUMORAL DESARROLLADA FRENTE A MAP.

Mientras que la inmunidad mediada por células, responsable de contener la infección debido a la respuesta inmunológica Th1, donde predominan las citocinas asociadas con la activación de los macrófagos como IFN γ y ésta comienza a disminuir, la infección progresa rápidamente, se presenta una respuesta inmune de tipo Th2 caracterizada por el predominio de citocinas tales como IL-4 e IL-10, esto coincide con la producción de anticuerpos. Conforme avanza la enfermedad, el animal infectado comienza a eliminar MAP en las heces y a diseminarse a otros tejidos como útero y glándula mamaria (Sweeney, 2011). Sin embargo, este cambio de perfil de Th1 a Th2 aún no está del todo dilucidado, puesto que en animales con lesiones avanzadas también se han detectado niveles altos de IFN γ en tejidos infectados (Alonso-Hearn *et al.*, 2019). Se ha demostrado que la inmunidad mediada por anticuerpos puede detectarse en corderos infectados experimentalmente con MAP a partir de las 16 semanas (Chávez G, 1993). Si bien se sabe que la respuesta inmunológica de tipo humoral no tiene un efecto protector al inicio de la infección, puesto que MAP está alojado en el interior del

macrófago del hospedador, pero en estadios avanzados cuando hay diseminación en sangre, la respuesta inmune humoral puede tener un efecto protector, aunque en esta etapa de infección el daño tisular es avanzado (Stabel, 2000). Otros estudios han indicado la importancia de la participación de los macrófagos infectados en la proliferación de linfocitos B y en la producción de anticuerpos específicos contra MAP (Waters *et al.*, 2003). Se ha descrito que el número de células B en linfonodos mesentéricos de corderos infectados experimentalmente con MAP, se redujo significativamente y lo mismo ocurrió en placas de Peyer yeyunal e ileal, aumentando así la proporción de células T con relación a los linfocitos B (Begara *et al.*, 1998). Caso contrario ocurrió en células mononucleares de sangre periférica de vacas infectadas naturalmente, donde esta relación de células T/B fue mayor en los casos donde los animales presentaron signos clínicos compatibles con PTB. Lo anterior puede deberse a que las células B a nivel local no pueden ser competentes para responder a la presentación de antígenos en etapas clínicas de la enfermedad, dado por anergia de células T y/o B (Waters *et al.*, 1999).

1.7. SIGNOS CLÍNICOS

Aunque los animales se infectan durante los primeros meses de vida, los signos clínicos se manifiestan en ovinos y caprinos después de uno a dos años post infección y en bovinos, hasta 5 años post infección (Kreeger, 1991).

Durante la fase subclínica los animales pueden mostrarse aparentemente sanos pero pueden eliminar el microorganismo en las heces (Sweeney, 2011). La fase clínica se caracteriza por presentar emaciación progresiva, además de diarrea siendo más común en los bovinos infectados, mientras que los borregos y cabras suelen no presentar la diarrea sino heces pastosas (Benedictus, 1984; Collins *et al.*, 1994). La pérdida de peso es debido al proceso inflamatorio granulomatoso que se produce a nivel intestinal y compromete la absorción de nutrientes. Otros signos clínicos que pueden presentarse son edema submandibular, disminución en la producción láctea e inclusive la muerte (Manning & Collins, 2001; Sweeney, 2011).

1.8. HALLAZGOS MACROSCÓPICOS

Algunos hallazgos macroscópicos que pueden observarse en PTB se encuentran: degeneración de la grasa, atrofia muscular, edema, ascitis y linfadenomegalia, aunque no son exclusivos de este proceso. Sin embargo, otros cambios sugerentes a PTB son el engrosamiento de la mucosa intestinal, principalmente a nivel de yeyuno e íleon del intestino delgado, mostrando un aspecto corrugado y edematoso, así como linfagiectasia, donde los vasos linfáticos presentes en la serosa del intestino se ven dilatados, tortuosos, engrosados, de aspecto nacarado o blanquecino y aperlado. Además, se observan los linfonodos mesentéricos aumentados de tamaño, tumefactos, de aspecto edematoso, al corte se observa la zona medular de color café verdoso o gris y pérdida de la separación de la corteza y médula, con nodulaciones nacaradas a nivel de corteza, sobre todo en los linfonodos que están a nivel de íleon y válvula ileocecal. Las lesiones en intestino pueden observarse de forma focal, zonal hasta difusa. En bovinos el engrosamiento intestinal es más evidente que en pequeños rumiantes y se observa principalmente a nivel de íleon tendiendo a ser difusa. Mientras que en el caso de cabras y borregos las lesiones pueden observarse en fases tempranas como pequeños nódulos o zonas de engrosamiento de la mucosa, sobre todo donde existen placas de Peyer, como en yeyuno e íleon y extenderse hasta convertirse a difusas. La linfagiectasia es más evidente en cabras donde incluso puede verse calcificación de las lesiones y en el caso de rumiantes silvestres puede observarse la mucosa intestinal congestionada (Pérez *et al.*, 1996; Clarke, 1997; Manning & Collins, 2001).

1.8.1 HALLAZGOS MICROSCÓPICOS

Los hallazgos histopatológicos han demostrado ser un buen parámetro para determinar el grado de infección basado en las lesiones ocasionadas por MAP. Las lesiones granulomatosas se caracterizan por infiltración de células mononucleares como linfocitos y principalmente macrófagos, los cuales pueden ser tipo epitelioides o células gigantes multinucleadas tipo Langhans que se encuentran organizadas de forma circunscrita. En las lesiones histopatológicas en ovinos se han clasificado 3 tipos de lesiones, que van de la tipo I (granulomas

pequeños en espacios interfoliculares en placas de Peyer) al tipo III (granulomas delimitados asociados a placa de Peyer y en mucosa asociada o no a tejido linfoide), siendo esta última dividida en 3 subtipos de: A a la C, mientras que las lesiones descritas en bovinos se clasifican de acuerdo a la distribución, tipo celular presente, severidad y grado de colonización micobacteriana, ya sea paucibacilar o multibacilar, donde dichas lesiones pueden ir de focal, multifocal y difusa, finalmente, esta última puede ser intermedia, multibacilar y linfocítica (Pérez *et al.*, 1996; Clarke & Little, 1996; Corpa *et al.*, 2000; Manning & Collins, 2001; González *et al.*, 2005).

Además de los rumiantes, los conejos silvestres son la única especie infectada naturalmente, donde también se ha empleado la clasificación de lesiones histopatológicas descrita en bovinos, en esta especie se han clasificado las lesiones en focal, multifocal y difusa, donde las de tipo difuso pueden ser intermedias o difusa multibacilar (Maio *et al.*, 2011). Macroscópicamente, en el conejo se ha observado engrosamiento de la pared en apéndice vermiforme, *sacculus rotundus* y ciego, principalmente; así como aumento de tamaño y tumefacción en linfonodos mesentéricos. A nivel microscópico se puede apreciar infiltrado granulomatoso compuesto por macrófagos con citoplasma pálido y abundante, con núcleos grandes, presencia de linfocitos y células multinucleadas Langhans (Maio *et al.*, 2011). En el cuadro 1, se mencionan las clasificaciones de lesiones descritas en ovinos, bovinos y conejos silvestres infectados naturalmente con PTB.

	CARACTERISTICAS EN OVINO	CARACTERISTICAS EN BOVINO	CARACTERISTICAS EN CONEJO
LESION TIPO I FOCAL	Granulomas pequeños (GP) en espacio interfolicular del tejido linfoide adyacente a las placas de Peyer (TLAPP) o en la lámina propia (LP) intestinal, sin alterar la morfología.	Granulomas pequeños delimitados (GPD), constituidos por macrófagos (MO) o alguna célula gigante (CG), formando parte del granuloma o aisladas. Lesiones ubicadas en TLAPP y en linfonodos (LN). Bacilos ácido alcohol resistentes (BAAR) nula o escasa.	GPD conformados por MO con presencia de linfocitos (LF) y escasas células Langhans (CL), ubicados en el tejido linfoide intestinal (TLI) y en áreas interfoliculares de LN. Sin BAAR.
TIPO II MULTIFOCAL	Granulomas delimitados (GD) y redondeados, en la base de la zona interfolicular de las placas de Peyer (PP), en LP o en las vellosidades relacionadas con TLI.	GD con escasos MO y rodeados por algunos LF y plasmáticas, en el TLI y LP de la mucosa intestinal. En ocasiones, se observan CG aisladas en la LP o formando parte de los granulomas.	Escasos GD en LP y TLI sin modificar la arquitectura, así como en áreas interfoliculares de LN. Se observan algunos BAAR.
TIPO III a	GD en mucosa intestinal, relacionada o no con PP, en la parte basal, vellosidades y entre las criptas de Liberkuhn, del íleon y a veces yeyuno. Linfangitis y linfangiectasia en la serosa de íleon. En la submucosa y serosa pueden aparecer LF y MO con relación con vasos linfáticos y sanguíneos. Lesiones granulomatosas en LN ileocecales. BAAR en mucosa y en menor número, relacionados con TLI.		
TIPO III b	Enteritis granulomatosa difusa con células epitelioides (CE) en yeyuno, íleon y válvula ileocecal (VIC). TLI con lesiones granulomatosas en áreas interfoliculares, folículos y cúpulas de PP con alteración de su conformación. En LP intestinal no relacionada con el TLI, infiltrado difuso compuesto por MO, algunos LF y CG. Linfadenitis granulomatosa de multifocal a difusa, con pérdida de su estructura. Se observa moderada cantidad de BAAR.	DIFUSA INTERMEDIA. Infiltrado de linfocitos, MO y algunas CG. Submucosa edematosa y con infiltrado mononuclear en vasos linfáticos. El TLI del yeyuno e íleon, puede presentar granulomas. La presencia de BAAR está relacionada con la cantidad de MO presentes.	DIFUSA INTERMEDIA. Pared intestinal engrosada por infiltrado de CE, MO, LF y CL; en submucosa hay infiltrado de plasmáticas, MO y LF sin afectar la serosa. Linfadenitis granulomatosa multifocal. BAAR en cantidad moderada.

TIPO III C	Enteritis granulomatosa difusa, predominan LF y CL, aunque se pueden apreciar algunos MO. En PP las lesiones son similares a las descritas en IIIb, pero con mayor número de MO y CG. En los granulomas, se pueden observar focos necróticos, en ocasiones calcificado. BAAR escasos o nulos.	DIFUSA MULTIBACILAR. Predominan MO y CE, escasos LF y CG en LP de forma difusa. Vellosidades fusionadas. Glándulas intestinales dilatadas, con material necrótico en su interior. Submucosa con edema y en ocasiones vasculitis granulomatosa, conformación de trombos. Granulomas en zonas interfoliculares así como en los folículos linfoides, se extiende a la muscular y serosa con linfangitis granulomatosa. Linfadenitis granulomatosa difusa con macrófagos y CG, tanto en la zona cortical y paracortical. Se observan numerosos BAAR.	DIFUSA MULTIBACILAR. Pared intestinal engrosada por infiltrado de CE, MO, LF y numerosas CL, con afectación de submucosa y PP, ocasionando fusión de vellosidades, en serosa se ven algunos granulomas; mientras que en folículos linfoides de LN, se observan abundantes MO y CL con afectación de la arquitectura normal. Abundante cantidad de BAAR en mucosa y submucosa, así como en serosa. Puede presentarse hepatitis granulomatosa.
		DIFUSA LINFOCÍTICA Predominan LF en LP intestinal, algunos MO y CG. Vellosidades acortadas y engrosadas. Submucosa puede contener granuloma rodeado de LF. Moderado infiltrado granulomatoso en la serosa. Linfadenitis granulomatosa difusa, con presencia esporádica de CG. Escasa o nula presencia de BAAR.	

Cuadro 1. Características lesionales descritas en ovinos, bovinos y conejos silvestres infectados naturalmente con MAP.

Fuente: Pérez *et al.*, 1996; González *et al.*, 2005; Maio *et al.*, 2011. **Abreviaturas:** BAAR: Bacilos ácido alcohol resistentes; CE: Células epiteliales; CG: Célula gigante; CL: células Langhans; GD: Granulomas delimitados; GP: Granulomas pequeños; LN: Linfonodos; LF: Linfocitos; LP: Lámina propia; MO: Macrófagos; PP: Placas de Peyer; TLAPP: Tejido linfoide adyacente a las placas de Peyer; TLI: Tejido linfoide intestinal; VIC: Válvula ileocecal.

1.9 ENFERMEDAD DE CROHN

La enfermedad de Crohn es una afectación inflamatoria intestinal crónica y hay indicios que sugieren que MAP está asociada con esta enfermedad en humanos (Loftus *et al.*, 1998; Naser *et al.*, 2000). Se ha detectado a MAP en pacientes que presentaron enteritis crónica de tipo granulomatosa mediante pruebas moleculares como PCR y cultivo bacteriológico (Bull *et al.*, 2003), siendo estas lesiones similares a las observadas en la enfermedad de Johne en los animales. Mediante hibridación *in situ* y empleando la secuencia de inserción IS900, MAP fue detectada en muestras con lesiones granulomatosas ulcerativas y en presente en el 100 % de las biopsias de pacientes con enfermedad de Crohn que fueron clasificados como enteritis de tipo granulomatoso, lo que sugiere que MAP es un probable agente zoonótico (Favila *et al.*, 2012). Dicho riesgo aun es controversial, dado que el empleo de la tinción de ZN no ha sido exitoso para detectar la presencia de MAP en todos los humanos con enfermedad de Crohn (Behr & Kapur, 2008), puesto que se ha observado que la presencia de esferoplastos, los cuales son fases infectivas de MAP que carecen de pared celular madura, por lo que no son detectadas mediante ZN, al no teñirse por coloración ácido alcohol resistente (Chiodini, 1986; Bull *et al.*, 2003; Favila *et al.*, 2012). Se presume que estos esferoplastos pueden ser una forma evolucionada de supervivencia bacteriana, ya que son altamente resistentes a la lisis química y enzimática, y la pérdida de la capa estructural externa ayuda a evadir la respuesta inmune del hospedador y permite la supervivencia dentro de él (Bull *et al.*, 2003; Beran *et al.*, 2006).

Se cree que uno de los factores involucrados en presentación de la enfermedad de Crohn es debido al consumo de leche, subproductos, agua y carne contaminados con MAP, puesto que resiste temperaturas de pasteurización (Ellingson *et al.*, 2005; Cirone *et al.*, 2007; Radostits *et al.*, 2007).

Existen varios elementos que participan en la presentación de la enfermedad de Crohn, como la predisposición genética, ya que existen genes que se asocian a un incremento de la presentación de Crohn, entre ellos se ha observado en pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal un aumento en la frecuencia de mutaciones en CARD15, NRAMP, el gen para el receptor de vitamina D, conocido como VDR, el gen *ATG16L1* e *IL223R* (Quirke, 2001; Hermon-Taylor & Bull, 2002; Behr & Schurr, 2006; Elguezabal *et al.*, 2012; Jakubowska *et al.*, 2012; Knights *et al.*, 2013; Sechi & Dow, 2015).

1.9.1 MAP Y SU RELACIÓN CON OTRAS ENFERMEDADES AUTOINMUNES EN HUMANOS.

MAP ha sido asociado con enfermedades autoinmunes y neurodegenerativas como diabetes tipo I, esclerosis múltiple, artritis reumatoide, enfermedad de Parkinson, Síndrome de Blau (sarcoidosis juvenil), lupus y tiroiditis de Hashimoto (Whittington *et al.*, 2019). La diabetes tipo 1, es una enfermedad autoinmune en la cual hay infiltrado de linfocitos T en los islotes del páncreas y destruyen la población de células beta, las cuáles producen insulina. Una teoría de la relación de MAP con esta enfermedad es por la homología de epítomos entre componentes de las micobacterias como Hsp65 y el ácido glutámico descarboxilasa pancreática presente en los islotes pancreáticos (Scheinin *et al.*; 1996). MAP también se ha asociado a artritis reumatoide, además del virus de Epstein-Barr (VEB). Mientras que la artritis reumatoide es una enfermedad autoinmune inflamatoria sistémica, caracterizada por poliartritis erosiva. Se especula que MAP en sinergismo con VEB provocan mimetismo molecular antigénico entre sus proteínas y las del hospedero, ocasionando fallas en la regulación del Factor regulador de Interferón 5 (FRI5) y ante un contacto previo de la micobacteria y desarrollo de la respuesta inmunológica, el hospedero produce anticuerpos contra el propio organismo, generando la presentación de enfermedades autoinmunes (El-Zaatari *et al.*; 1996; Dow CT, 2012; Bo *et al.*, 2018).

Sin embargo, a la fecha sigue existiendo controversia en la asociación de MAP con estas enfermedades, ya que solo en sarcoidosis, MAP ha sido identificado en los granulomas, por lo que ha sido más complicado su asociación con las otras enfermedades autoinmunes debido a la falta de evidencia directa de la identificación de MAP en estos pacientes.

1.10 DIAGNÓSTICO DE MAP

El diagnóstico está basado en la demostración directa del microorganismo o de forma indirecta, ya que se basan en la detección de la respuesta inmunológica que genera en el hospedero. Dentro de pruebas diagnósticas directas se encuentran el aislamiento bacteriológico en medios de cultivo, frotis con tinción ZN, Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y métodos indirectos como la detección de Interferón gamma (IFN γ),

intradermoreacción y las que se basan en la detección de anticuerpos contra MAP como inmunoensayo enzimático (ELISA), inmunodifusión en gel de agarosa (IDGA) y Fijación del Complemento (Manning & Collins, 2001; OIE, 2021).

MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO DIRECTOS

1.10.1 CULTIVO BACTERIANO

El cultivo bacteriano es considerado la prueba de oro para el diagnóstico de PTB a partir de muestras como heces, órganos, leche o leucocitos. Se usan medios artificiales como Herrold adicionado con yema de huevo y micobactina (HEYMJ) adicionado con piruvato, recomendado principalmente para cepas de origen bovino, o Löwestein-Jensen con micobactina recomendado principalmente para muestras de origen ovino o medios líquidos como Middlebrook 7H9, 7H10, 7H11. Debido al lento crecimiento de MAP, obtener un resultado definitivo con la aparición de colonias visibles puede ocurrir en un periodo que va de las 16 semanas hasta más de 50 semanas (Hernández *et al.*; 2022). Es considerada una técnica costosa y con baja sensibilidad en muestras de animales infectados con baja excreción de micobacterias (Clarke *et al.*, 1996; Pérez *et al.*, 1996; Corpa *et al.*, 2001; Manning & Collins, 2001). Los animales pueden eliminar el microorganismo en las heces de forma intermitente y en bajas cantidades, particularmente en etapas tempranas de la enfermedad, en estos casos la sensibilidad del cultivo utilizando muestras fecales va del 45%- 50%, pero es 100% específico. Además del tiempo requerido para obtener un resultado positivo, se requiere una descontaminación previa de las muestras con un compuesto llamado hexadecil pirididium (HPC) para evitar el desarrollo de microorganismos de lento desarrollo. También debe considerarse que a veces la aparición de colonias compatibles con MAP puede ser complicado debido la contaminación del cultivo con agentes micóticos y bacterianos, ya que a menudo es un problema cuando se utilizan muestras fecales (Sackett *et al.*, 1992; Garrido *et al.*, 2000). A pesar de las desventajas anteriormente mencionadas, se considera es la prueba de oro para la detección de animales infectados con MAP (Chiodini *et al.*, 1984; Cocito *et al.*, 1994; Stabel, 2000b; Garrido *et al.*, 2000; OIE, 2021).

1.10.1.2 IMPORTANCIA DE LA MICOBACTINA PARA EL CULTIVO DE MAP

La micobactina es un sideróforo asociado a la membrana bacteriana que es producido cuando existen limitadas cantidades de hierro en el medio, que ayudan a transportar el hierro a través de la pared celular hacia el citoplasma para facilitar el transporte de este metal requerido para su desarrollo, supervivencia y replicación. En el aislamiento de MAP debe considerarse que una de las características diferenciales con otras micobacterias, es la dependencia de micobactina en los medios de cultivo para su crecimiento *in vitro*, siendo un rasgo característico que distingue a esta micobacteria. Aunque MAP también puede crecer sin aporte externo de micobactina, cuando el medio contiene suficiente hierro y otros nutrientes disponibles. Originalmente, se agregaba micobactina P obtenida de *Mycobacterium phlei* al medio de cultivo hasta que se logró extraer micobactina producida por MAP, denominándose micobactina J (Chiodini *et al.*, 1984; Juste *et al.*, 1991; del Castillo-Rueda & Khosravi-Shahi, 2010; Gilardoni *et al.*, 2012).

1.10.2 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

La PCR más empleada en el diagnóstico de MAP se basa en fragmentos de inserción conocidos como secuencias de inserción (IS), que son secuencias repetidas en un número variable de copias dentro del genoma de las micobacterias y se han usado para identificar relaciones genéticas entre aislados de la misma especie. La PCR IS900 e ISMavII, es rápida, menos laboriosa que el cultivo y más sensible para la detección de MAP directamente de muestras clínicas, sin la necesidad de aislar al microorganismo (Vary *et al.*, 1990; Strommenger *et al.*, 2001). La secuencia IS900 no es exclusiva de MAP, ya que también se encuentra presente en la micobacteria saprófita *Mycobacterium cooki*; sin embargo, al estar entre 11 a 14 veces repetido en el genoma de MAP la hace muy sensible y por ello se sigue utilizando para el diagnóstico de MAP (Cousins *et al.*, 1999). Existen otras secuencias que son específicas de MAP como el gen *HspX*, o las secuencias de inserción ISMav2, ISMap02 y F57. Este último (F57) presenta una sola copia en el genoma, lo que lo hace un buen candidato para usarlo en la cuantificación de la carga micobacteriana mediante qPCR (Ellingson *et al.*, 2005; Stabel & Bannantine, 2005; Schonenbrücher *et al.*, 2008; Correa *et al.*, 2017).

La utilización de la PCR a partir de materia fecal permite obtener resultados de forma

rápida, pero debe considerarse que se puede detectar ADN de MAP en heces de animales que sin estar infectados han ingerido micobacterias en un medio altamente contaminado. Además, debe considerarse la posibilidad de resultados falsos negativos por la intermitencia en la excreción de micobacterias en las heces y por la acción de factores inhibidores, estos son agentes químicos que están presentes en las muestras clínicas como sales biliares, urea o incluso restos de los mismos reactivos que se emplean en la extracción de ADN y tienen actividad inhibidora sobre la acción de la ADN polimerasa. Por lo que en términos generales tiene una sensibilidad mayor al 80% y especificidad arriba del 95% (Sweeney *et al.*, 2006; Motiwala *et al.*, 2003).

1.10.3 MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO INDIRECTOS

1.10.3.1 DETECCIÓN DE INTERFERON GAMMA (IFN- γ)

Esta técnica se basa en la obtención de sangre periférica que se pone en contacto con antígenos como derivados proteicos purificados (PPD), obtenidos ya sea a partir de *M. bovis* o *M. avium*. Las muestras se dejan incubando durante 12 horas a 37 °C, posteriormente se centrifugan las muestras y se obtiene el plasma. El IFN γ es liberado por las células mononucleares en sangre periférica como respuesta a la exposición previa ante MAP. Esta citocina puede ser medida mediante ELISA y ELISPOT (Rothel *et al.*, 1990; Veerasami *et al.*, 2011). Su detección mediante ELISA, se considera que es una prueba simple, rápida y de alta especificidad. La especificidad de la prueba está relacionada con el antígeno que se emplee para estimular a los linfocitos. Sin embargo, es una prueba costosa y es posible que produzca reacciones cruzadas debido a que se comparten antígenos con las bacterias que integran el complejo tuberculosis (Stabel & Whitlock, 2001). Esta técnica permite detectar animales en fase subclínica de la infección, con una sensibilidad y la especificidad del 41% y 98%, respectivamente (Jungersen *et al.*, 2002; Nielsen & Toft, 2008).

1.10.4 INTRADERMOREACCIÓN

La prueba de intradermoreacción se realiza inoculando un PPD en el tercio medio del cuello, los PPD puede ser de *M. avium* o *M. bovis* o de MAP, conocido como Johnina. Para esta prueba previamente se mide el grosor de la piel y se realiza la aplicación del PPD y finalmente se realiza la lectura a las 72 horas. Se considera positivo, cuando hay un incremento en el espesor de la piel, igual o mayor que 3 mm. Esta prueba ofrece una sensibilidad del 64% y una especificidad del 79% (OIE, 2008).

1.10.5 INMUNOENSAYO ENZIMÁTICO (ELISA)

El ELISA indirecto probablemente es la prueba más utilizada en el diagnóstico de MAP. Esta se basa en la detección de anticuerpos en suero, plasma o leche contra MAP. Las ventajas de esta prueba incluyen bajo precio, rapidez y facilidad con la que se realiza, ya que permite trabajar con múltiples muestras a la vez. Además de que posee una alta especificidad y mediana sensibilidad que depende del estadio de la enfermedad que presenten los animales, así como del antígeno que se utilice (Robbe-Austernan *et al.*, 2006). Debe considerarse que el empleo de algunos antígenos son inefficientes en detectar casos subclínicos; puesto que los animales infectados generalmente no producen títulos detectables de anticuerpos hasta etapas avanzadas de la enfermedad (Stabel, 1997). La prueba de ELISA comparada con IDGA y Fijación del Complemento, es la más sensible de las 3 pruebas serológicas, en promedio tiene 45% de sensibilidad y 99% de especificidad (Collins & Sockett, 1993; Hope *et al.*, 2000). Tripathi menciona que la sensibilidad de la prueba de ELISA en cabras depende del grado de presentación de lesiones, donde es 100% sensible en lesiones multibacilares y 70 % en paucibacilares (Tripathi *et al.*, 2006). Aun con lo descrito por Tripathi, debe considerarse que esta sensibilidad y especificidad depende del antígeno empleado en la prueba de ELISA, como en los estudios que han empleado proteínas de choque térmico 85A, 85B, 85C y otra proteína como superóxido dismutasa SOD, han demostrado que la sensibilidad alcanzada es del 66 al 80 % (Nielsen & Toft, 2008). La especificidad en la prueba con el empleo de antígenos comerciales como la proteína protoplasmática PPA-3, ha sido aumentada al pre adsorber el suero con *Mycobacterium phlei*, ya que disminuye la detección de anticuerpos inespecíficos ante micobacterias ambientales o

saprófitas, pero esto también se ve reflejado en la disminución de la sensibilidad de la prueba (Yokomizo, 1985).

Los ensayos serológicos como ELISA son comúnmente utilizados como prueba tamiz en el diagnóstico de PTB en los rebaños y hatos donde se desconoce la presencia de esta enfermedad, ya que tiene un bajo costo y es rápida, puesto que el resultado puede obtenerse dentro de 2 a 3 días. La prueba de ELISA también es utilizada para monitorear rebaños y los resultados positivos pueden ser confirmados mediante cultivo o PCR, ya que la habilidad para detectar MAP, ayuda al manejo y control del rebaño infectado (Colgrove *et al.*, 1989; Nielsen & Toft, 2011). En el 2012, Castrellón y colaboradores diseñaron un ELISA indirecto empleando la P35 como antígeno para el diagnóstico de PTB a partir de muestras provenientes de distintos lugares del país, mostrando una sensibilidad del 100 % y una especificidad del 92% (Castrellón A.V.E, 2012).

1.10.6 INMUNODIFUSIÓN EN GEL DE AGAROSA (IDGA) Y FIJACIÓN DEL COMPLEMENTO

En tanto que, las pruebas de IDGA y la técnica de Fijación del Complemento ofrecen una rápida detección y se emplean para la confirmación de animales infectados. Estas técnicas son más baratas comparadas con el aislamiento en medios de cultivo y sobre todo la IDGA se considera fácil de realizar, sin embargo; tienen bajos grados de sensibilidad y especificidad en casos subclínicos, por lo que en general se consideran menos confiables, puesto que pueden presentarse resultados falsos negativos dependiendo del antígeno empleado. Y a pesar de que la prueba de Fijación del Complemento se menciona en el manual de la OIE para el diagnóstico de PTB, en México, no existen publicaciones o información sobre laboratorios que la realicen a nivel de diagnóstico, debido a las dificultades que existen para su estandarización, sobre todo al elegir el antígeno empleado. Mientras que, en Europa, la prueba de Fijación del complemento es recomendada para confirmar casos clínicos de PTB y según los reportes, su sensibilidad va del 10% al 90%, mientras que la especificidad es reportada alrededor de un 70% aproximadamente (Jørgensen & Aalund, 1984; Sherman *et al.*, 1990). Finalmente, con las ventajas que presenta el ELISA, las 2 técnicas anteriores han sido desplazadas por ésta última técnica diagnóstica (Gasteiner *et al.*, 2000).

1.11 IMPACTO ECONÓMICO

La PTB genera pérdidas económicas en el sector pecuario debido a que causa disminución en la producción de leche, desecho temprano de animales infectados, incremento en la incidencia de mastitis, desórdenes reproductivos, emaciación y su asociación con otras enfermedades se ve reflejada en el incremento de la mortalidad (Cocito *et al.*, 1994).

Esta enfermedad impacta directamente en la productividad y salud del hato o rebaño. Es endémica en casi todo el mundo, aunque con un mayor impacto en el hato lechero asociado al sistema intensivo de producción. En México, existen reportes sobre el impacto económico que causa PTB en las unidades de producción. Miranda y colaboradores, en el 2005; reportaron que la pérdida económica en promedio es de \$10,345.38/vaca/año con una prevalencia del 8.87%, presentando mayor pérdida en la disminución de producción láctea (Miranda *et al.*, 2005). Otro estudio evaluó el impacto económico en producciones lecheras caprinas en el estado de Guanajuato, estimando que las pérdidas económicas por cabra infectada al año, eran de \$454 hasta \$852, con seroprevalencias del 4 al 23%, asociado solo a la disminución en la producción de leche (Jorge *et al.*, 2011).

1.12 PREVENCIÓN Y CONTROL DE LA PARATUBERCULOSIS

De forma general el control de la enfermedad se basa en 3 conceptos básicos: 1. Identificar la presencia de MAP mediante el diagnóstico, 2. Dentro de la medida que sea posible eliminar los animales infectados y 3. Prevenir la entrada al hato de animales infectados para prevenir la exposición de los animales a MAP. Estas tres medidas se establecen para ayudar a disminuir el porcentaje de casos clínicos en la población y desecho de los animales que están eliminando MAP en las heces, las cuáles deben ser implementadas dependiendo de la situación particular de cada hato o rebaño (Chávez *et al.*, 2005). El manejo de excretas como el composteo es muy importante para reducir la exposición de los animales a las heces de animales que están eliminando micobacterias. Otras recomendaciones son separar a las crías y alimentarlas con calostro proveniente de hembras seronegativas (Whittington, 2010). Igual de importante es realizar el diagnóstico de los animales sospechosos y a partir del resultado, tomar

decisiones como la separación y futura eliminación. Sin dejar de considerar, que la detección y control de esta micobacteria es complicada, debido al tiempo de replicación y a su persistencia en el medio ambiente, puesto que una detección efectiva de animales subclínicos es un paso importante en el control y reducción de la prevalencia de PTB en los hatos y rebaños. Esta detección puede ayudar a disminuir el riesgo de exposición, separando a los animales jóvenes de animales adultos, los cuales están contaminando el ambiente mediante la eliminación de MAP en las heces (Doré *et al.*, 2012).

Muchos esfuerzos se están realizando para educar a productores y veterinarios sobre esta costosa enfermedad para ayudar a su control e implementar estrategias de manejo sanitario en hatos y rebaños sanos. En Estados Unidos, muchos estados están actualmente implementando sus propios programas voluntarios de control de PTB (Whittington *et al.*, 2019).

1.13. VACUNACIÓN CONTRA LA PARATUBERCULOSIS

Dentro de las estrategias efectivas e implementadas en conjunto con las recomendaciones mencionadas anteriormente para el control de esta enfermedad, se recomienda el uso de la vacunación (Santema *et al.*, 2011).

La vacunación es considerada una estrategia de control efectiva con efecto terapéutico como preventivo (Singh *et al.*, 2014; Arrazuria, *et al.*, 2016), ya que contribuye a disminuir la morbilidad y mortalidad, ayuda a disminuir la presencia de signos clínicos, disminuir la carga bacteriana eliminada en las heces, aumento en la producción láctea posterior a la vacunación, además de que los costos por vacunación son menores que los generados por las pérdidas en la producción y eliminación precoz de animales (Juste *et al.*, 2020). Las vacunas comerciales disponibles son: Gudair® producida por CZV, basada en la bacteria cepa 316F muerta por calor, empleada en ovinos y cabras; Silirium® de CZV, que emplea a MAP inactivada y su aplicación se realiza en bovinos, Micopar® de Fort Dodge/Solvay USA, basada en cepa 18 muerta de *M. avium* subsp. *avium* y Neoparasec® del Laboratorio Merial, que emplea la bacteria viva atenuada y se aplica en borregos y cabras (Bastida & Juste; 2011). La vacunación ha sido efectiva en la reducción de la mortalidad en bovinos hasta en un 90% de los casos clínicos de PTB

y en disminuir la eliminación fecal de MAP de hasta un 40 %, comparado contra los animales que no fueron vacunados (Alonso-Hearn *et al.*, 2012). Sin embargo, algunos autores mencionan que las actuales vacunas comerciales disponibles, tienen efectos subóptimos de protección y algunas desventajas: como el desarrollo de una lesión granulomatosa en el sitio de aplicación en los animales y en los humanos existe el riesgo por inoculación accidental, también pueden interferir con las actuales pruebas basadas en la respuesta celular para la detección de tuberculosis bovina, ya que provocan reacción cruzada con las pruebas de tuberculina y por lo tanto los animales inmunizados puede presentar reacciones falsas positivas, por lo que se restringe su uso en algunos países como es el caso en México (Hausleithner *et al.*, 2001; Chávez, 2005; Windsor *et al.*, 2005; Reddacliff *et al.*, 2006).

En Australia, Nueva Zelanda, Islandia y España, la vacunación en ovinos ha sido un método de control para disminuir la prevalencia en animales (cuadro clínico), observaron que también disminuye el porcentaje de mortalidad y la tasa de eliminación de MAP en heces. Lo anterior al estimular la respuesta inmune celular, la cual se ha comprobado que es eficiente para controlar esta enfermedad con la producción de IFN γ , facilitando la destrucción de patógenos intracelulares (Griffin *et al.*, 2009; Bastida & Juste, 2011; Dhan *et al.*, 2016).

La vacunación se recomienda en hatos o rebaños en unidades de producción donde se quiere disminuir el número de animales infectados, pero es importante mencionar que debe implementarse a la par, medidas de bioseguridad más detección y separación de animales positivos y negativos; con esto se logra proteger a los animales jóvenes susceptibles a una posible infección, disminuir la diseminación de la enfermedad y disminuir la tasa de eliminación de micobacterias en heces (Collins *et al.*, 2010).

La vacunación de forma profiláctica se recomienda en animales jóvenes, ya que de esta forma estarían protegidos ante una futura exposición a MAP, sin embargo, también se ha evaluado su efecto en animales adultos, sobre todo con efecto terapéutico (Corpa *et al.*, 2000; Alonso-Hearn *et al.*, 2012; Arrazuria *et al.*, 2016).

1.13.1 SITUACIÓN DE LA VACUNACIÓN COMO ESTRATEGIA DE CONTROL DE PARATUBERCULOSIS EN MÉXICO

En México, aunque la PTB genera pérdidas económicas y es una enfermedad que por su patogenia es difícil de diagnosticar y de controlar, no existe vacuna disponible contra esta enfermedad. Esto crea la necesidad de elaborar inmunógenos específicos y que no generen reacción cruzada con antígenos del Complejo tuberculosis, debido a la interferencia que podría tener con la Campaña de control y erradicación de la tuberculosis bovina. Las vacunas basadas en la bacteria completa contienen diversos antígenos que se comparten entre MAP y micobacterias del Complejo tuberculosis, como es el caso de las proteínas de choque térmico, por lo tanto, cuando se emplea la prueba intradermoreacción con el uso de tuberculina bovina, pueden generarse resultados falso positivos en el diagnóstico de tuberculosis en los bovinos inmunizados con vacunas comerciales. Lo anterior complica el diagnóstico y vacunación de PTB, por lo que la detección e inmunización puede hacerse con base a antígenos específicos de cada especie micobacteriana (Chávez, 2005).

1.13.2 SISTEMAS EMPLEADOS PARA EL DESARROLLO DE VACUNAS

A nivel de investigación se han descrito varios métodos para la producción de dichas vacunas, entre los que se describen preparados con células completas de MAP vivas o muertas, pero son inespecíficas, ya que MAP tiene una homología con *M. avium* del 97% y con *M. tuberculosis* comparte más de 3000 genes de un total de 3959, por lo que la inmunización con este tipo también interfiere en las pruebas de diagnóstico de tuberculosis bovina (Juste R, 2012). Diversos investigadores han planteado y desarrollado otras propuestas con vacunas basadas en técnicas de biología molecular, utilizando la secuencia del genoma de MAP; por ejemplo, mutagénesis por transposones y años después se realizaron trabajos desarrollando vacunas por cambio alélico (Cavaignac *et al.*, 2000; Hamilton & Davis, 2008). Ahora con la disponibilidad de herramientas de biotecnología, también se propone el uso de vacunas de ADN. Una vacuna de ADN, es la inserción de un gen que codifica al inmunógeno en un vector para transformar posteriormente una bacteria, lograr su amplificación y purificarlo para finalmente inyectarlo en un hospedero inmunocompetente. Las vacunas de ADN tienen

las siguientes ventajas: son fáciles de preparar, son de bajo costo, estables y sobre todo seguras, puesto que no están elaboradas con el agente infeccioso (Huygen, 2003). Otro de los sistemas empleados para producción de vacunas es el sistema de despliegue en fago. Este sistema se caracteriza porque se fusionan péptidos a proteínas de la cápside de un fago, como en el caso de fagos filamentosos donde se incluye al M13 (Manoutcharian *et al.*, 2004). Las proteínas de cápside que presenta el fago son: la proteína pVIII que está presente en 2700 copias, así como la pIII y pVI, presentes en uno de los extremos, mientras que el extremo contrario presenta a las proteínas pVII y pIX. El fago M13 se emplea para infectar a *Escherichia coli* que tiene un pilli F, por donde la pIII se une para ingresar el ADN viral. Usando la maquinaria de *E.coli* se producen partículas virales, a las que están unidas las proteínas de interés, todo esto sin lisar a *E.coli*. Una de las ventajas de este sistema es que a las 5 proteínas virales se les pueden unir antígenos. La pVIII es una de las más empleadas debido al alto número de copias que presenta, pero debe considerarse que solamente se unen péptidos cortos, pues deben ser liberados a través de la membrana celular, mientras que pIII puede unir proteínas de mayor tamaño, pero en mucho menor densidad, lo que reduce su inmunogenicidad. Otra ventaja que presenta este sistema, es la estimulación del sistema inmune a través de la vía TLR, con la presencia de motivos CpG en el genoma viral, que son partículas de interés que sirven como adyuvante porque generan una fuerte respuesta inmunológica, otra característica es que los antígenos pueden ser expresados en el MHC (o CMH) tanto I como II, lo que resulta en una respuesta mediada por linfocitos T citotóxicos y producción de anticuerpos (Hess & Jewell, 2020). Una de las aplicaciones de este sistema de despliegue en fagos filamentosos es identificar epítomos específicos de patógenos y biomoléculas, para desarrollar vacunas preventivas y terapéuticas, por ejemplo, en el tratamiento de cáncer de glándula mamaria (Manoutcharian *et al.*, 2001). Otra aplicación exitosa con este sistema fue la expresión de 3 péptidos y un antígeno recombinante, a bajos costos de producción. En este trabajo se observó que, con el empleo del fago recombinante, hubo desarrollo de ambas respuestas Th1/Th2 con la producción de IL-4 e IFN γ , generando una respuesta protectora contra la cisticercosis en cerdos al inmunizarlos vía subcutánea y oral,

debido a la capacidad del fago para reclutar células T cooperadoras y la participación de linfocitos T citotóxicos (Manoutcharian *et al.*, 2004).

1.13.3 PROTEÍNAS ESPECÍFICAS E INMUNOGÉNICAS PRESENTES EN MAP Y EN *M. AVIUM* SUBESP. *AVIUM*.

La vacunación es un método eficiente en el control de la PTB, sin embargo, esta se limita por la interferencia en las pruebas de diagnóstico al obtener resultados falsos positivos, situación que no sería una limitante si se implementa el uso de vacunas con el empleo de antígenos específicos de MAP. Estas características anteriormente mencionadas, reducen el número de candidatos inmunogénicos disponibles; sin embargo, en los últimos años se han caracterizado y evaluado antígenos de MAP o presentes en otras micobacterias como MAA, sin reacción cruzada con antígenos del complejo tuberculosis, los cuales se describen en el siguiente cuadro 2.

ANTIGENO	GEN	CARACTERISTICAS	ESPECIFICIDAD	REFERENCIA
AphC	<i>aphC</i>	hidroperóxido de alquilo reductasa C	evaluado y detectado en 9 cepas diferentes de MAP, no hubo detección en 20 distintas especies de otras micobacterias, solo hubo reacción tenue con <i>M. gordonae</i>	Olsen <i>et al.</i> , 2000.
AphD	<i>aphD</i>	hidroperóxido de alquilo reductasa D	evaluado y presente en 9 cepas diferentes de MAP, no hubo detección en 20 distintas especies de otras micobacterias, solo hubo reacción tenue con <i>M. gordonae</i>	Olsen <i>et al.</i> , 2000; 2001.
Map 39	-	posible antígeno reconocido por células T, homologa a la proteína de la familia PPE	homóloga en MAA	Nagata <i>et al.</i> , 2005.
Map 41	-	reconocido por células T, homologa a la proteína de la familia PPE	homóloga en MAA	Nagata <i>et al.</i> , 2005.
MPP14	-	Proteína del complejo MAA	específico del complejo <i>M. avium</i>	Olsen <i>et al.</i> , 2005.
Complejo A36	-	familia de TMA, parte de PPD	94% homología con MAA	Gilot <i>et al.</i> , 1992.
P35 35 kDa MMP	locus MAP2121c	asociado con la invasión de células epiteliales intestinales bovinas MMP. Papel putativo en la invasión de células epiteliales. Antígeno que reconocen células T	presente en <i>M. leprae</i> y en MAA	Banasure <i>et al.</i> , 2001; Shin <i>et al.</i> , 2005; Basagoudanavar <i>et al.</i> , 2006; Bannantine <i>et al.</i> , 2008; Swathi <i>et al.</i> , 2020.
Apa	<i>modD</i>	antígeno de fibronectina rico en alanina y prolina	98% homología con MAA	Giofre <i>et al.</i> , 2009.
Map1718c	-	-	99% homología con MAA	Santema <i>et al.</i> , 2009.
Map1087	-	proteína putativa de superficie, transporte de péptidos, transporte de níquel	presente en MAA y <i>M. smegmatis</i>	Bannantine <i>et al.</i> , 2008.
Map3968	-	proteína putativa hemaglutinina de unión a heparina	92% homología con MAA	Sechi <i>et al.</i> , 2006.
a362 P34	-	epítoto para células B, parte del complejo A36, complejo TMA	homólogo en <i>M. leprae</i>	Dekesel <i>et al.</i> , 1993.
Map1506	-	proteína hipotética de la familia PPE	homólogo en <i>M. avium hominissuis</i> y MAA	Newton <i>et al.</i> , 2009.
Map3817c	-	proteína putativa de membrana	secuencia única en MAP	Bannantine <i>et al.</i> , 2008.
Map3420c	-	proteína hipotética de la familia PPE	homólogo en <i>M. avium hominissuis</i> y MAA	Newton <i>et al.</i> , 2009.
rcP34	-	proteína 34 kDa terminal carboxilo	epítotoes comunes de MAP, MAA y <i>M. intracelulare</i>	Malamo <i>et al.</i> , 2007; Swathi <i>et al.</i> , 2020.
Lpp34	-	lipoproteína putativa	homologa a MAA y en <i>E. coli</i>	Giofre <i>et al.</i> , 2007.
L5P	-	lipopentapéptido	no presente en MAA o <i>M. smegmatis</i>	Biet <i>et al.</i> , 2008.
PstA	<i>pstA</i>	lipopéptido de pared celular	presente en MAA	Wu <i>et al.</i> , 2009.
Map3841	<i>grpE</i>	-	presente en MAA	Hughes <i>et al.</i> , 2008.
HspX/MBP	<i>hspX</i>	posiblemente involucrado en adhesión o choque térmico.	específico de MAP	Bannantine & Stabel <i>et al.</i> , 2003.

Cuadro 2. Antígenos descritos en MAP y MAA, sin reacción cruzada con el Complejo tuberculosis. TOMADO Y ADAPTADO DE MIKKELSEN Y COL., 2011, ACTUALIZADO CON INFORMACIÓN DE SWATHI Y COL, 2020. Abreviaturas: MAA: *Mycobacterium avium* subsp. *avium*; MAP: *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*; MMP: *Major membrane protein*; PPD: *Purified protein derivative*; PPE: *Proline- proline- glutamate*; TMA: *Thermoestable macromolecular antigen*.

1.13.4 PROTEÍNA P35 de MAP

Un antígeno que está presente en *Mycobacterium avium* subesp. *avium* y *Mycobacterium leprae*, es la proteína P35. La proteína P35, designada por su peso molecular de 35 kDa, llamada proteína principal de membrana o MMP (*major membrane protein*), originalmente fue purificada en una fracción de la membrana de *Mycobacterium leprae*, codificada en el *locus* MAP2121c (Winter *et al.*, 1995). En 1996, se determinó su capacidad antigénica, ya que se observó su capacidad inmunogénica en el suero de pacientes con lepra y en estudios con ratones se vio que la MMP, protege contra la infección de la lepra (Triccas *et al.*, 1996; Martin *et al.*, 2001). Este antígeno fue posteriormente encontrado en *M. avium* y MAP (Triccas *et al.*, 1998; Banasure *et al.*, 2001; Bannantine & Stabel, 2001). Se observó que esta proteína se expresa en un alto nivel en condiciones de baja concentración de oxígeno y alta osmolaridad, condiciones similares a las que se presentan en el intestino del rumiante, también se detectó que tiene una importante participación en la invasión de células epiteliales bovinas, sugiriendo su empleo en más estudios como antígeno para la obtención de anticuerpos monoclonales (Bannantine *et al.*, 2003a; Bannantine *et al.*, 2003b; Bannantine *et al.*, 2007). Otra característica importante que se observó en la P35, es que no es detectada en animales infectados con *Mycobacterium bovis* y *Mycobacterium tuberculosis*, describiendo a la P35 como una proteína inmunogénica presente solo en MAP, en *M. leprae* y *M. avium* subespecie *avium* (Triccas *et al.*, 1996), por lo que si se emplea en bovinos no interfiere con el diagnóstico en la Campaña de control y erradicación de la tuberculosis bovina. Además, se observó que la P35 participa en la respuesta inmune celular, al estimular linfocitos T y la producción de IFN γ , eventos que se asocian a un control efectivo contra microorganismos intracelulares, así como generar una reacción de hipersensibilidad de tipo retardada (Banasure *et al.*, 2001; Bannantine *et al.*, 2003a; Basagoudanavar *et al.*, 2004; Basagoudanavar *et al.*, 2006).

Esta proteína también se ha empleado con fines diagnósticos mediante ensayo de *immunoblot*, donde se detectó al 100% de los bovinos infectados y con cuadro clínico de PTB, mientras que en animales con infección subclínica se detectó a 75% de estos bovinos (El-Zaatari *et al.*, 1997).

En otros estudios, se ha evaluado a la P35 como candidato vacunal contra PTB. Se demostró que la supresión del gen *relA*, un gen regulador de MAP, anula la habilidad de ésta, para establecer una infección persistente y en ausencia de este gen, el bovino desarrolla células T CD8 citotóxicas y así logra eliminar las bacterias intracelulares, aunado a que al emplear mutantes en *relA* de MAP e infectar células de animales vacunados con P35, demostraron que la P35 es uno de los péptidos que dirige esta respuesta y evoca el desarrollo de linfocitos T CD8 citotóxicos a través de la interacción con el MHC I (Swathi *et al.*, 2020), mientras que en células mononucleares en sangre periférica (PBMCs), provocan la activación y proliferación de células de memoria de linfocitos T CD4 y CD8, comparado con el control positivo (Leite *et al.*, 2015; Abdellrazeq *et al.*, 2018; Abdellrazeq *et al.*, 2019, Franceschi *et al.*, 2019). Además de ser altamente inmunogénica al favorecer la estimulación de la respuesta Th1 con la producción de citocinas proinflamatorias en ratones, también se ha visto que esta proteína es detectada por sueros de animales en distintas etapas de infección con PTB, inclusive en etapas tempranas (Bannantine *et al.*; 2003a).

1.13.5 EMPLEO DE P35 COMO INMUNÓGENO

Una de las metodologías disponibles para la expresión y evaluación de antígenos, es el sistema de despliegue en fago filamentoso. Este sistema tiene las ventajas adicionales de que la proteína elaborada es estable y debido a que es producida con ayuda de un bacteriófago, las proteínas propias del virus ayudan a estimular el sistema inmunológico sin necesidad de utilizar adyuvantes. Al emplear el fago filamentoso M13, se expresó la proteína P35 en alto número de copias al ser unida a la pVIII del fago y una vez obtenida, fue evaluada mediante su detección con sueros de animales con cuadro clínico de PTB y diagnosticados previamente como positivos a través de PCR punto final, histopatología, aislamiento bacteriológico y ELISA empleando el antígeno comercial PPA-3. Con los datos obtenidos anteriormente, la P35 fue empleada como antígeno en ELISA indirecto, para el diagnóstico de animales con sospecha de PTB empleando suero y plasma provenientes de distintas partes de México, mostrando una sensibilidad del 100 % y una especificidad del 92% (Castrellón A.V.E, 2012).

Una vez demostrado su empleo como antígeno, se decidió evaluar su uso como inmunógeno mediante la estrategia de vacunación; para lo cual se aplicó en borregas

infectadas naturalmente con PTB y diagnosticadas como infectadas previamente mediante PCR punto final, aislamiento bacteriológico y ELISA P35. Una vez realizado lo anterior, se evaluó la respuesta inmune celular mediante microarreglos genéticos, que consisten en una serie de sondas de ADN unidas a un soporte sólido, donde cada una representa un gen diferente y sirve para determinar la expresión genética completa en un momento determinado. También se evaluó la liberación de citocinas pro inflamatorias y anti inflamatorias, así como la respuesta inmune humoral mediante ELISA P35, además de evaluar la excreción de MAP en heces mediante cultivo bacteriológico y PCR (González R. D, 2014; Castrellón A.V.E, 2018). Los resultados obtenidos demostraron que el empleo de P35 estimula la respuesta Th1 con la producción de IFN γ estimulando predominantemente la respuesta inmune celular con la producción de citocinas pro inflamatorias, como IL-2 e IL-12, además de interleucinas anti inflamatorias como IL-10 (Castrellón A.V.E, 2018).

1.14 MODELOS EMPLEADOS PARA LA INFECCIÓN EXPERIMENTAL CON MAP

Las infecciones experimentales se han realizado en animales de laboratorio como ratones, ratas, conejos, hámsteres, gerbos, cuyos y aves (Larsen & Moon, 1972; Mokresh *et al*, 1990; Talaat, 2020). También se ha demostrado la infección natural sintomática en primates no humanos como macacos (McClure *et al.*, 1987).

En contraste, los ratones empleados como modelo experimental en infecciones con MAP ha sido ampliamente reportado, sin embargo, la corta vida del ratón para su uso en una enfermedad de curso crónico, la escasa reproducibilidad de presentación de lesiones y la ausencia de un cuadro clínico en esta especie, ha llamado la atención hacia el uso de otro animal como modelo, siendo los conejos un animal que ha mostrado varias ventajas sobre el ratón (Arrazuria *et al.*, 2016; Talaat, 2020).

1.14.1 INFECCIÓN EN CONEJOS COMO MODELO EXPERIMENTAL

Se ha demostrado que los conejos son un modelo animal que ha mostrado varias ventajas sobre el ratón, como la presentación de diarrea o heces pastosas, disminución de peso, enteritis granulomatosa en *saculus rotundus* y en el apéndice vermiforme, enterocolitis y linfadenitis granulomatosa, así como excreción de micobacterias en heces; además de la conveniencia de su mantenimiento y que es un hospedero que se

infecta de PTB en vida silvestre (Daniels *et al.*, 2003a; Stevenson *et al.*, 2009). Por lo tanto, este modelo es susceptible a infecciones por MAP y su multiplicación puede ser monitoreada, además se puede tener condiciones controladas para garantizar que no están infectados con MAP, condiciones que a veces es difícil conseguir en campo (Mokresh & Butler, 1990 Arrazuria *et al.*; 2016). Lo anterior fue demostrado por Mokresh y colaboradores (1989), cuando emplearon conejos de 3 semanas de edad como modelo para infección vía oral con cultivo de MAP, donde más del 60 % de los animales presentaron lesiones granulomatosas en *sacculus rotundus* y apéndice vermiforme. También lograron el aislamiento de esta micobacteria a partir de muestras de íleon, linfonodos mesentéricos y heces, además de presentar diarrea intermitente. Demostrando así que el conejo es un modelo animal adecuado para replicar infecciones con MAP (Mokresh, Czuprynski, & Butlers, 1989). De igual forma se ha observado que la mejor vía de inoculación para infección en este modelo, es la oral, siendo la que se presenta de forma natural en rumiantes, ya que otras vías como subcutánea, intraperitoneal e intravenosa genera una inflamación granulomatosa en otros órganos, distinto a lo que se espera ocurra en el intestino delgado y grueso (Harding, 1958; Roupie *et al.*, 2012). Con base a lo anterior y según lo descrito por Arrazuria y colaboradores en el 2016, donde emplearon la cepa de MAP K10 de origen bovino, a una dosis 1×10^9 UFC, se tiene un porcentaje de eficiencia mayor al 87% (Arrazuria *et al.*, 2016).

En un trabajo de revisión realizado por Arrazuria y colaboradores en el 2016, muestran un resumen sobre infección experimental realizado en conejos e indican que algunos autores requirieron entre más 7 meses para poder observar lesiones granulomatosas en intestino delgado y linfonodos, obteniendo el mayor porcentaje de eficiencia en la infección (Cuadro 3).

ORIGEN DE LA CEPA	EDAD AL MOMENTO DEL DESAFIO	DOSIS	NUMERO DE DOSIS	VIA INOCULACION	NUMERO DE ANIMALES (TOTAL)	NECROPSIA SEMANAS POST INFECCION	% INFECTADOS ^a	REFERENCIAS
bovino	10 días	8.9 mg	2	IP	4	12-27	100	(Francis,1943)
conejo/ hámster	4-5 semanas	1.6-5.6 mg	7	oral	22	4-40	6-50	(Hirsch,1956)
conejo/ cabra	4-6 semanas	0.2 mg	1	IP	10	≤42	<50	(Hirsch,1956)
conejo/ cabra	8-10 semanas	0.5 mg	2	IV	10	1-33	100	(Hirsch,1956)
bovino	1-2 días	7x10 ⁶ UFC	5/10	oral	21	32-40	43	(Mokresh <i>et al.</i> ,1989)
bovino	1-2 días	3.6x10 ⁸ UFC	1	oral	15	2-36	38	(Mokresh y Butler,1990)
bovino	1-2 días	2.6x10 ⁸ UFC	1	oral	5	2-36	100 (conejos con cuadro clínico pero sin desarrollo de lesiones)	(Mokresh y Butler,1990)
bovino	3 meses	5x10 ⁸ UFC	3	oral	4 adultos	96-128	50	(Vaughan <i>et al.</i> , 2005)
bovino	2 semanas	1x10 ⁸ UFC	3	oral	16 juveniles	8-84	19	(Vaughan <i>et al.</i> , 2005)
bovino	8 semanas	1x10 ⁹ UFC	3	oral	15	16-20	40-87	(Arrazuria <i>et al.</i> , 2015a)

Cuadro 3. Estudios de infección experimental de paratuberculosis en conejos. UFC: unidades formadoras de colonia; IP: Intraperitoneal; IV: Intravenosa. ^a: Porcentaje de infección determinado principalmente por cultivo a partir de tejido y necropsia. Cuando no había datos disponibles, los métodos de detección fueron histología, cultivo fecal y PCR. TOMADO Y ADAPTADO DE ARRAZURIA Y COL., 2016.

Concluyendo que los conejos son un modelo animal adecuado para realizar infecciones experimentales y evaluar vacunas. Finalmente, en el estudio de Arrazuria (2016), evaluaron una vacuna comercial basada en la bacteria completa inactivada. Como resultados obtuvieron un incremento en la respuesta inmunológica celular y humoral, así como disminución de carga bacteriana en los tejidos evaluados una vez que fueron inmunizados (Arrazuria *et al.*, 2016).

CAPITULO I

EVALUACIÓN DE MAP CEPA C ORIGEN ORIX CIMITARRA (*Oryx dammah*) EN INFECCIÓN EXPERIMENTAL EN CONEJOS

Short communications. Clinical course and pathogenicity of a *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* isolate from scimitar oryx (*Oryx dammah*) in experimentally infected rabbits.

Disponible en:

<https://sjar.revistas.csic.es/index.php/sjar/article/view/19896/6361>

Spanish Journal of Agricultural Research
21 (4), e05SC01, 7 pages (2023)
eISSN: 2171-9292

DOI:[10.5424/sjar/2023214-19896](https://doi.org/10.5424/sjar/2023214-19896)



Clinical course and pathogenicity of a *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolate from scimitar oryx (*Oryx dammah*) in experimentally infected rabbits

● Edith MALDONADO-CASTRO¹, ● Ana L. HERNÁNDEZ-REYES¹, ● Beatriz ARELLANO-REYNOSO¹, ● Carlos G. GUTIÉRREZ¹, ● Marta ALONSO-HEARN² and ● Gilberto CHÁVEZ-GRIS^{1*}

¹ Faculty of Veterinary Medicine and Zootechnics, National Autonomous University of Mexico, University Av. 3000, Coyoacan, 04510, Mexico City, Mexico. ² Department of Animal Health, NEIKER, Basque Research and Technology Alliance (BRTA). Technology Park of Bizkaia, Parcela 812, Berreaga 1, 48160 Derio, Bizkaia, Spain.

*Correspondence should be addressed to Gilberto Chávez-Gris: gris@unam.mx

Abstract

Aim of the study: To evaluate the infectivity of a MAP type C of a scimitar oryx (*Oryx dammah*) - included in an international conservation list - that showed clinical signs and granulomatous enteritis associated with paratuberculosis in rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) using molecular, bacteriological and pathological methodologies.

Area of study: The study was made in Tequisquiapan, Queretaro, CEIEPAA, FMVZ, UNAM, Mexico.

Material and methods: Three 6-week-old female New Zealand rabbits were orally infected for 3 consecutive days with 109 CFU of the MAP isolate. Blood and fecal samples were collected every 2 weeks for a total period of 28 weeks. IS900 PCR in blood and F57 real-time PCR in the feces were performed every 2 weeks and pathological analysis and bacteriological culture from tissue were made 28 weeks post infection.

Main results: MAP was detected by IS900 PCR in the blood of two of the three animals after 2 weeks of infection and again by F57 real-time PCR in the feces of the three infected rabbits. Infection with the MAP isolates in feces at 22 and 28 weeks post infection in one rabbit and isolate of vermiform appendix resulted in the development of granulomatous lesions in the three rabbits. The lesions were diffuse intermediate in one animal and multifocal in the other two rabbits.

Research highlights: Overall, these results demonstrated the infectivity of a MAP isolate from the scimitar oryx in rabbits.

Additional key words: bacteriological culture; granulomatous lesions; IS900 PCR; real-time F57 PCR; ruminants; experimental infection.

Abbreviations used: AFB (acid-fast bacilli); CFU (colony forming units); HE (hematoxylin-eosin); HPC (hexadecyl pyridinium chloride); MAP (*Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*); PBS (phosphate buffered saline); PCR (polymerase chain reaction); PCRq (quantitative real-time PCR); PTB (paratuberculosis); WBC (white blood cells); wpi (weeks post infection); ZN (Ziehl Neelsen).

Citation: Maldonado-Castro, E; Hernández-Reyes, AL; Arellano-Reynoso, B; Gutiérrez, CG; Alonso-Hearn, M; Chávez-Gris, G (2023). Clinical course and pathogenicity of a *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolate from scimitar oryx (*Oryx dammah*) in experimentally infected rabbits. Spanish Journal of Agricultural Research, Volume 21, Issue 4, e05SC01. <https://doi.org/10.5424/sjar/2023214-19896>.

Supplementary material (Figs. S1, S2) accompanies the paper on SJAR's website.

Received: 12 Oct 2022. **Accepted:** 27 Sep 2023.

Copyright © 2023 CSIC. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International (CC BY 4.0) License.

Funding agencies/institutions	Project / Grant
UNAM, DGAPA-PAPIIT	Project IT201221 "Evaluation of control strategies and economic impact using the P35 immunogen in ruminants naturally infected with <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> "

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Introduction

Paratuberculosis (PTB) is a chronic granulomatous enteritis of domestic and wild ruminants caused by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP). PTB-associated clinical signs include diarrhea, weight loss, decreased milk production, and occasional premature death. MAP infection has also been linked to human intestinal inflammatory diseases, such as Crohn's disease (Whittington et al., 2019). Non-ruminant species, such as the wild rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) can become naturally infected with MAP through the gut-associated lymphoid tissue, which results in diarrhea or pasty stools, weight loss, and granulomatous lesions mainly in the *sacculus rotundus* and vermiform appendix in the late phase of the infection (Mokresh & Butler, 1990; Beard et al., 2001a,b; Arrazuria et al., 2015, 2016). Wild rabbits can transmit MAP to domestic and wild ruminants when they feed on pastures where MAP-infected rabbits cohabit, as in the case of deer and cattle (Raizman et al., 2005; Judge et al., 2006). Mice, rats, and rabbits have been used as animal models for MAP infection (Mokresh et al., 1989; Talaat et al., 2020). However, animal models other than rabbits do not exhibit the characteristic clinical signs of PTB (Greig et al., 1999; Vaughan et al., 2005). Granulomatous lesions similar to those found in cattle have been observed in the *sacculus rotundus* and vermiform appendix of more than 60% of experimentally infected rabbits (Arrazuria et al., 2016). Additionally, MAP has also been isolated from the ileum, mesenteric lymph nodes, and feces of experimentally infected rabbits, suggesting that rabbits are a suitable animal model for replicating MAP infection (Mokresh et al., 1989; Arrazuria et al., 2016).

The mouse is the species most used to evaluate MAP infections due to MAP replication in the liver, spleen, and gut. However, experimental infections in mice are usually induced by intraperitoneal or intravenous injection of MAP (Talaat et al., 2020). Mice have a short lifespan making it more difficult to study a disease with a long chronic course. In addition, experimentally infected mice do not normally exhibit clinical signs and rarely develop PTB-associated granulomatous lesions in the gut (Roupie et al., 2012; Cooney et al., 2014; Ghosh et al., 2015).

It appears that scimitar oryx is particularly susceptible to MAP infection. Although the data are scarce, in a zoo colony in Italy ten animals were infected and six died with clinical signs of PTB (Pigoli et al., 2020). Similarly, in Mexico, ten animals from the same herd were infected and 50% of them were ill (Hernández-Reyes et al., 2022). This apparent susceptibility to PTB highlights the importance of MAP diagnosis in scimitar oryx, which is considered extinct in the wild (IUCN red list 2016: <https://www.iucnredlist.org/species/15568/50191470>). Since interspecies transmission of MAP poses a risk

to the conservation of animals in zoological parks, it is important to carry out pathogenicity studies to evaluate the infectivity of MAP strains in animals that may transmit the disease, such as rabbits. Therefore, the objective of this study was to evaluate the infectivity of a MAP field isolate from *Oryx dammah* (type C) in rabbits.

Material and methods

Ethics statement

The procedures performed on the animals were approved by the Institutional Subcommittee for the Care and Use of Experimental Animals of the National Autonomous University of Mexico (UNAM), registry SICUAE.DC-2019/1-2.

Obtaining MAP type C ORYX origin

A scimitar oryx from a zoological park in Mexico City showed clinical signs and lesions compatible with PTB at necropsy. Grossly the small intestine showed a red coloration and thickening of the mucosa and exhibited severe diffuse granulomatous enteritis by histopathology. An intestine section was homogenized using a tissue grinder Tenbroeck, decontaminated with 0.75% hexadecyl pyridinium chloride (HPC), and the macerate was cultured in Herrold's medium for 52 weeks (Ratnamohan & Spencer, 1986). Subsequently, the isolate was identified as MAP type C using a specific polymerase chain reaction (PCR) and DNA sequencing (Hernández-Reyes et al., 2022). The isolate was conserved in Luria Bertani media containing 20% sterile glycerol and 10% equine fetal serum (Jorge et al., 2005) and placed in liquid nitrogen until use. This MAP isolate was cultivated at 37 °C for five weeks in a shaking incubator (Thermo Scientific™MaxQ 4450, Germany) in Middlebrook 7H9 liquid medium™ (Difco, Detroit, MI, USA) supplemented with 2 mg/L of mycobactin J (Allied Monitor™, Fayette, MO, USA), 10% OADC (oleic acid, albumin, dextrose, and catalase) enrichment (BBL™, USA). The MAP bacteriological culture was centrifuged at $1,699 \times g$ for 10 min and resuspended in 1 mL of phosphate buffered saline (PBS). The resultant suspension was passed through a syringe with a 27 G needle and homogenized by vortexing (Labnet International Inc, USA). The bacterial suspension was stained with 1% carbol fuchsin and quantified in a Petroff Hausser chamber that was observed under a light microscope at 40x (Leica DM 1000, USA). The viability of the bacteria and the number of colony forming units (CFU) were verified by bacteriological culture in 7H9 solid medium. Aliquots containing 10^9 CFU/mL PBS were prepared and used immediately.

Experimental infection and sampling

Three 6-week-old female New Zealand rabbits were adapted to the experimental conditions for 3 weeks. On week 2, the presence of coccidia in feces was ruled out by using the Flotation and McMaster technique (Alowanou et al., 2021).

At the end of the 3 weeks of adaptation, considered as day zero and before infection, blood samples were collected from the auricular vein of the infected animals in vacutainer tubes with EDTA (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA). The three rabbits were orally infected with 10^9 MAP CFU for 3 consecutive days. Blood and feces samples were collected every 2 weeks for a total period of 28 weeks. At 28 weeks post infection (wpi), the rabbits were sedated with xylazine (5 mg/kg) and ketamine (35 mg/kg) and later euthanized with sodium pentobarbital (60 mg/kg) overdose injected intracardially, according to the Official Mexican regulations (DOF, 2015).

Extraction of total DNA from blood, feces, and gut tissue samples

White blood cells (WBC) were obtained from blood samples by adding 1 mL of erythrocyte lysis buffer to 500 μ L of blood samples. The tubes were vortexed and spun at $20,200 \times g$ for 2 min. The cell pellet was treated again with erythrocyte lysis buffer until it became white according to Singh et al. (2010). Subsequently, DNA was extracted from WBC using a QIAamp DNA mini-kit spin column (QIAGEN®, Duesseldorf, Germany). DNA extraction from fecal samples was performed according to Garrido et al. (2000) and DNA extraction from gut tissue according to Ratnamohan & Spencer (1986). Finally, the isolated DNAs were stored at -20°C until further use.

IS900 PCR from WBC and tissue DNA

Specific primers for the amplification of the insertion sequence IS900 of MAP, P3N (5'-GGGTGTGGCGT-TTCCTTCG3') and P5N (5'-ATTTCGCCGCCACCGC-CACG3') were used according to Favila-Humara et al. (2010). The PCR master mix contained 0.5 μ g of total DNA, 20 μ L of FastStart™ PCR Master (Roche, USA), and 1 μ L of each primer at a concentration of 500 nM. The PCR amplification was performed under the following conditions: 1 cycle of denaturation at 94°C for 5 min, 35 cycles at 94°C for 40 sec, 56°C for 40 sec, and 72°C for 40 sec, with a final cycle of 72°C for 5 min, using a Px2 Thermal cycler (Thermo Electron Corporation, USA). In the positive samples, the amplification of a 314 bp fragment of the IS900 MAP sequence was observed on a 1% agarose gel stained with ethidium bromide 0.5 μ g/mL (Invitrogen, USA).

Fecal real-time PCR for the amplification of the F57 map sequence

Fecal real-time PCR was performed using the Primerdesign Ltd *M. avium* subsp. *paratuberculosis* species specific F57 DNA fragment Genesig Advanced Kit® according to the manufacturer's instructions (Roche, Germany). Each PCR reaction contained 5 ng of the DNA sample, 10 μ L of master mix, 1 μ L of probes (final concentration 0.1 μ M) and 4 μ L of RNase/DNase-free water. Five μ L of RNase/DNase-free water was used as a negative control, while 5 μ L of the positive control template provided in the kit, was used for the positive control. The PCR conditions were 1 cycle of 2 min at 95°C , 50 cycles of 10 sec at 95°C , and 60 sec at 60°C , using a Genesig q16® Thermal cycler (Roche, Germany).

Identification of map in feces using Ziehl Neelsen

The identification of acid-fast bacilli (AFB) in feces was achieved by Ziehl Neelsen (ZN) staining, following the protocol described by Jorge et al. (2005).

Anatomopathological study

Samples from the duodenum, jejunum, ileum, *sacculus rotundus*, vermiform appendix, colon, rectum, mesenteric lymph nodes, liver, kidney, spleen, tonsils, and brain were collected at necropsy. Tissues were kept frozen at -20°C until processed for bacteriological culture. For the histopathological analysis, samples were fixed in 10% formalin and embedded in paraffin. Paraffin blocks were cut at 5 μ m using an ultramicrotome and slices were mounted in a slide and stained with hematoxylin-eosin (HE) and ZN. The stained sections were examined under a light microscope. The PTB-associated lesions were classified according to Maio et al. (2011) and Balseiro et al. (2019).

Bacteriological culture from tissue and feces

Only samples from *sacculus rotundus*, vermiform appendix and lymph nodes obtained during the necropsy, as well as feces, were processed for culture. Two grams of tissue were macerated by mechanical disruption, while feces were decontaminated with 40 mL of HPC at a final concentration of 0.75% and allowed to settle for 3 days. Subsequently, 6-8 drops of the suspension were taken from the layer near the sediment and inoculated in HEYMP (Herrold's medium with egg yolk and sodium pyruvate) supplemented with 2 mg/L of mycobactin J. The tubes were incubated at 37°C for 56 weeks.

Table 1. Results of the different bacteriological, microbiological and molecular diagnostic methods after the experimental infection of three rabbits with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* type C.

ID	PCR IS900 blood	ZN feces smear	qPCR F57 feces	PCR IS900 VA	Bacteriological culture	Clinical signs	Gross pathology	Histopathology
1	positive	positive (22, 28 wpi)	415,282 copies (22 wpi) 523,976 copies (28 wpi)	positive (28 wpi)	negative feces positive VA (28 wpi)*	negative	VA, SC, proximal ileum with mucosal thickening, edema in Peyer's patches	Multifocal granulomatous lesions in VA, SC, LN, ileum. ZN negative
2	positive	positive (22, 28 wpi)	568,841 copies (22 wpi) 684,328 copies (28 wpi)	positive (28 wpi)	negative feces positive VA (28 wpi)*	negative	SC thickened wall	Multifocal granulomatous lesions in VA, SC, LN. ZN negative.
3	negative	positive (22, 28 wpi)	1,059,344 copies (22 wpi) 1,238,914 copies (28 wpi)	positive (28 wpi)	positive feces 22* and 28 wpi** positive VA (28 wpi)**	diarrhea and weight loss (20 wpi)	VA, SC with mucosal thickening, mesenteric lymph nodes increased in size	Diffuse intermediate granulomatous lesions in VA, SC. ZN positive. Multifocal granulomatous lesions in LN. ZN negative

ID: identification; wpi: weeks post infection; ZN: Ziehl Neelsen; VA: vermiform appendix; SC: *Sacculus rotundus*; LN: lymph node; low CFU*: high CFU**.

Results and discussion

The present study demonstrated the ability of a MAP isolate from oryx to infect rabbits via the oral route. Table 1 summarizes the results of the different bacteriological, microbiological, and molecular diagnostic methods used after the experimental infection of the three rabbits with a MAP isolate from scimitar oryx. The three infected animals developed multifocal (2/3) or diffuse lesions (1/3) in the *sacculus rotundus* and vermiform appendix at 28 wpi. Gross and microscopic lesions were not observed in the liver, spleen, tonsils, or other organs of the infected animals and IS900 PCR results were negative. MAP DNA was amplified by IS900 PCR from the vermiform appendix of the three infected animals. In addition, MAP was detected by qPCR and ZN staining in the feces of all animals at 22 and 28 wpi. Furthermore, rabbit ID3 had a MAP load in feces at 22 and 28 wpi, with more than 10⁶ DNA copies per gram of feces. While ID1 and ID2 rabbits did not present clinical signs, ID3 rabbit presented diarrhea 20 wpi and thereafter had a gradual loss of body weight. Rabbit ID1 showed moderate thickening of the ileum mucosa (Fig. 1A), vermiform appendix, and mesenteric lymph node. Microscopically, rabbit ID1 showed multifocal granulomas in the *sacculus rotundus* (Fig. 1B). Rabbit ID2 showed thickening only in the

vermiform appendix, and *sacculus rotundus* mucosa with multifocal granulomas composed of macrophages in the mesenteric lymph nodes (Fig. 1C) and in the absence of AFB (Fig. 1D). In rabbit ID3, mucosal thickening was observed in the vermiform appendix and *sacculus rotundus*. Histologically, both sections presented diffuse intermediate granulomatous lesions composed of macrophages and some Langhans-type multinucleated giant cells with moderate infiltration of lymphocytes at the interfollicular level in the submucosa (Fig. 1E). The infiltrate was also composed of macrophages and scarce giant cells, with abundant amounts of AFB in the vermiform appendix (Fig. 1F) and moderate amounts of AFB in *sacculus rotundus*. In the same animal, an increase in the size and edematous appearance of mesenteric lymph nodes was observed. Histologically, multifocal granulomas composed of Langhans-type multinucleated giant cells and macrophages were observed without the presence of AFB. MAP was cultured from the feces of one of the three infected rabbits (rabbit ID3) at 22 and 28 wpi (Fig. S1 [suppl]). Bacteriological cultures from the vermiform appendix of three rabbits at 28 wpi were positive. In contrast, the bacteriological cultures from the lymph nodes of three rabbits were negative despite the presence of multifocal granulomas. The association between granulomatous lesions with abundant AFB shown

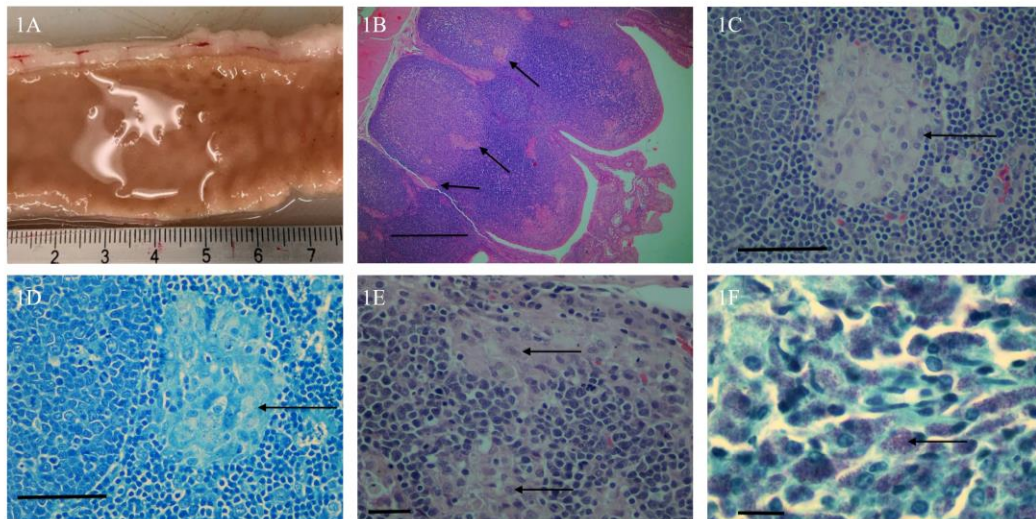


Figure 1. Results of the pathological study: (A) proximal ileum with mucosal thickening, rabbit ID1; (B) multifocal granulomatous lesions in *sacculus rotundus* rabbit ID1 (arrows); H-E 4x, bar 200 μ m. (C) multifocal granulomatous lesion in lymph node rabbit ID2 (arrow) H-E, 40x, bar 50 μ m; (D) multifocal granulomatous lesion in lymph node ZN negative, 40x, bar 50 μ m; (E) diffuse intermediate granulomatous lesions in associated lymphoid tissue in the vermiform appendix, rabbit ID3, (arrows) H-E, 40x, bar 20 μ m; (F) abundant AFB (arrow) in the cytoplasm of macrophages in lesion in the vermiform appendix, rabbit ID3, ZN positive, 100x, bar 10 μ m.

in this study and the presence of clinical signs has already been reported in both natural and experimental infections in rabbits, as well as in ruminants, where clinical signs are associated with advanced lesions, AFB and positive bacteriological cultures (Beard et al., 2001b; Maio et al., 2011). MAP was detected by IS900 PCR in the WBC of two of the three infected rabbits at two wpi (Fig. S2 [suppl]), indicative of an early systemic infection state in subclinical animals (Singh et al., 2010; Badia-Bringué et al., 2022).

Previous studies in experimental infections using rabbits have shown that not all of them develop clinical signs and lesions. These differences are due to age, breed, MAP strain type, infective dose, experiment duration, route and repeated inoculation (Mokresh et al., 1989; Mokresh & Butler, 1990; Vaughan et al., 2005; Begg & Whittington, 2008). Experimentally infected rabbits with MAP type C isolates revealed that it takes from 5 to 25 months to show clinical signs. Whereas, in some animals, lesions were observed as multifocal granulomatous with rare to moderate AFB in gut tissues and occurred between 5 to 32 months, and those without clinical signs tended to have focal lesions without AFB (Mokresh et al., 1989; Vaughan et al., 2005; Arrazuria et al., 2015, 2016). In our study, intermittent diarrhea was present in only one rabbit (ID3) at the fifth month and lesions in the intestine and lymph nodes were observed in three animals at 7 months post-infection. In experimental infection with MAP K10

isolate (type C) using the same dose as in this study (10^9 CFU), 87% of the infected rabbits developed PTB-associated lesions (Arrazuria et al., 2016). Furthermore, the different diagnostic techniques used for the evaluation of the infection may also contribute to the differences in the results between studies (Arrazuria et al., 2015, 2016). In natural conditions, it was determined that infected cattle eliminate around 10^8 CFU/g of feces, while the shedding of infected rabbits was estimated to be about $7.6 \times 10^5 \pm 5.2 \times 10^5$ CFU/g (Daniels et al., 2001, 2003). These figures for natural infection doses during extended periods of sharing pastures with infected cattle whose strains show the same genetic pattern (Greig et al., 1999) parallel the infective dose used in this study.

Conclusion

This is the first report of an experimental infection of rabbits with a MAP isolate from scimitar oryx. Our results demonstrate that rabbits can be infected with a MAP strain from oryx and develop PTB-associated lesions, mainly in the vermiform appendix and *sacculus rotundus*. We conclude that rabbits can replicate the clinical signs and the anatomical and histopathological lesions commonly observed in MAP-infected cattle. Therefore, rabbits infected with MAP are a suitable model to evaluate the pathogenesis of this disease and as vaccine candidates for the control of

PTB. In addition, our results demonstrated the infectivity of a MAP isolate from scimitar oryx in rabbits which has implications for the epidemiology of the disease. Rabbits and the scimitar oryx can be naturally infected with MAP and participate in MAP transmission, representing a risk to the conservation of animals in zoological parks where diverse animal species are closely housed.

Authors' contributions

Conceptualization: E. Maldonado-Castro, B. A. Arellano-Reynoso, C. G. Gutierrez, M. Alonso-Hearn, G. Chávez-Gris.

Data curation: B. A. Arellano-Reynoso, C. G. Gutierrez, M. Alonso-Hearn, G. Chávez-Gris.

Formal analysis: E. Maldonado-Castro, B. A. Arellano-Reynoso, C. G. Gutierrez, M. Alonso-Hearn, G. Chávez-Gris.

Funding acquisition: G. Chávez-Gris.

Investigation: E. Maldonado-Castro.

Methodology: E. Maldonado-Castro, B. A. Arellano-Reynoso, C. G. Gutierrez, M. Alonso-Hearn, G. Chávez-Gris.

Project administration: E. Maldonado-Castro, B. A. Arellano-Reynoso, C. G. Gutierrez, M. Alonso-Hearn, G. Chávez-Gris.

Resources: G. Chávez-Gris.

Software: Not applicable.

Supervision: B. A. Arellano-Reynoso, C. G. Gutierrez, M. Alonso-Hearn, G. Chávez-Gris.

Validation: A. L. Hernández-Reyes.

Visualization: B. A. Arellano-Reynoso, C. G. Gutierrez, M. Alonso-Hearn, G. Chávez-Gris.

Writing – original draft: E. Maldonado-Castro.

Writing – review & editing: B. A. Arellano-Reynoso, C. G. Gutierrez, M. Alonso-Hearn, G. Chávez-Gris.

References

- Alowanou GG, Adenilé AD, Akouèdegne GC, Bossou AC, Zinsou FT, Akakpo GCA, et al., 2021. A comparison of Mini-FLOTAC and McMaster techniques in detecting gastrointestinal parasites in West Africa dwarf sheep and goats and crossbreed rabbits. *J Appl Anim Res* 49: 30-38. <https://doi.org/10.1080/09712119.2021.1876703>
- Arrazuria R, Molina E, Mateo-Abad M, Arostegui I, Garrido JM, Juste RA, et al., 2015. Effect of various dietary regimens on oral challenge with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in a rabbit model. *Res Vet Sci* 101: 80-83. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2015.06.006>
- Arrazuria R, Molina E, Garrido JM, Pérez V, Juste RA, El-guezabal N, 2016. Vaccination sequence effects on immunological response and tissue bacterial burden in paratuberculosis infection in a rabbit model. *Vet Res* 47: 1-11. <https://doi.org/10.1186/s13567-016-0360-y>
- Badia-Bringué BG, Canive M, Casais R, Blanco VC, Amado J, Iglesias N, et al., 2022. Evaluation of a droplet digital PCR assay for quantification of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* DNA in whole-blood and fecal samples from MAP-infected Holstein cattle. *Front Vet Sci* 9: 1-13. <https://doi.org/10.3389/fvets.2022.944189>
- Balseiro A, Perez V, Juste RA, 2019. Chronic regional intestinal inflammatory disease: A trans-species slow infection? *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 62: 88-100. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2018.12.001>
- Beard PM, Rhind SM, Buxton D, Daniels MJ, Henderson D, Piral A, et al., 2001a. Natural paratuberculosis infection in rabbits in Scotland. *J Comp Pathol* 124: 290-299. <https://doi.org/10.1053/jcpa.2001.0466>
- Beard PM, Stevenson K, Pirie A, Rudge K, Buxton D, Rhind SM, et al., 2001b. Experimental paratuberculosis in calves following inoculation with a rabbit isolate of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *J Clin Microbiol* 39: 3080-3084. <https://doi.org/10.1128/JCM.39.9.3080-3084.2001>
- Begg DJ, Whittington RJ, 2008. Experimental animal infection models for Johne's disease, an infectious enteropathy caused by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Vet J* 176: 2: 129-145. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2007.02.022>
- Cooney MA, JL Steele, Steinberg H, Talaat AM, 2014. A murine oral model for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection and immunomodulation with *Lactobacillus casei* ATCC 334. *Front Cell Infect Microbiol* 4: 1-10. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2014.00011>
- Daniels MJ, Ball N, Hutchings MR, Greig A, 2001. The grazing response of cattle to pasture contaminated with rabbit faeces and the implications for the transmission of paratuberculosis. *Vet J* 161: 306-313. <https://doi.org/10.1053/tvjl.2000.0550>
- Daniels MJ, Henserson D, Greig A, Stevenson K, Sharp JM, Hutchings MR, 2003. The potential role of wild rabbits *Oryctolagus cuniculus* in the epidemiology of paratuberculosis in domestic ruminants. *Epidemiol Infect* 130: 553-559. <https://doi.org/10.1017/S0950268803008471>
- DOF, 2015. NORMA Oficial Mexicana NOM 033 SAG/ZOO/2014 métodos para dar muerte a los animales domésticos y silvestres. Diario Oficial de la Federación (México) 26/08/2015.
- Favila-Humara LC, Chávez-Gris G, Carrillo-Casas EM, Hernández-Castro R, 2010. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* detection in individual and bulk tank milk samples from bovine herds and caprine flocks. *Foodborne Pathog Dis* 7. <https://doi.org/10.1089/fpd.2009.0374>
- Garrido JM, Cortabarría N, Oguiza JA, Aduriz J, Juste RA, 2000. Use of a PCR method on fecal samples for diagnosis of sheep paratuberculosis. *Vet Microbiol* 77: 379-386. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(00\)00323-0](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(00)00323-0)
- Ghosh P, Shippy DC, Talaat AM, 2015. Superior protection elicited by live-attenuated vaccines in the murine model of paratuberculosis. *Vaccine* 33: 7262-7270. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.10.116>

- Greig A, Stevenson K, Henderson D, Pérez V, Hughes V, Pavlik I, et al., 1999. Epidemiological study of paratuberculosis in wild rabbits in Scotland. *J Clin Microbiol* 37: 1746-1751. <https://doi.org/10.1128/JCM.37.6.1746-1751.1999>
- Hernández-Reyes AL, Chávez-Gris G, Maldonado-Castro E, Alcaraz-Sosa LE, Díaz-Negrete MT, 2022. First identification of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in wild ruminants in a zoo in Mexico. *Vet World* 15: 655-661. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2022.655-661>
- Jorge M, Alito A, Bernardelli A, Canal A, Cataldi A, Cicuta M, et al., 2005. Diagnostic manual of mycobacteria of veterinary importance. A. AA de V. de L. of Diagnosis. Santa Fe, ed. AA de V. de L. of Diagnosis. Santa Fe, Argentina.
- Judge J, Kyriazakis I, Greig A, Davidson RS, Hutchings MR, 2006. Routes of intraspecies transmission of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in rabbits (*Oryctolagus cuniculus*): a field study. *Appl Environ Microbiol* 72: 398-403. <https://doi.org/10.1128/AEM.72.1.398-403.2006>
- Maio E, Carta T, Balseiro A, Sevilla IA, Romano A, Ortiz JA, et al., 2011. Paratuberculosis in european wild rabbits from the Iberian peninsula. *Res Vet Sci* 91: 212-218. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2010.12.014>
- Mokresh AH, Czuprynski CJ, Butler DG, 1989. A rabbit model for study of *Mycobacterium paratuberculosis* infection. *Infect Immun* 57: 3798-3807. <https://doi.org/10.1128/iai.57.12.3798-3807.1989>
- Mokresh AH, Butler DG, 1990. Granulomatous enteritis following oral inoculation of newborn rabbits with *Mycobacterium paratuberculosis* of bovine origin. *Can J Vet Res* 54: 313-319.
- Pigoli C, Garbarino C, Ricchi M, Bonacina E, Gibelli L, Grieco V, et al., 2020. Paratuberculosis in captive scimitar-horned oryxes (*Oryx dammah*). *Animals* 1-11. <https://doi.org/10.3390/ani10111949>
- Raizman EA, Wells SJ, Jordan PA, Delgiudice GD, Bey RR, 2005. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from free-ranging deer and rabbits surrounding Minnesota dairy herds. *Can J Vet Res*: 32-38.
- Ratnamohan TN, Spencer TL, 1986. A technique for the purification of *Mycobacterium paratuberculosis* from the ileal mucosa of infected cattle. *Aust Vet J* 63: 185-187. <https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.1986.tb02970.x>
- Roupie V, Viart S, Leroy B, Romano M, Trinchero N, Govaerts M, et al., 2012. Immunogenicity of eight *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* specific antigens in DNA vaccinated and Map infected mice. *Vet Immunol Immunopathol* 145: 74-85. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2011.10.012>
- Singh PK, Singh SV, Kumar H, Sohal JS, Singh AV, 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. <https://doi.org/10.4061/2010/748621>
- Talaat A, Chia W, Murray E, 2020. Experimental small animal models of paratuberculosis, 2nd ed; Berh M et al. (eds). CAB Int Publ, Boston, USA.
- Vaughan JA, Lenghaus C, Stewart DJ, Tizard ML, Michalski WP, 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. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2004.10.019>
- Whittington R, Donat K, Weber MF, Kelton D, Nielsen SS, Eisenberg S, et al., 2019. Control of paratuberculosis: who, why and how. A review of 48 countries. *BMC Vet Res* 4: 1-29. <https://doi.org/10.1186/s12917-019-1943-4>

SUPPLEMENTARY MATERIAL



Figure S1. Bacteriological isolation showing colonies compatible with MAP (circle) at 28 wpi in HEYMP medium from the vermiform appendix rabbit ID3 (14 weeks incubation).

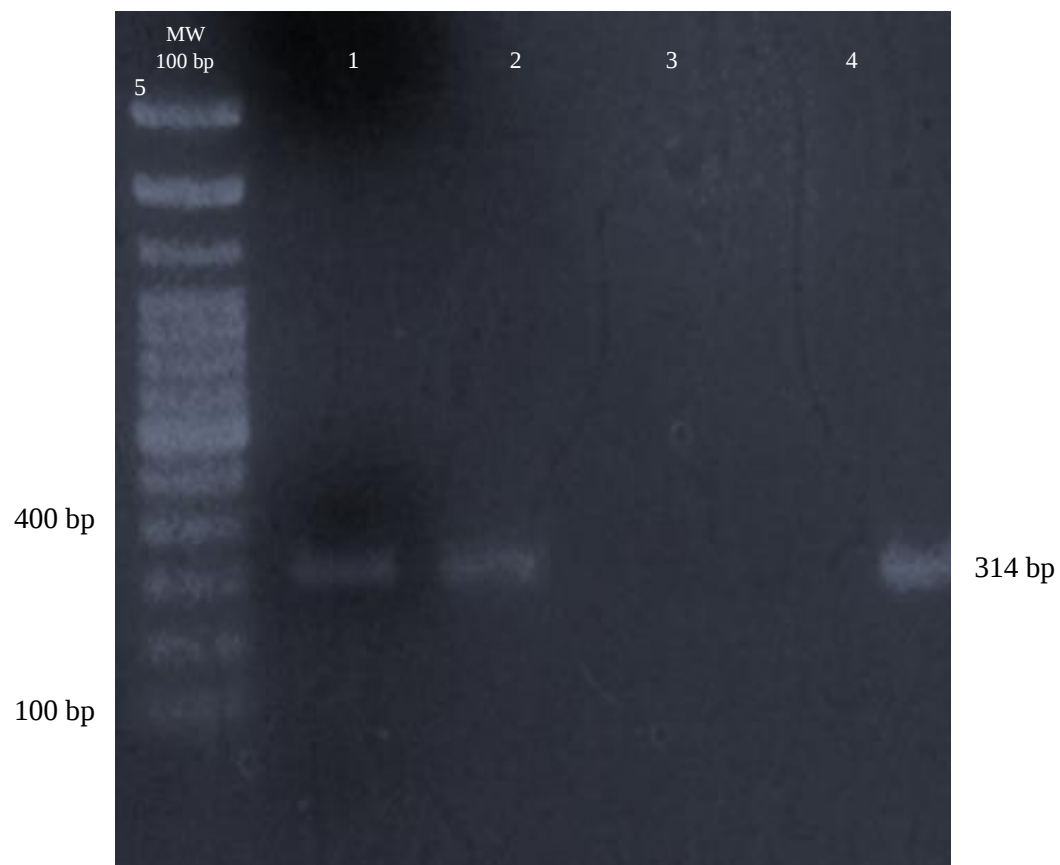


Figure S2. Amplification of MAP DNA by PCR IS900. MW lane; Molecular weight marker 100 bp; lanes 1-2 amplifications products (314 bp) obtained from blood rabbit ID1 and ID2; lane 3 rabbit ID3 negative result, lane 4 negative control (water) and lane 5 positive control (DNA MAP colony).

CAPITULO II

EVALUACIÓN DEL INMUNÓGENO P35 DE MAP EN CONEJOS ANTES Y DESPUÉS DE LA INFECCIÓN EXPERIMENTAL CON MAP CEPA C

2. JUSTIFICACIÓN

Se ha demostrado que el empleo de vacunas para el control de la PTB tiene efectos positivos tanto en su uso preventivo como terapéutico, al estimular la respuesta inmune celular y humoral, reduciendo la mortalidad, disminuir la excreción de MAP en heces, reducir la presentación de animales con cuadro clínico como diarrea y disminución de peso, así como controlar el desarrollo de lesiones granulomatosas en intestino de los animales inmunizados. Sin embargo, al emplear a la micobacteria completa, esto genera reacción cruzada con antígenos del Complejo tuberculosis y puesto que en México no existe una vacuna disponible para el control de PTB, crea la necesidad de elaborar inmunógenos específicos evaluados en un modelo animal económico para comprender mejor la patogenia y los mecanismos asociados al control de la paratuberculosis a través de un modelo animal.

2.1 HIPÓTESIS

El empleo de la vacuna P35 en conejos infectados experimentalmente provoca menor desarrollo de lesiones granulomatosas en intestino, disminución de la excreción de micobacterias en heces debido a que evoca tanto una respuesta inmune celular como humoral.

2.2 OBJETIVO GENERAL

1) Evaluar la expresión de interleucinas en células mononucleares en sangre, la excreción de MAP en heces, así como evaluar el desarrollo de lesiones granulomatosas en intestino y linfonodos mesentéricos, en conejos vacunados con P35 y desafiados con MAP cepa C a través de la vía oral.

2.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1) Obtener el inmunógeno P35 mediante su expresión empleando el sistema de Despliegue en el fago M13.

2) Evaluar el inmunógeno P35 mediante la expresión de TNF α , IL12, IL 8 e IL10 mediante PCR tiempo real a partir de células mononucleares en sangre y de IFN γ mediante ELISA comercial, en conejos inmunizados con P35 e infectados experimentalmente con MAP cepa C.

3) Determinar la eliminación de MAP en heces mediante PCR F57 tiempo real en conejos infectados experimentalmente con MAP cepa C e inmunizados con P35.

4) Evaluar el desarrollo de lesiones granulomatosas en intestino delgado y linfonodos mesentéricos, mediante estudio anatomopatológico en conejos inmunizados con P35 e infectados experimentalmente con MAP cepa C.

RESUMEN

La paratuberculosis es una enfermedad crónica ocasionada por *Mycobacterium avium* subesp. *paratuberculosis* (MAP) y se considera que está presente en los hatos y rebaños del país. La proteína P35 está presente en MAP pero no en las micobacterias que integran el Complejo tuberculosis y es considerada inmunogénica, por lo que se ha evaluado como candidato vacunal. La vacunación contra MAP en México ha sido limitada, y poco se conoce del efecto preventivo y terapéutico en condiciones experimentales controladas. Este estudio se diseñó para evaluar la inmunización con la P35 antes y después de la exposición con MAP usando conejos como modelo animal. Los conejos se dividieron en cinco grupos: 1CON testigo negativo (n=3); 2INF testigo infectado y no inmunizados (n=3); 3M13 inoculados con el adyuvante M13 sin la proteína P35 e infectados con MAP cepa C (n=4); 4INM-INF inmunizados con P35 e infectados con MAP cepa C en la semana cuatro (n=4) y el 5INF-INM infectados con MAP cepa C e inmunizados con P35 en la semana 10 (n=4). Los resultados demostraron que la P35 estimula la respuesta inmune celular y humoral, disminuyendo la excreción de MAP en heces y el desarrollo de lesiones granulomatosas de los conejos inmunizados debido a la expresión de $\text{IFN}\gamma$, $\text{TNF}\alpha$, IL8 e IL12. Se observó una mayor expresión de IL8 e IL12 en el grupo 5INF-INM, siendo mayor a las 12 semanas después de la inmunización, mientras que para el $\text{IFN}\gamma$ fue en la semana 14, mientras que la mayor expresión de $\text{TNF}\alpha$ fue a las 14 semanas en el grupo 4INM-INF. Por otro lado, la expresión de IL-10 y la producción de anticuerpos fue mayor en la semana 28, coincidente con el menor desarrollo de lesiones en intestino en los grupos 4INM-INF y 5INF-INM. Los resultados de este trabajo muestran que los conejos del grupo 5INF-INM, infectados en la semana 4 e inmunizados con P35 en la semana 10, evocan una respuesta inmune celular mayor y de forma más temprana comparada con el grupo 4INM-INF. Aunque se sugiere realizar más estudios evaluando distintas concentraciones de la P35 para determinar el mejor comportamiento inmunogénico e incluso evaluar en conjunto con otras proteínas inmunogénicas de MAP y que no estén presentes en el

Complejo tuberculosis, estos resultados sugieren que la P35 puede ser un adecuado candidato vacunal efectivo para el control de la paratuberculosis.

3. INTRODUCCIÓN

La paratuberculosis (PTB) es una enfermedad infecciosa crónica causada por *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* (MAP) de difícil control y a la falta de tratamiento, el escaso conocimiento sobre su patogenia, el largo periodo de incubación y las dificultades en el diagnóstico. La proteína P35 fue originalmente identificada en *Mycobacterium leprae* (Winter *et al.*, 1995), mostró capacidad inmunogénica en sueros de pacientes con lepra (Triccas *et al.*, 1996) y se sugirió su protección contra la infección en estudios con ratones (Martin *et al.*, 2000). Este antígeno fue posteriormente encontrado en *M. avium* (Banasure *et al.*, 2001; Triccas *et al.*, 1998) y MAP (Banasure *et al.*, 2001; Bannantine & Stabel, 2001). Otra característica importante que se observó en la P35, no es detectada en bovinos infectados con bacterias del Complejo tuberculosis (*Mycobacterium bovis* y *Mycobacterium tuberculosis*), concluyendo que la P35 es una proteína presente en MAP y no en el Complejo tuberculosis (Triccas *et al.*, 1996). Además, se observó que la P35 participa en la respuesta inmune celular, estimulando linfocitos T produciendo IFN γ , citocina importante asociada al control efectivo contra microorganismos intracelulares. También se observó el uso de la P35 como antígeno capaz de estimular linfocitos y generar una reacción de hipersensibilidad (Banasure *et al.*, 2001; Bannantine *et al.*, 2003; Basagoudanavar *et al.*, 2004; 2006).

Dentro de las estrategias para el control de la PTB, se recomienda el uso de la vacunación (Bastida & Juste, 2011). La vacunación es considerada una estrategia de control efectiva con efecto tanto terapéutico como preventivo (Singh *et al.*, 2014; Arrazuria, *et al.*, 2016). Contribuye a disminuir la morbilidad y mortalidad, así como la presencia de signos clínicos y la carga bacteriana eliminada en heces, provocando además como consecuencia aumento en la producción láctea (Castellanos & Aranaz, 2009; Bastida & Juste, 2011).

En los últimos años se han desarrollado vacunas subunitarias empleando proteínas secretoras como 19, 36-38 y 65 kDa, vacunas de ADN, recombinantes o con proteínas nativas como Hsp70, 74F, Ag85AA, g85BAg, 85C, SOD; las cuales generalmente se consideran costosas en su producción debido a los procesos de purificación (Gupta *et al.*, 2016). Por ello, se han evaluado otros sistemas de producción empleando distintos vehículos como el uso de fagos, con la ventaja de disminuir el costo de producción, su facilidad y mayor expresión de partículas en su superficie (Gupta *et al.*, 2019). El sistema de despliegue en fago filamentoso, tiene las ventajas de que la proteína elaborada es estable y debido a que es producida con ayuda de un bacteriófago, las proteínas propias del virus ayudan a estimular el sistema inmunológico sin necesidad de utilizar adyuvantes (Manoucharian *et al.*, 2001, 2004). Por lo que el objetivo de este trabajo fue evaluar a la P35 como inmunógeno, antes y después de la inoculación experimental por la vía oral con MAP cepa C en conejos empleados como modelo animal.

3.1 MATERIAL Y MÉTODOS

3.1.1 OBTENCIÓN DEL INMUNÓGENO P35 MEDIANTE EL SISTEMA DESPLIEGUE EN FAGO

Se realizó en el Laboratorio C-040 del Departamento de Inmunología del Instituto de Investigaciones Biomédicas, mediante la técnica de despliegue en fago, en la que se empleó el fago filamentoso M13 para expresar la proteína P35 unida la proteína de cubierta cpVIII del fago. De acuerdo a Manoucharian *et al.*, (2004) descrito brevemente, con las siguientes modificaciones: A partir de la clona 2 de *E. coli* TG1 transformada con el gen de la P35 e insertado en el vector fagémido pG8SAET, se cultivó en 20 ml de medio YT2x (BD Difco ®), las cuales se colocaron a 37 °C a 0.7 xG durante toda la noche, al día siguiente se tomó 1 ml, mediante choque térmico se liberó el ADN genómico bacteriano y se realizó una PCR con los iniciadores p35-NcoI y p35-SnaBI para verificar mediante amplificación y su visualización en gel de agarosa, de un fragmento con un tamaño esperado de 1000 pares de bases (pb), posteriormente este fragmento se secuenció empleando los iniciadores pYSAET y f8OLI, y se analizó mediante el

programa *Generun®*, donde se verificó la inserción de secuencia de P35. A partir de la clona 2, se emplearon 20 ml de cultivo 2xYT con ampicilina a 100 µg/ml, hasta alcanzar un valor de absorbancia de 0.6, se inoculó con 30µl de fago M13K07 (Sigma-Aldrich, St Louis, MO™), se incubó a 37°C sin agitación, terminado el tiempo se agitó a 250 rpm durante otros 30 minutos. El cultivo anterior se colocó con 400 ml de medio 2xYT con 400 µl de carbenicilina a 10 mg/ml y 400 µl de ampicilina, se dejó en incubación 37°C durante 16 h. Una vez concluido el tiempo, se centrifugó a 8000 xg durante 20 min a 4°C. Se colectó el sobrenadante en tubos nuevos y después se precipitó con 1/6 volúmenes de polietilenglicol (20% PEG/ 2 NaCl 5M). Se homogenizó y se incubó durante toda la noche a 4°C, se centrifugó a 10000xg durante 10 minutos, se conservó la pastilla y se suspendió con 20 ml de TBS, se centrifugó a 3000xg durante 5 minutos. Se tituló el fago en 5 ml de cultivo 2xYT con E. coli TG1 sin transformar, incubándolo a 37°C hasta lograr un valor de absorbancia de 0.7. Se obtuvo el número de partículas virales del fago recombinante P35, multiplicando el factor de dilución por el número de colonias obtenidas en cada dilución, usando agar-Luria Bertani con carbenicilina. Los rendimientos del fago fueron de 1×10^{14} UFC/ml de cultivo de medio (Manoucharian *et al.*, 2004; Domínguez *et al.*, 2020).

3.1.2 CONEJO COMO MODELO ANIMAL PARA LA EVALUACIÓN DE LA P35

Se emplearon 18 conejos hembras de raza Nueva Zelanda, de 6 semanas de edad, aparentemente sanos, libres de coccidias y pasteurelosis. Estos conejos se mantuvieron en adaptación y observación, de forma individual en jaulas metálicas durante 3 semanas en el animalario de la Unidad de Servicios de Diagnóstico y Constatación (USEDICO) del Centro de Enseñanza, Investigación y Producción Animal en Altiplano (CEIEPAA) perteneciente a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Durante estas semanas, se realizaron evaluaciones cuarentenarias para favorecer un periodo de acondicionamiento en los animales antes de iniciar los experimentos y de acuerdo al protocolo registrado en el Subcomité Institucional para el cuidado y uso de animales de experimentación (SICUAE) con número

SICUAE.DC-2019/1-2. Previo al inicio de la infección con MAP cepa C de *Oryx dammah*, se tomaron muestras de heces directamente de la charola recolectora de excretas, para descartar la presencia de coccidias, mediante la técnica de Flotación y Mc Master. Los conejos se mantuvieron en jaulas con rejilla de acero inoxidable (1 conejo por cada jaula), con piso de malla de alambre con 1.5 cm de separación, con suficiente amplitud y altura (60x40x90cm) para permitir el movimiento y posturas naturales de los conejos.

Los conejos fueron mantenidos en un fotoperiodo de 15 horas luz a una intensidad de 3 *watts* por m² y sistema de extracción de olores. En las jaulas se colocaron charolas con viruta como material absorbente. El cambio de cama y limpieza se realizó 5 veces por semana como mínimo. Las jaulas se mantuvieron limpias, secas y en condiciones ambientales aceptables. Todos los días se observaron los animales para detectar cambios de comportamiento, enfermedades, heridas o muerte, datos que se registraron en una bitácora. También se colocaron letreros de identificación con datos de contacto en caso de emergencia del responsable del proyecto de investigación. El alimento proporcionado fue alimento balanceado comercial (Purina®), elaborado para conejos en crecimiento y posteriormente a los 4 meses de edad se proporcionó alimento para reproductores, el cual se almacenó sobre tarimas y en una bodega ventilada para evitar contaminación ambiental. El agua suministrada a los animales era potable y a libre acceso, la cual se cambió todos los días. El lavado y desinfección de las jaulas se realizó una vez por semana como mínimo. Los desechos generados por los animales, cuando no fueron requeridos para su estudio, fueron removidos y eliminados en bolsas amarillas, llevadas a contenedores para su incineración, mientras que los materiales punzocortantes, fueron depositadas en contenedores especiales y los materiales contaminados y no biológicos se colocaron en bolsas rojas para su incineración.

3.1.3 TRATAMIENTOS EXPERIMENTALES PARA LA EVALUACIÓN DE P35

Se establecieron 5 grupos compuestos por conejos, hembras de 6 semanas de edad, como se indica. A continuación: el grupo testigo, sin tratamiento (**1CON**;

n=3); grupo infectados con MAP cepa C a la semana 4 después del tiempo cero (T0) (**2INF**; n=3); grupo inoculados con el fago M13 sin la proteína p35 en el T0 e infectados con MAP cepa C en la semana 4 (**3M13**; n=4); grupo inmunizados con P35 en el T0 e infectados con MAP cepa C en la semana 4 (**4INM-INF**; n=4); finalmente, el grupo infectados con MAP cepa C en la semana 4 e inmunizados con P35 en la semana 10 (**5INF-INM**; n=4).

3.1.4 INMUNIZACIÓN CON P35 Y FAGO M13 SIN LA PROTEÍNA P35

Se inmunizó con 0.2mg/ml de fago M13 sin la proteína M13 en TBS al grupo **3M13** empleando la vía subcutánea, en el costado derecho en el T0, con una revacunación a las 3 semanas posteriores a la primera inmunización. Mientras que el grupo **4INM-INF** se inmunizó con P35 a dosis de 0.2mg/ml TBS vía subcutánea, en el T0 y el grupo **5INF-INM** a las 10 semanas, en el costado izquierdo con una revacunación a las 3 posteriores a la primera inmunización, empleando la misma dosis en ambos grupos.

3.1.5 INFECCIÓN EXPERIMENTAL CON MAP CEPA C

Se infectaron vía oral con la cepa MAP, la cual fue obtenida de un rumiante silvestre *Oryx dammah* que presentó cuadro clínico compatible con PTB y a la necropsia presentó enteritis granulomatosa grave difusa con abundantes BAAR y del cual se obtuvo el aislamiento en HEYM, posteriormente fue caracterizada mediante PCR y secuenciación como MAP cepa C (Hernández *et al*; 2022). A partir de esta cepa, se cultivó en medio 7H9 con micobactina durante 5 semanas y se obtuvieron dosis de 10^9 UFC diluidas en 1 ml de PBS que se emplearon para infectar a los conejos de los grupos **2INF**, **3M13**, **4INM-INF** y **5INF-INM** durante 3 días consecutivos, en la semana 4. Los inóculos fueron obtenidos de acuerdo a lo descrito por Maldonado *et al.*, (2023).

3.1.6 TOMA DE MUESTRAS

A partir de estos grupos experimentales se tomaron muestras durante un periodo de 28 semanas, con intervalos de muestreo cada 2 semanas, desde el muestreo en el T0 al muestreo 12. Estas muestras consistieron en 1 ml de sangre completa con EDTA como anticoagulante y 1 ml de sangre con heparina obtenida a partir de la vena central de la oreja, así como 500 µl de sangre completa conservada en 500 µl de TRIZOL[®] (USA).

También se tomaron heces, recolectadas de forma individual directamente de la charola, guardadas en bolsas de plástico, identificadas y almacenadas a -20°C hasta su procesamiento.

3.1.7 DETECCIÓN DE IFN γ EN LEUCOCITOS

A partir de 500 µl de sangre con heparina, se agregó 35 µl de PPD aviar (*Mycobacterium avium* subesp *avium*, PRONABIVE[®], México) a una concentración de 10 µg/ml. Una vez homogenizadas, se incubaron a 37°C con 5-6 % de CO₂ durante 16 h. El plasma se obtuvo mediante centrifugación a 600 xg/10 min, las muestras fueron congeladas -20°C hasta su procesamiento. Se realizó la detección mediante ELISA comercial (NOVUS BIOLOGICALS a biotechne brand[®] Rabbit IFN-gamma colorimetric, USA). Se realizó una curva estándar con diluciones dobles seriadas a partir una concentración de 1000 pg/ml de IFN γ , de las cuales se colocaron 100 µl por pozo, en los pozos restantes se colocaron 100 µl por pozo de los plasmas de los conejos, de acuerdo a las indicaciones del proveedor. Se realizó la lectura por espectrofotometría empleando un lector de placas (ELx800 Biotek[®]) con filtro de 450 nm.

3.1.8 EXTRACCIÓN DE ADN A PARTIR DE MUESTRAS DE HECES

Se realizó de acuerdo a lo descrito por Garrido y colaboradores en el 2000. Descrito brevemente: A 1 ml de la interfase de las muestras de heces en suspensión, se centrifugó a 1600 xg / 10 min, se hicieron 3 lavados con 1 ml de PBS 1X, centrifugando a 1600 xg / 10 min; se hizo un último lavado con 2 ml PBS 1X y se centrifugó a 12800xg / 5 min.

Se agregó 500 µl de TE-tritón 100X, se mezcló y pasó a un criotubo de tapa de rosca (NALGENE®), las muestras se colocaron en nitrógeno líquido durante 5 min, posteriormente se incubaron a 100°C en estufa de calor seco (Terlab®) durante 5 minutos, este procedimiento se realizó 3 veces. Después se agregaron 450 µl de isoticianato de guanidina y 250 µl de acetato de amonio con pH de 6.3, se mezclaron por inversión varias veces y los criotubos se colocaron en un criocontenedor a 4°C (NALGENE®) durante 15 minutos. Las muestras se transfirieron a microtubos de 2 ml, se agregaron 500 µl de cloroformo-alcohol isoamílico, se mezclaron con un homogeneizador eléctrico por 10 segundos y se centrifugaron a 2800xg / 5 min; la fase acuosa (500-600 µl) se transfirió a un microtubo de 2 ml. A la fase acuosa obtenida se agregó 450 µl de isopropanol y se mantuvo a -20°C durante 18 horas. Al día siguiente, las muestras se centrifugaron a 2800xg / 5 min y se eliminó el sobrenadante, se obtuvo una pastilla, la cual fue lavada dos veces con 1 ml de etanol al 70%, se mezclaron por inversión suave y se centrifugó a 2800xg / 1 min; se dejó secar la pastilla a temperatura ambiente y una vez que no tuvo residuos de etanol se agregó 30 µl de agua destilada. El ADN fue conservado a -20°C hasta su uso para la PCRq.

3.1.9 PCRq F57 A PARTIR DE HECES

Para la reacción de amplificación se agregó 5 ng de ADN y se empleó el estuche comercial *Primerdesing Ltd M. avium* subsp. *paratuberculosis species specific F57 DNA fragment genesig Advanced Kit®* (Roche, Alemania), de acuerdo a lo descrito por Maldonado *et al.*, (2023).

3.1.10 DETECCIÓN DE ARNm PARA LA EXPRESIÓN DE TNF, IL-8, IL-10 E IL-12 A PARTIR DE SANGRE

3.1.10.1 OBTENCIÓN DE CÉLULAS MONONUCLEARES PERIFÉRICAS EN SANGRE

A 500 µl de sangre completa, se aforó con 1 ml de PBS 1X. Se agregó 500 µl de histopaque (Invitrogen®, USA) con una pipeta de transferencia. Se centrifugaron a

1.9 xG / 20 min. Se tomó la capa leucoplaquetaria y se transfirió a otro tubo nuevo. Se agregó 2 ml de PBS, se mezcló y se centrifugó a 1.9 xG / 15 min, se decantó el sobrenadante y se suspendió en 0.5 ml de PBS. Se contaron los leucocitos en la cámara de Neubauer y se obtuvieron alícuotas de 5×10^6 de células con 500 μ l de Trizol y se guardaron en nitrógeno líquido hasta su uso.

3.1.10.2 EXTRACCIÓN DE ARN TOTAL

Se agregó 500 μ l más de Trizol, se homogenizaron mediante vórtex durante 30 segundos. Se agregó 5 μ l de DietilPiroCarbonato (DEPC, Sigma®, EUA) y se agitó en vórtex durante 30 segundos más. Se colocó a 30°C durante 6 min. Cada 2 min se homogeneizaron las muestras en vórtex durante 30 seg. Se congelaron las muestras empleando nitrógeno líquido durante 1 ocasión por 3 min. Se incubó en bloque térmico a 30°C durante 6 min. Se agregó 200 μ l de cloroformo. Se incubó durante 6 min a 30°C. Se centrifugó a 11.6 xg / 15 min. Se colectó la fase acuosa y se transfirió a otro microtubo de 1.5 ml. Se agregó 400 μ l de isopropanol, se incubó a temperatura ambiente por 10 min, se centrifugó a 11.6 xg / 10 min y se desechó el sobrenadante. Se agregó 750 μ l de etanol 70%, se homogenizó y centrifugó a 11.6 xg / 10 min. Se retiró el líquido, se suspendió con 15 μ l de agua con DEPC al 1%. Se conservaron las muestras en nitrógeno líquido, hasta su uso.

3.1.10.3 SÍNTESIS DEL ADN COMPLEMENTARIO

El ADNc se sintetizó usando 4 unidades de enzima transcriptasa reversa más solución amortiguadora RT 1X (Invitrogen®, EUA), dNTPs (Gibco BLR®, EUA), iniciadores oligo dT (1 μ M), 1 μ g de ARN junto con agua bidestilada estéril en un volumen final de 20 μ l. La reacción se incubó a 37°C durante 1 h y se inactivó a 95°C/5 min.

3.1.10.4 CUANTIFICACIÓN DE ARNm MEDIANTE PCRq

Se llevó a cabo mediante el equipo Rotor Gene 5 plex HRM Qiagen®, en un volumen final de 10 μ l conteniendo 5 μ l de cada sonda, 5 μ l de mezcla (Roche®), 1.5 μ l de agua bidestilada estéril y 2.5 μ l de ADNc. Las condiciones de corrida

fueron 50 °C/2 min, 95°C/10 min, alineación 95°C/15 s y extensión 60°C/h durante 40 ciclos. La expresión se evaluó por duplicado, los cuales se normalizaron con los niveles de expresión del gen G3PDH y β -actina, utilizando el método doble delta ($2 \Delta\Delta$) y ajustado por el método de Pfaffl, 2007. La secuencia de los iniciadores y sondas empleados son los que mencionan a continuación:

GEN	SECUENCIA SENTIDO	SECUENCIA ANTISENTIDO	SONDA
TNFα	5'-TAG TAG CAA ACC CGC AAG TG-3'	3'-CTG AAG AGA ACC TGG GAG TAG A5'	5HEX/AT GAA GCT C/ZEN/A CGG ACA ACC AGC T/3IABkFQ/
IL-8	5'-CTG CTC TCT CTG ACT CTT TGT G-3'	3'-AGG TGT GGA GTG TGT CTT TAT G-5'	5Cy5/TG CAG TTC T/TAO/G ACA CGG ATT GGT ACAG/3IAbRQSp/
IL-10	5'-AGA GTC TAG GAC ATC AGT TAG GG-3'	3'-GGA GCT GAG GTA TCA GAG GTA A-5'	5TexRd-XN/AG CAC CTT GGA AAG CTG TTG TAC CT/3IAbRQSp/
IL-12a	5'-GTG TGA ACC ACA CGG AGT ATA A-3'	3'-AAT AGC ATC CAG CAT CAC CTC-5'	5HEX/AC CAA GAA T/ZEN/G AGA GTT GCC TGG CT/3IABkFQ/
β- ACTINA	5'-GCA AGT ATT CCG TTT GGA TTG G-3'	3'-GGA GGA CCA GCT TCA TCA TAT- T-5'	56-FAM/CC TCT CCA C/ZEN/G TTC CAG CAG ATG TG/3IABkFQ/
G3PDH	5'-GGT CGG AGT GAA CGG ATT T-3'	3'-TGT AGT GGA GGT CAA TGA ATG G-5'	56-FAM/CT GGC AAA G/ZEN/T GGA TGT TGT CGC C/3IABkFQ/

3.1.11 ENSAYO INMUNOENZIMÁTICO (ELISA P35)

Las muestras de plasma en los conejos se analizaron mediante ELISA indirecto P35 para la detección de IgG totales de acuerdo al protocolo descrito brevemente: a una concentración final de 20 μ g/ml de proteína P35 en solución tampón de carbonato pH 9.6. Se colocaron en cada pozo 100 μ l de proteína P35, se incubó

toda la noche a temperatura ambiente. Se lavó la placa 3 veces con 200 µl por pozo de PBS-Tween 20 al 0.1%. Se agregó 150 µl de PBS-gelatina al 1%, se incubó 1.5 h. Se lavó la placa 3 veces con 200 µl / pozo de PBS- Tween 20 al 0.1%. Se diluyó la muestra 1/800 en PBS. Se colocaron 100 µl de la muestra diluida por pozo. Se dejó incubar 1.5 h. Se lavó 3 veces con 200 µl / pozo de PBS-Tween 20 al 0.1%. Se agregó 100 µl / pozo de anti-IgG anti conejo (Invitrogen®, EUA) diluido 1/1500 en PBS. Se incubó 1.5 h. Se lavó la placa 3 veces con 200 µl / pozo de PBS- Tween 20 0.1% y dos veces más con 200 µl de PBS. Se agregó 100 µl por pozo de la solución de citratos y se incubó durante 20 min. Se obtuvieron los valores mediante espectrofotometría empleando Elx800 Biotek® con filtro 405 nm. Los resultados se expresan con un índice de absorbancia relativa calculado al dividir la absorbancia promedio de la muestra menos el valor de absorbancia del fago M13 sin la proteína P35 entre la absorbancia promedio de la muestra control positivo.

3.1.12 EUTANASIA DE LOS CONEJOS EN LOS GRUPOS EXPERIMENTALES

Una vez concluidas las 28 semanas de experimentación, en la semana 29, a los conejos se les aplicó muerte humanitaria mediante sobredosis de barbitúrico (Aranda®, México) a una concentración de 100mg/kg de peso corporal vía intracardiaca, con la previa sedación con 5mg/kg de xilacina (PiSA®, México) y 35 mg/kg de ketamina (PiSA®, México), ambas vía intramuscular, de acuerdo a la NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-062-ZOO-1999. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio y a la NOM-033-SAG/ZOO-2014. Métodos para dar muerte a los animales domésticos y silvestres.

3.1.13 ESTUDIO ANATOMOPATOLÓGICO

En la semana 29 se realizó el estudio anatomopatológico mediante necropsia e histopatología, durante el cual se hizo la toma de órganos como *sacculus rotundus*, apéndice vermiforme del ciego, intestino delgado, linfonodos mesentéricos, tonsilas, hígado, riñón, bazo, pulmón, corazón y encéfalo para

determinar la presencia de lesiones compatibles con PTB y presencia de MAP mediante tinción Hematoxilina-Eosina y ZN.

La identificación de las muestras seleccionadas se describe en el cuadro 4.

IDENTIFICACIÓN	REGIÓN ANATÓMICA
A	apéndice vermiforme
B	<i>sacculus rotundus</i>
C	duodeno
D1	yeyuno proximal
D2	yeyuno medio
D3	yeyuno distal
E1	íleon proximal
E2	íleon medio
E3	íleon distal
F	ciego, colon, recto
G	linfonodos mesentéricos
H	hígado
I	riñón
J	bazo
K	tonsilas
L	pulmón, corazón
M	encéfalo

Cuadro 4. Identificación de muestras tomadas durante la necropsia de conejos para el estudio histopatológico y cultivo bacteriológico.

3.1.14 CULTIVO BACTERIOLÓGICO

Al momento de la necropsia, se tomaron muestras de los órganos anteriormente mencionados para inocularse en medio Herrold con yema de huevo (HEYM) y 2 mg Micobactina J (IDEXX, EUA) disuelta en 4 ml de etanol absoluto para 1 litro de medio. Primero, se maceraron de acuerdo al protocolo descrito por Estévez y colaboradores en el 2007, con las siguientes modificaciones: se elige una sección de 15 a 20 cm de intestino, se agrega 1 ml de ampicilina (200 mg/ml, PiSA, México). Se raspó la mucosa utilizando una hoja de bisturí estéril, se homogeniza y se tritura utilizando un Ten Broeck™. Se agregó al macerado, 100 ml de solución de PBS con tripsina al 0.5% pH 7.5-8, se mantuvo en agitación media durante 30

min. Se centrifugó a 3220 x g durante 20 min. Se desechó el sobrenadante y el sedimento se colocó con 100 ml de solución PBS con 20 mg de lisozima (Estévez *et al.*, 2007). Nuevamente se mantuvo en agitación media durante 1 h. Se centrifugó a 3220 x g durante 20 min. Se desecha el sobrenadante y se suspende la pastilla con 10 ml de HPC al 0.75 %, de esta suspensión se tomaron de 8 a 10 gotas y se sembraron en tubos con HEYM, durante un periodo máximo de 50 semanas de incubación a 37 °C.

3.1.15 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos fueron analizados por medio de un diseño completamente al azar, con un arreglo de mediciones repetidas empleando PROC MIXED, SAS, 2004. Las significancias de las diferencias entre grupos para todas las variables fueron estimadas usando análisis de varianza (ANOVA) y cuando mostró diferencias significativas se utilizó la prueba de comparación de medias por Tukey. El modelo fue el siguiente:

$$Y_{ij} = \mu + t_i + \epsilon_{ij} \quad i=1,2, 3, 4, 5 (t) \quad j=1,2, 3, 4 (r)$$

Donde:

Y_{ij} = Variable de respuesta en tratamiento i, repetición j. IFN γ liberado en sangre, PCRq TNF, IL-8, IL10, IL12 en sangre y PCRq F57 en heces

μ = Media general.

t_i = Efecto del tratamiento i.

ϵ_{ij} = Error aleatorio $\epsilon_{ij} \sim N(0, \sigma^2)$

Se realizó una prueba de comparación de medias por Tukey con un valor de confianza de 0.05 (Steel & Torrie, 1996). Así mismo con los promedios obtenidos en el análisis de varianza se realizaron las gráficas correspondientes para las variables evaluadas.

4. RESULTADOS

4.1 PRODUCCIÓN DEL INMUNÓGENO P35

De la clona transformada para la expresión de la proteína recombinante P35, se obtuvo un título de 2.1×10^{13} de partículas de fago con la cual se inmunizó a los grupos correspondientes.

4.2 EVALUACIÓN DEL INMUNÓGENO P35 EN GRUPOS EXPERIMENTALES. DETECCIÓN DE IFN γ EN PLASMA

Los resultados de la concentración de IFN γ obtenidos en los grupos experimentales se muestran en la figura 1. En esta se aprecia que la concentración máxima de IFN γ se obtuvo en los grupos experimentales 4INM-INF y 5INF-INM y mostró diferencias significativas en la semana 14. En el grupo 4INM-INF, los niveles de IFN γ aumentaron posterior a la primera inmunización con P35; sin embargo, esta tendió a disminuir en la semana 24. En el grupo 5INF-INM, en la semana 10 cuando se realizó la primera inmunización, el nivel de IFN γ subió y este incremento cuando se hizo la segunda inmunización con P35, pero a partir de la semana 24 los niveles de IFN γ bajaron. Finalmente, en el grupo 3M13, donde se evaluó el efecto del fago sin la proteína P35, se observó que tuvo un comportamiento similar al control negativo, con una concentración máxima a las 16 semanas (Fig. 1).

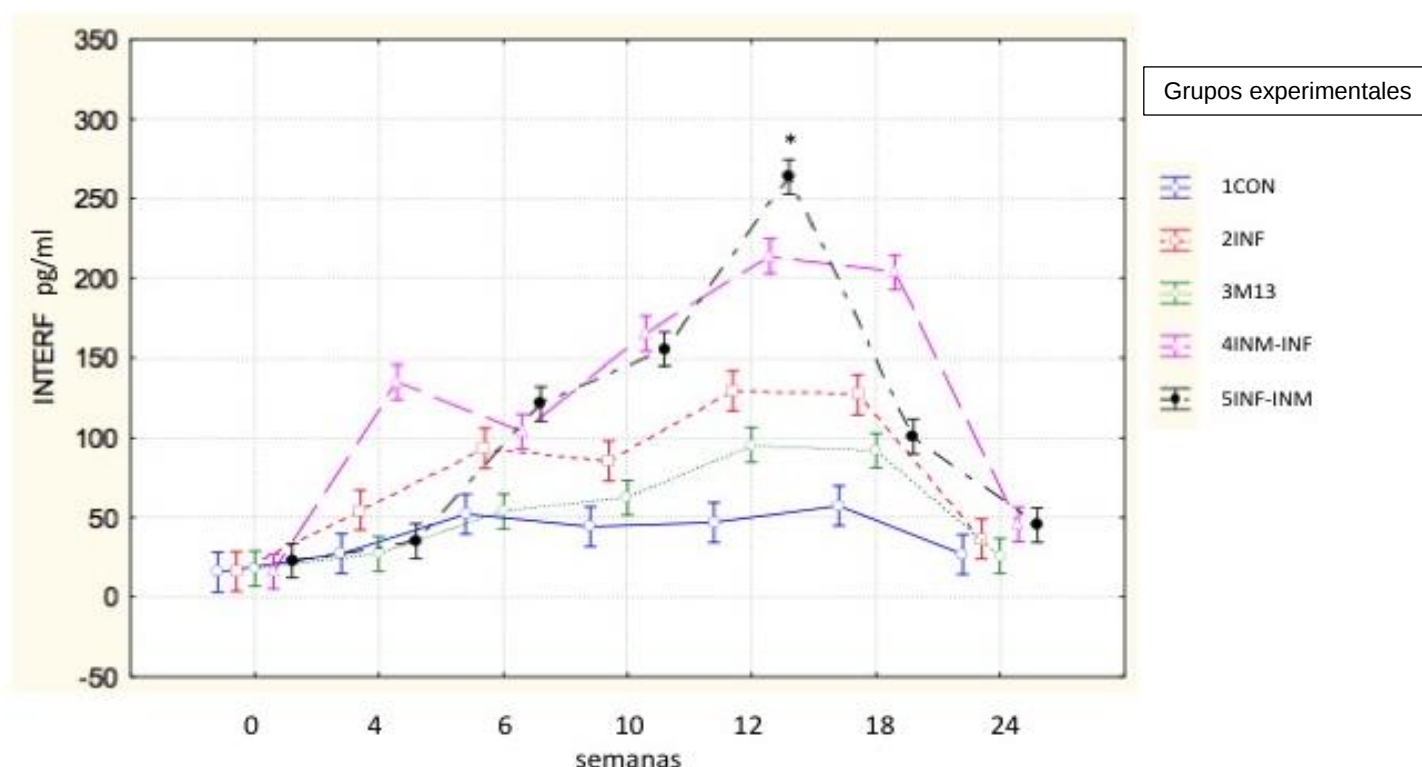


Figura 1. Determinación de IFN γ en sangre de grupos experimentales inmunizados e infectados con MAP cepa C. 1CON = sin tratamiento; 2INF = infectados con MAP cepa C; 3M13 = inoculados con el fago M13 sin la proteína P35 e infectados con MAP cepa C; 4INM-INF = inmunizados con P35 e infectados con MAP cepa C; 5INF-INM infectados con MAP cepa C e inmunizados con P35. (*) diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

4.3 DETECCIÓN DE ARNm DE TNF α EN SANGRE

Los resultados de la concentración de TNF α obtenidos en los grupos experimentales se muestran en la figura 2. En esta se aprecia que la concentración máxima de TNF α se obtuvo en el grupo experimental 4INM-INF y mostró diferencias significativas en la semana 12 (9 semanas después de la revacunación) (Fig. 2).

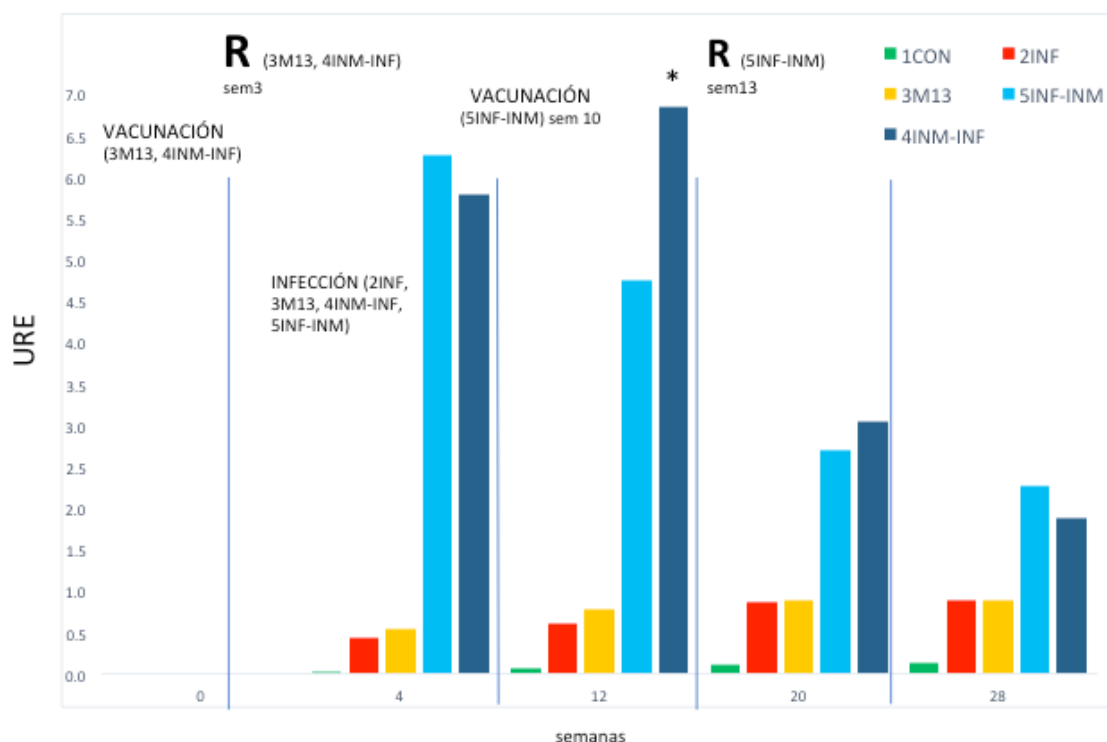


Figura 2. Determinación de la expresión de $TNF\alpha$ en células mononucleares en sangre de grupos experimentales inmunizados e infectados con MAP cepa C. URE= Unidad relativa de expresión. R= Revacunación. 1CON = sin tratamiento; 2INF = infectados con MAP cepa C; 3M13 = inoculados con el fago M13 sin la proteína p35; 4INM-INF = inmunizados con P35 e infectados con MAP cepa C e infectados con MAP cepa C; 5INF-INM infectados con MAP cepa C e inmunizados con P35. (*) diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

4.4 DETECCIÓN DE ARNm DE IL-8 EN CÉLULAS MONONUCLEARES EN SANGRE

Los resultados de la concentración de obtenidos en los grupos experimentales se muestran en la figura 3. Se observa que la concentración máxima de IL-8 se obtuvo en los grupos experimentales 4INM-INF e 5INF-INM y mostraron diferencias significativas con respecto a los grupos testigo en la semana 12, siendo mayor esta diferencia en el grupo 5INF-INM (Fig. 3).

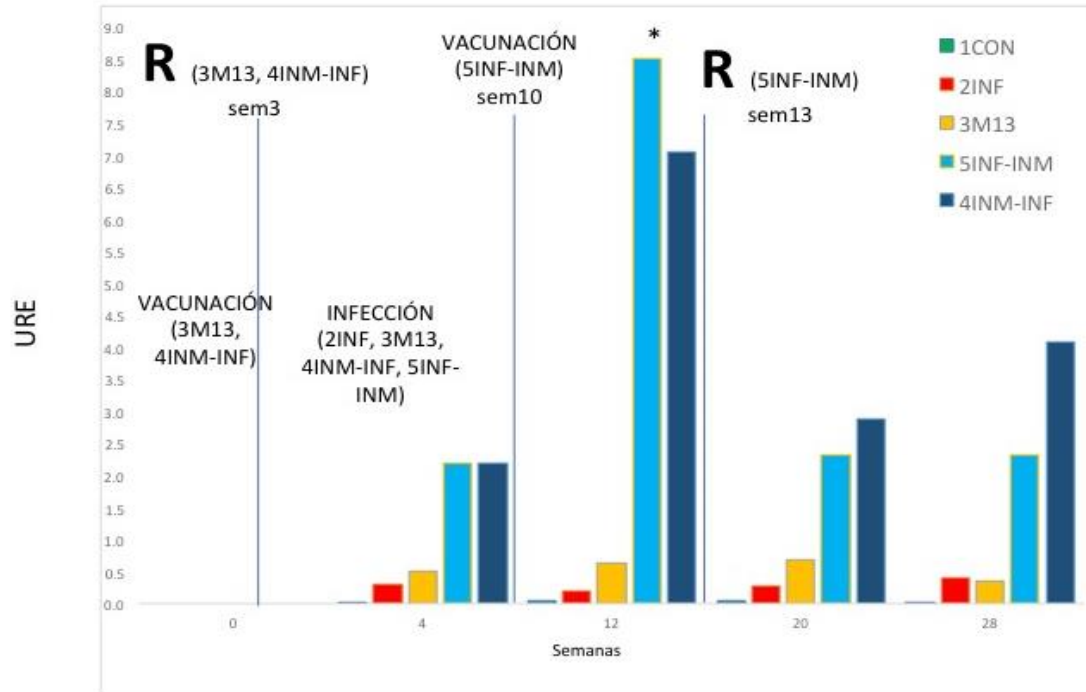


Figura 3. Determinación de la expresión de IL-8 en células mononucleares en sangre de grupos experimentales inmunizados e infectados con MAP cepa C. URE= Unidad relativa de expresión. **R**= Revacunación. **1CON** = sin tratamiento; **2INF** = infectados con MAP cepa C; **3M13** = inoculados con el fago M13 sin la proteína P35 e infectados con MAP cepa C; **4INM-INF** = inmunizados con P35 e infectados con MAP cepa C; **5INF-INM** infectados con MAP cepa C e inmunizados con P35. (*) diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

4.5 DETECCIÓN DE ARNm DE IL-12 A PARTIR DE CÉLULAS MONONUCLEARES EN SANGRE

Los resultados de la concentración de IL-12 obtenidos en los grupos experimentales se muestran en la figura 4. En esta se aprecia que la concentración máxima se obtuvo en el grupo experimental 5INF-INM y mostró diferencias significativas en la semana 12 (Fig. 4).

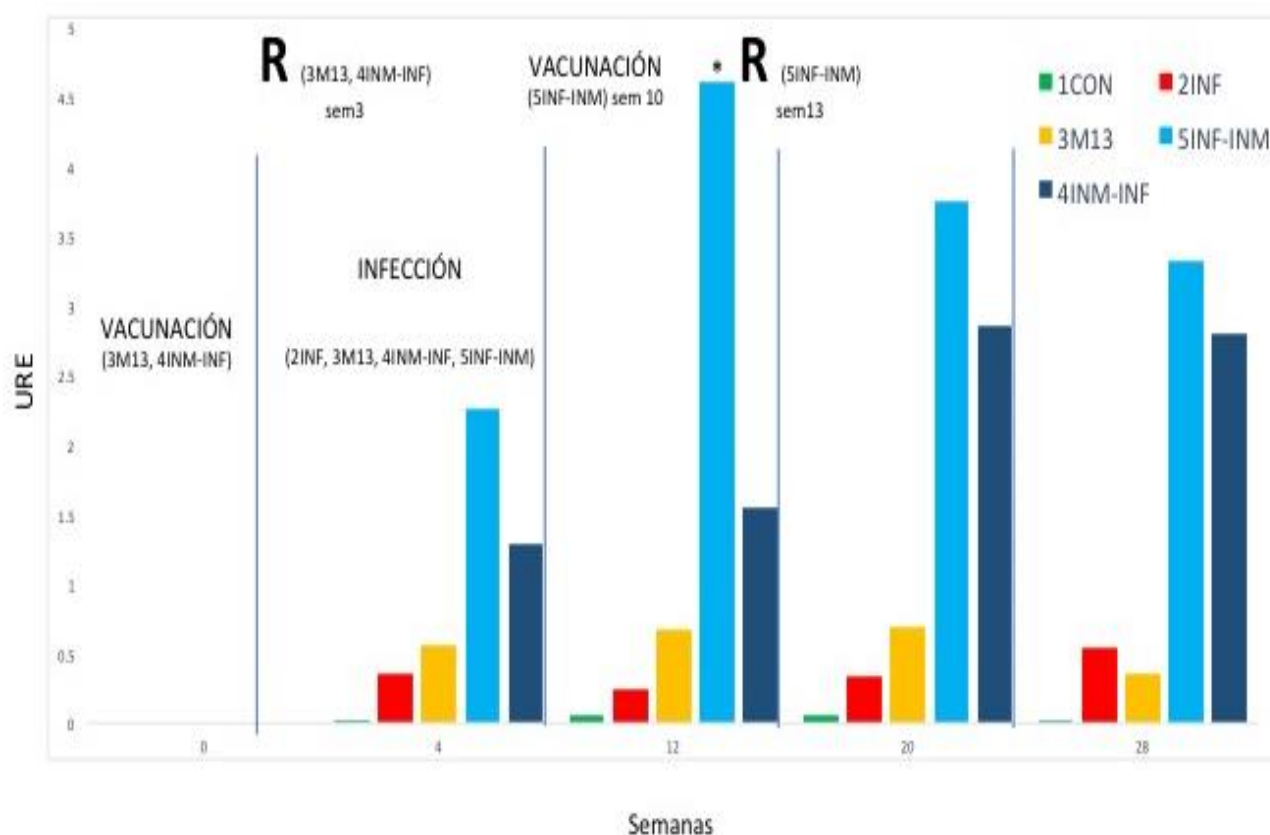


Figura 4. Determinación de la expresión de IL-12 en células mononucleares en sangre de grupos experimentales inmunizados e infectados con MAP cepa C. URE= Unidad relativa de expresión. R= Revacunación. 1CON = sin tratamiento; 2INF = infectados con MAP cepa C; 3M13 = inoculados con el fago M13 sin la proteína P35 e infectados con MAP cepa C; 4INM-INF = inmunizados con P35 e infectados con MAP cepa C; 5INF-INM infectados con MAP cepa C e inmunizados con P35. (*) diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

4.6 DETECCIÓN DE ARNm DE IL-10 EN CÉLULAS MONONUCLEARES EN SANGRE

Los resultados de la concentración de IL-10 obtenidos en los grupos experimentales se muestran en la figura 5. La mayor expresión detectada de ARNm fue en la semana 28, tanto en el grupo 4INM-INF como en el 5INF-INM, en el caso del 4INM-INF, ocurrió 25 semanas después de la revacunación y en el grupo 5INF-INM, 18 semanas después de la revacunación. Este mismo nivel de detección se observó a las 28 semanas en los grupos 2INF y 3M13. Se observó diferencia estadística significativa entre tratamientos 4INM-INF e 5INF-INM, con respecto a los demás grupos a las 20 semanas (Fig 5).

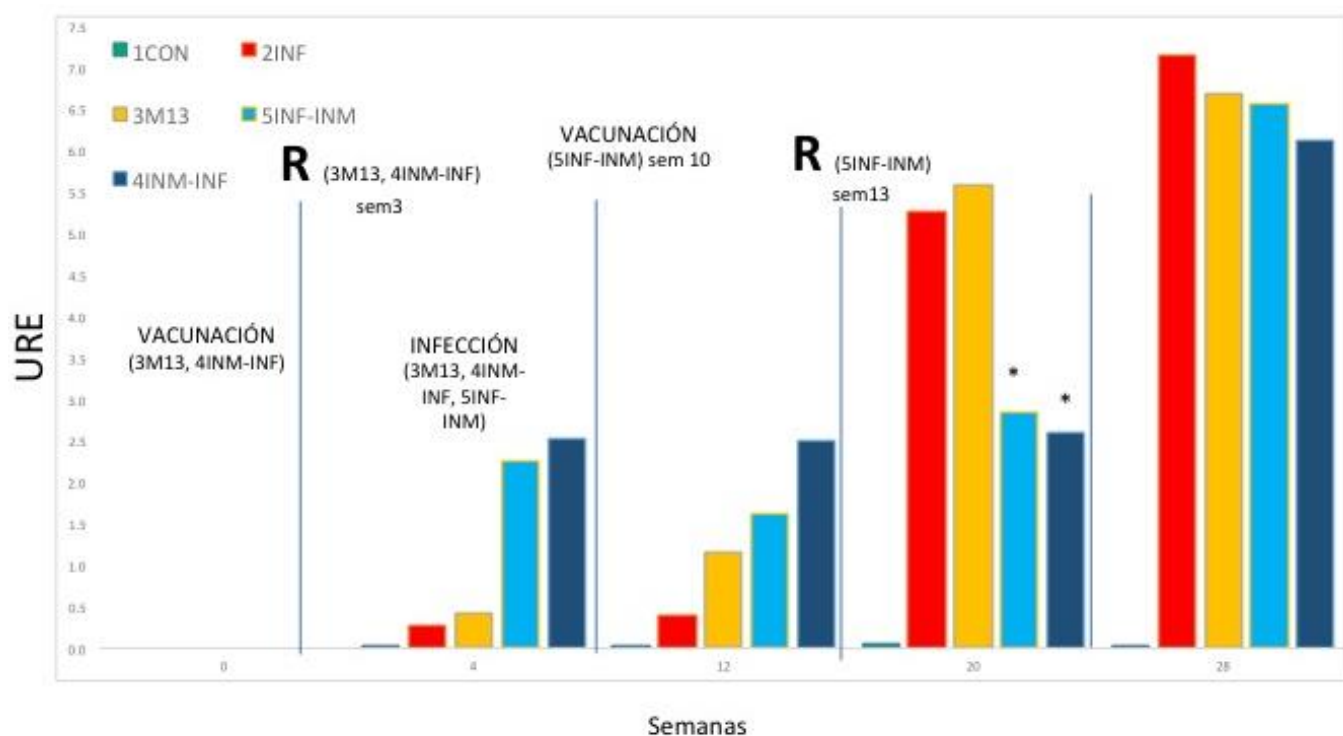


Figura 5. Determinación de la expresión de IL-10 en células mononucleares en sangre de grupos experimentales inmunizados e infectados con MAP cepa C. R= Revacunación. URE= Unidad relativa de expresión. **1CON** = sin tratamiento; **2INF** = infectados con MAP cepa C; **3M13** = inoculados con el fago M13 sin la proteína P35 e infectados con MAP cepa C; **4INM-INF** = inmunizados con P35 e infectados con MAP cepa C; **5INF-INM** infectados con MAP cepa C e inmunizados con P35. (*) diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

4.7 CUANTIFICACIÓN DE LA EXCRECIÓN DE MICOBACTERIAS EN HECES

Se encontró que a partir de la semana 18, la menor cantidad de micobacterias excretadas en heces fue en los grupos 4INM-INF y 5INF-INM con respecto a los demás grupos experimentales y tienden a incrementar a las 24 semanas. En el grupo 3M13, los niveles de MAP en heces fueron constantes durante todo el periodo que duró el experimento, teniendo un nivel más bajo en la semana 14 y hubo un incremento máximo de detección en la semana 24. En el grupo 4INM-INF, la menor cantidad de MAP excretada en heces fue detectada en la semana 18, pero posteriormente, hubo incremento en la detección de MAP en heces hasta el final del experimento. Finalmente, en el grupo 5INF-INM, la cantidad de MAP en heces disminuyó en la semana 14, esto posterior a que se realizó la segunda inmunización (11 semanas posterior a la revacunación). De forma relevante se observó que solo en este grupo, en la semana 28, se vio una disminución en la cantidad de MAP detectada, de al menos 4 veces menor, con diferencia estadística significativa con respecto a los demás grupos (Fig. 6)

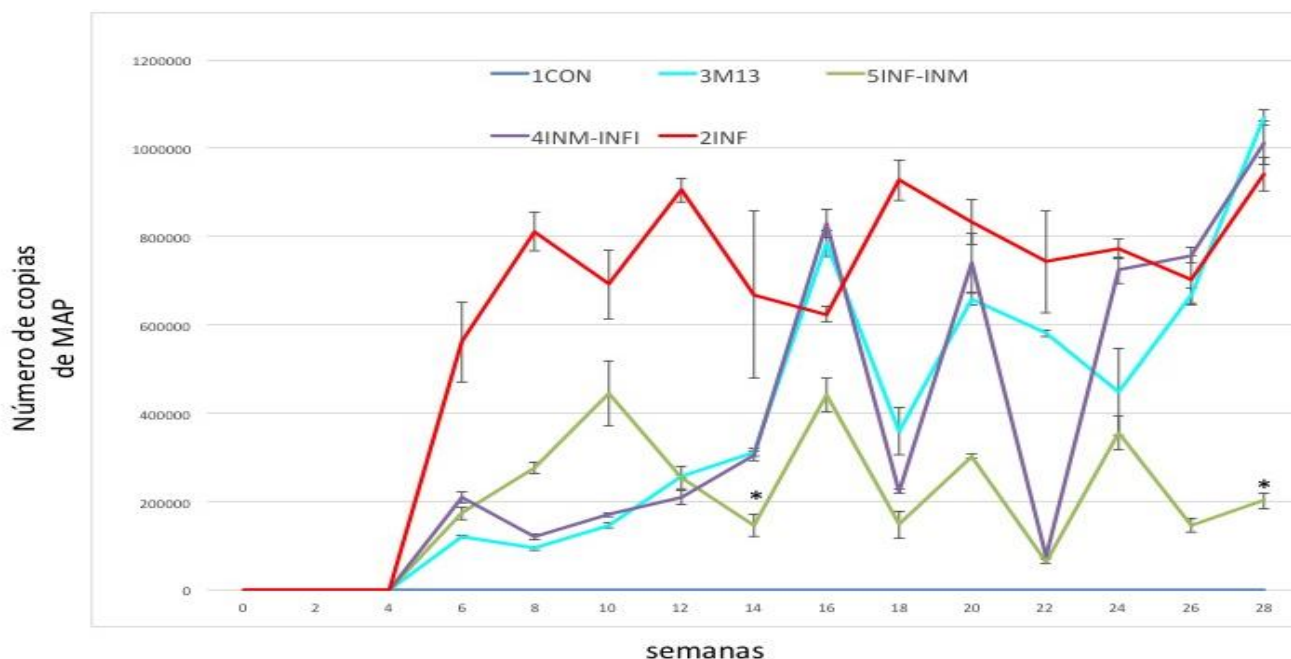


Figura 6. Detección de MAP en heces mediante PCRq F57 en grupos experimentales inmunizados con P35 e infectados con MAP cepa C. 1CON = sin tratamiento; 2INF = infectados con MAP cepa C; 3M13 = inoculados con el fago M13 sin la proteína P35 e infectados con MAP cepa C; 4INM-INF = inmunizados con P35 e infectados con MAP cepa C; 5INF-INM infectados con MAP cepa C e inmunizados con P35. (*) diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

4.8 DETERMINACIÓN DE IgG TOTALES EN PLASMA

En todos los grupos incrementó el nivel de anticuerpos desde la semana 2, posterior a la primera inmunización y una vez que se realizó la infección experimental (semana 4), nuevamente hubo incremento en la producción de inmunoglobulinas (IgGs) en plasma y su pico máximo de concentración fue en la semana 22 en el caso del grupo 5INF-INM, disminuyendo hacia la semana 28. Mientras que en el grupo 4INM-INF los niveles de IgGs tendieron a disminuir en la semana 26 e incrementaron nuevamente hacia la semana 28. El grupo 2INF los niveles de IgGs se mantuvieron constantes a partir de la semana 4, durante el periodo que duró el experimento (28 semanas). En el grupo 3M13 los niveles de anticuerpos tendieron a incrementar conforme transcurrían las semanas del

estudio experimental (28 semanas). Los resultados obtenidos de la concentración de IgG totales mostrados en los grupos experimentales inmunizados con P35 e infectados con MAP cepa C (Fig. 7).

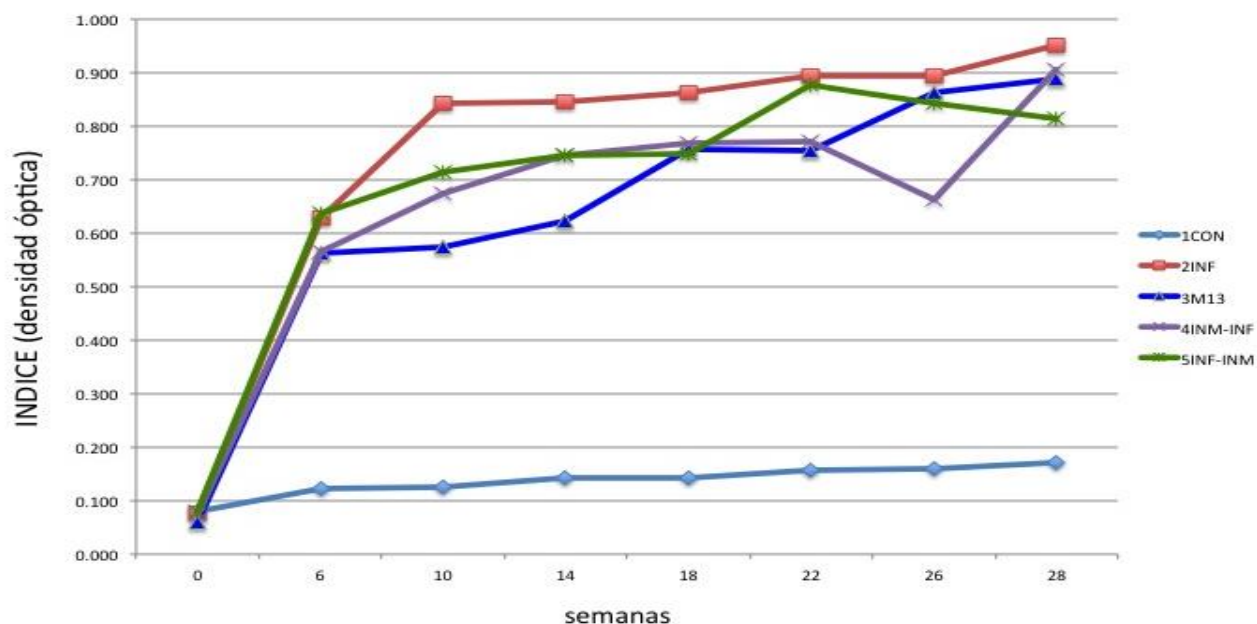


Figura 7. Detección de anticuerpos IgG totales (descrito en densidad óptica) mediante ELISA P35 en grupos experimentales inmunizados con P35 e infectados con MAP cepa C. 1CON = sin tratamiento; 2INF = infectados con MAP cepa C; 3M13 = inoculados con el fago M13 sin la proteína P35 e infectados con MAP cepa C; 4INM-INF = inmunizados con P35 e infectados con MAP cepa C; 5INF-INM infectados con MAP cepa C e inmunizados con P35.

4.9 ESTUDIO ANATOMOPATOLÓGICO

Al realizar las necropsias de los grupos experimentales, las lesiones macroscópicas y microscópicas observadas en cada grupo experimental fueron: en el grupo 1CON no se observaron lesiones aparentes. En el grupo 2INF macroscópicamente se observó engrosamiento del intestino delgado con placas de Peyer prominentes y aspecto granular con linfadenomegalia compatible con enteritis granulomatosa multifocal a intermedia con presencia de moderados a abundantes BAAR. El grupo 3M13 también mostró engrosamiento intestinal con

placas de Peyer prominentes y linfadenomegalia compatible con enteritis granulomatosa focal a multifocal con presencia de escasos BAAR. En los grupos 4INM-INF y 5INF-INM se observó mucosa intestinal prominente, placas de Peyer prominentes y linfadenomegalia, a nivel microscópico se observó en 4INM-INF enteritis granulomatosa multifocal con presencia de células gigantes sin BAAR en su interior, mientras que en el grupo 5INF-INM se observaron dos conejos con enteritis granulomatosa focal sin BAAR y dos conejos con enteritis granulomatosa multifocal con presencia de células gigantes sin BAAR. Los detalles de los hallazgos más relevantes son los que se muestran a continuación en el cuadro 4.

GRUPO	ID ANIMAL	HALLAZGOS MACROSCOPICOS			LESIONES MACROSCOPICAS	HALLAZGOS MICROSCOPICOS				LESIONES MICROSCOPICOS	CULTIVO BACTERIOLOGICO		
		SR	AV	Y/I		SR	AV	Y/I	LNIL		SR	AV	Y/I/LNIL
1CON	NI1	-	-	-	SCPA	-	-	-	-	SCPA	-	-	-
	NI2	-	-	-		-	-	-	-		-	-	-
	NI3	-	-	-		-	-	-	-		-	-	-
2INF	CI1	x	x	x	Engrosamiento de la pared intestinal, placas de Peyer prominentes y linfadenomegalia del linfonodo ileocecal	+	++	+	+	Enteritis granulomatosa difusa intermedia multibacilar	-	**	*(Y)
	CI2	x	x	-		+	+	-	-	Enteritis granulomatosa multifocal con presencia moderada de BAAR	-	*	-
	CI3	x	x	x		+	++	+	+	Enteritis granulomatosa difusa intermedia multibacilar	-	**	-
3M13	M1	x	x	-	Engrosamiento de la pared intestinal, placas de Peyer prominentes y linfadenomegalia del linfonodo ileocecal	+	+	-	+	Enteritis granulomatosa focal sin BAAR	-	-	-
	M2	x	x	x		+	+	-	-	Enteritis granulomatosa multifocal con escasos BAAR	-	*	-
	M3	x	x	x		+	+	-	-	Enteritis granulomatosa multifocal con escasos BAAR	-	*	-
	M4	x	-	-		+	+	-	-	Enteritis granulomatosa focal sin BAAR	-	-	-
4INM-INF	IM1	x	x	-	Palidez y mucosa prominente, placas de Peyer prominentes y linfadenomegalia del LNIL	+	-	-	-	Enteritis granulomatosa focal sin BAAR	-	-	-
	1M2	x	-	-		+	+	-	-	Enteritis granulomatosa multifocal sin BAAR	-	-	-
	1M3	x	x	-		+	-	-	-		-	-	-
	1M4	x	-	-		+	+	-	+		-	-	-
5INF-INM	IF1	x	x	-	Palidez y mucosa prominente, placas de Peyer prominentes y linfadenomegalia LNIL	+	-	-	-	Enteritis granulomatosa focal sin BAAR	-	-	-
	IF2	x	-	-		+	-	-	-		-	-	-
	IF3	x	x	-		+	+	-	+	Enteritis granulomatosa multifocal sin BAAR	-	-	-
	IF4	x	-	-		+	+	-	-		-	-	-

Cuadro 4. Resumen de hallazgos anatomopatológicos y resultados de cultivo bacteriológico a partir de tejidos de los grupos experimentales a las 24 semanas postinfección.

SR = *Sacculus rotundus*, **AV** = Apéndice vermiforme, **Y/I** = yeyuno y/o íleon, **LNIL** = Linfonodo ileocecal, **Y**= Yeyuno, - = Sin observación de hallazgos histopatológicos, **x** = observación de hallazgos macrosópicos, **+** = Lesiones granulomatosas tipo II multifocal, **++** = Lesiones granulomatosas tipo difusa intermedia, **SCPA**= Sin cambios patológicos aparentes, **BAAR**= bacilos ácido alcohol resistentes, * = Baja concentración de MAP, ** = Alta concentración de MAP

4.10 CULTIVO BACTERIOLÓGICO A PARTIR DE TEJIDO

Se observó el desarrollo de colonias visibles en muestras de apéndice vermiforme y/o yeyuno en los conejos del grupo 2INF a las 16 semanas de incubación y en dos conejos del grupo 3M13 a partir de las 22 semanas de incubación. Mientras que en los grupos 4INM-INF y 5INF-INM no se obtuvieron aislamientos bacterianos, los cuales se revisaron cada semana durante un periodo de 40 semanas. Los resultados son mostrados en el cuadro 4 y la imagen de uno de los cultivos obtenidos se muestra en la figura 8.

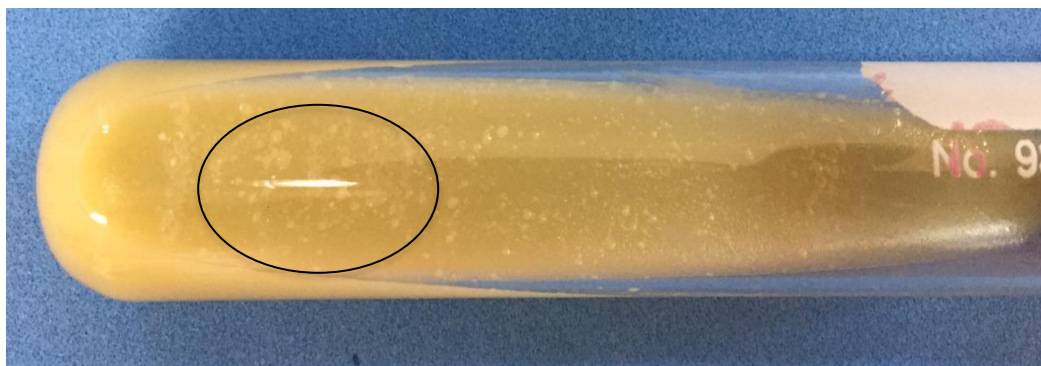


Figura 8. Aislamiento bacteriológico donde se observan colonias compatibles con MAP (CÍRCULO). A las 16 semanas post incubación en medio HEYM a partir de apéndice vermiforme de uno de los conejos del grupo 2INF.

5. DISCUSIÓN

En este trabajo se observó que la inmunización con P35 tuvo un efecto positivo sobre la reducción en el número de bacterias eliminadas en heces tanto en el grupo 4INM-INF como en 5INF-INM, con respecto al grupo infectado 2INF; siendo menor la excreción de MAP en el grupo 5INF-INM con respecto al grupo 4INM-INF, en la semana 14. De forma importante, se vio que la vacunación disminuye la excreción de MAP en heces, sobre todo posterior a la revacunación con P35. En otros estudios se ha indicado que esto se asocia a una mayor expresión de citocinas como IFN γ e IL-12, puesto que ocasionan una interacción entre los macrófagos y linfocitos, estimulando la secreción de citocinas Th1, produciendo el

reclutamiento de células en el sitio de infección, activación y proliferación celular, así como la producción de sintetasa inducible de óxido nítrico (*Inducible nitric oxide synthase*, iNOS) por parte de los macrófagos para aumentar la capacidad de la fusión del fagosoma con el lisosoma, así destruir a MAP y disminuir la excreción de MAP en las heces (Coussens *et al.*, 2004a, 2004b, Juste *et al.*, 2009).

Respecto a los resultados obtenidos en el estudio anatomopatológico, se demostró que la inmunización con P35 disminuyó la gravedad de lesiones presentes principalmente en apéndice vermiforme y *sacculus rotundus*, tanto en el grupo 4INM-INF como en 5INF-INM. En el grupo 4INM-INF se observaron lesiones granulomatosas multifocales sin presencia de BAAR, mientras que en el grupo 5INF-INM, éstas fueron en su mayoría focales a multifocales sin presencia de BAAR, consideradas lesiones menos graves comparadas con las observadas en los grupos 2INF y 3M13; ya que en éstos se observaron lesiones granulomatosas multifocales a difusas intermedias, con presencia de BAAR y con aislamiento bacteriológico positivo. Lo anterior, sugiere un efecto positivo de la vacunación sobre la progresión de las lesiones que se mantienen limitadas con una distribución focal a multifocal y sin presencia de bacilos. Lo anterior asociado a la mayor expresión de IFN γ e IL-12, así como a la presencia de células gigantes en las lesiones granulomatosas observadas en los intestinos del grupo 5INF-INM, las cuales tienen mayor capacidad en la fagocitosis, por lo tanto, se considera que son más eficientes para eliminar a MAP. Se ha visto que la participación de estas células, son un indicador del control de la progresión de MAP en los tejidos infectados y sugiere la actividad de una respuesta inmune celular que limita la multiplicación de MAP (Pérez *et al.*, 1999; González *et al.*, 2005; Maio *et al.*, 2011; Agulló *et al.*, 2022).

Así mismo, si bien en los grupos 4INM-INF y 5INF-INM, se observaron tanto lesiones granulomatosas focales como multifocales sin presencia de BAAR, sin aislamiento de MAP a partir de las muestras de intestino y linfonodos, esto posiblemente se asocia por la presencia de células gigantes, debido a una mayor

actividad microbicida que logra contener y eliminar a MAP, por lo que no se observaron BAAR dentro de dichos macrófagos. En este caso, se menciona que en las lesiones de este tipo y sin BAAR, el cultivo bacteriológico tiene una limitada sensibilidad para el desarrollo de colonias bacterianas a partir de estas muestras (Alonso-Hearn *et al.*, 2012; Hines *et al.*, 2014).

Los resultados también demostraron que el empleo de P35 estimuló la respuesta Th1 con la producción de IFN γ y las citocinas TNF α , IL-8, e IL-12 estimulando predominantemente una respuesta inmune celular. Lo anterior también fue demostrado por Franceschi y colaboradores en el 2019, al evaluar a la P35 en cultivo celular. Describieron que esta proteína logró la proliferación de células T CD8 así como TCD4 de memoria, debido a que la P35 conservó las características como proteína nativa y fue presentada en el MHC I y II por las células presentadoras de antígeno (Franceschi *et al.*, 2019).

Con relación a IFN γ , en este trabajo se vio que los niveles fueron diferentes en los tratamientos, 4INM-INF como en 5INF-INM, siendo mayor la expresión en el grupo 5INF-INM (260 pg/ml) comparado también con los controles 1CON (50 pg/ml), 2INF (130 pg/ml) y 3M13 (100 pg/ml) a las 12 semanas. En el tratamiento 4INM-INF, el aumento de IFN γ en la semana 2, puede asociarse a un posible efecto de la primera inmunización con P35 y después a la semana 3, se vio otro un incremento en la concentración de IFN γ , posiblemente por efecto de la revacunación en este grupo. Mientras, que en el tratamiento 5INF-INM, también se mostró un incremento en la producción de IFN γ , una vez que los conejos fueron vacunados y este efecto aumentó cuando se realizó la revacunación, aunque dicho efecto fue más constante y duradero comparado con en el grupo 4INM-INF a las 12 semanas. Se conoce que el IFN γ es un buen indicador de la respuesta Th1, ya que está relacionado con la producción de óxido nítrico por parte de los linfocitos T CD4+ para la destrucción de patógenos intracelulares como MAP (Begg & Griffin, 2005). Además se ha visto en borregos infectados y no vacunados que progresan a la enfermedad clínica, la asociación de los niveles de IFN γ con el

desarrollo de la enfermedad es porque tienen niveles más bajos de IFN γ , de forma temprana y durante un menor tiempo, con respecto al grupo infectados y vacunados (Purdie *et al.*, 2022), datos similares a los observados en los conejos inmunizados en este trabajo, donde la inmunización tuvo un efecto positivo aumentando la expresión de IFN γ . Sin embargo y de forma contraria, se ha visto que, en bovinos no está relacionado un resultado eficaz en la inmunización con la detección de niveles elevados de IFN γ en plasma, puesto que en animales con lesiones focales controladas consideradas como latentes, se han detectado niveles negativos de IFN γ . Dado que en lesiones graves puede haber una producción de IFN γ elevada, debido a que hay una respuesta de liberación de IFN γ por parte de células NK, asociado a la circulación de antígenos de MAP en sangre. Lo anterior, no necesariamente es indicativo de un efecto protector por parte de la respuesta inmune celular, puesto que lo que se observa a nivel periférico no es un reflejo de lo que ocurre a nivel local en el intestino ante una respuesta inflamatoria. Por lo que se sugiere medir los niveles de IFN γ en tejidos infectados en conjunto con otras interleucinas como TNF α , así como IL17a. Además, se recomienda realizar estudio anatomopatológico para determinar el tipo de lesiones granulomatosas presentes y su relación con la producción de IFN γ (Kohler *et al.*, 2001; Coussens *et al.*, 2004b; Begg *et al.*, 2010; Alonso- Hearn *et al.*, 2012; Dekuiper & Coussens, 2019; Gupta *et al.*, 2019). Por otra parte, de acuerdo con lo observado por Arrazuria y colaboradores, al evaluar la vacuna comercial Silirium® en conejos, tanto el efecto terapéutico como protector, en la medición de IFN γ , observaron que fue mayor el nivel de detección en el grupo vacunado e infectado comparado con el infectado y vacunado, sobre todo en la semana 16 post infección (Arrazuria *et al.*, 2016), datos contrarios a los aquí obtenidos, donde al final del experimento, después de la semana 24 tuvieron niveles similares en ambos tratamientos. Los autores sugieren que cuando se emplea una vacuna completa inactivada, hay un incremento temporal de IFN γ en los animales vacunados e infectados, pero no existe diferencia a los 128 días después de la inmunización, debido a la variabilidad que existe entre los animales

no reactores, bajos reactores y altos reactores a la estimulación y éstas diferencias ya no ocurren posteriormente para ser detectadas (Arrazuria *et al.*, 2016).

Finalmente, en el tratamiento 3M13, se observó que, aunque el fago M13 generó la producción de $\text{IFN}\gamma$, no alcanzó los niveles detectados en el grupo 5INF-INM. Sin embargo, se ha demostrado que el M13 tiene un efecto inmunoestimulador, ya que su tamaño y complejidad proteica permite procesar al sistema inmune como antígenos y presentados en el MHC I y II, induciendo una respuesta tanto de CD4^+ como CD8^+ . Y dado que el fago no tiene ninguna modificación antigénica, más que la proteína de fusión expresada en la superficie, conservan los PAMs que son reconocidos por los PRRs del sistema inmune. Lo que le confiere propiedades adyuvantes intrínsecas a las vacunas diseñadas con fagos (Slütter & Jiskoot, 2016; Hess & Jewell, 2020).

Con respecto a la expresión de $\text{TNF}\alpha$, en el grupo 4INM-INF hubo una mayor expresión de $\text{TNF}\alpha$ y se observaron lesiones granulomatosas focales en 1/4 conejos y multifocales sin BAAR en intestino de 3/4 conejos, comparadas con los grupos experimentales 2INF y 3M13, que mostraron lesiones granulomatosas multifocales a difusas con presencia de BAAR. Aunque el nivel de $\text{TNF}\alpha$ fue mayor en el grupo 4INM-INF, el grupo 5INF-INM tuvo mayor expresión de $\text{IFN}\gamma$, e IL-8 e IL-12 y presentó lesiones granulomatosas focales con presencia de células gigantes, por lo que la interacción en conjunto de las citocinas pro inflamatorias, puede tener un mayor efecto en la respuesta Th1 para lograr el control de MAP, que solo tomando en cuenta de forma aislada la expresión de $\text{TNF}\alpha$ (Coussens *et al.*, 2004b). Además, se observó que la mayor expresión de esta citocina en ambos grupos 4INM-INF y 5INF-INM fue en etapas tempranas de la infección, ya que se detectó a partir de la semana 8. Y la mayor expresión de $\text{TNF}\alpha$ en 4INM-INF y 5INF-INM, con respecto a los controles, puede asociarse que la respuesta de expresión de $\text{TNF}\alpha$, se debe a la presencia de macrófagos en el sitio de infección, donde esta citocina fue clave en la formación de la lesión granulomatosa. Así mismo, se ha demostrado que sin la actividad de $\text{TNF}\alpha$, MAP sobrevive en el macrófago al bloquear las funciones bactericidas, siendo un factor

importante que se asocia la presentación de lesiones granulomatosas difusas como en el caso del grupo 2INF (Coussens *et al.*, 2004a; 2004b; Palmer *et al.*, 2015).

De igual forma, se observó que la mayor expresión de IL-12 se detectó en el grupo 5INF-INM a las 12 semanas, con respecto a los demás grupos 1CON, 2INF y 3M13. Esto asociado a que en este grupo también se obtuvo la mayor expresión IFN γ , a las 12 semanas. Se ha descrito que la IL-12 es importante para el inicio y mantenimiento de la respuesta inmune Th1, induciendo una fuerte respuesta en la producción de IFN γ a nivel sistémica y local, ocasionando la disminución de la colonización micobacteriana en intestino en animales infectados e inmunizados, como lo fue en este caso en el grupo 5INF-INM (Park & Scott, 2001; Juste *et al.*, 2009). Se sabe que la IL-12, favorece la respuesta inmune celular, teniendo un efecto regulador sobre TNF α , donde tanto la IL-12 como TNF α , tienen un papel importante sobre el control de las enfermedades provocadas por organismos patógenos intracelulares, induciendo a los macrófagos en la activación bactericida y por lo tanto, menor desarrollo de lesiones granumomatosas en intestino y disminución de MAP en heces (Uzzona *et al.*, 2003; Coussens *et al.*, 2004b).

Se ha demostrado que existe un mayor nivel de expresión de IL-8 en lesiones focales en bovinos (Alonso-Hearn *et al.*, 2019), comparado con los niveles detectados en lesiones difusas, datos coincidentes con los aquí observados, donde la IL-8 fue menor en los grupos 2INF e 3M13, los cuáles presentaron lesiones granulomatosas multifocales a difusas intermedias con presencia de BAAR. La IL-8, fue mayor su expresión fue en el grupo 5INF-INM a las 12 semanas con respecto a los grupos 2INF, 3M13 e 4INM-INF. Mostrando que la IL-8 contribuye al mantenimiento y control de lesiones focales (Alonso-Hearn *et al.*, 2019), en conjunto con la participación de citocinas de la respuesta inmune celular como IFN γ , que ayudan a los macrófagos al menor desarrollo de lesiones granulomatosas, asociado en este estudio posiblemente por efecto de la inmunización con P35.

La expresión de IL-8 también fue evaluada en células mononucleares de animales infectados, cuando se pusieron en contacto con antígenos de vacunas comerciales en las que se observó una mayor expresión de IL-8, comparado con las células sin tratamiento. Concluyendo que los neutrófilos participan de forma inicial y al igual que los macrófagos, disponen de mecanismos efectivos de protección contra MAP durante la PTB (Ladero, 2021). También se observó con el empleo de MAP 316F viva atenuada como inmunógeno en células mononucleares en sangre de cabras, que los niveles de IL-8 fueron mayores después del desafío a las 14 semanas de evaluación. Se menciona que esta citocina es importante en una respuesta celular temprana debido a que es quimiotáctica para neutrófilos y linfocitos, la cual tiene relación directa con la sobreexpresión de IL-1 α y la liberación de especies reactivas de oxígeno por parte de macrófagos activados y posiblemente de los neutrófilos para contener a MAP mediante su unión con el fagolisosoma (Faisal *et al.*, 2013).

Respecto a la IL-10, en este estudio se observó que aumentó más de 8 veces en las semanas 20 y 28, en los grupos 2INF, 3M13, 4INM-INF, 5INF-INM. Se conoce que la IL10 bloquea las vías MAPK, NF-kB y STAT3, evitando la maduración del fagolisosoma y la apoptosis, proporcionando un nicho para la sobrevivencia persistente de MAP con la disminución de la producción de óxido nítrico, TNF α e IL-12. Si la infección ha progresado, los macrófagos no puedan controlar la invasión y destrucción de MAP, permitiendo el desarrollo de la enfermedad y desarrollo de lesiones avanzadas. Por lo que niveles elevados de IL-10 en los animales infectados, pueden ser un indicador de la progresión de la infección hacia la presentación clínica de PTB y el aumento en la producción de anticuerpos, con una participación importante como regulador de la respuesta proinflamatoria, controlando el daño tisular (Weiss *et al.*, 2005; Stabel, 2006; Saraiva *et al.*, 2010). Datos consistentes con lo observado en este estudio, donde a partir de la semana 16 se observó el aumento de IL-10 en todos los grupos experimentales. En la PTB, niveles elevados de IL-10 se asocian con un estado de inmunosupresión y eventualmente la presentación de signos clínicos que se

traduce en el desarrollo de lesiones granulomatosas difusas multibacilares y que coincide con el aumento en la detección de inmunoglobulinas en sangre. Por consiguiente, la detección de IL-10 a nivel de sangre, es un indicador relevante en animales infectados, ya que las células mononucleares periféricas tienden a secretar IL-10 en respuesta a la estimulación del antígeno, mientras que en tejidos infectados con MAP se sugiere además realizar la detección de TGF β , puesto que se observó que algunos animales tienden a mostrar niveles más elevados que la IL-10 (Counssens *et al.*, 2004b; Khalifeb & Stabel, 2004). Finalmente, podemos mencionar, a pesar de que la IL-10 está sobre expresada en todos los grupos al final del experimento, incluyendo en los inmunizados, 4INM-INF y 5INF-INM, podríamos considerar al observar la disminución en la eliminación de MAP en heces y el menor desarrollo de lesiones granulomatosas en estos grupos, que la inmunización con la P35 provocó la expresión de IFN γ , TNF α , IL-8, e IL-12, que en conjunto fueron capaces de lograr el control de MAP en los animales inmunizados aun con el desafío al que fueron expuestos (Coussens *et al.*, 2004a; Coussens *et al.*, 2004b). Concluyendo que la sola medición de la IL-10 parece no ser el único indicador de inmunosupresión y la sobreexpresión de esta citocina en los grupos 2INF, 3M13, 4INM-INF, 5INF-INM, puede estar asociado al tratamiento de infección con MAP.

Si bien el grupo 3M13 inoculado con el fago M13 sin la proteína P35 e infectado con MAP cepa C a las 4 semanas, no tuvo un efecto sobre la disminución en el desarrollo de lesiones granulomatosas en intestino y en la eliminación de MAP en heces, si tuvo una respuesta en la expresión de citocinas de IFN γ , TNF α , IL-8, e IL-12 y aunque menor, con respecto a los grupos 4INM-INF y 5INF-INM, la expresión de interleucinas el grupo 3M13 fueron mayores a partir de semana 12. Se ha demostrado que el fago M13 es capaz de evocar una respuesta inmunológica celular y humoral debido a la estimulación del sistema inmune a través de la vía TLR, asociado a los motivos CpG presentes en el genoma viral del M13, que sirven como adyuvante al generar una fuerte respuesta inmunológica y expresar los antígenos tanto en el MHC I como II, lo que resulta en una respuesta

mediada por linfocitos T citotóxicos y producción de anticuerpos (Hess & Jewell, 2020). Además, estimula la respuesta inmune celular Th1 con la producción de IFN γ , generando una respuesta protectora debido a la capacidad del fago para reclutar y proliferar células T CD4 $^{+}$ y linfocitos T CD8 $^{+}$ (Manoutcharian *et al.*, 2004, Domínguez *et al.*, 2020).

La detección de la respuesta inmune humoral es importante en estudios de evaluación de vacunas, puesto que se ha visto que la participación de los anticuerpos como en este estudio, se detectó una fuerte respuesta humoral con la producción de anticuerpos en el grupo 4INM-INF a partir de las 10 semanas respecto al grupo 1CON. Mientras que, a las 24 semanas, en el grupo 5INF-INM se observó la mayor concentración de anticuerpos IgG totales con diferencia significativa respecto al grupo 1CON, además se observó una disminución de la cantidad de MAP en heces y tejidos, en conjunto con la respuesta inmune celular tuvo un efecto protector contra las infecciones por MAP (Ladero, 2021). En este estudio se evaluó la producción de anticuerpos IgG totales en plasma en todos los grupos experimentales y se observó que los niveles de anticuerpos de los grupos vacunados fueron significativamente más altos que los grupos no vacunados. Estas diferencias en cuanto a la intensidad de la respuesta inmune humoral pueden estar asociados con la exposición previa al antígeno liberado por los macrófagos infectados que estimulan los linfocitos T cooperadores y que a su vez activan a las células B a diferenciarse y producir inmunoglobulinas IgM e IgG1 (Coussens *et al.*, 2004a). También se apreció que en el grupo 3M13 hubo una respuesta de producción de anticuerpos, posiblemente asociado al diseño del ELISA empleado en este estudio, donde se utilizó como antígeno adherido a la placa de poliestireno al fago M13 más la P35 y a que los conejos del grupo 3M13, fueron inmunizados con el fago M13 sin la P35 y posteriormente se infectaron con MAP cepa C; por lo que se detectaron en el ELISA tanto los anticuerpos producidos contra M13, P35 y contra MAP cepa C, dando como resultado la mayor producción de anticuerpos medidos en este grupo, con respecto a los grupos 1CON y 2INF. Aunque hay sugerencias de que la inmunidad humoral puede ser

importante en el control de *M. tuberculosis*, el papel de esta inmunidad contra la infección por MAP en rumiantes no se ha resaltado su importancia para su control. Se sabe que la eficacia de los anticuerpos ocurre cuando el microorganismo intracelular está fuera de la célula, mientras tanto las células B modulan la respuesta inmune a través de los linfocitos T con la presentación de antígenos y producción de citocinas. Estas observaciones han contribuido a demostrar que la respuesta inmune efectiva está determinada por los efectos colaborativos entre la inmunidad celular y la humoral (Bastida & Juste, 2011, Kozakiewicz *et al.*, 2013). De acuerdo con Pooley, se ha demostrado que en un estado clínico de PTB la respuesta proinflamatoria o Th1 disminuye y comienza a predominar la respuesta Th2, que es caracterizada por la producción de IgG1. Mientras que, un nivel bajo de anticuerpos al inicio de la infección en sueros de borregas infectadas y vacunadas, puede estar asociado a la eliminación de MAP o a la disminución de la estimulación antigénica de forma crónica, resultados que concuerdan con lo observado en este estudio (Pooley *et al.*, 2019). Aunque no se ha dado relevancia al control de la infección por MAP en la respuesta inmune humoral, se ha visto un posible efecto protector que potencializa la respuesta inmune celular, ya que las células B participan en la activación y modulación de los linfocitos T, también interactúan con las células presentadoras de antígenos mediante unión al receptor CD40 y unión al factor de activación de células B, produciendo células de memoria, anticuerpos y formando complejos inmunes que regulan la función de los macrófagos, siendo más importante la actividad de las células B en el sitio de la infección, como en el caso de PTB. Además, las bacterias opsonizadas tienen más probabilidad de interactuar con el receptor Fc en monocitos y macrófagos, aumentando el tráfico de bacterias intracelulares al lisosoma (Walters *et al.*, 2003; Elgueta *et al.*, 2009; Kozakiewicz *et al.*, 2013; de Silva *et al.*, 2015, Everman *et al.*, 2015; Pooley *et al.*, 2019). Por lo que podemos concluir que la P35 expresada en el fago M13 es capaz de evocar la respuesta inmune humoral en los conejos inmunizados antes y después del desafío.

Aunque la vacunación contra MAP es recomendada antes de los primeros 6 meses de vida, previo a que el animal entre en contacto con la micobacteria y lograr un efecto preventivo (animales no infectados, pero con el riesgo de infectarse posteriormente), también poco se conoce sobre el efecto terapéutico de la vacunación contra PTB en condiciones experimentales (Arrazuria *et al.*, 2016), en donde puede haber 2 escenarios, 1) animales infectados sin cuadro clínico y 2) animales infectados con cuadro clínico; en este caso, se ha visto un menor número de animales donde se ha logrado la regresión de lesiones granulomatosas en intestino y de los signos clínicos (Reddacliff *et al.*, 2006; Bull *et al.*, 2007; Alonso-Hearn *et al.*, 2012; Purdie *et al.*, 2022). Por lo que, en este estudio se evaluó la vacunación antes y después de la infección con MAP cepa C empleando al conejo como modelo experimental. Ya que, aunque de forma tradicional se ha visto que se requiere primero la vacunación antes de una exposición al agente infeccioso para mimetizar una infección natural con el inmunógeno e incrementar la respuesta inmunológica para evitar la infección. Sin embargo, en casos de infección crónica como en el caso de PTB, se ha observado que la respuesta inmune adquirida puede no ser suficiente para combatir el agente infeccioso, dado que se ha visto una mejor protección en animales adultos previamente infectados de forma natural o experimental. Por consiguiente, la inmunización después de dicha infección puede ser más eficiente que en los animales que fueron previamente inmunizados, situación que ocurre en una infección natural donde se plantea que una exposición previa y repetida ante el antígeno que favorece la activación de linfocitos T citotóxicos de memoria (Berzofsky *et al.*, 2004; Gupta *et al.*, 2019). Sin embargo, se ha demostrado que la vacunación en rumiantes e implementada tanto de forma preventiva como terapéutica, ha sido eficiente para reducir la eliminación de MAP en heces, retraso en la presentación del cuadro clínico, logrando reducir las pérdidas económicas y transmisión de MAP (Whittington *et al.*; 2019).

Finalmente, de acuerdo a los resultados observados sobre el comportamiento inmunológico en el grupo 5INF-INM con respecto al grupo 4INM-INF, hubo una

respuesta inmunológica mayor y más temprana por la expresión de citocinas Th1 como IFN γ , TNF α , IL-12 e IL-8, posiblemente asociado a la exposición previa con MAP y activación de linfocitos T citotóxicos de memoria con la inmunización de P35 expresada en el fago M13 (Berzofsky *et al.*, 2004; Gupta *et al.*, 2019., Franceschi *et al.*, 2019). Tomando en cuenta la carga bacteriana en heces y tejidos, así como cultivo, este estudio fue consistente con el estudio de Arrazuria y colaboradores, donde también observaron que la vacunación después de la infección fue más eficiente que la vacunación antes de la infección (Arrazuria *et al.*, 2016). Además, al emplear al conejo como modelo animal para evaluar la respuesta inmune celular y humoral, comparado los rumiantes se tiene la ventaja de reducir el tiempo experimental, ya que han sido diseñados en un lapso mayor a 2 años (Alonso-Hearn *et al.*, 2012).

6. CONCLUSIONES GENERALES

En este estudio podemos concluir que los conejos son adecuados para emplearse como modelo para realizar infecciones experimentales y el empleo de MAP cepa C origen orix, es capaz de desarrollar lesiones granulomatosas en intestino y linfonodos, mostrando su capacidad de infección interespecie, lo que permitiría estudios posteriores sobre patogenia, epidemiología y evaluaciones con candidatos vacunales para el control de la PTB.

Sin embargo, se requiere de más estudios, donde se evalúan otros candidatos vacunales presentes en MAP y que no generen interferencia con el diagnóstico de la tuberculosis bovina, para favorecer el control y prevención de la presentación clínica en animales con infección natural. Existen escasos trabajos recientes donde se emplea al conejo como modelo animal para evaluar dichos inmunógenos. El conejo tiene las ventajas de ser un hospedero natural reproduciendo el cuadro clínico de PTB, es fácil de mantener y comparado con el empleo en pequeños rumiantes, debido al largo periodo de incubación de MAP, los experimentos se vuelven menos costosos. Por lo que, el conejo puede ser una elección como modelo animal para evaluaciones de patogenicidad y vacunación en PTB.

El empleo de la proteína P35 de MAP como inmunógeno en modelo animal conejo desarrolló una respuesta inmunológica tanto celular como humoral que se vio reflejada en la menor eliminación de la cantidad de MAP en heces y menor desarrollo de lesiones granulomatosas en intestino en los grupos inmunizados con P35 antes y después de la infección, comparado con los grupos controles, por lo que se recomienda su uso en animales infectados naturalmente con MAP. Con relación a los resultados obtenidos en este estudio se sugiere la evaluación de este inmunógeno en casos de infección natural por paratuberculosis.

Aunque no está bien estudiado el efecto terapéutico de las vacunas contra MAP en animales previamente infectados, en este estudio se observó que el uso de la proteína P35 como inmunógeno es capaz de estimular la respuesta inmune celular y humoral, conteniendo el desarrollo de la infección y de las lesiones, favoreciendo la eliminación de MAP en heces favoreciendo el control de la PTB.

7. BIBLIOGRAFÍA

Abendaño N, Juste RA, Alonso-Hearn M. 2013. Anti-Inflammatory and antiapoptotic responses to infection a common denominator of human and bovine macrophages infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. Biomed Res Intl: 908348.

Abdellrazeq GS, Elnaggar MM, Bannantine JP, Park KT, Souza CD, Backer B & Davis WC. 2018. A *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* relA deletion mutant and a 35 kDa major membrane protein elicit development of cytotoxic T lymphocytes with ability to kill intracellular bacteria. Vet res, 49(1), 1-16.

Abdellrazeq GS, Fry LM, Elnaggar MM, Bannantine JP, Schneider DA, Chamberlin WM, Davis WC. 2019. Cognate epitope recognition by bovine CD4 and CD8 T cells is essential for primary expansion of antigen-specific cytotoxic T-cells following ex vivo stimulation with a candidate *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* peptide vaccine. BioRxiv, 555672.

Agulló RI, Andrada M, Pérez SM, Roy Á, Bezos J, Bonnet T, Risalde MA. 2022. Effect of heat-inactivated *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (MAP) vaccine on the lesions and immunopathology developed in target tissues of naturally MAP-infected goats. Vet Microbiol, 273, 109543.

Alexander DC, Turenne CY, Behr MA. 2009. Insertion and deletion events that define the pathogen *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. J Bacteriol, 191(3):1018–1025.

Alonso-Hearn M, Molina E, Geijo M, Vázquez P, Sevilla IA, Garrido JM, Juste RA. 2012. Immunization of adult dairy cattle with a new heat-killed vaccine is associated with longer productive life prior to cows being sent to slaughter with suspected paratuberculosis. J Dairy Sci, 95, 618-629.

Alonso-Hearn M, Canive M, Blanco-Vazquez C, Torremocha R, Balseiro A, Amado J, Varela-Martinez E, Ramos R, Jugo BM, Casais R. 2019. RNA-Seq analysis of ileocecal valve and peripheral blood from Holstein cattle infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* revealed dysregulation of the CXCL8/IL8 signaling pathway. Sci Rep, Oct 16;9(1):14845.

Angus KW. 1990. Intestinal lesions resembling paratuberculosis in a wild rabbit (*Oryctolagus cuniculus*). J of Comp Pathol, 103(1), 101-105.

Arrazuria R, Sevilla IA, Molina E, Pérez V, Garrido JM, Juste RA, Elguezabal N. 2015. Detection of *Mycobacterium avium* subspecies in the gut associated lymphoid tissue of slaughtered rabbits. Vet Res, 11:130.

Arrazuria R, Molina E, Garrido JM, Pérez V, Juste RA, Elguezabal N. 2016. Vaccination sequence effects on immunological response and tissue bacterial burden in paratuberculosis infection in a rabbit model. Vet Res, 47:77.

Arsenault RJ, Li Y, Bell K, Doig K, Potter A, Griebel PJ, Kusalik A, Napper S. 2012. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* inhibits interferon gamma-induced signaling in bovine monocytes: insights into the cellular mechanisms of Johne's disease. Infect Immun, 80:3039–3048.

Ayele WY, Bartos M, Svastova P, Pavlik I. 2004. Distribution of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in organs of naturally infected bull-calves and breeding bulls. Vet Microbiol, 103: 3-4, 209-217.

Bach EA, Aguet M, Schreiber RD. 1997. The IFN gamma receptor: a paradigm for cytokine receptor signaling. Annu Rev Immunol, 15: 563–591.

Banasure KD, Basagoudanavar SH, Chaudhury P, Tiwari V, Parihar NS, Goswami PP. 2001. Identification and characterization of a gene encoding a 35-kDa protein from *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. FEMS Microbiol L, 196: 2, 195–199.

Bannantine JP, Stabel JR. 2002. Killing of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* within macrophages. BMC Microbiol, 2:2.

Bannantine JP, Huntley JF, Miltner E, Stabel JR, Bermudez LE. 2003a. The *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* 35 kDa protein plays a role in invasion of bovine epithelial cells. Microbiol, 149 (Pt 8), 2061-2069.

Bannantine JP, Zhang Q, Li LL, Kapur V. 2003b. Genome homogeneity between *Mycobacterium avium* subs. *paratuberculosis* and *Mycobacterium avium* subs. *avium* belies their divergent growth rates. BMC Microbiol, 3:10.

Bannantine JP, Radosevich TJ, Stabel JR, Berger S, Griffin JFT, Paustian ML. 2007. Production and characterization of monoclonal antibodies against a major membrane protein of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. Clin vac immunol, 14(3), 312-317.

Bannantine JP, Wu CW, Hsu C, Zhou S, Schwartz DC, Bayles DO, Paustian ML, Alt DP, Sreevatsan S, Kapur V, Talaat AM. 2012. Genome sequencing of ovine isolates of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* offers insights into host association. BMC Genomics, 13:89.

Basagoudanavar SH, Goswami PP, Tiwari V, Pandey AK, Singh N. 2004. Heterologous expression of a gene encoding a 35 kDa protein of *Mycobacterium avium paratuberculosis* in *Escherichia coli*. Vet Res Commun, 28(3):209-24.

Basagoudanavar SH, Goswami PP, Tiwari V. 2006. Cellular immune responses to 35 kDa recombinant antigen of *Mycobacterium avium paratuberculosis*. Vet res communicat, 30, 357-367.

Bastida F, Juste RA. 2011. Paratuberculosis control: a review with a focus on vaccination. J of immune based therapies and vaccines, 9:8.

Bech-Neilson S, Jorgensen JB, Ahrens P, Feld NC. 1992. Diagnostic accuracy of a *Mycobacterium phlei*-absorbed serum enzyme linked immunosorbent assay for diagnosis of bovine paratuberculosis in dairy cows. J Clin, 30, 613-618.

Begg DJ, Griffin JFT. 2005. Vaccination of sheep against *M. paratuberculosis*: immune parameters and protective efficacy. Vaccine, 23:(42), 4999-5008.

Begg DJ, De Silva K, Carter N, Plain KM, Purdie A, Whittington RJ. 2011. Does a Th1 over Th2 dominancy really exist in the early stages of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infections? Immunobiol, 216:(7), 840-846.

Begara McGorum, Wildblood LA, Clarke CJ, Connor KM, Stevenson K, McInnes CJ, Sharp JM, Jones DG. 1998. Early immunopathological events in experimental ovine paratuberculosis Vet Immunol Immunopathol, 63, 265-287.

Behr MA, Schurr E. 2006. Mycobacteria in Crohn disease: A persistent hypothesis. Inflamm Bowel Dis. 12(10): 1000-1004.

Behr MA, Kapur V. 2008. The evidence for *Mycobacterium paratuberculosis* in Crohn's disease. Curr Opin Gastroenterol, 24 (1):17–21.

Benedictus G. 1984. Evaluation of organized control of bovine paratuberculosis in Friesland province, the Netherlands. Tijdschr Diergenees, (109): 905-916.

Beran M, Havelkova J, Kaustova L, Dvorska I. 2006. Cell wall deficient forms of mycobacteria: a review. *Vet Med*, 51(7): 365–389.

Bermudez LE, Petrofsky M, Sommer S, Barletta RG. 2010. Peyer's patch deficient mice demonstrate that *Mycobacterium avium* subs *paratuberculosis* translocates across the mucosal barrier via both M cells and enterocytes but has inefficient dissemination. *Infect Immun*, 78, 3570–7.

Bernut A, Nguyen-Chi M, Halloum I, Herrmann JL, Lutfalla G, Kremer L. 2016. *Mycobacterium abscessus*-Induced Granuloma Formation Is Strictly Dependent on TNF Signaling and Neutrophil Trafficking. *PLoS Pathog*, 12(11): e1005986.

Biet F, Sevilla IA, Cochard T, Lefrançois LH, Garrido JM, Heron I, Juste RA, McLuckie J, Thibault VC, Supply P, Collins DM, Behr MA, Stevenson K. 2012. Inter- and intra-subtype genotypic differences that differentiate *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* strains. *BMC Microbiol*, 12, 264.

Bo M, Niegowska M, Erre GL, Piras M, Longu MG, Manchia P, Manca M, Passiu G, Sechi LA. 2018. Rheumatoid arthritis patient antibodies highly recognize IL-2 in the immune response pathway involving IRF5 and EBV antigens. *Sci Rep*, 8:1789.

Borutaite V, Brown GC. 2003. Nitric oxide induces apoptosis via hydrogen peroxide, but necrosis via energy and thiol depletion. *Free Radic Biol Med*, 35:1457–1468.

Brumell JH, Scidmore MA. 2007. Manipulation of rab GTPase function by intracellular bacterial pathogens. *Microbiol Mol Biol Rev*, 71:636-652.

Brumell JH, Scidmore MA. 2007. Manipulation of rab GTPase function by intracellular bacterial pathogens. *Microbiol Mol Biol Rev*, 71:636-652.

Bryant JM, Thibault VC, Smith DGE, McLuckie J, Heron I, Sevilla IA, *et al.* 2016. Phylogenomic exploration of the relationships between strains of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. BMC Genomics,17:79.

Bull TJ, McMinn EJ, Sidi-Boumedine K, Skull A, Durkin D, Neild P. 2003. *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* and Crohn's disease: a systematic review and meta-analysis. Lancet Infect Dis, 7:607–613.

Castillo VU, Gómez FR, Chávez GG, Favila HLC, Soto CR, Maldonado CE, Tamez GP. 2015. Presence of paratuberculosis in dairy cows culled in Tizayuca. Rev Colomb Cienc Pecu, 28: 174–180.

Castrellón A. V. E. 2012. Expresión de la proteína recombinante p35 de *Mycobacterium avium* subs. *paratuberculosis* y su uso en diagnóstico en paratuberculosis en ovinos. Tesis de Maestría, Universidad Nacional Autónoma de México, 89 pp.

Castrellón A. V. E. 2018. Expresión de la proteína p35 de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* y su utilización como inmunógeno en ovinos infectados naturalmente con paratuberculosis. Tesis de Doctorado, Universidad Nacional Autónoma de México, 70 pp.

Cavaignac SM, White SJ, de Lisle GW, Collins DM. 2000. Construction and screening of *Mycobacterium paratuberculosis* insertional mutant libraries. Arch Microbiol, 173:229–231.

Chang TZ, Diambou I, Kim JR, Wang B, Champion JA. 2017. Host and pathogen derived adjuvant coatings on protein nanoparticle vaccines. Bioeng Transl Med, 2(1):120-130.

Charavaryamath C, Gonzalez CP, Fries P, Gomis S, Doig K, Scruten E, Potter A,

Napper S, Griebel PJ. 2013. Host responses to persistent *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection in surgically isolated bovine ileal segments. Clin Vaccine Immunol, 20:156–165.

Chávez Gris G. 1993. Tesis de Doctorado. Estudio comparativo de las lesiones y de la respuesta inmunológica observadas en corderos infectados experimentalmente con *Mycobacterium paratuberculosis* y *Mycobacterium avium* subsp. *silvaticum*. Universidad de Zaragoza, España.

Chávez Gris G, Tavera Trigo FJ, Svastova P, Pavlik I. 2004. Identificación del polimorfismo genético de aislamientos de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* de caprinos del centro de México. Vet Méx, 35(1), 75–82.

Chávez Gris G. Epidemiología, prevención y control de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* en pequeños rumiantes. Capítulo 24:393-401 En: “Enfermedades de importancia económica en Producción Animal”. Publicado por la Editorial Mc Graw Hill Interamericana. México. 2005. ISBN 970-10-4876-8.

Chen Z, O’Shea JJ. 2008. Th17 cells: a new fate for differentiating helper T cells. Immunol Res 41:87–102.

Chiodini RJ, Van Kruiningen HJ, Merkal RS. 1984. Ruminant paratuberculosis (Johne's disease): The current status and future prospects. Cornell veterinarian, 74(3), 218-262.

Chiodini RJ, Van Kruiningen HJ, Thayer WR, Coutu JA. 1986. Spheroplastic phase of mycobacteria isolated from patients with Crohn’s disease. J Clin Microbiol, 24, 357-363.

Chiodini RJ. 1993. The history of paratuberculosis (Johne’s disease). A review of the literature 1895 to 1992. Pp. 1–658. International Association for Paratuberculosis, Inc., Providence, Rhode Island.

Cirone K, Morsella C, Romano M, Paolicchi F. 2007. *Mycobacterium avium* subs. *paratuberculosis*: presencia en los alimentos y su relación con la enfermedad de Crohn. Rev Argent Microbiol, 39:57-68.

Clarke CJ. 1977. The pathology and pathogenesis of paratuberculosis in ruminants and other species. J Com Pathol, 116 (6): 217-261.

Clarke CJ, Little D. 1996. The pathology of ovine paratuberculosis: Gross and histological changes in the intestine and other tissues. J Comp Pathol, 114 (4): 419-43.

Cocito C, Gilot P, Coene M, deKesel M, Poupart P, Vannuffel P. 1994. Paratuberculosis. Clin Microbiol Rev, 7:(3).

Collins MT, Sockett DC, Goodger WJ, Conrad TA, Thomas CB, Carr DJ. 1994. Herd prevalence and geographic distribution of, and risk factors for, bovine paratuberculosis in Wisconsin. J A Vet Med Assoc, 204, 636-636.

Colgrove GS, Thoen CO, Blackburn BO, Murphy CD. 1989. Paratuberculosis in cattle: a comparison of three serologic tests with results of fecal culture. Vet microbiol, 19(2), 183-187.

Collins MT, Eggleston V, Manning EJB. 2010. Successful control of Johne's disease in nine dairy herds: results of a six-year field trial. J Dairy Sci, 93(4):1638-43.

Collins DM, De Zoete M, Cavaignac SM. 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(12):4760-2.

Correa-Valencia NM, Ramírez NF, Bülte M, Fernández-Silva JA. 2017. Fecal culture and two fecal-PCR methods for the diagnosis of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in a seropositive herd. Rev Colomb de Cienc Pec, 30(2), 101-115.

Corpa JM, Garrido J, Garcia MJF, Pérez V. 2000. Classification of Lesions Observed in Natural Cases of Paratuberculosis in Goats. J Comp Pathol, 122 (4) 255-265.

Costanzo G, Pinedo FA, Mon ML, Viale M, Gil A, Illia MC, Gioffré A, Arese A, Travería G, Romano MI. 2011. Accuracy assessment and screening of a dairy herd with paratuberculosis by three different ELISAs. Vet Microbiol, 6.

Coussens PM. 2001. *Mycobacterium paratuberculosis* and the bovine immune system. Anim Health Res Rev, (2): 141–61.

Coussens PM. 2004a. Model for immune responses to *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* in cattle. Infect Immun, 72(6), 3089–3096.

Coussens PM, Verman N, Coussens MA, Elftman MD, McNulty AM. 2004b. 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 and immun, 72(3), 1409-1422.

Coussens PM, Sipkovsky S, Murphy B, Roussey J, Colvin CJ. 2012. Regulatory T cells in cattle and their potential role in bovine paratuberculosis. Comp Immunol Microbiol Infect Dis, 35:233–239.

Cousins DV, Whittington R, Marsh I, Masters A, Evans RJ, Kluver P. 1999. Mycobacteria distinct from *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolated from the faeces of ruminants possess IS 900 -like sequences detectable by IS 900

polymerase chain reaction: implications for diagnosis. Mol and Cel Probes 13 (6) 431-442.

Daniels MJ, Ball N, Hutchings MR, Greig A. 2001. The grazing response of cattle to pasture contaminated with rabbit faeces and the implications for the transmission of paratuberculosis. Vet J, 161:306–313.

Daniels MJ, Henserson D, Greig A, Stevenson K, Sharp JM, Hutchings MR. 2003a. The potential role of wild rabbits *Oryctolagus cuniculus* in the epidemiology of paratuberculosis in domestic ruminants. Epidemiol Infect, 130: 553-559.

Daniels MJ, Hutchings MR, Beard PM, Henderson D, Greig A, Stevenson K, Sharp JM. 2003b. Do non-ruminant wildlife pose a risk of paratuberculosis to domestic livestock and vice versa in Scotland?. J Wild Dis, 39:10-15.

De Juan L, Álvarez J, Romero B, Bezos J, Castellanos E, Aranaz A, Mateos A, Domínguez L. 2006. Comparison of four different culture media for isolation and growth of type II and type I/III *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* strains isolated from cattle and goats, Applied and Environm Microbiol, 72(9), 5927–5932.

Del Castillo-Rueda A, Khosravi-Shahi P. 2010. Papel del hierro en la interacción entre el huésped y el patógeno. Med Clin, 10: 452-456.

Delgado F, Estrada CC, Romano M, Paolicchi F, Blanco VF, Capellino F, Chávez GG, Pereira SAL. 2010. Expression of NRAMP1 and iNOS in *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* naturally infected cattle. Comp Immunol Microbiol Infect Dis, Sep;33(5):389-400.

Deng X, Wang L, You X, Dai P, Zeng Y. 2018. Advances in the T7 phage display system (review). Mol Med Rep,17(1): 714-720.

DeKuiper JL & Coussens PM. 2019. Inflammatory Th17 responses to infection with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (MAP) in cattle and their potential role in development of Johne's disease. *Vet Immunol Immunopathol*, 218, 109954.

De Silva K, Plain KM, Begg DJ, Purdie AC, Whittington RJ. 2015. CD4(+) T-cells, gammadelta T-cells and B-cells are associated with lack of vaccine protection in *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection. *Vaccine*, 33(1):149–55.

Dhand NK, Eppleston J, Whittington RJ, Windsor PA. 2016. Changes in prevalence of ovine paratuberculosis following vaccination with Gudair®: results of a longitudinal study conducted over a decade. *Vaccine*, 34(42):5107-13.

Domínguez RAN, Martínez CF, Munguía ME, Odales J, Gevorkian G, Manoutcharian K. 2020. Generation of multiepitope cancer vaccines based on large combinatorial libraries of survivin-derived mutant epitopes. *Immunol*, Oct;161(2):123-138.

Doré E, Pare J, Cote G, Buczinski S, Labrecque O, Roy JP, Fecteau G. 2012. Risk factors associated with transmission of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* to calves within dairy herd: a systematic review. *J Vet Intern Med*, 26(1):32-45.

Dorman SE, Holland SM. 1998. Mutation in the signal-transducing chain of the interferon-gamma receptor and susceptibility to mycobacterial infection. *J Clin Invest*, 101:2364–2369.

Dow CT. 2012. *M. paratuberculosis* Heat Shock Protein 65 and Human Diseases: Bridging Infection and Autoimmunity. *Autoimmune Dis*, Article ID 150824, 6 page.

Dow CT. 2020. Proposing BCG Vaccination for *Mycobacterium avium* ss. *paratuberculosis* (MAP) Associated Autoimmune Diseases. *Microorganisms*, Feb 5;8(2):212.

Dudemaine PL, Fecteau G, Lessard M, Labrecque O, Roy JP, Bissonnette N. 2014. Increased blood-circulating interferon- γ , interleukin-17, and osteopontin levels in bovine paratuberculosis. *J Dairy Sci*, 97: 6, 3382-3393.

Elgueta R, Benson MJ, De Vries VC, Wasiuk A, Guo Y, Noelle RJ. 2009. Molecular mechanism and function of CD40/CD40L engagement in the immune system. *Immunol Rev*, 229(1):152–72.

Elguezabal N, Chamorro S, Molina E, Garrido JM, Izeta A, Rodrigo L, Juste RA. 2012. Lactase persistence, NOD2 status and *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection associations to Inflammatory Bowel Disease. *Gut Pathog*, 4, 6

Ellingson JLE, Anderson JL, Koziczkowski JJ, Radcliff RP, Sloan SJ, Allen SE Sullivan NM. 2005. Detection of viable *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in retail pasteurized whole milk by two culture methods and PCR. *J. Food Prot*, 68, 966-72.

El-Zaatari FA, Naser SA, Markesich DC, Kalter DC, Engstand L, Graham DY. 1996. Identification of *Mycobacterium avium* complex in sarcoidosis. *J Clin Microbiol*, 34(9):2240–5.

El-Zaatari FA, Naser SA, Graham DY. 1997. Characterization of a specific *Mycobacterium paratuberculosis* recombinant clone expressing 35,000-molecular-weight antigen and reactivity with sera from animals with clinical and subclinical Johne's disease. *J of clinical microbiol*, 35(7), 1794-1799.

Estévez DI, Hernández CR, Trujillo GAM, Chávez GG. 2007. Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in goat and sheep flocks in Mexico. Small Rum Res, 72: 2–3, 209-213.

Everman JL, Bermudez LE. 2015. Antibodies against invasive phenotype-specific antigens increase *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* translocation across a polarized epithelial cell model and enhance killing by bovine macrophages. Front Cell Infect Microbiol, 5:58.

Faisal SM, Yan F, Chen TT, Useh NM, Guo S, Yan W, Chang YF. 2013. Evaluation of a Salmonella vectored vaccine expressing *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* antigens against challenge in a goat model. PLoS One, 8(8), e70171.

Favila HLC, Chávez GG, García VFJ, RemesTJM, Uscanga LF, Santillán FMA, Paolocchi F, Carrillo CEM, Hernández CR. 2012. Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Crohn's Disease Patients and Ruminants Intestine by *in situ* hybridization. In: "Crohn's Disease" Intech open access publisher. Chapter 7, 121-128. ISBN 978-953-307-811-3.

Feller M, Huwiler K, Stephan R, Altpeter E, Shang A, H. Furrer, Rhodes GEG, Pickup R, Hermon TJ. 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.

Fernández M, Benavides J, Sevilla IA, Fuertes M, Castaño P, Delgado L, García Marín JF, Garrido JM, Ferreras MC, Pérez V. 2014. Experimental infection of lambs with C and S-type strains of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*: immunological and pathological findings. Vet Res, 45:5.

Florou M, Leontides L, Kostoulas P, Billinis C, Sofia M. 2009. Strain-specific sensitivity estimates of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* culture in greek sheep and goats. *Zoonoses and Public Health*, 56(1), 49–52. doi: 10.1111/j.1863-2378.2008.01179.x.

Franceschi V, Mahmoud AH, Abdellrazeq GS, Tebaldi G, Macchi F, Russo L & Donofrio G. 2019. Capacity to Elicit Cytotoxic CD8 T Cell Activity Against *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* Is Retained in a Vaccine candidate 35 kDa peptide modified for expression in mammalian cells. *Front in Immunol*, 10, 2859.

Garrido JM, Cortabarria N, Oguiza JA, Aduriz G, Juste RA. 2000. Use of a PCR method on fecal samples for diagnosis of sheep paratuberculosis. *Vet Microbiol*, Dec 20;77(3-4):379-86.

Gasteiner J, Awad-Masalmeh M, Baumgartner W. 2000. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in cattle in Austria, diagnosis with culture, PCR and ELISA. *Vet microbiol*, Dec 20;77(3-4):339-49.

Gilardoni LR, Paolicchi FA, Mundo SL. 2012. Bovine paratuberculosis: a review of the advantages and disadvantages of different diagnostic tests. *Rev Argent Microbiol*, Jul-Sep; 44(3):201-15.

Gioffré A, Correa Muñoz M, Alvarado Pinedo MF, Vaca R, Morsella C, Fiorentino MA, Paolicchi F, Ruybal P, Zumárraga M, Travería GE, Romano MI. 2015. Molecular typing of Argentinian *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolates by multiple-locus variable number-tandem repeat analysis. *Braz J Microbiol*, Jun 1;46(2):557-64.

Gómez LE, Blanco M del M, Doménech A. Manual de inmunología veterinaria. Pearson Educación, S.A., Madrid, 2006. 728 pp. ISBN. 978-84-8322-358-1.

González J, Geijo MV, García-Pariente C, Verna A, Corpa JM, Reyes LE, Ferreras MC, Juste RA, García MJF, Pérez V. 2005. Histopathological classification of lesions associated with natural paratuberculosis infection in cattle. *J Comp Pathol*, 133, 184-96.

González Rodríguez D. 2016. Caracterización molecular de la respuesta inmune de ovinos infectados naturalmente con *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* vacunados con la proteína P35 expresada en el fago M13 recombinante. Tesis de Maestría, México, D.F. FMVZ-UNAM.

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, 1-13.

Griffin JFT, Hughes AD, Liggett S, Farquhar PA, Mackintosh CG, Bakker D. 2009. Efficacy of novel lipid-formulated whole bacterial cell vaccines against *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in sheep. *Vac*, 27(6), 911-918.

Gumber S, Taylor DL, Marsh IB, Whittington RJ. 2009. Growth pattern and partial proteome of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* during the stress response to hypoxia and nutrient starvation. *Vet Microbiol*, 133:344–357.

Guirado E, Schlesinger LS, Kaplan G. 2013. Macrophages in tuberculosis: friend or foe. *Sem Immunopathol*, 35:563-583.

Gupta S, Singh SV, Bhatia AK. 2016. Immuno-reactivity pattern of secretory proteins of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* vaccine strain 'S 5' with potential for diagnosis of Johne's disease in early infection. *Indian J Biotech*, 15:306–312.

Gupta S, Singh SV, Singh M, Chaubey KK, Karthik K, Bhatia AK, Kumar N, Dhama K. 2019. Vaccine approaches for the 'therapeutic management' of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection in domestic livestock. *Vet quarterly*, 39(1), 143-152.

Hamilton MJ, Davis WC. 2008. Demonstration of allelic exchange in the slow-growing bacterium *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, and generation of mutants with deletions at the *pknG*, *relA*, and *Isr2* loci. *Appl Environ Microbiol*, 74:1687–1695.

Harding HP. 1959. The histopathology of *Mycobacterium johnei* infection in small laboratory animals. *J Pathol and Bact*, 78: 157-169.

Harris NB, Barletta RG. 2001. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in vet medicine. *Clin Microbiol Rev*, 14, 489-512.

Hausleithner, Cubler K, Klawonn W, Hess RG. 2001. Immune reactions in cattle after immunization with a *Mycobacterium paratuberculosis* vaccine and implications for the diagnosis of *M. paratuberculosis* and *M. bovis* infections. *J Vet Med Public Health*, 48:185–195.

Hermon Taylor J, Bull T. 2002. Crohn's disease caused by *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*: a public health tragedy whose resolution is long overdue. *J Med Microbiol*, 51:3–6.

Hernández-Reyes AL, Chávez-Gris G, Maldonado-Castro E, Alcaraz-Sosa LE, Díaz-Negrete MT. 2022. First identification of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in wild ruminants in a zoo in Mexico. *Vet World*, 15(3): 655-661.

Heron I, Kopečna M, May L, Pavlik I, Sharp JM, Thibault VC, Willemsen P, Zadoks RN, Knights D, Lassen KG, Xavier RJ. 2013. Advances in inflammatory bowel

disease pathogenesis: linking host genetics and the microbiome. *Gut*, 62, 1505-10.

Hess KL, Andorko JI, Tostanoski LH, Jewell CM. 2017. Polyplexes assembled from self-peptides and regulatory nucleic acids blunt toll-like receptor signaling to combat autoimmunity. *Biomaterials*, 118:51-62.

Hess KL, Jewell CM. Phague display as tool for vaccine and immunotherapy development. 2020. *Bioeng Med*, 5:e10142. 15.

Hutchings MR, Stevenson K, Greig A, Davidson R, Marion G, Judge J. 2010. Infection of non-ruminant wildlife by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. In: Behr MA, Collins DM (eds) *Paratuberculosis: Organism, Disease, Control*. MA: CAB International, Cambridge, 188–200.

Huygen K. 2003. On the use of DNA vaccines for the prophylaxis of mycobacterial diseases. *Infect and immun*, 71(4), 1613-1621.

Jakubowska BL *et al.* 2012. Genotyping of CARD15/NOD 2, ATG16 L1 and IL223R genes in polish Crohn's disease (CD) patients- Are they related to the localization of the disease and extra intestinal symptoms. In: "Crohn's Disease" Intech open access publisher. Chapter 3, 39-58. ISBN 978-953-307-811-3.

Jorge RJM, Guzmán Ruiz CC, López Díaz CA, Santillán Flores MC, Valencia Posadas M, Díaz Aparicio E, Córdova López D, Favila Humara LC, Mejía Haro J. 2011. Impacto económico de la paratuberculosis caprina en explotaciones lecheras del estado de Guanajuato. En U. A. de Chapingo, ed. *La ganadería ante el agotamiento de los paradigmas dominantes*. Volumen 2. Chapingo, México, pp. 347–353.

Jørgensen JB, & Aalund O. (Eds.). 1984. *Agriculture. Paratuberculosis, diagnostic methods, their practical application and experience with vaccination*. Workshop in

the CEC Programme of Coordination of Research in Animal Pathology, held in Copenhagen 22 and 23 November 1983 (159pp).

Judge J, Kyriazakis I, Greig A, Davidson RS, Hutchings MR. 2006. Routes of intraspecies transmission of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in rabbits (*Oryctolagus cuniculus*): a field study. Appl Environ Microbiol, 72:1, 398-403.

Jungersen, G, Mikkelsen H, Grell SN. 2012. Use of the johnin PPD interferon-gamma assay in control of bovine paratuberculosis. Vet immunol immunopathol, 148(1-2), 48-54.

Juste RA, Aduriz JJ. 1990. Diagnóstico. Ovis. Ed: R. A. Juste,7, 49-62.

Juste RA, Marco JC, de Ocáriz CS, Adúriz JJ. 1991. Comparison of different media for the isolation of small ruminant strains of *Mycobacterium paratuberculosis*. Vet microbiol, 28(4), 385-390.

Juste RA, Garrido JM, Anduriz G. 2000. El agente causal de la paratuberculosis y su situación taxonómica. Bovis, 93:14-28.

Juste RA. 2012. Slow infection control by vaccination: paratuberculosis. Vet Immunol Immunopathol, 148(1-2), 190-196.

Juste RA, Alonso-Hearn M, Molina E, Geijo M, Vazquez P, Sevilla IA, Garrido JM. 2009. Significant reduction in bacterial shedding and improvement in milk production in dairy farms after the use of a new inactivated paratuberculosis vaccine in a field trial. BMC research notes, 2, 1-6.

Juste R, Garrido JM, Elguezabal N, Sevilla IA. 2020. 22 Paratuberculosis Vaccines. Paratuberculosis: Organism, Disease, Control, 365.

Kalis CH, Collins MT, Hesselink JW, Barkema HW. 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.

Keewan E, Naser SA. 2020. MiR-146a rs2910164 G > C polymorphism modulates Notch-1/IL-6 signaling during infection: a possible risk factor for Crohn's disease. *Gut Pathogens*, 12, 1-10.

Khalifeh MS & Stabel JR. 2004. Upregulation of transforming growth factor-beta and interleukin-10 in cows with clinical Johne's disease. *Vet immunol immunopathol*, 99(1-2), 39-46.

Kleinnijenhuis J, Oosting M, Joosten LAB, Netea MG, Van Crevel R. 2011. Innate immune recognition of *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Dev Immunol*, 405310.

Knights D, Lassen KG, Xavier RJ. 2013. Advances in inflammatory bowel disease pathogenesis: linking host genetics and the microbiome. *Gut*, 62:1505-1510.

Koets ARV, 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.

Kozakiewicz L, Phuah J, Flynn JA, Chan J. 2013. The role of B cells and humoral immunity in *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Adv Exp Med Biol*, 783:225–50.

Kreeger JM, Snider TG, Olcott BM, 1991. Spontaneous murine thymocyte comitogenic activity consistent with interleukin-1 in cattle naturally infected with

Mycobacterium paratuberculosis. Vet Immunol and Immunopathol, (28) 3–4, 317-326.

Ladero Auñón I. 2021. Vaccine immunomodulation and protection mechanism against *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: Focus on innate responses. Tesis de Doctorado, NEIKER, Universidad del País Vasco, España, 296 p.

Lamont EA, O'Grady SM, Davis WC, Eckstein T, Sreevatsan S. 2012. Infection with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* results in rapid interleukin-1 β release and macrophage transepithelial migration. Infection and immunity, 80(9), 3225–3235.

Larsen AB, Moon HW, Merkal RS. 1972. Susceptibility of horses to *Mycobacterium paratuberculosis*. Am J Vet Res, 33: 2185-2189.

Larsen AB, & Moon, HW. 1972. Experimental *Mycobacterium paratuberculosis* infection in chickens. Am J Vet Res, 33, 1231-1235.

Li L, Wagner B, Freer H, Schilling M, Bannantine JP, Campo JJ, Katani R, Grohn YT, RadzioBasu J, Kapur V. 2017. Early detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in cattle with multiplex-bead based immunoassays. PloS ONE 12, (12): 1-16.

Leite FL, Reinhardt TA, Bannantine JP, Stabel JR. 2015. Envelope protein complexes of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and their antigenicity. Vet microbiol, 175(2-4), 275-285.

Loftus EV, Silverstein MD, Sandborn WJ, Tremaine WJ, Harmsen WS, Zinsmeister AR. 1998. Crohn's disease in Olmsted County, Minnesota, 1940–1993: Incidence, prevalence, and survival. Gastroenterol, 114 (6), 1161-116.

Mabbott N, Donaldson D, Ohno H, Williams I, Mahajan A. 2013. Microfold (M) cells: important immunosveillance posts in the intestinal epithelium. *Mucosal Immunol*, 6(4): 666-677.

Macdonald SHF, Woodward E, Coleman MM, Dorris ER, Nadarajan P, Chew WM, McLaughlin AM, Keane J. 2012. Networked T cell death following macrophage infection by *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS One* 7, e38488.

Mackintosh CG, Labes RE, Griffin JF. 2005. The effect of Johne's vaccination on tuberculin testing in farmed red deer (*Cervus elaphus*). *N Z Vet J*, 53:216–222.

Magombedze G, Eda S, Ganusov VV. 2014. Competition for antigen between Th1 and Th2 responses determines the timing of the immune response switch during *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection in ruminants. *PLoS Comput Biol*, 10:e1003414.

Magro G. 2020. SARS-CoV-2 and COVID-19: is interleukin-6 (IL-6) the 'culprit lesion' of ARDS onset? What is there besides Tocilizumab? SGP130Fc. *Cytokine* 14:100029.

Mahida YR, Kurlac L, Gallagher A, Hawkey CJ. 1991. High circulating concentrations of interleukin-6 in active Crohn's disease but not ulcerative colitis. *Gut*, 32(12):1531–4.

Maio ET, Carta T, BalseiroA, Sevilla IA, Romano A, Ortiz JA, Vieira-Pinto M, Garrido JM, Pérez de la Lastra JM, Gortazar C. 2011. Paratuberculosis in European wild rabbits from the Iberian Peninsula. *Res Vet Sci*, 91, 212–218.

Manning EJ, Collins MT. 2001. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: pathogen, pathogenesis and diagnosis. *Rev Sci Tech*, 20:133-150.

Manning EJB. 2011. Paratuberculosis in captive and free-ranging wildlife. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 27: 621-630.

Martin E, Kamath AT, Triccas JA, Britton WJ. 2000. Protection against virulent *Mycobacterium avium* infection following DNA vaccination with the 35 kilodalton antigen is accompanied by induction of gamma-interferon secreting CD4+T-cells. *Infect Imm*, 68: 3090-3096.

Martin E, Roche PW, Triccas JA, Britton WJ. 2001. DNA encoding a single mycobacterial antigen protects against leprosy infection. *Vac*, 19(11-12), 1391-1396.

Manoutcharian K, Gevorkian G, Cano A, Almagro JC. 2001. Phage displayed biomolecules as preventive and therapeutic agents. *Current Pharm Biotechnol*, 2(3).

Manoutcharian K, Díaz OA, Gevorkian G, Fragoso G, Acero G, González E, de Aluja A, Villalobos N, Gómez CE, E. 2004. Recombinant bacteriophage-based multiepitope vaccine against *Taenia solium* pig cysticercosis. *Vet Immunol Immunopatol*, 99,11-24.

McClure HM, Chiodini RJ, Anderson DC, Swenson RB, Thayer WR, Coutu JA. 1987. *Mycobacterium paratuberculosis* infection in a colony of stump-tail macaques (*Macaca arctoides*). *J Inf Dis*, Volume 155:5, 1011–1019.

Mikkelsen H, Aagaard C, Nielsen SS, Jungersen G. 2011. Review of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* antigen candidates with diagnostic potential. *Vet Microbiol*, Aug 26;152(1-2):1-20.

Miranda Bandera V. 2005. Evaluación del impacto económico de la paratuberculosis en ganado bovino lechero (sistema intensivo), en el Complejo Agropecuario Industrial Tizayuca, Hidalgo. Tesis de Maestría. FMVZ, UNAM.

Mokresh AH, Czuprynski CJ, Butlers DG. 1990. A Rabbit Model for Study of *Mycobacterium paratuberculosis* Infection. Infection and Immunity, 3798-3807.

Motiwalla A, Amonsin A, Strother M, Manning EJ, Kapur V, Sreevatsan S. 2003. Molecular epidemiology of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolates recovered from wild animal species. J Clin Microbiol, 42:41, 1703-1712.

Naser SA, Schwartz DBS, Shafran IMD. 2000. Isolation of *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* From Breast Milk of Crohn's Disease Patients. Ame J Gastroenterol, 95(4), 1094-1095.

Nielsen SS, Toft N. 2011. Effect of management practices on paratuberculosis prevalence in Danish dairy herds. J dairy scienc, 94(4), 1849-1857.

Nielsen SS, Toft N. 2012. Effect of days in milk and milk yield on testing positive in milk antibody ELISA to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in dairy cattle. Vet immunol immunopathol, 149(1-2), 6-10.

Nielsen S. 2014. Developments in diagnosis and control of bovine paratuberculosis. CAB Rev, 9, 012:1-12, doi: 10.1079/PAVSNNR20149012.

NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-033-SAG/ZOO-2014. Métodos para dar Muerte a los animales domésticos y silvestres. Consultado en:

https://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5405210&fecha=26/08/2015#gs.c.tab=0

NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-062-ZOO-1999. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Consultado en: https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/203498/NOM-062-ZOO-1999_220801.pdf

Oakes RS, Froimchuk E, Jewell CM. 2019. Engineering Biomaterials to Direct Innate Immunity. *Adv Therap*, 2:1800157.

O'Brien R, Mackintosh CG, Bakker D, Kopecna M, Pavlik I, Griffin JFT. 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.

OIE.2021.https://www.woah.org/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/3.01.15_Paratuberculosis.pdf

Palmer MV, Thacker TC, Waters WR. 2015. Analysis of Cytokine Gene Expression using a Novel Chromogenic In-situ Hybridization Method in Pulmonary Granulomas of Cattle Infected Experimentally by Aerosolized *Mycobacterium bovis*. *J Comp Pathol*, 153, 150-159.

Park HE, Park HT, Jung YH, Yoo HS. 2018. Gene expression profiles of immune-regulatory genes in whole blood of cattle with a subclinical infection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *PLoS One*, 13(4):e0196502.

Park AY, Scott P. 2001. IL-12: Keeping Cell-Mediated Immunity Alive: Frontlines-Topic review. *Scandinavian J of immunol*, 53(6), 529-532.

Pavlik I, Horvathova A, Dvorska L, Barti J, Svastova P, du Maine R, Rychlik I. 1999. Standardisation of restriction fragment length polymorphism analysis for

Mycobacterium avium subspecies *paratuberculosis*. J Microbiol Methods, 38:155-167.

Pavlik I, Bartl J, Dvorska L, Svastova P, du Maine R, Machackova M, Yayo Ayele W, Horvathova A. 2000. Epidemiology of paratuberculosis in wild ruminants studied by restriction fragment length polymorphism in the Czech Republic during the period 1995–1998. Vet Microbiol, 77:231–251.

Pérez V, García MJF, Badiola JJ. 1996. Description and classification of different types of lesion associated with natural paratuberculosis infection in sheep. J Comp Pathol, 114 (2), 107-122.

Pfaffl MW. 2007. Relative quantification. In Real-time PCR. Taylor & Francis Group, 1st Ed. pp. 89-108, eBook ISBN 9780203967317.

Pigoli C, Garbarino C, Ricchi M, Bonacina E, Gibelli L, Grieco V, Scaltriti E, Roccabianca P, Sironi G, Russo S, Pongolini S, Arrigoni N. 2020. Paratuberculosis in Captive Scimitar-Horned Oryxes (*Oryx dammah*). Animals, 10 (11):1949.

Plattner BL, Huffman E, Jones DE, Hostetter JM. 2014. T lymphocyte responses during early enteric *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection in cattle. Vet Immunol Immunopathol, 157:12–19.

Pooley HB, Begg DJ, Plain KM, Whittington RJ, Purdie AC, de Silva K. 2019. The humoral immune response is essential for successful vaccine protection against paratuberculosis in sheep. BMC Vet Res, Jul 2;15(1):223.

Purdie AC, Plain KM, Begg DJ, De Silva K, Whittington RJ. 2012. Expression of genes associated with the antigen presentation and processing pathway reconsistently regulated in early *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection. Comp Immunol Microbiol Infect Dis, 35:151–162.

Purdie AC, Plain KM, Pooley H, Begg DJ, De Silva K, Whittington RJ. 2022. Correlates of vaccine protection against *Mycobacterium avium* sub-species *paratuberculosis* infection revealed in a transcriptomic study of responses in Gudair® vaccinated sheep. Front Vet Sci, 9, 1004237.

Quinn PJ, Markey BK, Carter ME. 2002. Microbiología y enfermedades infecciosas veterinarias. Acribia, Zaragoza, pp:115-124.

Quirke P. 2001. *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* is a cause of Crohn. Gut BMJ, 49(6), 757—760.

Reddacliff L, Eppleston J, Windsor P, Whittington R, Jones S. 2006. Efficacy of a killed vaccine for the control of paratuberculosis in Australian sheep. Vet Microbiol, 115(1-3):77-90.

Radostits OM, Gay CC, Hinchcliff KW, Constable PD. Text book of veterinary Medicine. 11 ed; 2017. 1017-44.

Ramakrishnan L. 2012. Revisiting the role of the granuloma in tuberculosis. Nat Rev Immunol 20:12(5):352-66.

Rothel J, Jones S, Corner L, Cox J, Wood P. 1990. A sandwich enzyme immunoassay for bovine interferon- γ and its use for the detection of tuberculosis in cattle. Aust Vet J, 67:134–137.

Rue-Albrecht K, Magee DA, Killick E, Nalpas NC, Gordon SV, MacHugh DE. 2014. Comparative functional genomics and the bovine macrophage response to strains of the *Mycobacterium* genus. Frontier in immunol, vol 5, 1-14.

Ruiz-Larrañaga O, Garrido JM, Iriando M, Manzano C, Molina E, Koets AP, Rutten VP, Juste RA, Esteban A. 2010. Genetic association between bovine NOD2

polymorphisms and infection by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Holstein-Friesian cattle. *Anim Genet*, 41:652-655.

Runyon EH. 1970. Identification of mycobacterial pathogens utilizing colony characteristics. *Am J Clin Path*, 54:578-586.

Roupie V, Viart S, Leroy B, Romano M, Trinchero N, Govaerts M, Huygen K. 2012. Immunogenicity of eight *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* specific antigens in DNA vaccinated and Map infected mice. *Vet immunol and immunopathol*, 145(1-2), 74-85.

Roussey J A, Steibel JP, Coussens PM. 2014. Regulatory T Cell Activity and Signs of T Cell Unresponsiveness in Bovine Paratuberculosis. *Front Vet Sci*, 21:1.

Santema W, Rutten V, Koets A. 2011. Bovine paratuberculosis: recent advances in vaccine development. *Vet Quart*, 31(4), 183-191.

Schonenbrücher H, Abdulmawjood A, Failing K, Bulte M. 2008. New triplex real-time assay for detection of *Mycobacterium* subsp. *Avium paratuberculosis* in bovine feces. *Appl Environ Microbiol*, May; 74(9): 2751–2758.

Scheinin T, Tran Minh NN, Tuomi T, Miettinen A, Kontiainen S. 1996. Islet cell and glutamic acid decarboxylase antibodies and heat-shock protein 65 responses in children with newly diagnosed insulin-dependent diabetes mellitus. *Immunol Lett*, 49(1–2):123–6.

Sechi LA, Dow CT. 2015. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* Zoonosis the Hundred Year War -Beyond Crohn's Disease. *Front Immunol*, 6, 96.

Sherman DM, Gay JM, Bouley DS, Nelson GH. 1990. Comparison of the complement-fixation and agar gel immunodiffusion tests for diagnosis of subclinical

bovine paratuberculosis. *Ame J Vet Res*, Mar 1; 51(3):461-5.

Shu D, Subharat S, Wedlock DN, Luo D, de Lisle GW, Buddle BM. 2011. Diverse cytokine profile from mesenteric lymph node cells of cull cows severely affected with Johne's disease. *Clin Vaccine Immunol*, 18:1467–1476.

Shu DS, Wedlock DN, Luo D, de Lisle GW, Buddle BM. 2011. Diverse Cytokine Profile from Mesenteric Lymph Node Cells of Cull Cows Severely Affected with Johne's Disease. *Clin Vaccine Immunol*, 18.

Singh SV, Gupta S, Chaubey KK, Kumar N, Rawat KD, Tiwari R, Dhama K. 2014. Dose standardization studies of 'indigenous vaccine' for the control of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in naturally infected goats. *Adv Anim Vet Sci*, 2:17–22.

Slütter B, Jis koot W. 2016. Sizing the optimal dimensions of a vaccine delivery system: a particulate matter. *Expert opinion on drug delivery*, 13(2), 167-170.

Socket DC, Conrad TA, Thomas CB, Collins MT. 1992. Evaluation of four serological tests for bovine paratuberculosis. *J Clin Microbiol*, 30 (5).

Sohal JS, Arsenault J, Leboeuf A, Hélie P, Buczinski S, Robinson Y, Labrecque O, Lachapelle V, Fecteau G, L'Homme Y. 2019. Molecular characterization of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* C-type and S-type isolated from sheep and goats by using a combination of MIRU-VNTR loci. *Can J Vet Res*, 83(3):160-167.

Strommenger B, Stevenson K, Gerlach GF. 2001. Isolation and diagnostic potential of ISMav2, a novel insertion sequence-like element from *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *FEMS Microbiol Lett*, 196, 31– 37.

Stabel JR. 2000. Cytokine secretion by peripheral blood mononuclear cells from cows infected with *Mycobacterium paratuberculosis*. *A J Vet Res*, 61(7), 754-760.

Stabel JR. 2000b. Transitions in immune responses to *Mycobacterium paratuberculosis*. *Vet Microbiol*, 77 (3–4), 465-473.

Stabel JR, Whitlock RH. 2001. An evaluation of a modified interferon – gamma assay for the detection of paratuberculosis in dairy herds. *Vet Immunol Immunopathol*, 79:69–81.

Stabel JR, Bannantine JP. 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 JR, Bannantine JP, Eda S, Robbe-Austerman S. 2011. Induction of B cell responses upon experimental infection of neonatal calves with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Clin Vaccine Immunol*, 18:1139–1149.

Stabel JR, Bannantine JP. 2019. Divergent Antigen-Specific Cellular Immune Responses during Asymptomatic Subclinical and Clinical States of Disease in Cows Naturally Infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Infection and immunity*, 88(1), e00650-19.

Stassen M, Fondel S, Bopp T, Richter C, Müller C, Kubach J, Jonuleit H. 2004. Human CD25+ regulatory T cells: two subsets defined by the integrins $\alpha 4\beta 7$ or $\alpha 4\beta 1$ confer distinct suppressive properties upon CD4+ T helper cells. *European J immunol*, 34(5), 1303-1311.

Steel RG, Torrie JH. 1996. Bioestadística: principios y procedimientos. México: McGraw Hill. 622 p.

Stevenson K, Hughes VM, de Juan L, Inglis NF, Wright F, Sharp JM. 2002. Molecular characterization of pigmented and nonpigmented isolates of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. J Clin Microbiol, 40:1798–804.

Stevenson K, Alvarez J, Bakker D, Biet F, de Juan L, Denham S, Dimareli Z, Dohmann K, Gerlach GF, Heron I, Kopečna M, May L, Pavlik I, Sharp JM, Thibault VC, Willemsen P, Zadoks RN, 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.

Stevenson K. 2010. Comparative Differences between Strains of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, in Collins, M. T. and Behr, M. A. (eds) Paratuberculosis Organism, Disease, Control. 2nd ed. International, Oxfordshire, UK., pp. 126–137.

Stevenson K. 2015. Genetic diversity of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* and the influence of strain type on infection and pathogenesis: a review. Vet Res, 46, 64.

Stief B, Möbius P, Türk H, Hörügel U, Arnold C, Pöhle D. 2012. Paratuberculosis in a miniature donkey (*Equus asinus f. asinus*). Berliner und Munchener tierärztliche Wochenschrift, 125: 1-2, 38-44.

Swathi D, Saranya S, Raja A, Vijayarani K, Kumanan K. 2020. In silico prediction of the epitopes for the immunogenic proteins present in *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. Indian J A Sci, 90. 156-160.

Sweeney RW.1996. Transmission of Paratuberculosis. Vet Clin North Am Food Anim Pract, 12, 305-312.

Sweeney RW, Whitlock RH, McAdams SC. 2006. Comparison of three DNA

preparation methods for real-time polymerase chain reaction confirmation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* growth in an automated broth culture system. J Vet Diagn Invest,18(6), 587-590.

Sweeney RW. 2011. Pathogenesis of paratuberculosis. Vet Clin North Am Food Anim Pract 27:537–546.

Talaat A, Chia WW, Murray EH. (2020). 16. Experimental Small Animal Models of Paratuberculosis. in Paratuberculosis: Organism, Disease, Control, 213-247. 2nd Edition, Edited by Berh MA, Stevenson K, Kapur V. CAB International Publishing, Boston USA.

Thirunavukkarasu S, de Silva K, Whittington RJ, Plain KM. 2013. In vivo and in vitro expression pattern of Toll-like receptors in *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection. Vet Immunol Immunopathol, Nov 15;156(1-2):20-31.

Thorel MF, Krichevsky M, Lévy-Frébault VV. 1990. Numerical taxonomy of mycobactin-dependent mycobacteria, emended description of *Mycobacterium avium*, and description of *Mycobacterium avium* subsp. *avium* subsp. nov., *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* subsp. nov., and *Mycobacterium avium* subsp. *silvaticum* subsp. nov. Int J Syst Bacteriol, 40, 254-60.

Triccas JA, Roche PW, Winter N, Feng CG, Butlin CR, Britton WJ. 1996. A 35-kilodalton protein is a major target of the human immune response to *Mycobacterium leprae*. Infect and immun, 64(12), 5171-5177.

Triccas JA, Winter N, Roche PW, Gilpin A, Kendrick KE, Britton WJ. 1998. Molecular and immunological analyses of the *Mycobacterium avium* homolog of the immunodominant *Mycobacterium leprae* 35-kilodalton protein. Infect Immun, Jun;66(6):2684-90.

Triccas JA, Winter N, Roche PW. 1998. Molecular and immunological analysis of the *Mycobacterium avium* homolog of the immunodominant *Mycobacterium leprae* 35-kDa protein. *Infect Immun*, 66, 2684–2690.

Turenne CY, Alexander DC. 2010. *Mycobacterium avium* Complex. *Paratuberculosis: Organism, Disease, Control.*, Ed. Behr MA, Collins DM, CAB International, Reino Unido, 60-73.

Urdahl KB, Shafiani S, Ernst JD. 2011. Initiation and regulation of T-cell responses in tuberculosis. *Mucosal Immunol*, 4: 288–293.

Vallee H, Rinjard P: Etudes sur l'enterite paratuberculeuse des bovides (note preliminaire). *Rev Gen Med Vet*, 1926, 35:1-9.

Vary PH, Andersen PR, Green E, Hermon-Taylor J, Mcfadden JJ. 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.

Vázquez P, Garrido JM, Juste RA. 2013. Specific antibody and interferon gamma responses associated with immunopathological forms of bovine paratuberculosis in slaughtered friesland cattle. *PLoS One*, 8:e64568.

Veerasami M, Moorthy L, Das D, Parthasarathy S, Chandran D, Lingala R, Srinivasan VA. 2011. Assessment of critical parameters in blood processing for the bovine interferon-gamma ELISPOT assay to detect *Mycobacterium bovis* infected cattle in India. *Vet Ital*, 47:25–34.

Verin R, Perroni M, Rossi G, De Grossi L, Botta R, De Sanctis B, Rocca S, Cubeddu T, Crosby-Durrani H, Taccini E. 2016. Paratuberculosis in sheep: Histochemical, immunohistochemical and in situ hybridization evidence of in utero and milk transmission. *Res Vet Sci*, 106:173–9.

Wagner B, Freer H. 2009. Development of a bead-based multiplex assay for simultaneous quantification of cytokines in horses. *Vet Immunol Immunopathol*, 127: 242–248.

Waters WR, Stabel JR, Sacco RE, Harp JA, Pesch BA, Wannemuehler MJ. 1999. Antigen-specific B-cell unresponsiveness induced by chronic *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* infection of cattle. *Infect Immun*, 67 pp. 1593-1598.

Waters WR, Miller JM, Palmer MV, Stabel JR, Jones DE, Koistinen KA, Steadham EM, Hamilton MJ, Davis WC, Bannantine JP. 2003. Early induction of humoral and cellular immune responses during experimental *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection of calves. *Infect Immun*, 71:5130–5138.

Wayne LG, Kubica GP. 1986. The mycobacteria. In: Sneath P H A, Mair N S, Sharpe M E, Holt J G, editors. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Vol. 2. Baltimore, Md: The Williams & Wilkins Co.; pp. 1435–1457.

Weiss DJ, Evanson OA, Souza CD. 2005. Aumento de la expresión de interleucina-10 y supresor de la señalización de citocinas-3 asociado con la susceptibilidad a la enfermedad de Johne. *Soy J Vet Res*, 66:1114–20.

Whittington RJ, Hope AF, Marshall DJ, Taragel CA, Marsh I. 2000. 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 RJ, Marsh IB, Whitlock RH. 2001. Typing of IS1311 polymorphisms confirms that bison (*Bison bison*) with paratuberculosis in Montana are infected with a strain of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* distinct from that occurring in cattle and other domesticated livestock. *Mol Cell Probes*, 15,139-145.

Whittington RJ, Windsor PA. 2009. In utero infection of cattle with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: A critical review and meta-analysis. *Vet J*, 179:1, 60-69.

Whittington RJ, Begg DJ, de Silva K, Plain KM, Purdie AC. 2012. Comparative immunological and microbiological aspects of paratuberculosis as a model mycobacterial infection. *Vet immunol immunopathol*, Jul 15;148(1-2):29-47.

Whittington Richard, Karsten Donat, Maarten F. Weber, David Kelton, Søren Saxmose Nielsen, Suzanne Eisenberg, Norma Arrigoni, Ramon Juste, Jose Luis Sáez, Navneet Dhand, Annalisa Santi, Anita Michel, Herman Barkema, Petr Kralik, Polychronis Kostoulas, Lorna Citer, Frank Griffin, Rob Barwell, Maria Aparecida Scatamburlo Moreira, Iva Slana, Heike Koehler, Shoor Vir Singh, Han Sang Yoo, Gilberto Chávez-Gris, Amador Goodridge, Matjaz Ocepek, Joseba Garrido, Karen Stevenson, Mike Collins, Bernardo Alonso, Karina Cirone, Fernando Paolicchi, Lawrence Gavey, Md Tanvir Rahman, Emmanuelle de Marchin, Willem Van Praet, Cathy Bauman, Gilles Fecteau, Shawn McKenna, Miguel Salgado, Jorge Fernández-Silva, Radka Dziedzinska, Gustavo Echeverría, Jaana Seppänen, Virginie Thibault, Vala Fridriksdottir, Abdolah Derakhshandeh, Masoud Haghighi, Luigi Ruocco, Satoko Kawaji, Eiichi Momotani, Cord Heuer, Solis Norton, Simeon Cadmus, Angelika Agdestein, Annette Kampen, Joanna Szteyn, Jenny Frössling, Ebba Schwan, George Caldow, Sam Strain, Mike Carter, Scott Wells, Musso Munyeme, Robert Wolf, Ratna Gurung, Cristobal Verdugo, Christine Fourichon, Takehisa Yamamoto, Sharada Thapaliya, Elena Di Labio, Monaya Ekgatat, Andres Gil, Alvaro Nuñez Alesandre, José Piaggio, Alejandra Suanes and Jacobus H. de Waard. 2019. Control of paratuberculosis: who, why and how. A review of 48 countries. *BMC Vet Research*, 15:198 (1-29).

Windsor PA, Bush R, Links I, Eppleston J. 2005. Injury caused by self-inoculation with a vaccine of a Freund's complete adjuvant nature (Gudair) used for control of ovine paratuberculosis. *Aust Vet J*, 83:216–220.

Winter N, Triccas JA, Rivoire B, Pessolani MC, Eiglmeier K, Lim EM, Hunter SW, Brennan PJ, Britton WJ. 1995. Characterization of the gene encoding the immunodominant 35 kDa protein of *Mycobacterium leprae*. Mol Microbiol, Jun;16(5):865-76.

Yadav D, Singh SV, Singh AV, Sevilla I, Juste RA, Singh PK, *et al.* 2007. Pathogenic “Bison-type” *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* genotype characterized from riverine buffalo (*Bubalus bubalis*) in North India. Comp Immunol Microbiol Infect Dis, 31:373–87.

Yokomizo Y, Yugi H, Merkal RS. 1985. A method of avoiding false-positive reactions in an enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for the diagnosis of bovine paratuberculosis. J Vet Sci, 47:11-19.

Zhao B, Collins MT, Czuprynski CJ. 1997. Effects of gamma interferon and nitric oxide on the interaction of *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* with bovine monocytes. Infect Immun, 65:1761-1766.