



UBA
Universidad de Buenos Aires



Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Veterinarias
Cátedra de Inmunología

Tesis Doctoral

“Respuesta inmune humoral inducida
por proteínas de *Mycobacterium avium*
subsp. *paratuberculosis* en bovinos”

Tesista

Vet. Bárbara Fernández

Directora

Dra. Silvia Leonor Mundo

11 de Julio de 2016

Agradecimientos

A la Facultad de Ciencias Veterinarias, a la Universidad de Buenos Aires y al CONICET, por brindarme la posibilidad de realizar este sueño, de crecer profesionalmente.

A Silvia, por confiar en mí y en mi capacidad de trabajo, por enseñarme a analizar y discutir cada resultado, y a ser crítica, por transmitirme su pasión al trabajo de investigación y hacia las micobacterias, y por apoyarme siempre.

A Silvita, por enseñarme a dar los primeros pasos en el laboratorio, por llevarme al campo para inmunizar bovinos, por apoyarme y ayudarme con su amistad y sabiduría a superar momentos de flaqueza.

A las inmunitas paratuberculosas (Anitas, Lauritas y Gise) por darme su amistad, por compartir tantas horas de trabajo y estudio, tantos medios, bacterias, placas, sueros, así como también frustraciones y logros, por sus consejos y por ayudarme a crecer personal y profesionalmente. Por ser mi sustento y centro de apoyo en el trabajo.

A Ana Jar, por ayudarme a resolver problemas de último momento y por enseñarme tanto.

A Lili, por ayudarme con las PCRs y por compartir muestras biológicas, viajes y conocimientos.

A Eloy, por ayudarnos en el trabajo con bovinos y a conformar un lindo y mejor grupo de investigación.

A Fernando, por su buena predisposición para responder cada una de mis preguntas y por las bacterias.

A Lucas, por bancarme con las clases para terminar de escribir.

Al resto de mis compañeros docentes y no docentes de inmuno Susi, Vivi, Marina, Liliana, Adriana, Fede, Ali, Marito y Nico.

A Jorge, por resolverme muchos problemas y hacer más simple mi trabajo con los animales.

A Lola, por trabajar juntas en la producción de INF, por brindarme tanta alegría, frescura y valorar no sólo mi trabajo sino también mi enseñanza.

A Guada, que contestar muy sencillamente cada una de mis preguntas de clínica bovina.

Con respecto al trabajo realizado con terneros, cabe resaltar que fue un experimento muy arduo, que implicó muchas horas de trabajo y sólo fue posible gracias a la colaboración de

Agradecimientos

un sinfín de personas, que sin ellas nunca hubiera sido posible llevar a cabo este experimento. Por supuesto que en primer lugar está todo el equipo de paratuberculosis de Inmuno que colaboraron en la preparación de los boxes, en el diseño del experimento, en la salud de los animales, en las sangrías, en la alimentación, en el guardado de los fardos, en la preparación de los materiales de trabajo y de la lavandina, entre tantas otras cosas. Agradezco además a Pablo Regner que nos brindó su ayuda durante los 7 meses de trabajo; a las Autoridades de la Facultad comenzando por el Decano Marcelo Miguez y siguiendo por Laura Fischman, Jorge Veksler Hess, Jorge de la Orden, Gabriel Capitelli, etc., por ayudarnos a mejorar las instalaciones de los Boxes, por ejercer una veloz gestión interna y externa con SENASA para hacer posible el movimiento de los animales. A Fede Hoffman y Sanidad Ganadera por la donación de las vacunas. A Diego, Hernán y Agostina por ayudarnos con los animales.

A mis amigos de la vida, por tratar de comprender mi trabajo y acompañarme. A Julia, mi psicóloga investigadora, por sus tantas recomendaciones.

A mi familia de sangre y política por su estímulo, apoyo, amor y colaboración. A todos mis hermosos sobrinos que llenan de alegría mi alma. A mi abuelo por sus buenos deseos en mi vida profesional y personal. A mis hermanas por apoyarme, acompañarme y ayudarme en cada paso que doy en la vida. A mi papá por transmitirme el amor a la biología, a la veterinaria y al trabajo en el laboratorio, y por enseñarme a esforzarme y a trabajar muy muy duro. A mi mamá, la mujer más maravillosa, quien desde chica con sus largas charlas me estimuló a esforzarme y tener una vida profesional, y quien es mi soporte en cada tropiezo, que me acompaña y me ayuda en todo momento.

A Javier, mi gran compañero, mi cable a tierra, por aguantar mis locuras, mis corridas de sábados, domingos, 24 de Diciembre con 40°C para ver a los terneros o terminar experimentos. Por incentivar me y acompañarme en este largo camino.

A Zoe, la luz de mis ojos, mi fuente de energía, mi bella y pequeña hormiguita deambuladora que da sentido a mis días y a mi vida.

Parte de los resultados que se describen en el presente trabajo de Tesis Doctoral han sido publicados en revistas científicas:

✓ Fernández, B., Jolly, A., Colavecchia, S., Fernández, E., Mundo, S. 2011. Efecto de la infección de *Mycobacterium avium paratuberculosis* en la producción de anticuerpos bovinos. *Investigación Veterinaria (InVet)*. Vol. 13, Nº 1, Octubre 2011.

✓ Fernández B., Gilardoni L. R., Jolly A., Colavecchia S. B., Paolicchi F. A., Mundo S. L. 2012. Detection of Bovine IgG Isotypes in a PPA-ELISA for Johne's Disease Diagnosis in Infected Herds. *Veterinary Medicine International*. Vol. 2012. Article ID 145318, 6 pages. doi:10.1155/2012/145318.

Declaro que el material incluido en esta tesis es, a mi mejor saber y entender, original producto de mi propio trabajo (salvo en la medida en que se identifique explícitamente las contribuciones de otros), y que este material no lo he presentado, en forma parcial o total, como una tesis en ésta u otra institución.

Bárbara Fernández.

Índice

<i>Abreviaturas</i>	1
<i>Resumen</i>	5
<i>Abstract</i>	9
<i>Introducción</i>	12
La paratuberculosis	17
Historia de la paratuberculosis.....	19
Agente etiológico	20
Inmunopatogenia	23
Epidemiología	28
Animales susceptibles.....	28
Fuente de infección.....	28
Transmisión.....	29
Diagnóstico.....	30
Anamnesis y diagnóstico clínico.....	31
Diagnóstico histopatológico.....	32
Diagnóstico etiológico.....	33
Cultivo.....	33
Técnicas moleculares.....	35
Diagnóstico inmunológico.....	36
Evaluación de la respuesta inmune celular.....	36
Serología.....	37
Prevalencia.....	39
Control de la paratuberculosis	42
Impacto de <i>Map</i> en la Salud Pública	46
Impacto económico	47
Importancia de la especie bovina y del control de la paratuberculosis en la Argentina	48
Respuesta Inmune Humoral en Bovinos	49
Receptores para los Ac.....	53
Composición antigénica de <i>Map</i>	56

<i>Hipótesis y Objetivos</i>	59
Hipótesis	59
Objetivos	60
<i>Materiales y Métodos</i>	61
Producción de reactivos	61
Obtención de <i>stocks</i> de micobacterias	61
Producción de proteínas recombinantes.....	62
Animales y muestras	66
Caracterización de los animales	66
Procedencia	66
Signos clínicos.....	66
Diagnóstico serológico	67
Aislamiento e identificación de <i>Map</i>	67
Grupos de bovinos	69
Objetivo I: Identificar el efecto de la infección con <i>Map</i> sobre los niveles de anticuerpos totales en muestras de suero y materia fecal de bovinos en distintos estadios de la patología	70
Objetivo II: Estudiar la respuesta inmune humoral específica frente a <i>Map</i> y sus proteínas en bovinos naturalmente infectados distintos estadios de la paratuberculosis	73
Objetivo IIa: Determinar los niveles de los isotipos de inmunoglobulinas específicos frente a <i>Map</i> y Hsp65r en bovinos	73
Construcción de curvas patrones	73
Evaluación de los niveles de isotipos de Igs específicos frente a <i>Map</i>	75
Evaluación de los niveles de Acs específicos frente a Hsp65r	77
Objetivo IIb: Analizar el uso de la técnica de ELISA de isotipos de IgG específicos frente a PPA en sueros de bovinos naturalmente infectados	77
Objetivo III: Caracterizar la repuesta inmune humoral inducida por la infección experimental con aislamientos locales de <i>Map</i> en terneros	79
Animales	79
Infección	79
Manejo de los animales	81
Muestras y estudios.....	81
Evaluación clínica	82
Cultivo de muestras de MF	82

Inducción de la respuesta inmune celular	82
Cinética de producción de INF γ específico	82
Intradermorreacción	82
Cinética de respuesta inmune humoral sistémica	83
Objetivo IV: Evaluar el efecto de los anticuerpos bovinos específicos frente a <i>Map</i> y sus proteínas, sobre la viabilidad bacteriana intracelular en un modelo de infección de macrófagos bovinos <i>in vitro</i>	84
Anticuerpos	84
Caracterización de los sueros	84
Purificación de los anticuerpos	85
Purificación de anticuerpos por precipitación salina	85
Purificación de anticuerpos por afinidad a proteína G	85
Estudio de la funcionalidad de los anticuerpos purificados	86
Pre-tratamiento de <i>Map</i> con Acs purificados	86
Evaluación de la viabilidad intracelular de <i>Map</i> en macrófagos bovinos	86
Bloqueo del efecto de los Acs en la viabilidad intracelular de <i>Map</i>	87
Análisis Estadístico	88
Capítulo I	89
Resultados	89
Discusión	93
Conclusiones	94
Capítulo II	95
Resultados	95
Niveles de isotipos de inmunoglobulinas específicos frente a <i>Map</i> y Hsp65r en bovinos	95
Desarrollo de reactivos	95
Producción de IgG3r	95
Producción de Hsp65r	96
Niveles de los isotipos de inmunoglobulinas específicos a <i>Map</i>	97
Animales	97
Niveles de IgM <i>Map</i> -específica	98
Concentración de IgA <i>Map</i> -específica	99
Niveles de IgG <i>Map</i> -específica	100
Concentraciones de IgG1, IgG2 e IgG3 <i>Map</i> -específicas	101
Niveles de anticuerpos específicos frente a Hsp65r	103

Índice

Animales	104
Acs específicos a Hsp65r	105
El uso de la técnica de ELISA de isotipos de IgG específicos frente a PPA en sueros de bovinos naturalmente infectados.....	106
Discusión	110
Conclusiones.....	118
<i>Capítulo III.....</i>	<i>119</i>
Resultados.....	119
Desarrollo de reactivos	119
Producción de p34r	119
Infección	120
Evaluación clínica.....	121
Excreción de <i>Map</i> por MF.....	121
Inducción de respuesta inmune celular	122
Cinética de producción de INF γ específico.....	122
Intradermorreacción	123
Cinética de respuesta inmune humoral	125
Reactividad frente a <i>Map</i>	125
Reactividad frente a PPA	127
Reactividad frente a Hsp65r	129
Reactividad frente a p34r	131
Discusión	134
Conclusiones.....	142
<i>Capítulo IV.....</i>	<i>143</i>
Resultados.....	143
Anticuerpos.....	143
Caracterización de los sueros	143
Purificación de los anticuerpos.....	144
Purificación de los anticuerpos por precipitación salina	145
Purificación de los anticuerpos por afinidad a la proteína G.....	145
Estudio de la funcionalidad de los anticuerpos purificados.....	146
Discusión	149
Conclusiones.....	151
<i>Discusión General.....</i>	<i>152</i>

<i>Conclusiones Generales</i>	155
<i>Bibliografía</i>	157
<i>Anexos</i>	179
Anexo Técnico	179
A- Producción de proteínas recombinantes	179
B- ELISA-PPA.....	180
C- Cultivos de muestras de materia fecal	181
D- Captación de <i>Map</i> a partir de muestras de leche	182
E- IS900 PCR.....	182
F- Metodología para pre-adsorber sueros con <i>E. coli</i>	183
G- Evaluación de la producción INF γ por células periféricas	183
H- Purificación de anticuerpos	184
I- Evaluación del papel de anticuerpos específicos en la viabilidad intracelular de <i>Map</i> en macrófagos bovinos	185
Anexo Estadístico	186
Capítulo I: Efecto de la infección por <i>Map</i> en los niveles de anticuerpos totales en muestras de suero y MF de bovinos en distintos estadios de la patología	186
Capítulo II: Respuesta inmune humoral específica frente a <i>Map</i> y sus proteínas, en bovinos naturalmente infectados en distintos estadios de la patología	188
Niveles de isotipos de inmunoglobulinas específicos frente a <i>Map</i> en muestras de suero y materia fecal	188
Niveles de anticuerpos específicos frente a Hsp65r	194
El uso de la técnica de ELISA de isotipos de IgG específicos frente a PPA en sueros de bovinos naturalmente infectados.....	194
Capítulo III: Respuesta inmune humoral inducida por la infección experimental con aislamientos locales de <i>Map</i> en terneros	198
Capítulo IV: Efecto de anticuerpos bovinos específicos sobre la viabilidad intracelular de <i>Map</i> en un modelo de infección de macrófagos bovinos <i>in vitro</i>	229

Abreviaturas

ABC: área bajo la curva ROC

Acs: anticuerpos

ANOVA: Análisis de Varianza

BCG: *Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guérin*

C: cepa de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* tipo bovino (cattle)

CCDA: citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos

CDRH3: regiones determinantes de complementariedad de la cadena pesada 3

cgL: células gigantes de tipo Langhans

CH: región o dominio constante de la cadena pesada

CH2: región o dominio constante 2 de la cadena pesada

DE: desvío estándar

DO: densidad óptica

DO_{600nm}: densidad óptica analizada a 600nm de longitud de onda.

Fc: fracción cristalizable de los anticuerpos

Fm: factor de dilución de la muestra

g: gramo

γ-globulinas: gamma-globulinas

h: hora

HPC: cloruro de hexadecilpiridinio

HRP: peroxidasa

Hsp: proteínas de shock térmico

Hsp65: proteína de shock térmico de 65 kDa de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*

Hsp65r: proteína de shock térmico de 65 kDa de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* recombinante

Hsp70: proteína de shock térmico de 70 kDa de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*

IDR: intradermorreacción

Ig: inmunoglobulinas

IgG3r: IgG3 bovina recombinante
IL1: interleuquina 1
IL6: interleuquina 6
IL10: interleuquina 10
IL17: interleuquina 17
INF γ : interferón *gamma*
INTA: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria
IPTG: isopropil-beta-D-tiogalactopranósido
ITAM: secuencias de activación
ITIM: secuencias de inhibición
kDa: kilodalton
L: litro
LAM: lipoarabinomanano
LB: Linfocito B
LB: medio de cultivo Luría-Bertani
LT: Linfocito T
LTc: Linfocitos T citotóxicos
LT $\gamma\delta$: Linfocitos T gamma delta
LTh1: Linfocitos T helper 1
LTh17: Linfocitos T helper 17
LTreg: Linfocitos T reguladores
Ma: *Mycobacterium avium*
Maa: *Mycobacterium avium* subsp. *avium*
Mah: *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis*
MALT: sistema inmune asociado a mucosas
Map: *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*
Mas: *Mycobacterium avium* subsp. *silvaticum*
MF: materia fecal
 μ g: microgramo
mg: miligramo
min: minutos

- MIRU-VNTR: análisis de locus múltiples; mycobacterial interspersed repetitive units (MIRU), variable number of tandem repeats (VNTR)
- μL: microlitro
- mL: mililitro
- MOI: multiplicidad de infección
- NAHMS: Servicio Nacional de Monitoreo de Sanidad Animal de los Estados Unidos (National Animal Health Monitoring System)
- NK: células natural killer o asesinas naturales
- OPD: ortophenilendiamina
- p34r: proteína p34 carboxi-terminal de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* recombinante
- pb: pares de bases
- PFGE: electroforesis en gel bajo campo pulsado
- PPA: antígeno protoplasmático de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*
- PPD: derivad proteico purificado
- PPDa: derivad proteico purificado de *Mycobacterium avium* subsp *avium*
- PPDb derivad proteico purificado de *Mycobacterium bovis*
- PPDp: derivad proteico purificado de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*
- PRR: receptores de reconocimientos de patrones moleculares asociados a patógenos
- REA: análisis de restricción enzimática
- RFc: receptor para la fracción cristalizable de los anticuerpos
- RFcn: receptor para Fc neonatal
- RFLP: polimorfismo de los fragmentos de restricción
- ROC: Receiver-operating characteristic
- RpIg: receptor de poli-Ig
- rpm: revoluciones por minuto
- S: cepa de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* tipo ovino (sheep)
- SDS-PAGE: Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes
- Seg: segundos
- SENASA: Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria
- SFB: suero fetal bovino
- sMF: sobrenadante de muestra de materia fecal

TGF β : factor de crecimiento transformante β

TLR: receptor de tipo Toll

TLR2: receptor de tipo Toll 2

TLR4: receptor de tipo Toll 4

TNF α : factor de necrosis tumoral *alpha*

UFC: unidades formadoras de colonias

VC: valor de corte

VCsosp: VC de sospechosos

Vol.: volumen

Resumen

La paratuberculosis, causada por el *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (*Map*), es una patología crónica intestinal que afecta a rumiantes. El diagnóstico es engorroso y permite identificar principalmente a los bovinos en estadios avanzados (clínico).

El objetivo general del trabajo fue caracterizar los anticuerpos bovinos totales y específicos frente a *Map* y sus proteínas, e identificar su efecto en la viabilidad bacteriana. Los objetivos particulares fueron:

- Identificar el efecto de la infección con *Map* en los niveles de anticuerpos totales.
- Caracterizar la respuesta inmune humoral específica frente a *Map* y sus proteínas en bovinos infectados de manera natural y experimental.
- Evaluar el efecto de anticuerpos bovinos específicos frente a *Map* y sus proteínas, sobre la viabilidad bacteriana intracelular.

Los anticuerpos bovinos se estudiaron por la metodología de ELISA (niveles) y mediante un modelo de infección de macrófagos *in vitro* (funcionalidad).

Se evaluaron un total de 120 animales. Los grupos de bovinos analizados difirieron según los experimentos, pero en general fueron: infectados naturalmente en estadio subclínico, clínico y terminal, infectados experimentalmente, expuestos, inmunizados con proteínas específicas de *Map* y controles sanos.

Se demostró que:

- ❖ La paratuberculosis afecta los niveles de anticuerpos totales en muestras de suero y materia fecal, según el estadio. Los bovinos con paratuberculosis clínica presentan incrementos en los niveles de IgM sérica, así como de IgM, IgG e IgA a nivel local.
- ❖ El estudio del isotipo IgG2 específico frente a la bacteria entera o al antígeno protoplasmático de *Map* (PPA) mejora la identificación de bovinos infectados en estadio subclínico (sensibilidad de IgG2 e IgG/ELISA-PPA del 54% y del 23%, respectivamente).
- ❖ El isotipo IgG2 aparece de manera temprana en la infección experimental ($p=0,013$, a los 60 días postinfección).

❖ Los anticuerpos específicos frente a la proteína p34 inhiben la viabilidad intracelular de *Map* en el modelo de infección de macrófagos bovinos *in vitro* utilizado.

Estos resultados impactan sobre las metodologías diagnósticas utilizadas en la actualidad y revalorizan el papel de los anticuerpos específicos frente a p34. Este hallazgo justifica la continuación de su análisis en modelos de infección y protección en la especie bovina.

Resumen extendido

La paratuberculosis o enfermedad de Johne, causada por el *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (*Map*), es una patología crónica intestinal que afecta a rumiantes y que genera una pérdida económica anual en la Argentina de entre US\$ 14,3 y 23,3 millones. Además, se relaciona a *Map* con la enfermedad de Crohn que afecta al ser humano.

La principal vía de ingreso del patógeno es la oral a través de calostro, leche o materia fecal (MF) contaminados. Los terneros neonatos representan la categoría más susceptible a la infección. Estos animales atraviesan un prolongado estadio subclínico en el que se describe el predominio de respuesta celular o perfil Th1. Luego de varios años de incubación y sólo en algunos animales, la patología avanza hacia el estadio clínico, que se caracteriza por un predominio de la respuesta inmune humoral o perfil Th2.

La respuesta inmune celular se considera fundamental para el control de la paratuberculosis. Sin embargo, se cuestiona si la inmunidad celular sola es suficiente para proteger al huésped de la infección o es la causante de la patología y signología clínica. Por otro lado, varios investigadores proponen que los anticuerpos (Acs) juegan un papel importante en la respuesta inmune frente a *Map*.

Dadas las características enunciadas, el diagnóstico de la patología es engorroso y representa un desafío para los veterinarios. Los métodos disponibles permiten identificar principalmente a los bovinos en estadios clínicos. Estos animales presentan los signos clásicos de la enfermedad: diarrea crónica, pérdida de peso, edema submandibular y disminución en la producción láctea. Además, eliminan altas cantidades de *Map* por MF y presentan altos niveles de Acs específicos. Mientras que, los bovinos en estadios tempranos son los más difíciles de detectar debido a que no manifiestan signos clínicos, excretan bajos niveles de *Map* y de manera intermitente, y también presentan bajos niveles de Acs específicos. La identificación de estos últimos resulta fundamental para el control de los rodeos dado que conforman la mayoría de los animales.

El objetivo del trabajo fue ampliar el conocimiento de la respuesta inmune humoral específica frente a *Map* y sus proteínas en bovinos infectados de manera natural y experimental e inmunizados.

Los bovinos estudiados en el presente trabajo, se clasificaron en distintos grupos según: la procedencia de rodeos con o sin paratuberculosis, la presencia de signos clínicos, el diagnóstico serológico (usando el antígeno protoplasmático de *Map*, PPA; Allied Monitor

Laboratories Inc.) y el aislamiento (mediante el cultivo de muestras de MF o la inmunocaptación de muestras de leche) y posterior identificación de *Map* (IS900 PCR; Tabla).

Grupos	Procedencia	Signos	ELISA	PCR
Controles negativos	-	-	-	-
Infectados subclínicos	+	-	- / +	+
Infectados clínicos	+	+	- / +	+

Tabla. Grupos de bovinos estudiados. Los datos están expresados como + (positivos) o - (negativos).

Durante el desarrollo de la tesis se evaluó:

❖ El efecto de la infección por *Map* en los niveles de Acs totales en muestras de suero y materia fecal de bovinos en distintos estadios de la patología

Se incorporó una clasificación adicional tomando en cuenta los niveles de proteínas totales en suero, aquellos con valores inferiores al normal, se clasificaron como “infectados terminales”. El estudio permitió evidenciar que la paratuberculosis bovina afecta los niveles de isotipos de inmunoglobulinas totales en suero y MF, según el estadio. Así, los animales en estadio clínico mostraron incrementos en los niveles de IgM en suero y de IgM, IgG e IgA a nivel local.

❖ La respuesta inmune humoral específica frente a *Map* y sus proteínas en bovinos naturalmente infectados en distintos estadios de la paratuberculosis.

Mediante el estudio de los isotipos específicos frente a *Map* (bacteria entera inactivada por calor) se detectaron incrementos en los niveles de IgG sérica en todos los bovinos infectados. Se identificó al isotipo IgG1 como responsable del aumento en los infectados clínicos mientras que los isotipos IgG2 e IgG3 estarían implicados en la respuesta humoral de los bovinos subclínicos. Asimismo, se comprobó que la detección de IgG2 específica frente a PPA mediante la técnica de ELISA mejora el diagnóstico de animales infectados con *Map* en estadio subclínico; en consecuencia, la combinación IgG2/ELISA-PPA e

IgG/ELISA-PPA permitiría incrementar la identificación de rodeos con animales en diferentes estadios de la paratuberculosis.

La proteína Hsp65 ha sido identificada como un antígeno inmunodominante en la paratuberculosis, sin embargo los datos obtenidos en el desarrollo de esta tesis mostraron un bajo número de animales infectados (11 %) que reconocen a la Hsp65 recombinante (Hsp65r). Estos resultados podrían deberse a cambios conformacionales en epitopes B ocasionados por el sistema de expresión utilizado o por la técnica empleada (ELISA).

❖ La respuesta inmune humoral inducida por la infección experimental con dos aislamientos locales de *Map* en terneros.

Los grupos de animales estudiados durante 180 días postinfección fueron: controles negativos, infectados con *Map* A e infectados con *Map* C. En los grupos infectados, se detectó un pico de excreción de *Map* a través de MF a los 60 días, luego del cual los animales resultaron negativos al cultivo. Se utilizaron las técnicas diagnósticas de inmunidad celular como la producción de INF γ por células periféricas y se identificaron altos niveles de INF γ producidos de forma espontánea. Resultados similares fueron publicados por otros autores que recomiendan no aplicar esta metodología en rumiantes jóvenes menores a 2 años. El diagnóstico serológico (ELISA-PPA que utiliza un anti-IgG) no detectó la infección en los terneros desafiados. Sin embargo, la respuesta inmune humoral fue inducida tempranamente por la infección experimental de *Map* en el modelo de terneros utilizado ya que se hallaron incrementos en los niveles de Acs específicos frente a la bacteria entera desde los 50 días postinfección; además IgG2 específico frente a *Map* fue el primer isotipo que mostró aumentos significativos en sueros de los infectados en relación a los controles.

Se evaluó también la respuesta de los terneros infectados a las proteínas Hsp65r y p34 carboxi-terminal de *Map* recombinante (p34r). Frente a estos antígenos, identificamos baja a nula respuesta (tanto celular como humoral). En el caso de la Hsp65r podría indicar que la proteína recombinante obtenida no incluye a los epitopes B y T de la Hsp65 de *Map* nativa. La evaluación de la respuesta humoral específica frente a la p34r permitió detectar sólo al grupo de terneros infectados con el aislamiento A. En general podríamos concluir que los antígenos proteicos evaluados en esta tesis no servirían para mejorar el diagnóstico.

❖ El efecto de Acs bovinos específicos frente a *Map* y sus proteínas, sobre la viabilidad bacteriana intracelular en un modelo de infección de macrófagos bovinos *in vitro*.

Se evaluó el papel de IgGs purificadas a partir de sueros de bovinos infectados clínicos, inmunizados con Hsp65r, inmunizados con la p34r y controles negativos. Nuestros resultados muestran que los Acs de bovinos inmunizados con p34r inhiben la viabilidad de *Map* en el modelo de infección utilizado.

Los resultados que se presentan en la presente tesis permiten ampliar el conocimiento de la respuesta inmune humoral de bovinos natural y experimentalmente infectados con *Map* así como de inmunizados con proteínas de *Map* recombinantes. Estos impactan sobre las metodologías diagnósticas utilizadas en la actualidad y en el desarrollo de nuevas técnicas. Se demostró que la utilización del isotipo IgG2 mejora la identificación de la categoría de animales más difícil de detectar, los infectados en estadio subclínico. La cinética de la respuesta inmune hallada en el modelo de terneros desafiados aporta para el desarrollo de próximos experimentos a realizar en el país.

Se contribuyó en el estudio del papel de los anticuerpos en la infección de la célula blanco y se evidenció que los anticuerpos específicos frente a p34r disminuyen la viabilidad bacteriana intracelular.

Mucho resta por conocer de la compleja interacción entre este patógeno y el huésped. Este trabajo demuestra que la respuesta inmune humoral es inducida por *Map* en bovinos, que su caracterización mejora el diagnóstico disponible y que los Acs cumplen un papel activo en la infección.

Abstract

Paratuberculosis is a chronic granulomatous enteritis of ruminants caused by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (*Map*). The diagnosis of paratuberculosis is difficult and the current diagnostic tests are suitable for detection of the clinical phase of the infection.

The general aim was to characterize the total and specific (to *Map* and its proteins) bovine antibodies, and to identify its role in the viability of bacteria. The especial aims were:

- To detect the effect of the *Map* infection on the levels of total antibodies.
- To characterize the specific humoral immune response to *Map* and its proteins in naturally- and experimentally-infected bovines.
- To evaluate the role of specific bovine antibodies to *Map* and its proteins in the viability of ingested bacteria.

Bovine antibodies were evaluated by ELISA (levels) and by an *in vitro* macrophages infection model (role).

A total of 120 animals were studied. The analyzed groups varied with the experiments: subclinically, clinically and terminally naturally infected, experimentally infected, exposed, immunized with specific proteins of *Map* and healthy control bovines.

Data demonstrated that:

- ❖ *Map* infection affects the total levels of antibodies in sera and feces samples of animals in the different stages of paratuberculosis: bovines with clinical signs present increased total levels of IgM in sera as well as IgM, IgG and IgA in feces.
- ❖ The study of whole *Map* or protoplasmic antigen (PPA) specific IgG2 improves the identification of subclinically infected bovines (sensitivity of 54% and 23% to IgG2 and IgG/ELISA-PPA, respectively).
- ❖ IgG2 is the first isotype that increases in sera of *Map*-experimentally infected calves (p=0,013, on 60 days postinfection).

❖ *Map* viability is decreased upon treatment with antibodies from p34r-immunized cattle in the *in vitro* macrophages infection model.

The results impact on the current diagnostic techniques and demonstrate the functional anti-bacterial role of anti-p34r antibodies. These data justify the evaluation of anti-p34r antibodies in infection and protection models

Extended Abstract

Paratuberculosis or Johne's disease is a chronic granulomatous enteritis of ruminants caused by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (*Map*). In Argentina, this disease causes an annual economic loss of US\$ 14.3 – 23.3 millions. It is hypothesized that *Map* could have a role in the pathophysiology of Crohn's disease in humans.

Calves are the most susceptible and become infected through ingestion of *Map*-contaminated colostrums, milk or feces. During subclinical infection, bovines develop a Th1 cellular immune response. After a long incubation time (years), a low proportion of infected animals evolve to a clinical phase dominated by a Th2 humoral immune response.

As a rule, the development of a cellular immune response is believed to be essential to control mycobacterial infections; however, it is not clear whether the cellular immunity alone is enough to accomplish efficient pathogen clearance or it is the cause of the immunopathology and clinical disease. On the other hand, the antibody (Ab) response has been demonstrated to play an important role in the immune response against *Map*.

The diagnosis of paratuberculosis represents a challenge in veterinary medicine because current diagnostic tests are suitable for detection of the clinical phase of the infection. Clinical paratuberculosis is characterized by chronic diarrhoea, weight loss, submandibular oedema and a reduction in milk production. In addition, bovines with clinical paratuberculosis are also high shedders and have elevated levels of specific Abs. The detection of paratuberculosis in animals undergoing the subclinical phase is difficult because *Map* shedding in feces is low and intermittent and the levels of *Map*-specific Abs are also low. As in herds most of the animals may be in the subclinical phase, their identification is essential to carry out effective paratuberculosis control measures.

The aim was to evaluate the specific humoral immune response to *Map* and its proteins in naturally and experimentally infected and immunized bovines.

In the present work, the division of bovines into the different groups was done according to whether animals belonged to *Map*-infected herds or not, the presence of clinical signs of paratuberculosis, the serologic diagnosis (using the protoplasmic antigen, PPA; Allied Monitor Laboratories Inc.) results and the presence of the specific *Map* DNA fragment (IS900) evaluated by PCR in colonies isolated from feces (culture) or milk samples (immunocapture with magnetic beads, Table).

Groups	Precedence	Signs	ELISA	PCR
Healthy control	-	-	-	-
Subclinically infected	+	-	- / +	+
Clinically infected	+	+	- / +	+

Table. Groups of the bovines studied. Data are expressed as + (positive) or - (negative).

The present doctoral thesis evaluated:

❖ The effect of the *Map* infection on the levels of total Abs in sera and feces of bovines undergoing the different stages of the pathology. Those bovines with clinical disease and low levels of total serum proteins (less than 6,2 g / dL) were classified as “terminal infected”. Results demonstrated that infection with *Map* affects the total levels of Abs in sera and feces of animals in the different stages of paratuberculosis: bovines with clinical signs presented increased total levels of IgM in sera as well as IgM, IgG and IgA in feces.

❖ The specific humoral immune response to *Map* and its proteins in naturally-infected bovines undergoing the different stages of the disease. Levels of whole heat-inactivated *Map* specific IgG were found to be increased in sera of all infected animals. IgG1 was found to be related to the animals with clinical disease, while IgG2 and IgG3 were the isotypes responsible for the increased levels of total specific IgG in the sera of bovines undergoing the subclinical infection. In addition, the IgG2/PPA-ELISA proved to be more efficient in detecting animals with a subclinical infection. Moreover, results suggest that the combination of IgG2/PPA-ELISA with IgG/PPA-ELISA may increase the identification of herds with animals in different stages of the disease.

The 65 kDa heat shock protein (Hsp65) has been identified as an immunodominant antigen of *Map*; however, a low reactivity (10 %) to recombinant Hsp65 (Hsp65r) was detected in sera of *Map*-infected cattle. The latter result could be explained by the occurrence of conformational changes in B-cell epitopes or in the protein adsorbed to the ELISA microplates.

❖ The humoral immune response in calves experimentally infected with two local *Map* isolates. Three experimental groups studied during 180 days post-infection: mock infected, experimentally infected with *Map* isolate A (A) and experimentally infected with *Map* isolate C (C). A peak of *Map* shedding was detected after 60 days post-infection. After the peak, cultures for *Map* were negative. High levels of IFN γ produced by non-stimulated peripheral cells were detected. These results are in line with those of other authors, who have recommended not applying that methodology for ruminants under 2 years. In addition, serological diagnosis (PPA-ELISA using an anti-IgG conjugate) failed to detect the infection in the challenged calves. However the humoral immune response was induced early as *Map*-specific Abs were detected from 50 days post-infection on. In addition, IgG2 was the first isotype that increased significantly in sera of *Map*-infected calves. As for the antigens employed in this work, low to null cellular and humoral responses against Hsp65r were detected. These results would demonstrate losses in B- and T-cell epitopes or differences between the recombinant and the native proteins. Regarding recombinant carboxy-terminal peptide of protein p34 of *Map* (p34r), this antigen was only recognized by calves experimentally infected with *Map* A. The findings indicate that these proteins would not be suitable antigens to be used in diagnostic tests.

❖ The role of specific bovine Abs to *Map* and its proteins in the viability of ingested bacteria in an *in vitro* macrophages infection model. Purified IgG were evaluated from sera belonged to the following animal groups: infected and with clinical signs, Hsp65r-immunized, p34r-immunized and healthy controls. *Map* viability was decreased upon treatment with Abs from p34r-immunized cattle.

In summary, the results presented in this work enlarge the knowledge of the humoral immune response in natural and experimental *Map*-infected bovines and in immunized with *Map*-recombinant proteins. These data impact on the current diagnostic techniques. This work supports the assessment of other Ab isotypes like IgG2 to improve the identification of *Map*-infected cattle undergoing a subclinical infection. In addition, the kinetics of the immune response found in *Map*-experimentally infected calves contributes to futures experiments in our country.

This work demonstrates the functional anti-bacterial role of anti-p34r Abs, which justifies the evaluation of anti-p34r Abs in *in vivo* infection models.

The complex interaction between the pathogen and its host is not well known. This thesis proves that *Map* induces a detectable humoral immune response previously to the appearance of the clinical signs, the characterization of this response improves available diagnostic techniques and the Abs play an active role in infection.

Introducción

La paratuberculosis

La paratuberculosis o enfermedad de Johne es una patología crónica intestinal que afecta a rumiantes (Clarke, 1997; Harris y Barletta, 2001; Sweeney, 2011). El agente etiológico es el *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (*Map*), el cual fue aislado a partir de rumiantes tanto domésticos como silvestres (bovinos, ovinos, caprinos, ciervos, camélidos, búfalos, muflones, alces y renos; Mackintosh y Griffin, 2010) y de otras especies no rumiantes como visones, roedores, conejos, aves, zorros, osos y hasta humanos (Hutchings y col., 2010).

Los bovinos generalmente se infectan tempranamente y atraviesan un largo estadio subclínico (años). Las lesiones intestinales comienzan a desarrollarse durante este período, son de naturaleza granulomatosa y generalmente restringidas al íleon y válvula ileocecal (Clarke, 1997; González y col., 2005).

A pesar de existir la posibilidad de que el animal infectado pueda eliminar al patógeno, la mayoría de los terneros expuestos a *Map* desarrollan una infección crónica y de por vida. La capacidad de resolver la infección o evolucionar hacia la cronicidad, depende de múltiples factores como: la cepa de *Map*, el número de exposiciones, la dosis infectiva, el número de focos infecciosos, la tasa de reinfección endógena y exógena, la carga genética del huésped, así como su capacidad para estimular las poblaciones celulares adecuadas en el sitio de inflamación (Stabel, 2000; Verna y col., 2007; Fernández y col., 2014).

En algunos animales luego de varios años de incubación, la patología avanza al estadio clínico (Clarke, 1997). Las lesiones del tejido intestinal producen el incremento de la permeabilidad vascular que provoca la pérdida de proteínas por heces (Patterson y col., 1967) y afecta además a la absorción de nutrientes (Patterson y Berrett, 1969; Fecteau y Whitlock, 2010). La inflamación intestinal estimula la producción de citoquinas pro-inflamatorias: las interleuquinas 1 (IL1) y 6 (IL6) actúan a nivel del sistema nervioso central produciendo anorexia mientras que el factor de necrosis tumoral *alpha* (TNF α) induce la degradación de reservas del tejido graso. De esta manera, los bovinos sufren un balance energético y proteico negativo. Se describe que sólo el 10 % de los bovinos infectados crónicos desarrollan la enfermedad progresiva y fatal (Sweeney, 2012; Koets y col., 2015).

Los signos característicos de la paratuberculosis son: la diarrea crónica, la mala absorción de nutrientes, la pérdida de peso y de proteínas, el edema submandibular y la colecta líquida

en cavidades corporales. Los animales pueden concluir en caquecía y muerte (Figura 1). Esta patología afecta a los parámetros productivos observándose disminuciones en la producción tanto de leche como de carne (Sweeney, 1996; Fecteau y Whitlock, 2010).

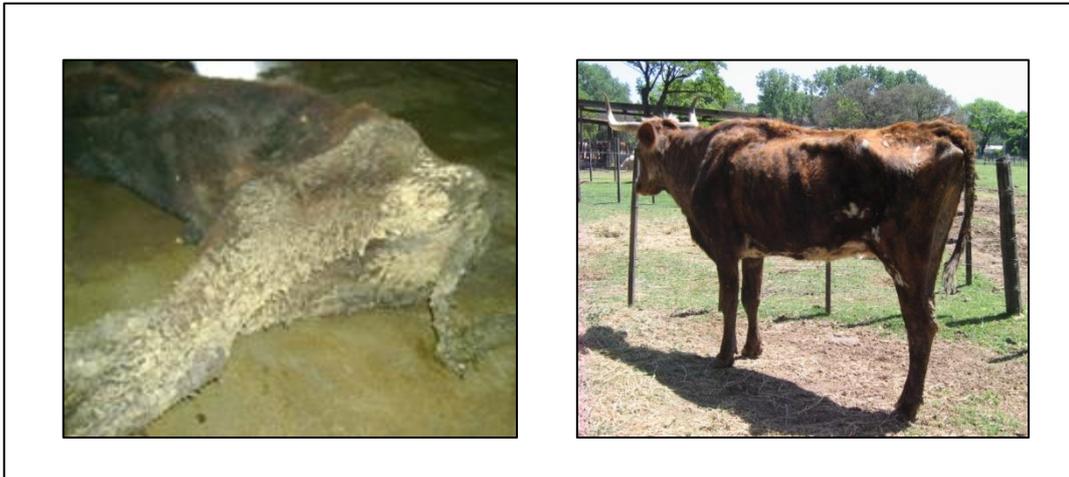


Figura 1. Signos clínicos típicos de la paratuberculosis en bovinos: diarrea (miembros posteriores y cola manchados) y caquexia. Las imágenes corresponden a dos bovinos infectados, que fueron incluidos en este trabajo de tesis.

En la paratuberculosis, se pueden identificar los siguientes estadios:

- I: subclínico no excretor de *Map*
- II: subclínico excretor de *Map*
- III: clínico excretor de *Map*

Los bovinos en el estadio I corresponden a aquellos infectados que no presentan signos clínicos ni diseminan a la bacteria. Esta etapa es típica de los animales jóvenes menores de dos años y adultos expuestos a pequeñas dosis del microorganismo. El estadio II incluye a aquellos bovinos que no muestran signos clínicos pero excretan *Map* en pequeñas cantidades y de manera intermitente a través de la materia fecal (MF). Estos animales representan una fuente de infección del medio ambiente, generalmente oculta. En algunos bovinos, el progreso hacia la tercera etapa puede durar meses o años, y comúnmente se asocia con períodos de estrés, entre ellos el parto en hembras de tambo. Los animales del estadio III corresponden a aquellos que presentan los signos clínicos clásicos de la paratuberculosis.

Historia de la paratuberculosis

En 1807 Skellet informó sobre una enfermedad consuntiva en bovinos. Los primeros reportes de paratuberculosis podrían ser los descritos por Hurrell d'Arboval en 1826, que detectó engrosamientos en las membranas mucosas de intestinos delgado y grueso asociados con diarrea crónica. En ese momento no se sabía que correspondía a la paratuberculosis, pero desde nuestra perspectiva, podríamos creer que se trataba de la patología en cuestión (Twort y Ingram, 1912; Manning y Collins, 2010a).

En 1894 Johne y Frothingham estudiaron muestras intestinales de una vaca con disminución en la producción láctea, así como en la ganancia de peso. Propusieron que el agente causal era el *Mycobacterium avium* y denominaron a la patología como “pseudotuberculosis enteritis” debido a su similitud con la tuberculosis intestinal (Johne y Frothingham, 1895).

Once años más tarde, en 1906, Bang inyectó antígenos de *Mycobacterium bovis* (tuberculina) a bovinos con tuberculosis e identificó una respuesta febril acompañada de hinchazón en el sitio de inoculación. Por otra parte, la inoculación de antígenos provenientes de *M. avium* no indujo respuesta. Este hallazgo promovió la aplicación de la prueba de tuberculina intradérmica como herramienta para el diagnóstico de la tuberculosis bovina en todo el mundo. También permitió identificar que los animales que sufrían de la patología descrita por Johne y Frothingham reaccionaban con la tuberculina de *M. avium* pero no con la de *M. bovis* (Bang, 1906).

Recién en 1912 se pudo cumplir con los postulados de Koch: el agente etiológico de la paratuberculosis se aisló, se caracterizó y se utilizó para producir la enfermedad (Twort e Ingram, 1912).

Agente etiológico

Map pertenece al género *Mycobacterium* y es un bacilo Gram positivo de 0,5 a 1,5 μm de largo que suele presentarse en forma de agregados o “clumps” (Figura 2). *Map* resulta positivo a la tinción de Ziehl-Neelsen (ácido-alcohol resistente, Figura 2) debido a que en su pared contiene gran cantidad de ácidos micólicos que se colorean con fuscina y resisten la decoloración con alcohol ácido.

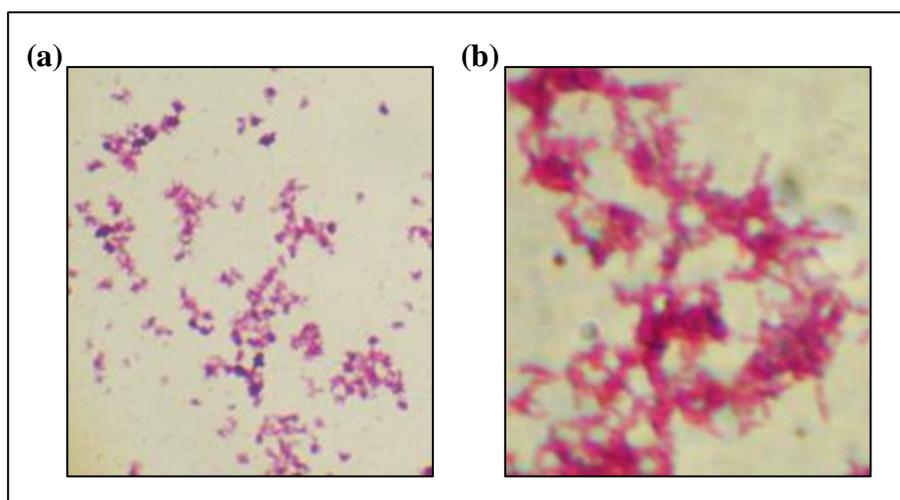


Figura 2. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* teñido con la coloración de Ziehl-Neelsen a 100X (a) y a 1000X (b). Se observan pequeños bacilos, algunos de manera dispersa y la mayoría en forma de agregados o “clumps”.

El crecimiento de *Map* se caracteriza por ser lento, con un tiempo de duplicación de entre 22 y 26 horas. Requiere además de medios enriquecidos con piruvato de sodio y micobactina J.

El complejo *M. avium* está constituido por especies de crecimiento lento, entre las que se incluyen tanto a patógenos de aves y rumiantes, y a oportunistas de humanos, como a micobacterias apatógenas que frecuentemente se ubican en el medio ambiente (Turenne y Alexander, 2010). A su vez, *M. avium* se divide en 4 subespecies representadas por organismos que difieren en patogenicidad y rango de hospedador: *M. avium* subsp. *avium* (*Maa*), que genera la tuberculosis aviar; *M. avium* subsp. *hominissuis* (*Mah*), el cual produce linfadenitis cervical, infecciones pulmonares e infecciones diseminadas en cerdos y en el hombre; *M. avium* subsp. *silvaticum* (*Mas*), que causa la enfermedad *simil* tuberculosis en palomas; y *Map* (Rindi y Garzelli, 2014).

Una secuencia genómica se ha descrito como exclusiva del ADN de *Map* y corresponde a una inserción denominada IS900 que presenta entre 15 a 20 copias por genoma (Collins y col., 1989) y está constituida por 1.451 pares de bases (pb; Green y col., 1989). La identificación de esta secuencia mediante PCR es útil con fines diagnósticos (Collins y col. 1993; Bölske y Herthnek, 2010). Sin embargo, una secuencia IS900-simil fue descrita en otras micobacterias: *Maa*, *Mycobacterium cookii*, *Mycobacterium scrofulaceum* y *Mycobacterium porcinum* (Cousins y col., 1999; Nacer y col., 1999; Englund y col., 2002; Taddei y col., 2005; Möbius y col., 2008).

Nuestro grupo ha diseñado cebadores o primers que amplifican dos secuencias cortas de ADN del inserto IS900, los cuales mostraron una identidad del 100 % entre las cepas de *Map*. Además, se confirmó la especificidad de dichos fragmentos mediante la evaluación con *M. phlei*, *Maa*, *M. fortuitum* y *M. scrofulaceum*, por PCR (Mundo y col., 2013).

Otras secuencias de inserción se han identificados en el genoma de *Map*, entre las cuales se encuentra la F57. La misma es específica de *Map*, se presenta una sola copia por genoma y no se ha descrito homología con otras micobacterias (Poupart y col., 1993).

El análisis del polimorfismo de los fragmentos de restricción (RFLP) en IS900 (IS900-RFLP) permitió identificar cuatro genotipos de *Map* denominados A, B, C y E (Pavlík y col., 1995). Todos ellos han sido aislados en nuestro país (Moreira y col., 1999).

Las cepas de *Map* también se pueden caracterizar mediante el esquema de análisis de locus múltiples “MIRU-VNTR” (mycobacterial interspersed repetitive units (MIRU) – variable number of tandem repeats (VNTR)), el cual permite distinguir entre cepas mediante la detección de diversidad en ocho regiones limitadas del genoma de *Map* (Thibault y col., 2007; Castellanos y col., 2012). Ésta es la técnica de genotipificación más utilizada en la actualidad, por lo que el Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias de Francia (Institut National de la Recherche Agronomique) ha creado en el año 2014 una base de datos de libre acceso que nuclea la información sobre los perfiles identificados a nivel mundial (“Mac INMV database”, <http://mac-inmv.tours.inra.fr>; Cochard y col., 2014). Se han publicado sólo 3 estudios en los que se evalúan los genotipos de *Map* circulantes en Argentina por MIRU-VNTR (Romano y col., 2005; Fernández-Silva y col., 2012; Gioffre y col., 2015). Los datos indican que el código 1 (INVI 1) es el más frecuente en nuestro país.

Las cepas de *Map* se clasifican en tipo ovino (S, sheep) o bovino (C, cattle) mediante la utilización de IS900-RFLP y el análisis de restricción enzimática de IS1311 (IS1311/PCR-

REA; Collins y col., 1990; Marsh y col., 1999; Pavlik y col., 1999). Mientras que, por electroforesis en gel bajo campo pulsado (PFGE), se identifican tres patrones: el tipo I, que corresponde a la cepa S; el tipo II, que pertenece a la cepa C y el tipo III, que se lo consideraba un tipo intermedio (de Juan y col., 2006), pero la secuenciación confirmó que también corresponde al tipo S (Stevenson, 2015). Las cepas C y S de *Map* mostraron además comportamientos fenotípicos distintos en la respuesta por macrófagos infectados *in vitro* (Janagama y col., 2006; Abendaño y col., 2013 y 2014). Más allá de las diferencias, cepas de los distintos grupos han sido aisladas en ovinos, bovinos y otras especies. Aunque las cepas de C son obtenidas predominantemente de muestras de bovinos y otras especies mientras que las S suelen obtenerse a partir de muestras de ovinos y caprinos (Stevenson, 2010).

Recientemente se ha identificado una mayor diversidad genotípica de *Map* debido a la detección de un nuevo aislamiento en India “Indian Bison Type” que mostró diferenciarse de las restantes cepas por IS1311/PCR-REA (Singh y col., 2013).

Con respecto a la genómica, se han publicado varias secuencias completas de *Map* (Li y col., 2005; Bannatine y col., 2014).

Inmunopatogenia

La paratuberculosis es una patología que ha sido intensamente estudiada. Sin embargo, aun quedan numerosas etapas de la inmunopatogenia que restan comprender a la luz de los avances biotecnológicos. Nuevos aportes al conocimiento permitirán sentar las bases para el desarrollo de nuevas metodologías diagnósticas así como de vacunas exitosas.

Luego de la ingestión oral de *Map*, el primer sitio de ingreso al organismo es a través de las tonsilas. Sin embargo, las células M asociadas a las placas de peyer del íleon distal se identifican como el sitio de preferencia para atravesar la pared intestinal. Estas células protruyen hacia la luz intestinal para poder ingerir, además de macromoléculas, a microorganismos como por ejemplo a *Map*. Y las transporta hacia la membrana basolateral para que macrófagos intra y subepiteliales realicen la fagocitosis (Momotani y col., 1988; Clarke, 1997). También se ha descrito un mecanismo de entrada del *Map* mediante la interacción activa con enterocitos (Bannantine y Bermudez, 2013). La fibronectina hace de puente entre proteínas presentes en la superficie de *Map* y la $\beta 1$ integrinas ubicadas en las células epiteliales intestinales. Las células M tienen mayor cantidad de $\beta 1$ integrinas en la superficie luminal en comparación con enterocitos, por lo que esto podría ser la causa responsable de que éstas sean la principal vía de entrada (Secott y col., 2004).

Diversos estudios han señalado la importancia de la vía de ingreso de *Map* al macrófago y las vías de señalización dado que afectarán el proceso de ingestión del patógeno, el tráfico del fagosoma y su maduración, la inducción de la apoptosis y la expresión de citoquinas, determinando por último la viabilidad o no del *Map*. Si el receptor implicado en el reconocimiento de *Map* es el receptor de tipo Toll 2 (TLR2), se enviarán señales inhibitorias a las células y se evitará la acidificación del fagosoma (Weiss y Souza, 2008; Thirunavukkarasu y col., 2013). Lo mismo ocurre con el receptor CR3 del complemento. Mientras que, si el patógeno es reconocido a través del receptor para la fracción cristalizable (Fc) de anticuerpos (RFc), se producirán señales pro-inflamatorias y habrá estallido respiratorio (Abebe y Bjune, 2009).

Las micobacterias patógenas despliegan una serie de mecanismos destinados a evadir la fagocitosis y sobrevivir dentro del macrófago. Por ejemplo, se demostró que cuando *Map* es ingerido, se incrementan los fagosomas tempranos quedando en un estadio “inmaduro”, por lo que éstos no se unen con el lisosoma ni se acidifican, y en consecuencia, no afecta la viabilidad del patógeno (Hostetter y col., 2003; Weiss y Souza, 2008).

Se sostiene que las células infectadas con patógenos intracelulares sufren un proceso de apoptosis, que favorece a la presentación antigénica, sin embargo los resultados publicados para *Map* son contradictorios. Varios investigadores describen que *Map* evita la apoptosis celular a fin de limitar su detección por el sistema inmune (Weiss y Souza, 2008; Kabara y Coussens, 2012). Por otro lado, el trabajo publicado por Periasamy y col. (2013) muestra un incremento en la apoptosis de macrófagos infectados con *Map*.

La respuesta contra micobacterias también incluye la producción de citoquinas pro- y anti-inflamatorias. El TNF α es un importante mediador inflamatorio, inductor de la destrucción de micobacterias, de la apoptosis de macrófagos infectados con *Map* y de la formación y mantenimiento de la estructura del granuloma (Lei y col., 2008; Weiss y Souza, 2008). En contraposición, la interleuquina 10 (IL10) es un potente mediador anti-inflamatorio, que disminuye/inhíbe la activación de macrófagos, su capacidad microbicida, la secreción de citoquinas y la presentación de péptidos tanto en macrófagos como en células dendríticas. Cuando *Map* contacta con células fagocíticas, induce rápidamente la expresión de altas cantidades de IL10 mientras que la expresión de TNF α es mínima (Weiss y Souza, 2008; Abendaño y col., 2014).

En cada foco infeccioso se genera un alto número de microorganismos. Si la infección no es contenida por la reacción local o si hay fallas para desarrollar una respuesta inmune efectiva dentro del sistema inmune asociado a mucosas (MALT), se desencadena un recrudecimiento de la inflamación y se expande la lesión. La emigración de los macrófagos infectados a partir del foco de lesión hacia el lumen intestinal generará que los animales excreten *Map* resultando positivos al cultivo de muestras de materia fecal.

La respuesta inmune adaptativa durante el prolongado estadio subclínico se caracteriza por el predominio de respuesta celular o perfil de linfocitos T (LT) helper 1 (LTh1). La respuesta T cumple dos papeles fundamentales en la protección contra *Map*: estimular a macrófagos infectados para la destrucción de las micobacterias a través de la secreción de interferón *gamma* (INF γ) por los LTh1, y destruir a macrófagos y células dendríticas infectados con *Map*, mecanismo que realizan los LT citotóxicos (LTc) efectores que migran a los tejidos dañados. A consecuencia del perfil de Th1 desarrollado, numerosos LT (LTh1 y LTc) acompañan a los macrófagos en la formación del granuloma. Pero para que los LT puedan alcanzar el tejido dañado, resulta necesaria la respuesta pro-inflamatoria de los macrófagos, que es generalmente inhibida por *Map* (Koets y col., 2015).

En cuanto a los linfocitos B (LB), se observó un reducido número en los linfonódulos mesentéricos y tejido linfoide intestinal al inicio de la infección (asociado a la fuerte respuesta celular). Además, los niveles de anticuerpos (Acs) específicos en este estadio suelen ser bajos (Stabel, 2000) y el isotipo de inmunoglobulina (Ig) que predomina es el IgG2 (Estes y Brown, 2002).

En el estadio de paratuberculosis clínica, la respuesta inmune cambia hacia el predominio de respuesta humoral o perfil Th2. Por lo que los bovinos enfermos (con paratuberculosis clínica) muestran altos niveles de Acs específicos principalmente del isotipo IgG1 (Abbas y Riemann, 1988; Chiodini, 1996; Stabel, 2000; Estes y Brown, 2002). El número de LB en sangre periférica se identifica elevado en la paratuberculosis clínica avanzada pero la capacidad de proliferación frente a *Map* se encuentra disminuida (Waters y col., 1999; Stabel, 2000). Estos hallazgos pueden estar relacionados a una regulación negativa de la respuesta o a que los LB específicos a *Map* se encuentren ubicados en los tejidos dañados.

Con la progresión de la paratuberculosis, se describe el incremento en la expresión de citoquinas anti-inflamatorias como ser la IL10 y el factor de crecimiento transformante β (TGF β) mientras que se regula la expresión de INF γ (Koets y col., 2015). Además, Subharat y col. (2012) detectaron una asociación negativa entre la producción de IL10 y la severidad de la paratuberculosis en bovinos infectados experimentalmente.

Koets y col. (2001) estudiaron los isotipos de Igs específicos frente a diversos antígenos de *Map* y sólo detectaron el patrón descrito por Estes y Brown (2002) cuando se utilizó el derivado proteico purificado (PPD) de *Map* (PPDp) como antígeno.

Si bien se describe la existencia de distintos estadios en la paratuberculosis caracterizados por dos perfiles de respuesta inmune excluyentes (Th1 y Th2), esto constituye una simplificación de la inmunopatogenia. Más aun, Ganusov y col. (2015) estudiaron animales experimentalmente infectados e identificaron respuesta inmune celular y humoral específica de manera simultánea en la mayoría de los bovinos (14/20). Además, Koets y col. (2002) evidenciaron un predominio de la respuesta inmune humoral sobre la celular en algunos bovinos con paratuberculosis subclínica y clínica.

Se demostró la participación de otras células inmunes en la respuesta contra *Map*. Dudemaine y col. (2014) sugieren la participación del LT helper 17 (LTh17) y proponen el reemplazo del denominado perfil Th2 por el perfil inflamatorio Th17 (dado que hallaron incrementos en la secreción de la interleuquina 17 (IL17) en estadios avanzados de la

paratuberculosis). La inflamación de tejidos producidos por esta citoquina durante un período de tiempo prolongado, junto con la invasión de grandes cantidades de células del sistema inmune, serían los principales responsables de la pérdida de la función tisular.

Algunos autores indican la participación de LT reguladores (LTreg) en la progresión de la patología hacia el estadio clínico y sostienen que los LT CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ corresponden a los LTreg y que inducen una respuesta anti-inflamatoria mediante la secreción de IL10 y del TGFβ (de Almeida y col., 2008; Coussens y col., 2012). Mientras que, Hoek y col. (2009) señalan que los LT CD4⁺ CD25⁺ no muestran una actividad supresora en bovinos.

Los LT gamma delta (LTγδ) representan a la población celular más numerosa presente en sangre bovina, alcanzan el sitio de entrada de *Map* previo a los LT CD4⁺ (Plattner y col., 2012) y secretan INFγ para inducir una respuesta celular contra las micobacterias. Sin embargo, también se ha descrito que los LTγδ (WC1.1⁺ y WC1.2⁺) actúan de manera regulatoria mediante la secreción de IL10 (Hoek y col., 2009).

Se considera a la respuesta inmune celular como fundamental para el control de la paratuberculosis (Stabel, 2000; Koo y col., 2004), sin embargo es también la responsable de generar la hipersensibilidad de tipo IV. Por lo tanto, se cuestiona si la inmunidad celular sola es suficiente para proteger al huésped de la infección o es la causante de la patología y signología clínica. Diversos estudios muestran que los Acs juegan un papel importante en la respuesta inmune frente a patógenos intracelulares (Igietseme y col., 2004) y micobacterias (Glatman-Freedman, 2006; Joller y col., 2010). de Vallière y col. (2005) demostraron que al opsonizar *M. bovis bacillus Calmette-Guérin* (BCG) con Ac de pacientes humanos vacunados (con BCG) se incrementa la asociación y la ingestión de la micobacteria por células fagocíticas, se disminuye la viabilidad de las bacterias fagocitadas, y se aumenta la cantidad de LT productores de INFγ y la desgranulación de LTc. Experimentos *in vivo* con micobacterias señalan un aumento en la formación de granulomas, disminución en las unidades formadoras de colonias (UFC) y mayor supervivencia de ratones tratados con Ac monoclonales (Teitelbaum y col., 1998; Williams y col., 2004; Abebe y Bjune, 2009).

Son pocos los trabajos que evaluaron la funcionalidad de Acs en la respuesta contra *Map*. En un modelo *in vitro*, Hostetter y col. (2005) demostraron que al opsonizar *Map* con sueros inmunes inactivados por calor, disminuye la viabilidad de las bacterias ingeridas.

Nuestro grupo estudió el papel de Acs específicos de bovinos en la respuesta de macrófagos frente a *Map*. Los resultados mostraron incrementos en la asociación de *Map*-macrófagos bovinos, en la inducción de factores relacionados con la activación celular y la formación del granuloma y disminución en la viabilidad intracelular de *Map* (Mundo y col., 2008; Jolly y col., 2011).

Epidemiología

Animales susceptibles

Los terneros dentro del primer año de vida son los más susceptibles a la infección, siendo los primeros días los más críticos (Windsor y Whittington, 2010). Esto se asocia con la presencia de mayores cantidades de placas de peyer ileales transitorias en este período, que proporcionan un mayor número de células M (Koets y col., 2015). Los bovinos de 12 meses e incluso mayores pueden infectarse dependiendo principalmente de la carga bacteriana ingerida y el número de exposiciones (Clarke, 1997; Windsor y Whittington, 2010). La dosis infectiva para neonatos es probablemente menor a la de los adultos (Manning y Collins, 2010b). Además, los animales que habitan en un medio con elevada contaminación ambiental tendrán mayor riesgo potencial de infectarse con *Map* debido a la constante exposición al agente.

Se ha demostrado que la diversidad genética de los bovinos huéspedes influye en la susceptibilidad a *Map*. Son muchos los genes estudiados y los que aún restan por evaluar. A modo de ejemplo, se pueden citar los correspondientes a los receptores de reconocimientos de patrones (PRR): el receptor de tipo Toll 4 (TLR4; Sharma y col., 2015) y la dectina 1 (receptor de lectina, Pant y col., 2014), así como también al gen CD209 (Vázquez y col., 2014). En cuanto al NOD2 (que tiene como función principal unirse al muramil dipéptido de las bacterias), existen resultados contradictorios y parecería ser relevante en bovinos cruza Brahman por Angus (Kirkpatrick, 2010).

Otros factores de riesgo o predisponentes: los sistemas de producción intensiva, los suelos ácidos, la presencia de factores de estrés, la alimentación deficiente y la existencia de enfermedades inmunosupresoras concomitantes han sido identificados. La raza y el sexo no se han descripto como factores predisponentes. Sin embargo, los diferentes manejos ligados al sexo podrían impactar sobre la incidencia de la patología (Clarke, 1997).

Fuente de infección

La principal fuente de infección en un rodeo son los animales que excretan *Map* al medio ambiente principalmente a través de la MF. Los bovinos infectados atraviesan un prolongado estadio subclínico durante el cual pueden eliminar bajos niveles de *Map* y de manera intermitente. Los animales subclínicos excretan *Map* hasta 18 meses previos a la manifestación de los signos. Mientras que los bovinos infectados en estadio clínico, excretan

generalmente grandes cantidades (hasta 10^{12} UFC / g de MF) y en forma constante de *Map* a través de las heces (Chiodini y col., 1984a). El *Map* también puede ser eliminado a través del calostro y leche. La proporción de vacas que excretan *Map* por MF y que también lo hacen a través de la leche es baja. Sin embargo, los niveles en leche parecerían estar relacionados con la excreción fecal y la progresión de la patología de subclínicos a clínicos (Taylor y col., 1981; Sweeney y col., 1992; Barkema y col., 2010).

Map es un microorganismo muy resistente ya que puede sobrevivir en el suelo hasta un año (Whittington y col., 2004), mientras que en el agua puede resistir durante un período de tiempo más prolongado (Whittington y col., 2005). Se ha descrito que factores ambientales como la temperatura, la humedad, el pH y la intensidad de radiación ultravioleta afectan su sobrevivencia fuera del animal (Chiodini y col., 1984a).

Transmisión

La principal vía de ingreso del patógeno al organismo es la oral. Los animales susceptibles ingieren calostro o leche contaminados o succionan pezones contaminados con MF proveniente de la misma hembra o de otro animal infectado. Los bovinos también pueden infectarse a través del consumo de forraje o agua contaminados, lo cual suele ser frecuente en rodeos con una elevada proporción de animales infectados (Chiodini y col., 1984a; Diéguez y col., 2008). Además, se demostró la transmisión entre terneros (Benedictus y col., 2008) y a través de aerosoles (Eisenberg y col., 2011).

Si bien la transmisión horizontal es la principal vía de contagio, también se ha identificado la transmisión vertical; Whittington y Windsor (2009) informaron que los porcentajes de fetos infectados a partir de hembras con paratuberculosis subclínica y clínica son de entre el 9 y 39 %, respectivamente. Pribylova y col. (2013) identificaron a *Map* por PCR a partir de lavaje vaginal en el 75 % de hembras bovinas positivas al cultivo de muestras de MF. Además, se ha demostrado la excreción de *Map* por semen de toros infectados tanto en el estadio clínico como en el subclínico. Y dado que *Map* es resistente a los antibióticos utilizados y al proceso de congelación, la inseminación artificial se propuso como otra vía alternativa de transmisión (Ayele y col., 2004; Khol y col., 2010).

Diagnóstico

La identificación de bovinos infectados con *Map* representa un desafío para los veterinarios debido a las características del agente y a la respuesta inmune que induce. Ésto dificulta arribar a un diagnóstico certero, por lo que se requiere de la combinación de varias estrategias. Los bovinos en estadios tempranos son los más difíciles de detectar.

Teniendo en cuenta que en un rodeo infectado con *Map*, los animales están expuestos al patógeno, se esperaría que la mayoría se encuentren infectados. Sin embargo, ésto no es lo que se observa con los métodos diagnósticos existentes. Por cada vaca (nacida en ese establecimiento) con paratuberculosis clínica y con diagnóstico positivo, es probable que otros 15 - 25 bovinos del rodeo estén infectados con *Map* en estadio subclínico (Whitlock, 1992); sólo del 25 al 30 % de estos animales infectados subclínicos podrían ser detectados mediante las metodologías diagnosticas disponibles (Whitlock, 2009). A este hecho se lo conoce como “fenómeno iceberg”, ya que unos pocos de los bovinos infectados (generalmente en estadio clínico, “punta del iceberg”) pueden ser diagnosticados mediante la utilización de los métodos tradicionales (Figura 3). Mientras que, la mayoría de los animales con paratuberculosis, se encuentran en la “base del iceberg” y no son identificados como infectados.

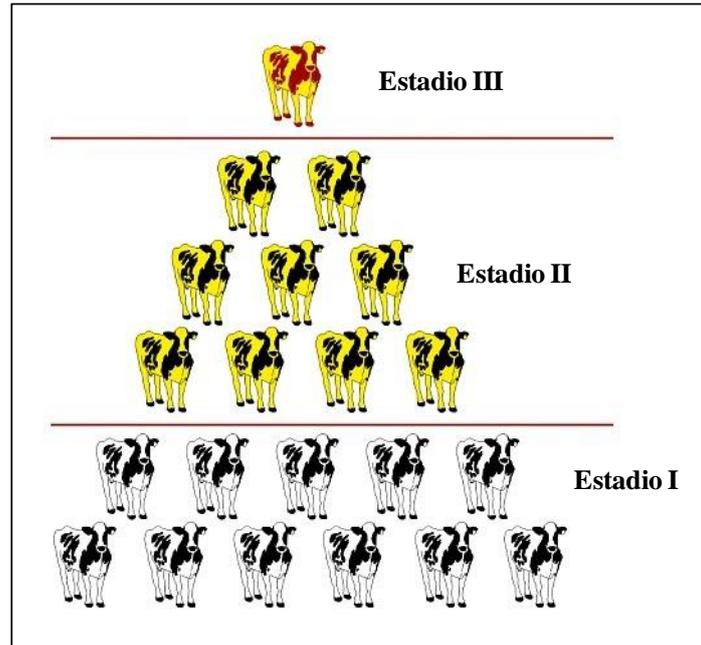


Figura 3. Fenómeno “iceberg”. El bovino con paratuberculosis clínica (estadio III) representa la "punta del iceberg" mientras que los bovinos que no muestran signos clínicos pero que pueden excretar pequeñas cantidades y de manera intermitente de *Map* a través de MF corresponden al estadio II de la paratuberculosis. Por último, la “base del iceberg” está simbolizada por los bovinos en el estadio I (no presentan signos clínicos ni diseminan la bacteria).

Anamnesis y diagnóstico clínico

Por las características de la patología, resulta relevante analizar los antecedentes del rodeo con respecto a la paratuberculosis.

El diagnóstico clínico sólo involucra a los animales que están en un estadio avanzado de la paratuberculosis y por lo tanto se detectan principalmente bovinos adultos.

Los signos característicos son: diarrea crónica intermitente, profusa y hasta líquida, asociada a la mala absorción de nutrientes, a la pérdida de peso, al edema submandibular, a la colecta líquida en cavidades corporales, a la disminución en la producción tanto láctea como cárnica, a la caquexia y hasta a la muerte. Por ser los signos de la paratuberculosis inespecíficos, se debe proceder a realizar el diagnóstico diferencial con otras enfermedades que generan signos similares como son el parasitismo gastrointestinal, la peritonitis crónica, la amiloidosis renal, el linfosarcoma, la insuficiencia renal, la deficiencia de cobre, la desnutrición, y otras enfermedades infecciosas crónicas, como por ejemplo: la tuberculosis intestinal, la leucosis y la salmonelosis crónica.

Diagnóstico histopatológico

La lesión característica de la paratuberculosis es la inflamación granulomatosa de intestino y linfonódulos asociados (Clarke, 1997).

Las lesiones macroscópicas se observan casi exclusivamente en los casos de paratuberculosis clínica. El engrosamiento de la mucosa intestinal es el principal signo macroscópico; el íleon y válvula ileocecal son los sitios comúnmente afectados aunque puede distribuirse en todo el intestino. La mucosa adopta un parecido a las circunvoluciones de la corteza cerebral. Este aspecto denominado “cerebroide”, es típico de la paratuberculosis y se caracteriza por el desarrollo de pliegues que no desaparecen al estirar la mucosa. En los linfonódulos mesentéricos suele observarse linfadenomegalia acompañada de linfangitis y linfagiectasia de los vasos linfáticos correspondientes (Clarke, 1997). Las lesiones macroscópicas en el estadio subclínico son no específicas, sutiles o se encuentran ausentes (Burgelt y col., 1978).

Se describen los siguientes tipos de lesiones histopatológicas (González y col., 2005):

-Focal: están formados por pequeños granulomas demarcados que se ubican en íleon distal y linfonódulos ileales y yeyunales. Las células que predominan son macrófagos (5 – 30 / granuloma), células gigantes de tipo Langhans (cgL) y pequeñas cantidades de linfocitos. Estas lesiones se asocian con el estadio temprano (subclínico) y son las lesiones más frecuentemente halladas.

-Multifocal: presentan similares características y ubicación a las lesiones focales pero además se detectan cgL dispersas en las vellosidades intestinales y linfonódulos, rodeadas de linfocitos y células plasmáticas. Si bien se hallan numerosas lesiones intestinales, la cantidad no alcanza como para generar lesiones difusas y modificar la arquitectura normal del tejido.

-Difusa: consisten en lesiones granulomatosas severas. Muchas zonas del intestino presentan infiltrado inflamatorio, que genera el engrosamiento de la pared. Además, las vellosidades intestinales se muestran alteradas. Generalmente se lo relaciona con el estadio clínico de la paratuberculosis bovina. Existen tres subtipos:

-Multibacilar: las células predominantes en estas lesiones son macrófagos y cgL. Además, gran cantidad de bacilos ácido alcohol resistentes son identificados en el interior de macrófagos.

-Linfocítica o paucibacilar: los linfocitos son las células predominantes, y se pueden observar algunos macrófagos y cGL. Generalmente se evidencian poca cantidad de micobacterias. Este tipo de lesiones son las menos identificadas.

-Intermedia: tanto los linfocitos como los macrófagos son las células características en estas lesiones.

Diagnóstico etiológico

Cultivo

El aislamiento del agente mediante el cultivo seguido de la identificación por PCR representa la prueba de oro. Esta metodología es cara, engorrosa y lenta (requiere 6 meses de incubación; de Juan y col., 2006). El aislamiento de *Map* se puede realizar a partir de muestras de MF, calostro, leche y tejidos (OIE, 2014). Teniendo en cuenta que las muestras en estudio se encuentran densamente cargadas de otros microorganismos (principalmente las de MF) y que *Map* requiere para su desarrollo de medios enriquecidos y periodos prolongados de tiempo, se debe realizar la decontaminación previo al cultivo mediante el tratamiento con agentes antibacterianos. Entre ellos, se encuentra el cloruro de hexadecilpiridinio (HPC; Merkal, 1984), que es el más utilizado y recomendado (Dundee y col., 2001). Este procedimiento impacta sobre la viabilidad, recuperación y crecimiento de las micobacterias (Whittington, 2010). A pesar de la decontaminación y el agregado de antibióticos y antifúngicos al medio del cultivo, es común el desarrollo de microorganismos contaminantes que compiten por nutrientes y espacio con el *Map*, lo que dificulta y, en muchos casos, imposibilita el diagnóstico.

Map es un microorganismo muy exigente para su crecimiento por lo que para realizar primo-aislamientos se requiere de la utilización de medios de cultivo enriquecidos con piruvato de sodio y micobactina J. El piruvato de sodio se utiliza para estimular el crecimiento de *Map* y compensar los efectos inhibitorios generados por los antibióticos, mientras que la micobactina es un sideróforo que le permite a la micobacteria captar el hierro (Whittington, 2010).

Las colonias de cepas C de *Map* aparecen entre las 5 semanas y 6 meses en medio Herrold con huevo y suplementado con piruvato y micobactina J. Son pequeñas, convexas y de coloración brillante entre transparentes a blanquecinas. Con el tiempo, las colonias aumentan de tamaño, se vuelven opacas y de coloración entre blanco crema a beige, y desarrollan

además, morfología mamillada. Las micobacterias saprófitas tienen una apariencia similar y pueden desarrollarse en los mismos medios de cultivos, sin embargo aparecen a los 5 - 7 días de incubación (OIE, 2014).

El cultivo de muestras de MF es ampliamente utilizado por requerir de una muestra fácil de tomar y por permitir aislar al patógeno. La especificidad es del 100 % (Nielsen y Toft, 2008; Sweeney y col., 2014). Sin embargo, se ha descrito la existencia de animales falsos positivos en rodeos con alta carga ambiental de *Map*. Estos resultados corresponderían a micobacterias que fueron ingeridas y que atravesaron el trayecto digestivo sin penetrar el tejido intestinal (Fecteau y Whitlock, 2010).

La sensibilidad del cultivo de muestras de MF es variable según: el tratamiento de decontaminación, el medio de cultivo, así como los niveles de *Map* en las muestras de los animales. En este sentido, la excreción a través de la MF es intermitente (principalmente en el estadio subclínico), por lo que su cultivo permite detectar principalmente a animales infectados en estadios avanzados. Nielsen y Toft (2008) indicaron que el cultivo de muestras de MF posee una sensibilidad variable que oscila entre el 23 y el 70 %, en general para todos los estadios de la patología, y del 70 % cuando se evalúan bovinos con paratuberculosis clínica. Por su parte, Sweeney y col. (2014) identificaron una sensibilidad del 49 % para el cultivo de muestras de MF de bovinos provenientes de rodeos infectados. Con respecto al límite de detección, se requiere de al menos 100 UFC de *Map* / g de MF para poder lograr un cultivo positivo (Merkal, 1970). Por lo tanto, la utilización de esta técnica para confirmar la ausencia de infección por *Map* en animales es limitada (Collins y col., 2005).

La existencia de bovinos super-excretores, que eliminan más de 10.000 UFC de *Map* por gramo de MF, representa un riesgo potencial en la transmisión a otros miembros del rodeo. Estos animales son escasos en número, representan entre 2 y 3 % de los cultivos positivos en los rodeos, y son además, fáciles de diagnosticar. La mayoría (aproximadamente el 80 %) de los animales en un rodeo infectado corresponden a bovinos bajos (Collins y col., 2005) y medianos excretores (Whitlock y col., 2000). Dado que los neonatos pueden infectarse con pequeñas cantidades de *Map* (1×10^7 UFC; Sweeney y col., 2006), la detección de animales eliminadores de bacterias representa una clave extremadamente importante para prevenir la transmisión (Huda y col., 2004; Eda y col., 2006).

El prolongado período de tiempo necesario para obtener un resultado y el riesgo de contaminación hacen que el cultivo sea una prueba de diagnóstico poco práctica para ser empleada como tamiz en forma rutinaria.

Map se excreta a través de la leche de animales infectados por lo que también se puede proceder su cultivo. Los niveles de eliminación de *Map* por leche son bajos y, de forma similar a lo descrito en muestras de MF, aumentan con la progresión de la patología (Taylor y col., 1981; Sweeney y col., 1992). Los bovinos con paratuberculosis subclínica excretan sólo entre 2 y 8 UFC / 50 mL de leche (Sweeney y col., 1992), mientras que en estadio clínico eliminan como máximo 100 UFC / mL (Taylor y col., 1981; Giese y Ahrens, 2000).

En aquellos casos en los que se practica la necropsia del animal, el cultivo de tejidos intestinales, principalmente del íleon y jejunio distal, y de linfonódulos asociados a los mismos, representan las mejores muestras para aislar a *Map* y poder realizar un diagnóstico etiológico (Sweeney y col., 2006).

Técnicas moleculares

La utilización de la PCR para la detección directa de *Map* en una muestra biológica no es una alternativa práctica para ser aplicada en el diagnóstico de rutina por sus altos costos y su baja sensibilidad (Grant y col., 1998; Nielsen y col., 2001). Sin embargo, su empleo con el fin de confirmar la identidad bacteriana a partir de un cultivo muestra una sensibilidad del 100 % (Manning y Collins, 2001). La principal ventaja de la PCR es que otorga un pronto resultado. Sin embargo, existen factores inhibidores de la Taq polimerasa en las muestras biológicas (sangre, leche, MF y tejidos), por lo que se requiere de la aplicación de alguna técnica de purificación (OIE, 2014). En la actualidad, existen varias metodologías que permiten resolver este inconveniente otorgando buenos resultados; uno de ellos consiste en realizar una inmuno-captación del *Map* previo a la realización de la PCR. Esta metodología permite no sólo eliminar a los inhibidores de la PCR sino también concentrar a la micobacteria. De esta manera, su aplicación impacta sobre la sensibilidad de la metodología (100 vs. 23 %, para inmuno-captación seguido de PCR y PCR directa, respectivamente; Grant y col., 2000). Nuestro equipo de trabajo ha desarrollado una técnica de captación de *Map* a partir de leche bovina mediante la utilización de perlas inmunomagnéticas sensibilizadas con Acs monoclonales y policlonales específicos contra *Map* seguido de la

identificación del ADN bacteriano mediante la amplificación por PCR (Mundo y col., 2013; Gilardoni y col., en prensa).

La utilización de las nuevas tecnologías como el PCR en tiempo real presenta varias ventajas por sobre la PCR en tiempo final como mayor sensibilidad y la posibilidad de cuantificar la cantidad aproximada de bacterias pero los costos de insumos y de equipamiento hace que aún no sea utilizada de rutina (Rodríguez-Lazaro y col., 2004).

Diagnóstico inmunológico

El diagnóstico indirecto de la paratuberculosis se puede realizar mediante el estudio de la respuesta inmune. Las metodologías que pueden aplicarse varían según el estadio de la patología en el que se encuentre el animal, dado que inicialmente se describe un predominio de la respuesta inmune celular, mientras que la respuesta humoral es característica en estadios avanzados.

Teniendo en cuenta la similitud antigénica entre micobacterias, que incluyen microorganismos apatógenos y patógenos, se debe diferenciar si la respuesta detectada es inducida por *Map* u otro microorganismo para evitar la obtención de resultados falsos positivos.

Evaluación de la respuesta inmune celular

Se describe un predominio de la respuesta inmune celular en el estadio subclínico, por lo que la aplicación de las metodologías de intradermorreacción (IDR, *in vivo*) y de producción de IFN γ (*ex vivo*) permiten arribar al diagnóstico de paratuberculosis. Sin embargo, la interpretación de los resultados es dificultosa dado que estas técnicas han demostrado ser muy variables y poco específicas. Los antígenos que se utilizan son: el PPD de *Maa* (PPDa) o PPDp; los cuales no son específicos, dado que los animales pueden sensibilizarse por cualquier agente del complejo de *M. avium* y reaccionar en forma cruzada (OIE, 2014).

Un estudio demostró que la inoculación intradérmica de PPDp en bovinos tiene una especificidad del 89 % utilizando el valor de corte (VC) ≥ 2 mm, del 91 % para el VC ≥ 3 mm y del 94 % para el VC ≥ 4 (Kalis y col., 2003). Sin embargo, no se evaluó la influencia de esos distintos VCs en la sensibilidad de la metodología (OIE, 2014). Además, se ha identificado que el rendimiento de estas pruebas pueden estar afectadas por mínimas modificaciones antigénicas que existieran entre las distintas series de producción del

antígeno (Kalis y col., 2003). Las similitudes antigénicas entre micobacterias producen que la infección por *M. bovis* interfiera en el diagnóstico de paratuberculosis, especialmente en la prueba de intradermorreacción (Bezós y col., 2012). La prueba de IDR posee una desventaja que corresponde a la necesidad de sujetar en dos momentos a los animales: el primero, para la inoculación, y 72 hs después, para realizar la lectura. Esto incrementa el estrés sometido a los mismos, así como también los costos para el pago de honorarios a veterinarios y peones.

La evaluación de la producción específica de $IFN\gamma$ por linfocitos periféricos provenientes de animales infectados (*ex vivo*) permite que los animales pasen una sola vez por la manga a fin de obtener las muestras de sangre. Existe una prueba comercial diagnóstica de la tuberculosis bovina (Bovigam, Prionics, Zúrich, Suecia) que es ampliamente utilizada a nivel mundial para diagnosticar a la paratuberculosis en bovinos, pero no está validada para esta patología (OIE, 2014).

La especificidad descrita de la prueba de $IFN\gamma$ en bovinos para el diagnóstico de paratuberculosis es de entre 67 y 95 % y la sensibilidad del 13 y 85 % (Kalis y col., 2003; Paolicchi y col., 2003; Huda y col., 2004; Nielsen y Toft, 2008).

Si bien se describe que la evaluación de la respuesta inmune celular específica permitiría identificar animales sospechosos de paratuberculosis subclínica, la aplicación de la prueba de $IFN\gamma$ a rumiantes jóvenes menores a 2 años no es confiable debido a que estos animales producen altas cantidades de $IFN\gamma$ de manera espontánea (Billman-Jacobe y col., 1992). El otro inconveniente que presenta esta técnica es que, al trabajarse con la función biológica de células, se deben procesar las muestras de sangre dentro de las 8 hs de obtenidas. Por lo cual resulta necesario contar con algún laboratorio cercano al establecimiento que posea equipos necesarios para el cultivo celular.

Serología

En cuanto a las técnicas serológicas disponibles, el ELISA es la más sensible y específica (OIE, 2014). El ELISA es muy utilizado dado que presenta grandes ventajas sobre otras metodologías diagnósticas: requiere una sola visita al establecimiento y una sola sujeción de los animales, las muestras pueden ser congeladas (facilitando de esta manera el transporte, la automatización de la prueba y su repetitividad), y se pueden evaluar muchas muestras al mismo tiempo de manera rápida, económica y con alto rendimiento.

Se describe una relación directa entre la excreción fecal de *Map* y los niveles de Acs séricos (Ganusov y col., 2015) y la sensibilidad del ELISA (Sweeney y col., 1995; Kalis y col., 2002; Collins y col., 2005). Se estimó que el 30 – 40 % de los bovinos positivos al cultivo de muestras de MF también se detectan mediante el ELISA (Whitlock y col., 2000).

Un estudio realizado en Australia demostró que la sensibilidad del ELISA en bovinos de 2, 3 y 4 años de edad fue del 1, 9 y 12 %, respectivamente; mientras que en bovinos de mayor edad, la sensibilidad fue de entre el 20 y 30 % (Jubb y col., 2004). Nielsen y Toft (2008) revisaron la bibliografía publicada sobre las herramientas diagnósticas disponibles para paratuberculosis e informaron que la sensibilidad del ELISA en bovinos varía entre el 7 y 94 %. El amplio rango de sensibilidad se debe a la utilización de distintos reactivos, principalmente de antígenos, así como también a las distintas categorías de animales incluidas en el estudio.

A fin de eliminar la reactividad cruzada frente a otras micobacterias, Yokomizo y col. (1985) propusieron un proceso de pre-adsorción de los sueros con *M. phlei*. Este procedimiento disminuye los resultados falsos positivos y aumenta la especificidad del ELISA (Scott y col., 2010). Según Nielsen y Toft (2008), la especificidad del ELISA varía entre el 40 – 100 % de acuerdo con los reactivos utilizados y con las categorías de animales.

Existen varios antígenos que pueden utilizarse en el ELISA, sin embargo el antígeno protoplasmático de *Map* (PPA) es el recomendado por la OIE (2008) y el más utilizado a nivel mundial (Gilardoni y col., 2012; OIE, 2014). El PPA corresponde a los antígenos protoplasmáticos o intra-citoplasmáticos solubles de *Map* y se obtienen a partir de realizar la destrucción de la bacteria y la remoción de los restos de pared (OIE, 2008; Bannantine y col., 2010). Este antígeno se ofrece a nivel comercial (Allied Monitor Laboratories Inc., Fállete, Misuri, USA). Diversos autores plantearon la necesidad de identificar nuevos antígenos a fin de mejorar el diagnóstico (Eda y col., 2006; Speer y col., 2006; Scott y col., 2010; Mikkelsen y col., 2011). La utilización en ELISA de antígenos de superficie de *Map* obtenidos por tratamiento con etanol mostraron una sensibilidad (94 – 97 %) y una especificidad (100 %) altas (Eda y col., 2006; Speer y col., 2006; Scott y col., 2010).

Nielsen y Toft (2008) resumieron los datos de sensibilidad y especificidad para algunos ELISAs comerciales a partir de trabajos publicados hasta ese momento (Tabla 1). Como puede verse, estos ELISAs comerciales son sensibles para detectar a los bovinos con paratuberculosis clínica (77 - 87 %).

ELISA comercial	%	Bovinos excretores de <i>Map</i> por MF	Bovinos con paratuberculosis clínica
Herdcheck	Sensibilidad	24 – 74	87
	Especificidad	83 – 98	-
Paracheck	Sensibilidad	24 – 84	77
	Especificidad	98 – 99	-
Pourquier	Sensibilidad	28	-
	Especificidad	-	-

Tabla 1. Sensibilidad y especificidad de tres ELISAs comerciales. Tabla adaptada de Nielsen y Toft (2008). La sensibilidad y la especificidad están expresadas en porcentaje (%) para cada categoría de bovinos en estudio. ELISAs comerciales: Herdcheck (IDEXX Laboratories, Inc., Westbrook, USA); Parachek (Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA); Pourquier (Instituto Pourquier, Montpellier, Francia).

IDEXX desarrolló un nuevo kit de ELISA (IDEXX *Mycobacterium paratuberculosis* Antibody Test Kit) que en suero tiene una sensibilidad del 51,4 % y una especificidad del 99,3 %. Otro kit de ELISA nuevo (Bovicheck *Map* ELISA kit, Biovet, Saint-Hyacinthe, Canadá) que utiliza antígenos obtenidos por tratamiento con etanol, informa que la sensibilidad y especificidad son del 86,7 y 98,9 %, respectivamente.

Existen ELISAs comerciales que permiten estudiar los niveles de Acs específicos en muestras de leche. La especificidad de esta metodología es similar a las de las pruebas séricas mientras que la sensibilidad es algo menor (OIE, 2014).

Prevalencia

La paratuberculosis es una enfermedad endémica a nivel mundial; y es probable que todos los países que utilizan rumiantes como parte de su producción agropecuaria estén infectados con *Map*. La prevalencia de esta patología se encuentra subestimada por la dificultad diagnóstica y varía en función del área geográfica, el tamaño de la muestra, el grupo etario y la metodología diagnóstica empleada.

Para estudiar la prevalencia en los rodeos y con el fin de reducir costos, se propone la evaluación de muestras de MF en grupos o pooles de más de un animal. La agrupación de

muestras de 5 bovinos presenta alta correlación con el cultivo de muestras de MF individual (Wells y col., 2003). Tavoranpanich y col. (2008) proponen la realización del cultivo de 6 muestras de MF obtenidas del medio ambiente para determinar si un rodeo está infectado con *Map*; sin embargo, esta práctica puede fallar en rodeos con baja prevalencia. La evaluación de leche de tanque permite estudiar al rebaño en su conjunto. Sin embargo, se ha descrito que su análisis por cultivo, PCR y ELISA es poco sensible (Barkema y col., 2010; Sweeney y col., 2012).

Varios autores sugieren que la prevalencia de la paratuberculosis está aumentando, pero las estrategias de muestreo y de metodología aplicadas en una misma región difieren entre los estudios disponibles (Barkema y col., 2010). Este incremento en la prevalencia podría estar relacionado con:

- los altos niveles productivos exigidos a bovinos en la actualidad, que podrían generar el estrés desencadenante de la progresión de la patología.
- el uso de nuevas metodologías diagnósticas (más sensibles).
- la evaluación de otras categorías de animales (como bovinos jóvenes).

El Servicio Nacional de Monitoreo de Sanidad Animal de los Estados Unidos (National Animal Health Monitoring System, NAHMS) evaluó establecimientos lecheros ubicados en los principales 17 estados lácteos, que representan al 80 % de las operaciones lecheras y al 83 % de los bovinos del país. El 68 % de los rodeos lecheros tuvieron por lo menos un cultivo ambiental positivo. La prevalencia a nivel de rodeo aumentó con el tamaño del rodeo (número de bovinos / rodeo): 63, 75 y 95 % para los rodeos con < 100, 100 - 499 y > 500 vacas, respectivamente (NAHMS, 2007). A partir de este estudio, sumado a datos holandeses, se concluyó que la prevalencia de la infección por *Map* es probablemente mucho mayor que el 50 % en la mayoría de los países con una industria lechera importante (Barkema y col., 2010).

En Europa se estima que la prevalencia individual es del 3 al 20 % y a nivel de rodeo es mayor al 50 % (Nielsen y Toft, 2009).

Australia presenta bajos niveles de seroprevalencia a nivel de rodeos bovinos: 17 % para los rodeos lecheros y 0,05 % para los rodeos cárnicos (Sergeant y col., 2012)

Existen pocos datos acerca de la situación epidemiológica en América latina. En el sur de Chile se describió una prevalencia de rodeos bovinos lecheros del 27 y 49 % evaluados por

cultivo de muestras de MF obtenida del medio ambiente y por PCR en tiempo real de leche de tanque, respectivamente (Kruze y col., 2013).

Los datos publicados en Argentina son parciales y escasos, sólo tres relevamientos aportan datos de seroprevalencia: uno realizado en Sampacho (suroeste de la provincia de Córdoba), en el que se describió una prevalencia serológica del 0,3 % en animales y un 5,3 % en establecimientos (Magnano y col., 2002); otro realizado en rodeos de cría de la Cuenca del Salado (provincia de Buenos Aires) en el que se informa una seroprevalencia entre 7,2 y 19,6 % (Paolicchi y col., 2004); y el tercero en rodeos lecheros de la provincia de Corrientes, en el que se detectó una seroprevalencia individual del 7,6% (Martinis Mercado y col., 2014).

El Laboratorio de Bacteriología del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) de Balcarce, a cargo del Ms. Fernando A. Paolicchi, estudió 114.833 sueros bovinos de distintas regiones de la Argentina e indicó una seroprevalencia individual del 7,9 %. Además, evaluaron cómo impacta el sistema de producción y detectaron una seroprevalencia del 7 % en los rodeos de cría mientras que en los lecheros fue del 17,1 % (Paolicchi, Comunicación personal).

En la Figura 4 se muestra los países que reportaron la paratuberculosis (en animales domésticos y silvestres) a la OIE en el semestre comprendido entre Enero y Julio de 2015 (OIE, 2015).

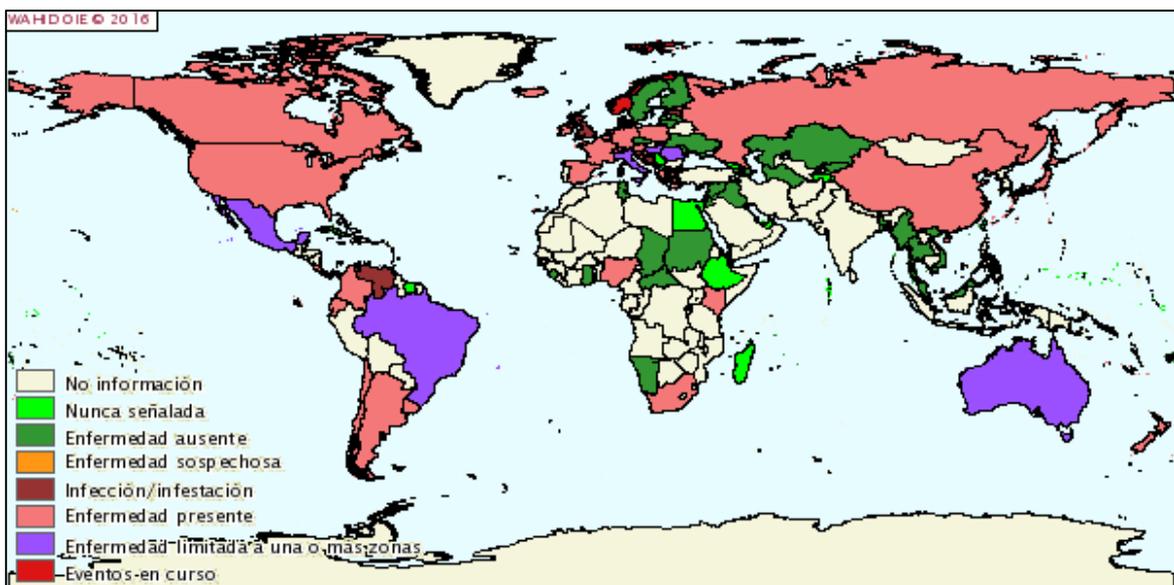


Figura 4. Mapa de distribución de la paratuberculosis: período de Enero – Junio de 2015 para animales domésticos y silvestres (OIE, 2015).

Control de la paratuberculosis

El control de la paratuberculosis es sumamente engorroso y requiere del desarrollo de programas de control sustentados por el gobierno para proporcionar ayuda logística, administrativa y financiera. Sólo Estados Unidos, Australia y varios países de Europa (Figura 5) cuentan con estos programas.

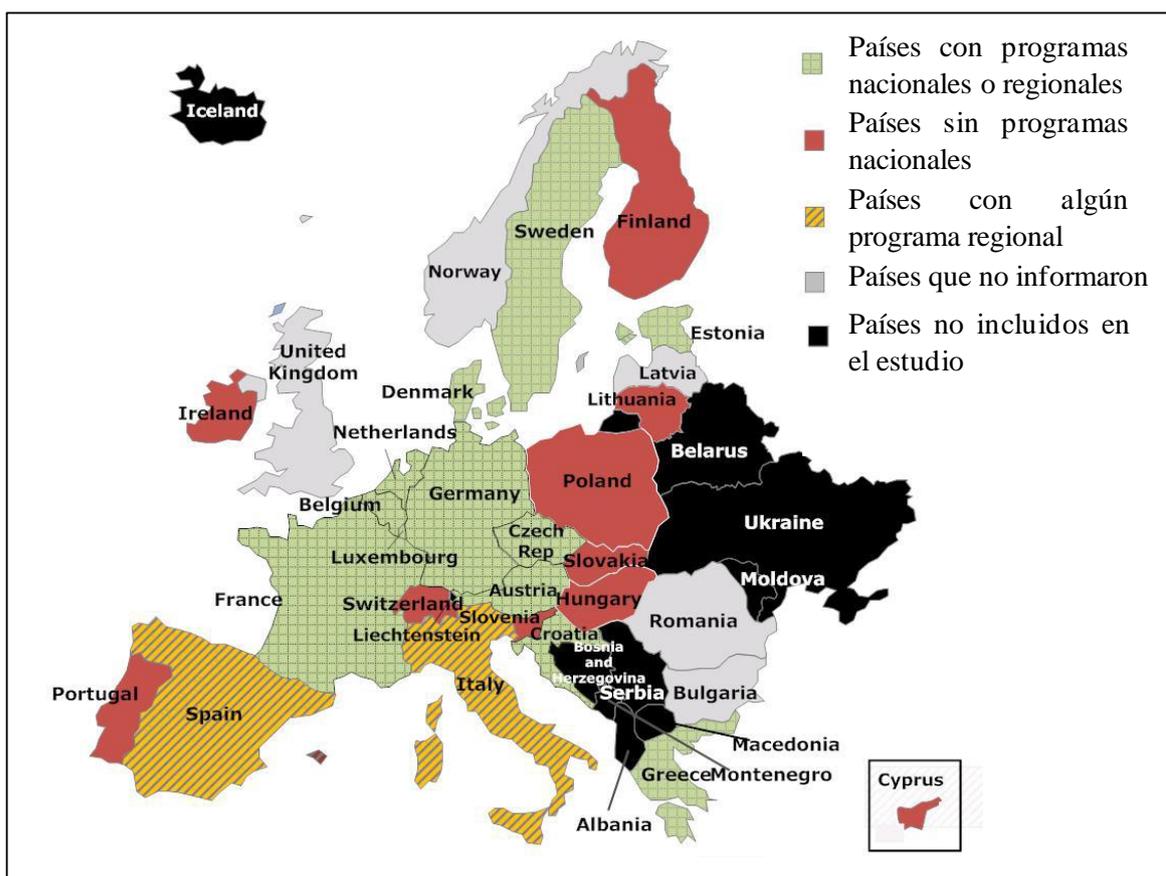


Figura 5. Países europeos que cuentan e implementan programas de control de la paratuberculosis. Imagen modificada de Nielsen (2009).

Algunas de las estrategias sugeridas para el control de la paratuberculosis en el ganado bovino son:

- 1- Prevenir nuevas infecciones: introducir cambios en el manejo.
- 2- Eliminar animales infectados: aplicar pruebas diagnósticas para su detección.
- 3- Reemplazo con animales certeramente no infectados.
- 4- Mejorar la resistencia a la paratuberculosis.

1- Prevención de nuevas infecciones

Considerando que el parto y la lactancia son dos momentos estresantes para las hembras que podrían inducir al avance de la patología hacia el estadio clínico, y que las madres estarían en contacto con los animales más susceptibles a la infección (neonatos), se deben implementar buenas prácticas de limpieza y desinfección de las instalaciones. Se recomienda además, ubicar en potreros “limpios” (que no hayan albergado a animales adultos ni sospechosos de estar infectados con *Map*) a las madres prontas a parir así como también a terneros neonatos y jóvenes. El aislamiento espacial es necesario para evitar el riesgo de transmisión por aerosoles.

Otras sugerencias son: separar tempranamente a los terneros de sus madres y alimentar a neonatos con calostro/leche de sus madres, de madres sustitutas o de bancos libres de *Map*. Además, el calostro y la leche de reemplazo deben ser pasteurizados (65,5°C durante 30 minutos o 72°C durante 15 segundos) a fin de disminuir el riesgo de transmisión. Sin embargo, es de considerar que el proceso de pasteurización disminuye el riesgo de infección de los terneros, pero no lo elimina totalmente (Chidini y Hermon-Taylor, 1993; Grant y col., 1996). Algunos autores proponen la utilización de plasma en reemplazo del calostro ya que reduce la probabilidad de infección (Pithua y col., 2009).

Los rodeos lecheros presentan características de manejo que expone mayor riesgo de contraer la enfermedad dado que los animales comparten periódicamente un lugar de reunión, están expuestos a un contacto cercano desde el inicio de su vida y permanecen durante un período prolongado en el establecimiento. Mientras que, los riesgos relacionados al manejo de los rodeos de cría son menores debido a que los animales permanecen menor cantidad de tiempo en el establecimiento y la posibilidad de contacto entre animales excretores (generalmente adultos) y susceptibles es menor. Sin embargo, hay que considerar que el tiempo de permanencia de los terneros con sus madres es mayor.

La capacitación del personal de los establecimientos es una tarea fundamental para lograr los cambios en el manejo.

2- Eliminación de animales infectados

Se deben aplicar pruebas diagnósticas a fin de identificar a aquellos infectados con *Map* y eliminar a los positivos. Dado que ninguna metodología diagnóstica es 100 % sensible y específica, para controlar la paratuberculosis se deben repetir las evaluaciones diagnósticas

cada 6 meses a un año, durante años. A continuación, se resumen las sugerencias realizadas por la OIE (2014) en cuanto los métodos diagnóstico disponibles y las recomendaciones según el propósito de uso (Tabla 2). La utilización del ELISA es recomendada para realizar la vigilancia epidemiológica, así como para identificar a bovinos positivos en rodeos infectados con más del 5 % de prevalencia. Mientras que, para realizar el estudio en rodeos libres o con una prevalencia menor al 5 %, la mejor metodología diagnóstica recomendada es el cultivo de muestras de MF (Sweeney y col., 2012).

Metodología	Aplicación para la evaluación de				
	Rodeos libres	Bovinos previo al movimiento	Políticas de Erradicación	Confirmación de caso clínico	Prevalencia Vigilancia epidemiológica
Cultivo	+++	+++	+	+++	+
PCR	+	+	+	++	+
ELISA	++	+	+	+	+++
Producción de INF γ	-	-	+	-	-
Intradermorreacción	-	-	+	-	-

Tabla 2. Métodos disponibles para el diagnóstico de paratuberculosis y su propósito. Tabla modificada de OIE (2014). +++: Método recomendado; ++: método adecuado; +: podría usarse en ciertas situaciones pero el costo, la confiabilidad, u otro factor, limitan seriamente su aplicación; -: método no apropiado para este propósito.

3- Reemplazo con animales certeramente no infectados

Las prácticas de bioexclusión se encuentran entre las medidas importantes para evitar el ingreso del microorganismo al establecimiento a través del material biológico (animales de reposición, control de la fauna silvestre, etc.). Sin embargo, uno de los problemas más importantes para lograr el saneamiento de los rodeos es la identificación de los animales que se encuentran en estadio subclínico. Por lo tanto, el desarrollo de herramientas diagnósticas eficientes y precoces es necesario para la compra de ganado de “bajo riesgo”.

4- Mejorar la resistencia a la paratuberculosis

Si bien existen vacunas que han demostrado disminuir la cantidad de *Map* excretada y la progresión de la patología hacia el estadio clínico, no previenen la infección, la excreción de *Map* e interfieren en el diagnóstico de la tuberculosis (Bastida y Juste, 2011). Este hecho impide su aplicación en nuestro país, donde la prueba de intradermorreacción utilizando la PPD de *M. bovis* (PPDb) constituye el pilar fundamental para el control de la tuberculosis bovina (según el Plan Nacional de Control y Erradicación de la Tuberculosis Bovina de la Argentina. Resolución n° 128/2012, Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria, SENASA; SENASA, 2012).

La detección de animales genéticamente resistentes está en estudio (Kirkpatrick, 2010). Sin embargo, no se debe dejar de considerar la selección de animales resistentes como una posible futura medida de control.

Impacto de *Map* en la Salud Pública

En 1913 se informó una enfermedad que afectaba a humanos, la cual se caracterizaba por la presencia de una enteritis granulomatosa crónica y mostraba signos clínicos y lesiones histopatológicas similares a la paratuberculosis en bovinos. Chiodini y col. (1984b) aislaron *Map* a partir de intestinos de pacientes con esta patología, que fue luego denominada enfermedad de Crohn (Chiodini, 1989).

Numerosos estudios investigaron por diversos métodos la presencia de *Map* en diferentes muestras de tejidos de pacientes con la enfermedad de Crohn. Sin embargo, el papel de esta bacteria en esta enfermedad de los seres humanos aun está en discusión (Sweeney y col., 2012; Liverani y col., 2014; Waddell y col., 2015).

La susceptibilidad del ser humano tanto genética como inmunológica, parecería ser esencial para que el *Map* pueda sobrevivir a la fagocitosis y al estallido respiratorio. Además, se demostró que existe relación entre la mutación de una proteína CARD15/NOD2 y el riesgo de contraer enfermedad de Crohn, por lo que este dato demuestra la importancia de la interacción huésped-patógeno (Maeda y col., 2005).

Existe preocupación por el posible riesgo para la salud pública que esta bacteria representa ya que es indudable la exposición humana a este agente dado que *Map* se halló en productos alimenticios de origen animal (Shankar y col., 2010; Paolicchi y col., 2012; Cirone y col., 2013), así como también en agua corriente (Aboagye y Rowe, 2011). Además, los humanos están expuestos a través de aerosoles ambientales y de animales (Rhodes y col., 2014). Bannatine y col. (2014) han aislado y secuenciado el genoma completo de *Map* a partir de la leche de una mujer con la enfermedad de Crohn, aportando nuevas evidencias sobre las similitudes de la enfermedad de Crohn en humanos y la paratuberculosis en el ganado.

Los principales factores de riesgo son la ingestión de leche no pasteurizada o subproductos crudos, y la inhalación por vía aerógena, ya sea a través del contacto con animales enfermos o aerosoles producidos en la playa de faena de los frigoríficos y salas de ordeño.

Impacto económico

Las pérdidas económicas se generan por la disminución en la producción láctea y cárnica, por el incremento de infertilidad, de los intervalos entre partos, de la incidencia de mastitis y otras enfermedades infecciosas, así como el menor valor comercial de la canal. Además, la paratuberculosis incrementa la tasa de descarte y disminuye a la mitad la expectativa de la vida productiva de los animales infectados. Ésto limita la diversidad genética e incrementa los costos por reposición. Asimismo, se deben adicionar los costos asociados al tratamiento, al diagnóstico y a los honorarios a veterinarios (Benedictus y col., 1987; Ott y col., 1999; Johnson-Ifearulundu y col., 2000; Lombard y col., 2005; Weber, 2006).

Las verdaderas pérdidas económicas resultan muy difíciles de calcular dado que la mayoría de los animales infectados pertenecen al estadio subclínico.

El NAHMS informó que las pérdidas económicas debidas a la paratuberculosis en establecimientos de bovinos lecheros con bajos niveles de eliminación de animales por paratuberculosis clínica son de US\$ 40 por bovino, mientras que en rodeos con alta tasa de descarte por paratuberculosis clínica es de US\$ 227 (NAHMS, 1997). Ott y col. (1999) indicaron que, en promedio, las pérdidas ocasionadas por la paratuberculosis en lechería de los Estados Unidos son de entre US\$ 22 – 27 por vaca por año. Y el impacto a nivel nacional se informó en US\$ 200 - 250 millones anuales.

Nuestro grupo ha evaluado el impacto productivo y económico de la patología en 182 vacas de tres establecimientos lecheros ubicados en la provincia de Buenos Aires. Las vacas seropositivas produjeron 1.373 Kg de leche menos por año, lo que representa una pérdida económica anual de US\$ 6.862 para los tres establecimientos (Villamar Manrique, 2015). A nivel nacional, las pérdidas económicas por año provocadas por la enfermedad se han estimado en US\$ 14,3 a 23,3 millones (Passucci y col., 2007). Estos datos demuestran el alto impacto de la paratuberculosis y la necesidad de plantear medidas para su control.

Importancia de la especie bovina y del control de la paratuberculosis en la Argentina

Los rumiantes convierten la celulosa y hemicelulosa en energía y en proteínas de alto nivel biológico. Por lo tanto, su producción resulta muy ventajosa para obtener productos alimenticios de alta calidad para la población humana.

En el año 2006 la población urbana mundial superó a la rural y se espera que en el 2030 el 60 % de la población mundial resida en zonas urbanas. El incremento en el ingreso *per cápita* de los países emergentes permitirá basar la dieta en lácteos y proteínas animales. Por esto, es necesario contar también con técnicas de diagnóstico rápidas y fiables, que permitan garantizar la calidad sanitaria de los alimentos de origen animal. En este contexto, la mejora en la identificación de animales infectados con agentes productores de zoonosis o que impactan en la producción debe considerarse una prioridad.

En la Argentina hay 42.503.917 cabezas de ganado bovino distribuidos en 154.541 establecimientos, según la Encuesta Nacional Agropecuaria realizada el año 2008 por el Instituto Nacional de Estadística y Censos (INDEC). El “Plan Nacional de Control y Erradicación de la Tuberculosis Bovina en la República Argentina” aprobado en el año 2012 por SENASA (Res. SENASA 128/2012) propone como principal técnica diagnóstica la intradermorreacción simple con el PPD_b y la eliminación de los animales positivos. Diferentes autores han encontrado que esta herramienta no permite discriminar correctamente entre los animales infectados con *M. bovis* y aquellos infectados con *Map* en rodeos con co-infección de tuberculosis y paratuberculosis (Seva y col., 2014).

El Plan Nacional “Argentina innovadora 2020” cita a la paratuberculosis como enfermedad a incluir dentro de los planes de control nacional (MINCYT, 2013). Además, esta enfermedad está incluida en la lista de enfermedades de importancia para el comercio internacional de la OIE (2014).

Respuesta Inmune Humoral en Bovinos

La especie bovina se describen siete isotipos de inmunoglobulinas: IgM, IgD IgG1, IgG2, IgG3, IgE e IgA. Estas glicoproteínas desempeñan múltiples funciones entre ellas: como receptores celulares específicos del LB (BCR) o como proteínas secretadas por plasmocitos pudiendo formar complejos inmunes con los antígenos específicos (Tizard, 2013). Las diferencias isotípicas son estructurales y están relacionadas con la función de cada uno de los Acs (Figura 6). Los hidratos de carbono ubicados en los sitios conservados de glicosilación de la porción Fc de los Acs afectan su reconocimiento por los RFc (Kacskovics, 2004).

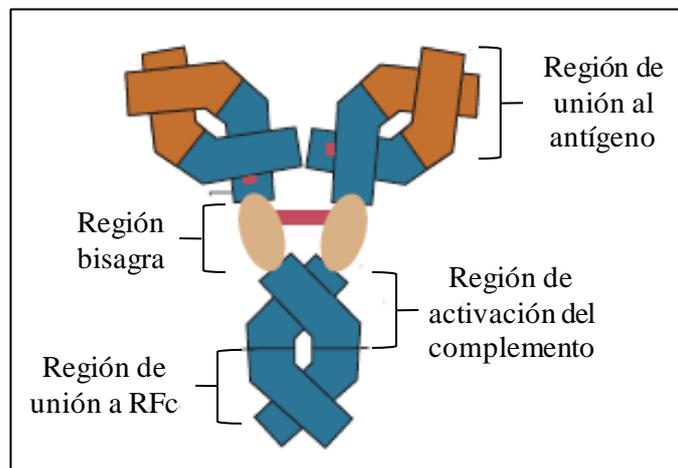


Figura 6. Estructura de una molécula de IgG y sus regiones relevantes para desempeñar las diferentes funciones. Imagen adaptada de Tizard (2013).

La regulación de la expresión de los diferentes isotipos es compleja y multifactorial. La IgM es el primer isotipo que producen y secretan los LB2 durante la respuesta primaria. Luego, a medida que avanza la respuesta, cambia el isotipo a IgG1, IgG2, IgG3, IgE o IgA, según las citoquinas circulantes.

En los bovinos se asocia al perfil Th2 con el isotipo IgG1, mientras que al perfil Th1 se lo relaciona con el isotipo IgG2. El $IFN\gamma$ (producido por los LTh1) induce el cambio del isotipo hacia IgG2 (Estes y Brown, 2002). La acción de estos linfocitos es crítica en la respuesta contra infecciones bacterianas agudas en el bovino, dado que la IgG2 actúa como opsonina para la fagocitosis por parte de los neutrófilos, co-adyuvando este efecto, el $IFN\gamma$

activa a los neutrófilos para matar las bacterias que han sido fagocitadas (Ellis y Beaman, 2004).

La distribución de los diferentes isotipos en las distintas muestras biológicas se relaciona con la estructura, el sitio de producción y la función que cumplen en la especie bovina (Tabla 3). En muestras de sueros de bovinos sanos, predominan los isotipos IgG1 e IgG2, los que se encuentran en similares cantidades. La IgA es la de mayor concentración en lágrimas, secreciones nasales, bronco-alveolares y saliva. Mientras que la IgG1 predomina en calostro y leche. En el tracto gastrointestinal, similares cantidades de IgG1 e IgA fueron descriptas (Butler, 1983).

Muestra	IgM	IgG1	IgG2	IgA
Suero	3,05	11,20	9,20	0,37
Calostro	6,77	46,40	2,87	5,36
Leche	0,09	0,58	0,06	0,08
Secreción nasal	0,04	1,56	ne	2,81
Saliva	0,01	0,03	0,02	0,34
Lágrima	0,18	0,03	0,01	2,72
Orina	Trazas	0,01	trazas	0,00
Bilis	0,05	0,10	0,09	0,08
Secreción vaginal	Ne	0,23	0,13	0,90
Fluido bronco-alveolar	0,03	0,08	0,10	0,30
Fluido intestinal	Trazas	0,25	0,06	0,24

Tabla 3. Concentraciones (mg / mL) de IgM, IgG1, IgG2 e IgA en las distintas muestras biológicas de bovinos sanos. Tabla modificada de Butler (1983). ne: no evaluado.

IgM

La IgM es el primer isotipo que se secreta en una respuesta inmune humoral y es el isotipo característico de los Acs naturales generados por los LB1 en respuesta a antígenos glicolipídicos. La IgM presenta una estructura pentamérica; el péptido llamado J es el involucrado en la polimerización de este isotipo. Koti y col. (2010) describieron una particularidad de la IgM en la especie bovina: las regiones determinantes de complementariedad de la cadena pesada 3 (CDRH3) son más largas. La IgM muestra baja

afinidad pero alta avidéz por el antígeno, dado que las posibilidades de interacción son de por lo menos 5 epitopes. Este isotipo actúa principalmente en el compartimiento intravascular debido a su alto peso molecular (1.030 kDa), pero en situaciones de procesos inflamatorios con aumento de la permeabilidad vascular puede acceder al lecho extravascular. Cuando la IgM junto con el antígeno conforman el complejo inmune, actúa en forma muy eficiente tanto en la activación de la vía clásica del complemento como en la neutralización de microorganismos o toxinas (Butler, 1983).

IgD

Existen poco estudios con respecto a la IgD en bovinos. El gen fue descrito por Zhao y col. en el año 2002. Recién en 2012, Xu y col. desarrollaron un Ac que permitió identificar su expresión como glicoproteína constitutiva del receptor de LB y como glicoproteína soluble en sangre periférica y bazo de algunos bovinos.

IgG

Este isotipo es el que se encuentra en mayores concentraciones en el suero: representa aproximadamente el 30 % de las proteínas séricas totales. La IgG muestra una estructura monomérica, por lo que su peso molecular aproximado es de 157 kDa y puede actuar tanto en el compartimiento intravascular como en el extravascular. Es eficiente en la neutralización y en la activación del complemento, así como también en inducir una citotoxicidad celular dependiente de Acs (CCDA), debido a que se puede unir a RFc y desencadenar respuestas varias según el receptor y la célula implicados (Butler, 1983).

Se conocen 3 isotipos de IgG bovinas: IgG1, IgG2 e IgG3 (Butler, 1986; 1987; Mundo, 2005). La comparación de secuencias entre $\gamma 1$ y $\gamma 2$ muestra diferencias fundamentalmente en la región o dominio constante (CH) 2 de la cadena pesada (CH2) y en la región bisagra.

IgG1

La IgG1 bovina es el isotipo que se encuentra en mayores concentraciones en calostro y leche. Este isotipo representa más del 95 % de las proteínas totales del calostro, el cual alcanzarían a partir del suero mediante un transporte selectivo (ver página 54). A nivel intestinal también es relevante, mostrando similares cantidades al isotipo IgA. En el tracto

respiratorio la IgG1 es la principal opsonina para macrófagos alveolares, mientras que la IgA cumple un papel secundario en dicha función (Butler, 1983).

IgG2

La IgG2 bovina presenta una región bisagra más corta, es considerada citofílica para neutrófilos y una potente opsonina para los fagocitos (Watson, 1976; Lascelles, 1979). La IgG2 mostró una eficiencia mayor a 100 veces en relación a la IgG1 en reacciones de CCDA (Butler, 1983). Su producción se relaciona con la protección frente a infecciones piógenas y frente a *Haemophilus sonnus* (Berghaus y col., 2006).

IgG3

Este isotipo fue inicialmente identificado como IgG2b (Butler y col., 1987) y fue reconocida como subclase IgG3 por un suero policlonal y por un clon genómico único que no era ni IgHG1 ni IgHG2 (Knight y col., 1988). Posteriormente se informó la estructura y el polimorfismo del gen IgHG3 obtenido a partir de una biblioteca de bazo bovino, de linfocitos periféricos, y una línea celular productora de IgG3 (Rabbani y col., 1997). El gen que codifica para IgG3 presenta un sitio adicional de glicosilación en el dominio CH3. Poco se conoce de sus niveles de expresión, pero se considera que su concentración en suero es baja. Los datos funcionales de este isotipo son escasos pero presenta una mayor longitud de la zona de la bisagra, la que permitiría una mayor flexibilidad de la molécula y por lo tanto la IgG3 podría ser más efectiva en la formación de los inmunocomplejos. Sin embargo, debido a que la bisagra es el sitio preferencial de proteólisis, la IgG3 podría ser más lábil.

IgA

La IgA es dimérica en suero (Butler, 1983), pero se han descrito polímeros mayores. La IgA secretoria bovina está compuesta por dos monómeros unidos por el péptido J y una molécula de glicoproteína α o el componente secretor que corresponden a una parte receptor de poli-Ig (RpIg), el cual se encarga de la transcitosis de la IgA a través de las células epiteliales. La IgA en secreciones intestinales se produce principalmente a nivel local, mientras que la mayor parte de la IgG1 deriva del plasma.

IgE

La IgE se encuentra en muy bajas cantidades en el suero dado que es un isotipo homocitotrópico responsable de la hipersensibilidad de tipo I y cumple un papel importante en la defensa frente a parásitos así como bacterias y virus, y en la reacción a alérgenos que ingresan por vía aerógena (Gershwin, 2009; Tizard, 2013).

Receptores para los Ac

Todas las células hematopoyéticas expresan en sus membranas RFc, los que juegan un papel muy importante en la respuesta inmune, pues son el nexo entre el complejo inmune y la maquinaria efectora celular, constituyendo un lazo fundamental entre la inmunidad humoral y celular. La mayoría de estos receptores actúan mediante la fosforilación de secuencias de activación del receptor inmune (ITAM) y producen la activación de los mecanismos efectores celulares tales como la fagocitosis, la CCDA y la liberación de citoquinas y otros mediadores de la inflamación. Sin embargo, hay trabajos que demuestran que motivos ITAM, bajo ciertas condiciones, pueden inhibir la señalización en lugar de provocar la activación celular. Por ejemplo, las interacciones de baja avidéz de la IgA sérica con el RFc α (Steevels y Meyaard, 2011).

En bovinos se han descrito los siguientes RFc:

- RFc γ I (CD 64): son receptores de alta afinidad por lo que se activan mediante la unión con IgG monomérica, y su importancia radica en su pronta participación en la respuesta inmune dado que se activaría ante el contacto con bajas concentraciones de Acs. En bovinos se demostró su expresión en macrófagos alveolares y linfocitos. Sin embargo, dado que es un receptor conservado respecto al de humanos y ratones, su presencia también podría involucrar a células dendríticas, monocitos, macrófagos y neutrófilos (Kacs Kovics, 2004).

- RFc γ II (CD 32): se expresan en LB, monocitos, macrófagos alveolares, células dendríticas, células dendríticas plasmocitoides y neutrófilos (Kacs Kovics, 2004; Chattha y col., 2010; Reid y col., 2011; Robinson y col., 2011). Se demostró la participación de los RFc γ II en la infección de células dendríticas por el virus de la Fiebre Aftosa opsonizado con Acs específicos (Robinson y col., 2011). Además, dada la similitud del RFc γ II de bovinos con el RFc γ IIB de humanos y ratón, los RFc γ II podrían mediar efectos inhibitorios en LB activados (Muta y col., 1994) mediante secuencias presentes en su cola intracitoplasmática denominados ITIM (motivos de inhibición basados en tirosinas del receptor inmune).

- RF γ III (CD16): se expresan en LT $\gamma\delta$, monocitos, macrófagos alveolares y células natural killer o asesinas naturales (NK; Kacs Kovics, 2004). En cuanto a su función, se mostró que células CD16+: NK de linfonódulos y monocitos de sangre periférica de bovinos ejercen sus mecanismos efectores como ser, los citotóxicos, de endocitosis y de secreción de citoquinas (Boysen y col., 2008; Connelley y col., 2014; Corripio-Miyar y col., 2015).

-RF γ 2: se expresan en macrófagos alveolares y se unen con el isotipo IgG2 (no lo hacen con el IgG1) y promueven la fagocitosis y la CCDA (Zhang y col., 1994; Kacs Kovics, 2004).

-RF α I (CD89): se demostró que su estructura es similar al receptor de humanos. En esta última especie, la unión del complejo IgA-antígeno al RF α I activa a la célula induciendo a la fagocitosis, ADCC y la secreción de mediadores de la inflamación (Morton y col., 2005).

-RF ϵ I: son receptores de alta afinidad para la IgE que se ubican en mastocitos, basófilos y eosinófilos activados. Participan en las hipersensibilidades de tipo I (Kacs Kovics, 2004).

-RF ϵ II: es el receptor para IgE de baja afinidad. El RF ϵ II se expresa en LB previo al cambio de isotipo, así como también en monocitos, eosinófilos y plaquetas, y juega un papel importante en la activación del LB y en la producción de IL4. Este receptor está involucrado en las alergias en bovinos (Watson y col., 2000).

Otros tipos de RFc presentan otras funciones como, por ejemplo, el transporte de los Acs hacia las superficies mucosas y epiteliales:

-El RIgp: se expresa en el lado basal de células epiteliales de la superficie mucosa y realizan el transporte de los Acs poliméricos, principalmente de IgA. En la membrana apical de la célula epitelial, se cliva el dominio externo del RIgp. Éste permanece unido al Ac transportado (IgA o IgM), se denomina componente secretorio (CS) y protege al Ac de la proteólisis (Kacs Kovics, 2004; Tizard, 2013). Este receptor también juega un papel importante en la primera línea de defensa en la cavidad oral de bovinos mediante el transporte de IgA en las glándulas salivares (Sakaguchi y col., 2013).

-El RFc neonatal (RFcn): está implicado en la transferencia de Acs a neonatos así como en la protección de IgG de la degradación. En la glándula mamaria de bovinos, el RFcn realiza la transcitosis de IgG1 desde la circulación sanguínea hacia el calostro o la secreción láctea (Butler y Kehrlí, 2005). Luego de la ingestión de calostro, los Acs atraviesan la mucosa intestinal de manera no específica o independiente del RFcn (Cervenak y Kacs Kovics, 2009). El RFcn también ha sido identificado en otras mucosas (Kacs Kovics, 2004) así como en hepatocitos, monocitos, macrófagos y células dendríticas, y se postuló

Introducción

Respuesta Inmune Humoral en Bovinos

que activa la fagocitosis en neutrófilos (Vidarsson y col., 2006). El RFcn está involucrado además en la homeostasis de las IgGs bovinas, protegiéndolas de la proteólisis. La IgG2 muestra una vida media un poco mayor a la IgG1 y se cree que el RFcn sería el responsable de esta diferencia, dado que la IgG2 se une de manera más fuerte al mismo (Cervenak y Kacs Kovics, 2009).

Composición antigénica de *Map*

Debido a la estrecha relación genética entre los miembros del género, *Map* comparte numerosos antígenos con otras micobacterias, principalmente con aquellas que integran Complejo *M. avium*.

La pared celular de *Map* es compleja y se encuentra organizada de la siguiente manera (desde el interior de la bacteria, Figura 7):

- Membrana citoplasmática: se compone de manera similar a otras bacterias.
- Esqueleto de la pared: se forma por la unión del peptidoglicano con el arabinogalactano.
- Bicapa lipídica asimétrica: en su capa interna se ubican principalmente fosfolípidos y ácidos micólicos, los cuales se unen al complejo peptidoglicano-arabinogalactano. La capa externa se conforma por lípidos que son fácilmente extraíbles con solventes.
- Cápsula: se compone de glúcidos y proteínas.

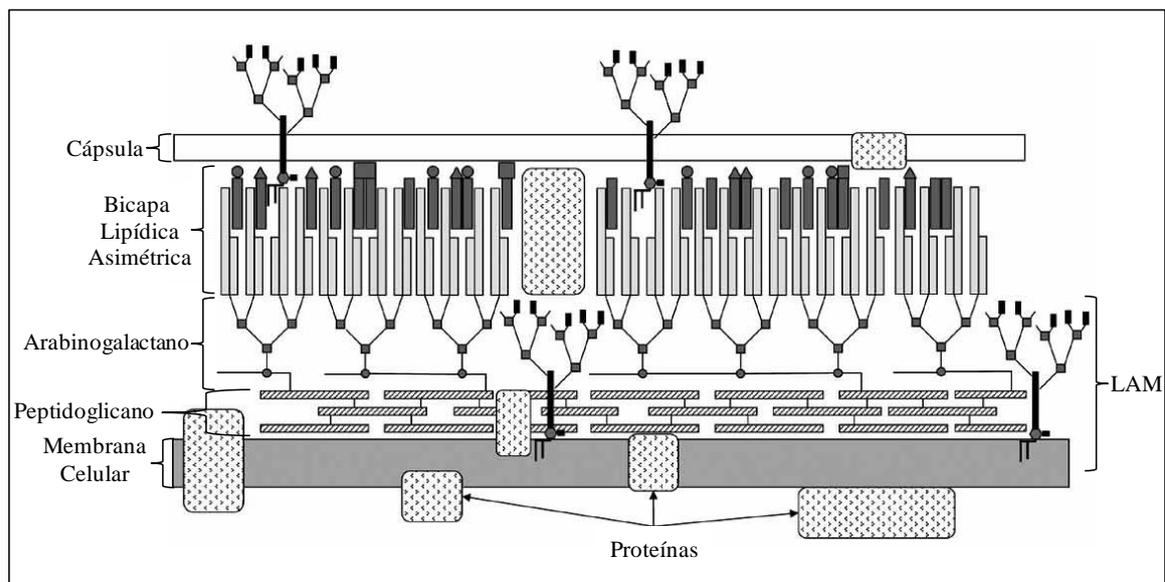


Figura 7. Estructura de la pared celular micobacteriana. Imagen adaptada de Brennan y Crick (2007). LAM: lipoarabinomanano.

Entre los principales antígenos de la pared del *Map*, se describe al lipoarabinomanano (LAM). Nuestro grupo trabajó con esta molécula y mostró que presenta una actividad inmunomoduladora (Colavecchia y col., 2012) e induce la producción de Acs, que disminuyen la viabilidad intracelular de *Map* en macrófagos bovinos (Jolly y col., 2011).

Las proteínas, a diferencia de hidratos de carbono y lípidos, son antígenos T-dependientes, por lo que la respuesta inmune humoral que inducen suele ser mejor en el sentido de los isotipos de Igs que se producen, así como su afinidad y niveles (Tizard, 2013).

Las proteínas de *Map* se hallan en las distintas estructuras de la pared (Figura 7). La proteína p34 se encuentra ubicada en la superficie celular y en el fluido extracelular en fase de crecimiento estacionario (de Kessel y col., 1993). La región amino-terminal es hidrofóbica y se encuentra alojada en la envoltura de *Map*, mientras que el extremo carboxi-terminal (hidrofílico) se halla expuesto en la superficie celular (Gilot y col., 1993). La proteína p34 carboxi-terminal fue identificada como específica de *Map* e inmunodominante para células B bovinas (de Kessel y col., 1993; Ostrowski y col., 2003; Mundo y col., 2008).

Las proteínas de shock térmico (Hsp) se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza y son moléculas sumamente conservadas (entre micobacterias, otros procariontes y proteínas eucariotas). La expresión de Hsp se incrementa durante los procesos de estrés celular en ambos, procariontes y eucariotas. Las Hsp se ubican principalmente a nivel del citosol y cumplen funciones de chaperonas, participando en modificaciones postraduccionales durante la síntesis de proteínas.

La similitud entre la Hsp de 65 kDa de micobacterias y su homólogo en mamíferos muestran aproximadamente un 60 % de identidad (Zügel y Kauffman, 1999a), mientras que entre la Hsp65 de *Map* (Hsp65) con las de *M. tuberculosis*, *M. leprae* y *M. avium* 18 son del 93, 89 y 98 %, respectivamente (el-Zaatari y col., 1995). En el extremo amino-terminal, se describió una similitud de apenas el 46 % en relación a la Hsp65 de *M. leprae*. Y además, es la región que mayor variación presenta entre las bacterias del complejo de *M. avium* (Turunne y col., 2006).

Las Hsp son consideradas antígenos inmunodominantes en muchas enfermedades infecciosas (Zügel y Kauffman, 1999b; Quintana y Cohen, 2011), pero principalmente en aquellas generadas por micobacterias (Koets y col., 1999 y 2001; Afzal col., 2015). En cuanto a la paratuberculosis, el-Zaatari y col. (1995) evaluaron la reactividad de sueros de distintas especies frente a la Hsp65 y detectaron como positivos a: 5/25 bovinos con paratuberculosis subclínica, 3/10 bovinos con paratuberculosis clínica, 2/2 ovinos con paratuberculosis, 1/2 caprinos con paratuberculosis y 7/13 seres humanos con enfermedad de Crohn. En ovinos infectados con *Map* se ha identificado respuesta inmune celular específica frente a Hsp65 (Colston y col., 1994b). En bovinos con paratuberculosis

subclínica también se describió un incremento en la respuesta inmune celular específica para la Hsp65 y la Hsp de 70 kDa (Hsp70; Koets y col., 1999). En cuanto a la respuesta inmune humoral, Koets y col. (2001) identificaron aumentos en los niveles de IgG1 específica frente a Hsp65 y de IgG2 específica frente a Hsp70 en sueros de bovinos infectados con *Map* en estadio subclínico.

Las Hsp65 de las micobacterias presentan epitopes conservados y no conservados. Ambos epitopes son capaces de estimular la respuesta inmune, por lo que, de esta manera se podría generar reactividad cruzada y causar autoinmunidad en el huésped debido a la gran similitud entre las Hsp de eucariotas y procariotas (Cohen, 1991).

Hipótesis y Objetivos

Hipótesis

“El estudio de los anticuerpos de bovinos infectados con *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* o inmunizados con sus proteínas mejora: la comprensión de la respuesta inmune humoral y el diagnóstico de la paratuberculosis”.

1. Las lesiones intestinales generadas en la paratuberculosis en bovinos producen pérdida de proteínas y mala absorción de nutrientes. En los estadios avanzados se detecta una disminución en los niveles de proteínas séricas. A partir de este conocimiento, nuestra primera hipótesis es:

“La infección con *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* disminuye los niveles totales de anticuerpos en bovinos.”

2. El conocimiento de la respuesta inmune humoral que genera la infección con *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* en los diferentes estadios de la patología puede profundizarse, postulamos que:

“El estudio de anticuerpos específicos permite mejorar el diagnóstico tradicional de la paratuberculosis bovina”.

3. El papel beneficioso de la respuesta inmune humoral en las infecciones causadas por bacterias intracelulares es discutido por diversos autores, durante el desarrollo de la presente tesis proponemos aportar evidencias sobre la siguiente hipótesis:

“Los anticuerpos bovinos inducidos por infección o inmunización con proteínas específicas disminuyen la viabilidad intracelular del *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*”.

Objetivos

El objetivo general del trabajo es:

Caracterizar los anticuerpos bovinos totales y específicos frente a *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* y sus proteínas, e identificar su efecto en la viabilidad bacteriana.

Para poder responder cada una de las hipótesis planteadas, en el presente trabajo de tesis se proponen los siguientes objetivos particulares:

1. Identificar el efecto de la infección con *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* sobre los niveles de anticuerpos totales en muestras de suero y materia fecal de bovinos en distintos estadios de la patología.

2. Estudiar la respuesta inmune humoral específica frente a *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* y sus proteínas en bovinos natural y experimentalmente infectados.

a) Determinar los niveles de los isotipos de inmunoglobulinas específicos frente a *Map* y sus antígenos proteicos en muestras de suero y materia fecal de bovinos infectados naturalmente en distintos estadios de la patología.

b) Analizar el uso de la técnica de ELISA de isotipos de IgG específicos frente al antígeno protoplasmático de *Map* en sueros de bovinos naturalmente infectados.

c) Caracterizar la respuesta inmune humoral inducida por la infección experimental con aislamientos locales de *Map* en terneros.

3. Evaluar el efecto de los anticuerpos bovinos específicos frente a *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* y sus proteínas, sobre la viabilidad bacteriana intracelular en un modelo de infección de macrófagos bovinos *in vitro*.

Materiales y Métodos

Producción de reactivos

Para el desarrollo de los objetivos del presente trabajo de tesis se requirió de micobacterias y proteínas recombinantes.

Obtención de *stocks* de micobacterias

Se utilizaron las cepas K10 (ATCC BAA-968, Foley-Thomas, 1995; gentilmente cedida por el Ms. Paolicchi) y ATCC 19698 de *Map*, los aislamientos de *Map* A y C de la Argentina (gentilmente cedidos por el Ms. Paolicchi) y la cepa ATCC 23042 de *M. phlei* (gentilmente cedida por SENASA). Las bacterias fueron cultivadas en medio líquido Middlebrook 7H9 broth (7H9, Difco™, BD biosciences, Franklin Lakes, Nueva Jersey, USA) suplementado con 10 % albumina-dextrosa-cloruro de sodio, a 37°C en agitación (Tabla 4) y en fase exponencial de crecimiento fueron:

- inactivadas por calor (86°C durante 30 min) y almacenadas a -20°C hasta su uso como antígeno en ELISA.

- congeladas, en medio 7H9 con 15 % de glicerol, a -80°C hasta el momento de uso en modelos de infección *in vitro* o *in vivo*.

Bacteria	Suplementos del medio de cultivo 7H9	Aplicadas en
<i>Map</i> K10	micobactina	ELISA
<i>Map</i> ATCC 19698	micobactina	ELISA Modelo <i>in vitro</i>
<i>Map</i> aislamiento A	micobactina piruvato de sodio	Modelo <i>in vivo</i>
<i>Map</i> aislamiento C	micobactina piruvato de sodio	Modelo <i>in vivo</i>
<i>M. phlei</i> ATCC 23042	-	ELISA

Tabla 4. Cepas de micobacterias utilizadas. Suplementos del medio de cultivo 7H9: 2 mg / L micobactina J; 4,1 g / L de piruvato de sodio.

Producción de proteínas recombinantes

Se produjeron las siguientes proteínas recombinantes:

- IgG3 bovina recombinante (IgG3r)
- Proteína de shock térmico de 65 kDa de *Map* recombinante (Hsp65r)
- Proteína p34 carboxi-terminal de *Map* recombinante (p34r)

La metodología de producción en los tres casos fue similar, a saber: todas ellas fueron clonadas en *pRSET A* (Invitrogen Corp., Carlsband, California, USA) y expresadas en *E. coli* BL21 *pLysS*. Su purificación se realizó a través de cromatografías de afinidad a níquel, ya que el plásmido comercial *pRSET A* incorpora una secuencia de seis histidinas, aminoácido que posee afinidad a dicho metal. Para ello, se utilizó la resina His*Bind[®] Resin (Novagen, Merck KGaA, Darmstadt, Alemania). La expresión y purificación de las proteínas recombinantes se confirmó por SDS-PAGE en geles de acrilamida al 12 %. Las proteínas recombinantes se concentraron (mediante la utilización del Amicon[®]Ultra Centrifugal Filtres 30K; Millipore, Carrigtwohill, Co. Cork, Irlanda), se filtraron por 0,22 µm (Millex-GP; Millipore) y se almacenamiento a -80°C hasta el momento de utilización. La metodología utilizada se encuentra detallada en el Anexo Técnico (página 179).

En paralelo, se procedió con el cultivo de *E. coli* BL21 *pLysS* transformadas con el plásmido *pRSET A* sin inserto, de esta manera se obtuvieron bacterias *E. coli* controles. Además, una fracción bacteriana fue tratada con la “solución de pegado desnaturalizante” (página 179, Anexo Técnico) a fin de lisar las bacterias y obtener el denominado “extracto de *E. coli*” que fue utilizado como adsorbente de sueros para eliminar reacciones cruzadas.

Se utilizaron las bacterias transformadas con IgG3-*pRSET A* (Gene Bank Accession U63639) o con p34-*pRSET A* (Gene Bank Accession X68102) previamente producidas en nuestro laboratorio (Mundo y col., 2008).

En el caso de Hsp65r, se trabajó con un fragmento de la Hsp65 de *Map* que pertenece a la región 3` de la proteína dado que se ha descrito que la región 3` de las Hsp65 es la que presenta mayor variación entre bacterias del complejo de *M. avium* (Turunne y col., 2006). La construcción de la Hsp65r se realizó por la amplificación de un fragmento de 1.626 pb a partir del ADN genómico de la cepa K10 de *Map*, que corresponde a los nucleótidos de 124 a 1750 de la secuencia descrita por Colston y col. (Gene Bank Accession X74518; 1994a), y se clonó en el vector PcDNA3 (Sambrook y col., 1989). El clono seleccionado se secuenció

en Genomics Core Research Facility Center for Biotechnology, Universidad de Nebraska, Lincoln.

A partir de la Hsp65-pcDNA3 se amplificó un fragmento de 672 pb que se clonó en el vector *pRSET A* (Invitrogen Corp.; Figura 8). Para ello, se utilizaron los siguientes primers o cebadores: directo 5' CTC GGA TCC GCG GTA AAG GTC ACG TTG G 3' (introduce un sitio de restricción *Bam*HI) y reverso 5' GTC GAA TTC GAT GAT CAG CAG CGG CTT G 3' (introduce un sitio de restricción *Eco*RI). El fragmento seleccionado correspondió a los nucleótidos desde 197 a 868 de la secuencia descrita por Colston y col. (1994a).

Se realizó la transformación de *E. coli* BL21 *pLysS* con el plásmido Hsp65-*pRSET A* obtenido (Sambrook y col., 1989).

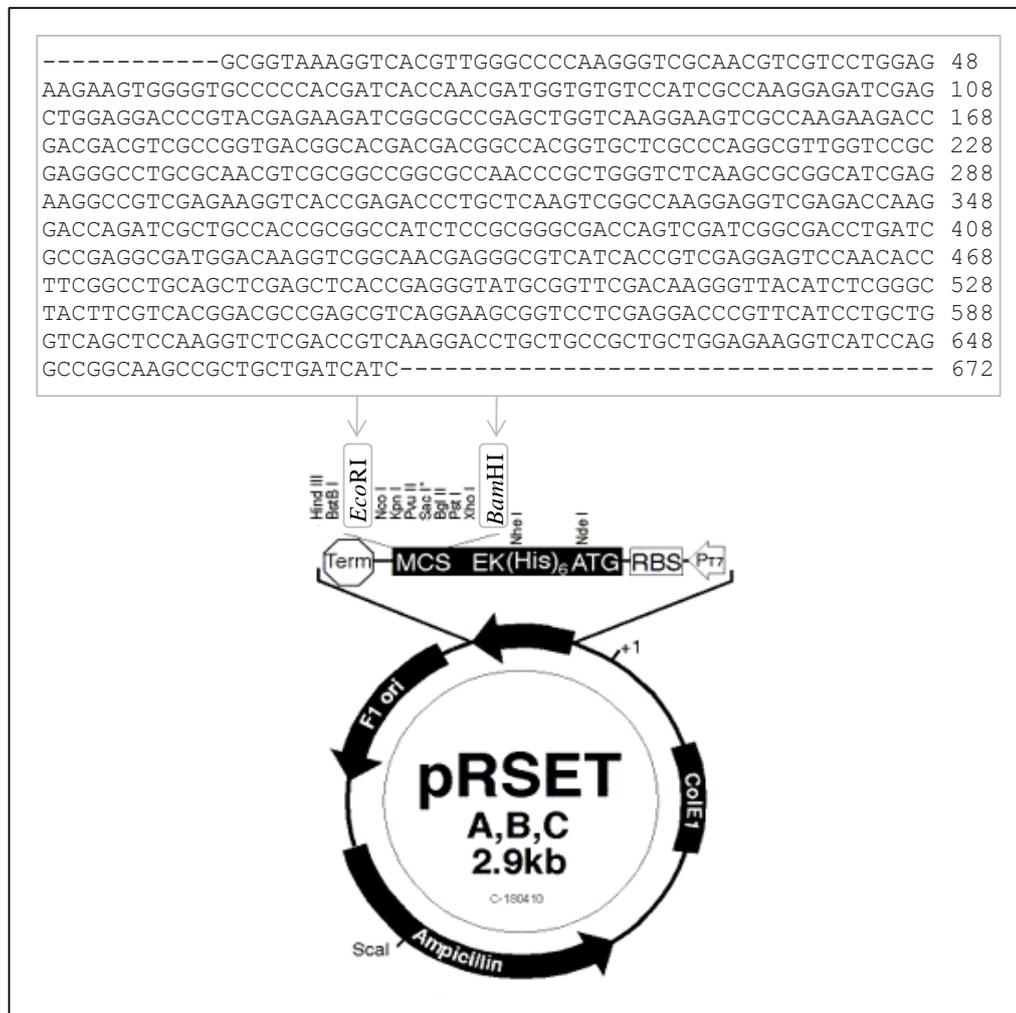


Figura 8. Plásmido Hsp65-*pRSET A*. En el rectángulo gris, se indica la secuencia insertada que corresponde a 672 pb.

El día 20 de Marzo de 2014 se realizó el análisis del fragmento de Hsp65 (clonado en pRSET A) por BLAST Nucleotide; los resultados se muestran en la Tabla 5.

Homología	Nºn ≠	Bacteria	Aislamiento a partir de	Cepa	Citas
100 %	0	<i>Map</i>	bovino	K10	Li y col., 2005
		<i>Map</i>	bovino	K10	Turenne y col., 2006
		<i>Map</i>	humano	4	Bannantine y col., 2014
		<i>Map/Ma</i>	bovino	18*	Colston y col., 1994a
99 %	1	<i>Map</i>	cerdo	LN20	Turenne y col., 2006
		<i>Mah</i>	búfalo	822	Turenne y col., 2006
		<i>Mah</i>	canino	T2759	Haist y col., 2008
		<i>Mah</i>	canino	T3054	Haist y col., 2008
		<i>Mah</i>	humano	TH135	Uchiya y col., 2013
		<i>Mah</i>	humano	28132	Turenne y col., 2006
		<i>Mah</i>	humano	104	Fleischmann y col., 2014
		<i>Mah</i>	humano	2000-333	Turenne y col., 2006
		<i>Mah</i>	humano	76102	Turenne y col., 2006
		<i>Maa</i>	pollo	25291	Turenne y col., 2007
5	2	<i>Ma</i>	humano	Serovar 8	Nagabhushanam y col., 2001
		<i>Map</i>	humano	Linda	El-Zaatari y col., 1995

Tabla 5. Homología del fragmento teórico de Hsp65 (clonado en pRSET A) evaluado por BLAST Nucleotide. El análisis se realizó el día 20 de Marzo de 2014. Los datos de homología están expresados en porcentaje (%); Nºn ≠: número de nucleótidos diferentes; *Ma*: *Mycobacterium avium*; *Maa*: *Mycobacterium avium* subsp. *avium*; *Mah*: *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis*; *Map*: *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *esta cepa fue discutida si correspondía a *Map* (Colston y col., 1994a) o *Ma serovar 2* (Chiodini y col., 1993).

La Hsp65r consta de 224 aminoácidos y un peso teórico aproximado de 24 kDa según el análisis realizado por el Prot Param Tool y las herramientas ofrecidas por GenScript USA Inc. (Piscataway, Nueva Jersey, USA).

Animales y muestras

Para cumplir con los objetivos planteados se diseñaron experimentos con bovinos de diferentes categorías provenientes de rodeos libres de tuberculosis.

Caracterización de los animales

Teniendo en cuenta que la paratuberculosis es una patología de diagnóstico engoroso, se clasificaron los bovinos estudiados según: la procedencia de rodeos infectados o no con *Map*, la presencia de signos clínicos, el diagnóstico serológico y el aislamiento e identificación de *Map* a partir de muestras de leche y/o materia fecal.

Se obtuvieron muestras de sangre, leche y materia fecal de bovinos siguiendo el protocolo recomendado por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Experimentación (CICUAL) de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad de Buenos Aires. La sangre se extrajo a partir de la vena coccígea o la vena yugular. En los casos en que fue posible, se obtuvieron muestras de leche a partir de los cuartos craneal derecho y caudal izquierdo luego de limpiar los pezones con solución de iodopovidona. Las muestras de MF se extrajeron mediante braceo rectal. En todos los casos se almacenaron las muestras obtenidos a -20°C hasta el momento de uso.

Procedencia

Se analizó si los animales provenían de rodeos infectados o no con *Map*. Los rodeos clasificados como infectados fueron aquellos que presentaron historia de paratuberculosis clínica, animales positivos al diagnóstico serológico (ELISA) y al aislamiento de *Map*. Mientras que se consideraron como rodeos libres, a aquellos que no mostraron ninguna de las características previas descriptas en los últimos 5 años (según datos históricos aportados por el Laboratorio de INTA Balcarce).

Signos clínicos

La diarrea crónica intermitente o persistente estuvo presente en todos los animales con paratuberculosis clínica. Otros signos presentes fueron: disminución de peso, disminución en la producción láctea, caquexia y edema submandibular.

Diagnóstico serológico

Se utilizó la técnica de ELISA desarrollada en nuestro laboratorio (ELISA-PPA) a fin de realizar el análisis serológico (Anexo Técnico, página 180). Los sueros pre-adsorbidos con *M. phlei* (a fin de eliminar la reactividad cruzada generada por otras micobacterias) se estudiaron a una dilución final de 1/100. Como antígeno se utilizó el PPA (Allied Monitor) y como anticuerpo el anti-IgG bovino (KPL, Kirkegaard & Perry Laboratories Inc., Gaithsburg, Maryland, USA) marcado con peroxidasa (HRP). Según las condiciones establecidas en nuestro laboratorio, se clasificaron los animales como:

- positivos, con densidades ópticas (DO) promedio mayores o igual a 0,298.
- sospechosos, con DO promedio entre 0,199 y 0,297.
- negativos, con DO promedio menores a 0,198.

Aislamiento e identificación de *Map*

Se estudió la presencia de *Map* en todas las muestras de MF de los animales incluidos en el trabajo. En aquellos casos que además fue posible obtener leche, se capturaron las micobacterias mediante el tratamiento de las muestras con perlas inmuno-imantadas. La identidad de *Map* se confirmó en todos los casos mediante IS900 PCR.

Cultivos de muestras de materia fecal. Las muestras de MF fueron decontaminadas con 0,9 % de HPC (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, Misuri, USA) y sembradas en tubos con medio Herrold con piruvato (Sigma-Aldrich) y micobactina J (Allied Monitor) en pico de flauta. La lectura de los cultivos se realizó cada 15 días, durante 24 semanas, a fin de identificar la presencia de UFC (Figura 9a). En el Anexo Técnico (página 181) se describe en detalle la metodología utilizada.

Procesamiento de las muestras de leche. Las muestras de leche fueron tratadas con perlas imantadas conjugadas con anti-IgG de ratón (New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, USA) sensibilizadas con Acs específicos a *Map* elaborados en nuestro laboratorio (Anexo Técnico, página 182; Figura 9b).

Confirmación de la identidad de *Map*. La presencia de la inserción IS900 se estudió por PCR (Mundo y col., 2013), a partir de los aislamientos de las muestras de MF y leche (Figura 9c).

Se trabajó con el primer IS1 (Mundo y col., 2013) que amplifica una secuencia corta de ADN del inserto IS900: 155 pb de longitud correspondiente a los nucleótidos 1129 - 1283: IS1 directo (5' ACC CGC TGC GAG AGC AAT CGC TGC 3') e IS1 reverso (5' ACG TCG GCG TGG TCG TCT GCT GGG 3'). La metodología utilizada se describe en el Anexo Técnico (página 182).

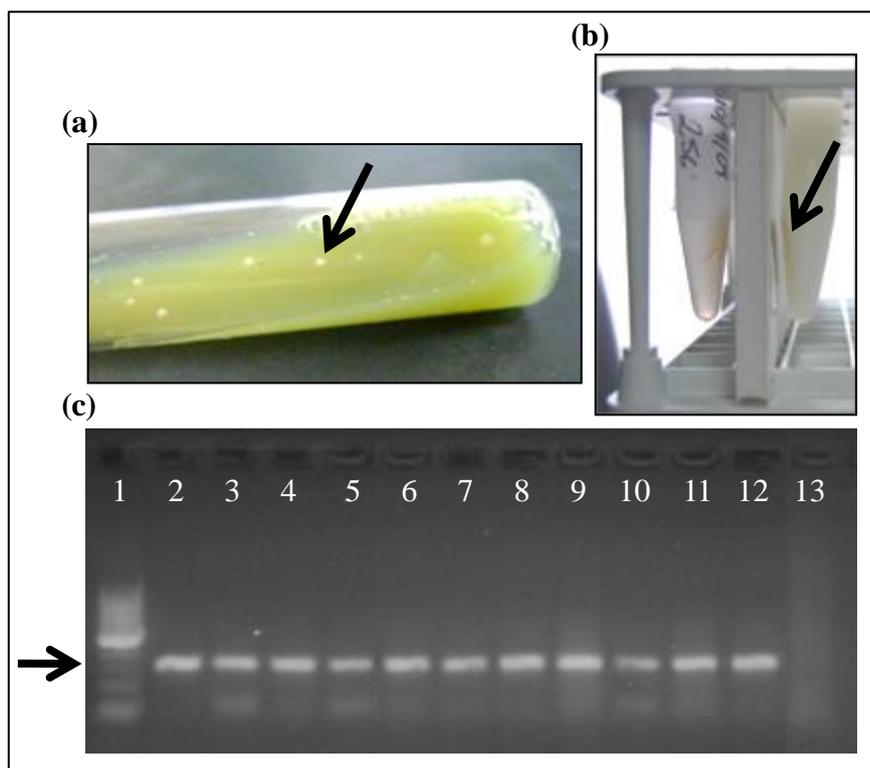


Figura 9. Aislamiento e identificación de *Map* a partir de muestras de materia fecal y leche. Colonias características de *Map* obtenidas mediante el cultivo de muestras de materia fecal en medio de cultivo Herrold suplementado con piruvato y micobactina J (a). Procedimiento de captación de perlas imantadas a partir de leche (b). Gel de agarosa al 2 % para la lectura del IS900 PCR a partir de aislamientos de muestras de materia fecal y leche: calle 1: patrón de pesos moleculares (B041-50 Marker Byodinamics, Buenos Aires, Argentina) con fragmentos de 50 a 500 pb en incrementos de 50 pb (el fragmento de 250 pb posee triple masa); calles 2 - 11: aislamientos a partir de muestras de bovinos; calles 12 - 13: cepas de referencia: *Map* ATCC 19698 (12), *M. phlei* ATCC 23042 (13).

Grupos de bovinos

Teniendo en cuenta los parámetros y resultados obtenidos, las muestras bovinas se clasificaron como provenientes de:

- **Bovinos Infectados Naturalmente:** a aquellos que provinieron de rodeos infectados con *Map* y fueron positivos al IS900 PCR de muestras de MF y/o leche. Este grupo se subdividió como:

- Subclínicos (ISC):** a aquellos que no mostraron signología.

- Clínicos (IC):** a los que presentaron signos clásicos de paratuberculosis en el momento de estudio.

- **Bovinos Controles Negativos (CN):** a aquellos que provinieron de rodeos libres de paratuberculosis y resultaron negativos al ELISA-PPA y al IS900 PCR de muestras de MF y leche.

- **Bovinos utilizados en ensayos de inmunización o infección experimental:** los animales provinieron de rodeos libres de paratuberculosis y arrojaron resultados negativos a todas las técnicas diagnósticas.

- Bovinos Inmunizados con Hsp65r (IHsp65):** los días 0 y 23 se inmunizaron animales adultos con 200 µg de Hsp65r purificada (ver 96) en 0,75 mL de PBS y emulsionada en 0,75 mL Adyuvante de Freund Incompleto (Sigma-Aldrich). Previamente a la realización del plan de inmunización, se realizó un control de esterilidad de los inmunógenos mediante el cultivo en Medio Agar Sangre.

- Bovinos Inmunizados con p34r (Ip34):** se trabajó con sueros de animales inmunizados con tres dosis de 15 mg de lisados de *E. coli* BL21 pLysS transformadas que expresaban p34r, emulsionada en Adyuvante de Freund Incompleto (Sigma-Aldrich). Estos sueros policlonales se produjeron durante el desarrollo de la Tesis doctoral de la Dra. Silvia L. Mundo (Mundo, 2005).

- Terneros infectados experimentalmente:** se infectaron terneros Holando-Argentino machos de entre 48 y 62 días de edad con dos aislamientos locales de *Map*. Previo a la infección, todos los animales arrojaron resultados negativos a todas las técnicas diagnósticas.

Objetivo I: Identificar el efecto de la infección con *Map* sobre los niveles de anticuerpos totales en muestras de suero y materia fecal de bovinos en distintos estadios de la patología

Para cumplir con el primer objetivo, se estudiaron los isotipos IgM, IgG e IgA totales a nivel sistémico y local en bovinos naturalmente infectados con *Map* mediante la técnica de ELISA. Teniendo en cuenta que la paratuberculosis afecta, en estadios avanzados, los niveles de proteínas séricas totales, se determinó la proteinemia por refractometría y se incorporó una categoría adicional: “bovinos terminales” que correspondieron a aquellos infectados clínicos con valores de proteinemia por debajo de 6,2 g / dL, cifra que corresponde al valor normal según el manual de Merck (2010).

La metodología utilizada fue la siguiente: las microplacas fueron sensibilizadas con 50 µL de las muestras de suero o MF, o con Acs anti-IgA (Bethyl Laboratories Inc., Montgomery, Texas, USA) diluido 1/100. Como Acs secundarios se trabajó con: anti-IgM bovino-HRP (Bethyl) diluido 1/500, anti-IgG bovino-HRP (KPL) diluido 1/5.000 y anti-IgA bovino-HRP (Bethyl) diluido 1/500.

Por no disponer de patrones de IgM e IgG, se analizaron los niveles de Acs totales mediante la comparación de las DO obtenidas en la evaluación de cada muestra a una dilución determinada para cada estudio.

Se realizaron ensayos preliminares en el que se efectuaron diluciones seriadas de muestras de suero y MF de tres bovinos controles sanos (considerados como animales patrones normales). Para realizar el análisis de las muestras de MF por ELISA, se homogenizaron las muestras en distintos volúmenes de 0,05 % Tween 20 en PBS y se centrifugaron a 4°C durante 30 min a 3.000 rpm y luego a 10.000 rpm, con el fin de obtener los “sobrenadantes de muestras de materia fecal” (sMF) lo más límpidos posible. Éstos se almacenaron a -20°C hasta el momento de uso. Los resultados de las curvas de estandarización se muestran en la Figura 10.

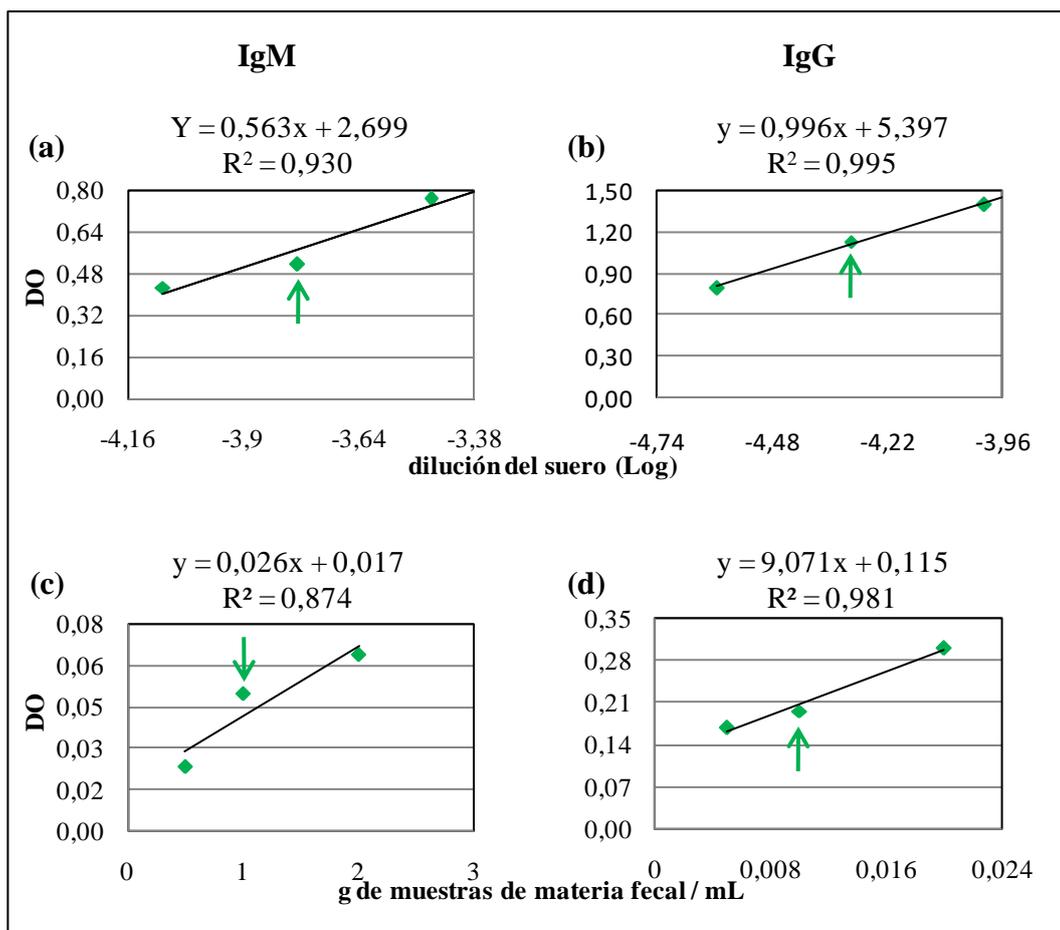


Figura 10. Curvas de IgM (a y c) e IgG (b y d) de anticuerpos totales en muestras de suero (a y b) y de materia fecal (MF, c y d) de tres bovinos controles sanos. Los datos están expresados en densidades ópticas promedio de los tres bovinos controles (DO) en relación a la dilución del suero (logaritmo, Log) o en g de muestra de materia fecal / mL. Las flechas indican las diluciones seleccionadas para la evaluación de los anticuerpos totales en cada muestra: 1/6.000 (IgM sérica); 1/20.000 (IgG sérica); 1 g / mL (IgM en MF) y 10 mg / mL (IgG en MF).

A partir de las curvas obtenidas se determinaron las condiciones de los ELISAs desarrollados para estos experimentos y se seleccionaron, para la comparación con los animales infectados, aquellas diluciones de las muestras de suero y MF que estaban incluidas dentro del rango de detectabilidad de la técnica y que permitan identificar pequeñas variaciones de concentración de Acs.

En cuanto a la evaluación de IgA total, se analizaron los resultados de manera similar a los otros isotipos evaluados (en DO). Para determinar las diluciones de las muestras a aplicar: se desarrolló la curva patrón (Figura 11) utilizando la IgA bovina (Bethyl), se realizaron

ensayos preliminares con muestras de tres bovinos controles sanos, y se seleccionaron las diluciones de las muestras que estuvieran incluidas en la curva patrón de IgA.

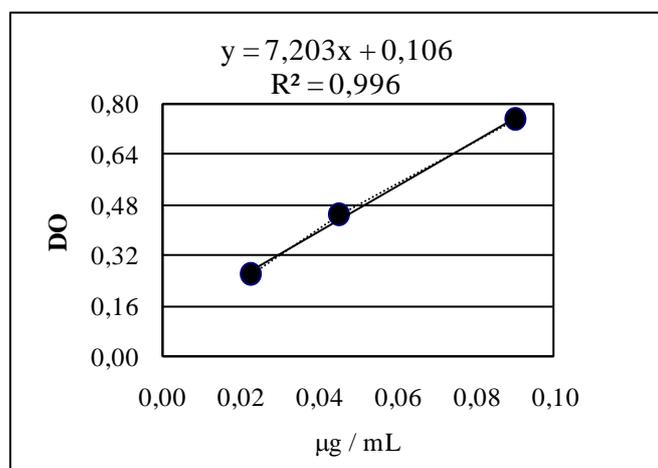


Figura 11. Curva patrón de IgA. Se utilizaron los siguientes reactivos comerciales: anticuerpo de captura anti-IgA, IgA y anti-IgA conjugado con peroxidasa (Bethyl). Los datos están expresados en µg / mL vs. densidades ópticas (DO).

Las diluciones de las muestras de suero y MF utilizadas para la evaluación de los niveles totales de IgM, IgG e IgA se muestran en la Tabla 6.

Muestra	Isotipo evaluado		
	IgM	IgG	IgA
Suero	1/6.000	1/20.000	1/200
MF	1 g / mL	10 mg / mL	20 mg / mL

Tabla 6. Diluciones de las muestras de suero y materia fecal (MF) utilizados para el estudio de los niveles totales de IgM, IgG e IgA por ELISA.

Se llevaron a cabo tres repeticiones independientes de cada ensayo. Los resultados se expresan en DO (valores de DO obtenidos para cada muestra menos las DO de los controles negativos, que fueron incluidos en cada placa) ± DE.

Objetivo II: Estudiar la respuesta inmune humoral específica frente a *Map* y sus proteínas en bovinos naturalmente infectados distintos estadios de la paratuberculosis

Objetivo IIa: Determinar los niveles de los isotipos de inmunoglobulinas específicos frente a *Map* y Hsp65r en bovinos

El siguiente objetivo planteó la evaluación de los niveles de IgM, IgG, IgG1, IgG2, IgG3 e IgA específicos frente a *Map* (bacteria entera) y Hsp65r en muestras de suero y MF de bovinos infectados naturalmente en distintos estadios de la patología.

Construcción de curvas patrones

Se efectuaron ensayos preliminares para fijar las diluciones y concentraciones de uso de los reactivos comerciales y elaborados en nuestro laboratorio con la finalidad de desarrollar las curvas patrones de manera tal que se pueda cuantificar los isotipos IgG1, IgG2 e IgG3 a partir de muestras biológicas, con mínimos cruzamientos entre los isotipos. Las microplacas fueron sensibilizadas con 50 μ L de cada IgG1 (Bethyl), IgG2 (Bethyl) o IgG3r producido en nuestro laboratorio (ver página 95). Los Acs anti-isotipos utilizados fueron: anti-IgG1 bovino-HRP (Bethyl), anti-IgG2 bovino monoclonal (Sigma-Aldrich), anti-IgG3r policlonal de conejo producido previamente en nuestro laboratorio (Mundo, 2005) pre-adsorbido en medio líquido y sólido con *E. coli* (con el fin de eliminar reactividad cruzada, Anexo Técnico, página 183). Y como Acs secundarios se usaron los siguientes reactivos: anti-IgG ratón-HRP (KPL) y el anti-IgG conejo-HRP (KPL). A partir de los ensayos de titulación, se fijaron las diluciones de uso de los patrones de isotipos de Igs y de cada Ac anti-isotipos (Tabla 7).

Curvas Patrones	Isotipo de IgG evaluado		
	IgG1	IgG2	IgG3
Rango de concentración de isotipo patrón (µg / mL)	1 – 4*	0,063 - 0,250*	0,021 - 0,172*
Dilución de Acs anti-isotipo [#]	1/1.000	1/10.000	1/500
Dilución de Acs secundarios [†]	-	1/1.000	1/500

Tabla 7. Curvas Patrones de IgG1, IgG2 e IgG3 bovinas. Diluciones de uso de los reactivos comerciales o desarrollados en nuestro laboratorio: * patrones de isotipos de Igs: IgG1 e IgG2 (Bethyl) o IgG3r (producido en nuestro laboratorio); # Acs anti-isotipos: anti-IgG1 bovino-HRP (Bethyl), anti-IgG2 bovino monoclonal (Sigma-Aldrich), anti-IgG3r policlonal de conejo producido previamente en nuestro laboratorio (Mundo, 2005) pre-adsorbido en medio líquido y sólido con *E. coli*; † Acs secundarios: anti-IgG ratón-HRP (KPL) y el anti-IgG conejo-HRP (KPL).

Se desarrollaron las curvas patrones de IgG1, IgG2 e IgG3 mediante la repetición de 3 ensayos independientes. Para elaborar la curva patrón de IgG3, las DO obtenidas por la reactividad de IgG3r fueron corregidas mediante la resta de las DO obtenidas por el reconocimiento del extracto de *E. coli* (Figura 12).

Butler (1983) publicó que las concentraciones séricas de IgG1 e IgG2, son de 11 mg / mL (6 – 15 mg / mL) y 9 mg / mL (5 – 14 mg / mL), respectivamente. Teniendo en cuenta estos datos, que indican que los niveles de IgG1 e IgG2 en suero son relativamente similares y la ausencia de información acerca de las cantidades de IgG3 sérica, se estudiaron por ELISA los cruzamientos entre los patrones de isotipos colocando en las microplacas iguales concentraciones proteicas de cada patrón (Figura 12).

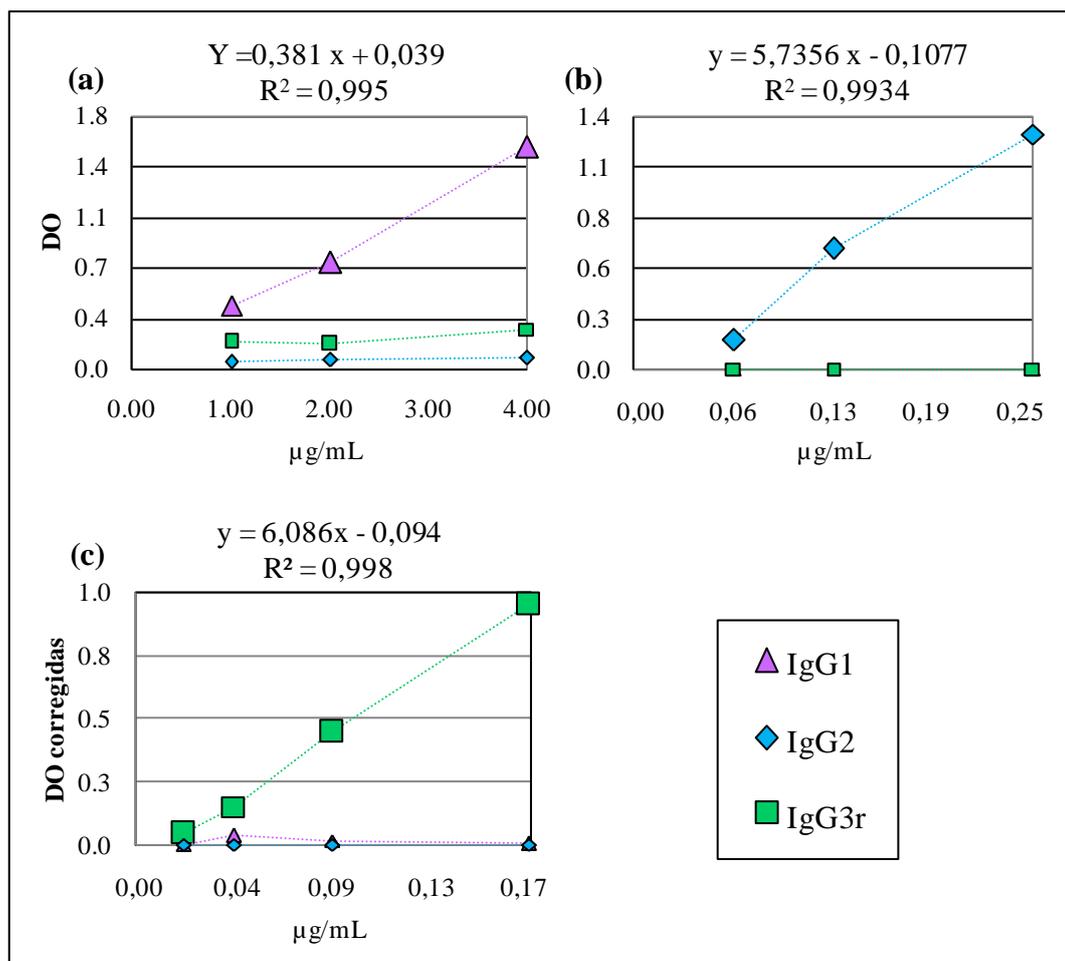


Figura 12. Curvas patrones de IgG1 (a), IgG2 (b) e IgG3 (c) y la reactividad de cada anticuerpo anti-isotipo. Proteínas patrones de isotipos de IgG: violeta (IgG1), celeste (IgG2) y verde (IgG3r). Los datos están expresados en µg / mL vs. densidades ópticas (DO) o DO corregidas: DO frente a cada patrón - DO frente a extracto de *E. coli*.

Evaluación de los niveles de isotipos de Igs específicos frente a *Map*

Se determinaron los niveles de IgM, IgG, IgG1, IgG2, IgG3 e IgA específicos a la cepa K10 de *Map*, por ELISA, en suero y sMF de bovinos que fueron categorizados en 3 grupos: infectados subclínicos, infectados clínicos y controles negativos. Para estudiar las muestras de MF se procedió de manera similar a lo enunciado previamente (página 70). Las muestras de MF se diluyeron 1 g por mL de 0,05 % Tween 20 en PBS y de esta manera se obtuvo el sMF.

Las microplacas fueron sensibilizadas con 0,4 DO_{600nm} de la cepa K10 de *Map* (que corresponde a aproximadamente $1,2 \times 10^{13}$ UFC / mL, según experimentos desarrollados en nuestro laboratorio), de los patrones IgG1 (Bethyl), IgG2 (Bethyl) o IgG3 producido (ver

página 95), o Acs anti-IgA bovina (Bethyl). Para cuantificar los niveles de IgG1, IgG2, IgG3 e IgA se utilizaron las curvas patrones desarrolladas (páginas 72 y 75). En todos los ensayos se incluyeron al menos dos puntos de cada curva para validar la cuantificación. Se realizaron estudios preliminares para establecer las diluciones de las muestras en la cual los valores de DO estuvieran incluidos en cada curva patrón. Las diluciones de las muestras utilizadas se muestran en la tabla 8. Se usaron además los siguientes Acs anti-isotipos: el anti-IgM bovino-HRP (Bethyl) diluido 1/500, el anti-IgG bovino-HRP (KPL) diluido 1/5.000, el anti-IgG1 bovino-HRP (Bethyl) diluido 1/1.000, el anti-IgG2 bovino monoclonal (Sigma-Aldrich) diluido 1/10.000, el anti-IgG3r policlonal de conejo pre-adsorbido en medio líquido y sólido con *E. coli* diluido 1/500 y el anti-IgA bovina-HRP (Bethyl) diluido 1/500. Como Acs secundarios se usaron: anti-IgG ratón-HRP (KPL) diluido 1/1.000 y el anti-IgG conejo-HRP (KPL) diluido 1/500.

Muestra	IgM	IgG	IgG1	IgG2	IgG3	IgA
Suero	1/10	1/100	1/30 - 1/400	1/50 - 1/800	s/diluir	1/10
sMF	s/diluir	s/diluir	s/diluir - 1/30	s/diluir	s/diluir	s/diluir

Tabla 8. Diluciones de las muestras de suero y sobrenadantes de muestras de materia fecal (sMF) de bovinos utilizadas para el estudio de los niveles de isotipos de IgM, IgG, IgG1, IgG2, IgG3 e IgA específicos frente a *Map* por ELISA. s/diluir: sin diluir.

Se llevaron a cabo tres repeticiones independientes de cada ensayo. Los resultados se expresan en DO (valores de DO obtenidos para cada muestra menos las DO de los controles negativos, que fueron incluidos en cada placa) \pm DE para IgM e IgG, o en $\mu\text{g} / \text{mL} \pm$ DE para IgG1, IgG2, IgG3 e IgA. Para realizar la cuantificación de cada isotipo se trabajó con la zona de la recta de la curva sigmoidea que se obtuvo al diluir los patrones proteicos. Y para calcular las concentraciones se tuvo en cuenta en cada caso el factor de dilución de la muestra (Fm):

$$-\mu\text{g de IgG1} / \text{mL de muestra} = (\text{DO} - 0,039) / 0,381 * \text{Fm}$$

$$-\mu\text{g de IgG2} / \text{mL de muestra} = (\text{DO} + 0,1077) / 5,7356 * \text{Fm}$$

$$-\mu\text{g de IgG3} / \text{mL de muestra} = (\text{DO} + 0,094) / 6,086$$

$$-\mu\text{g de IgA} / \text{mL de muestra} = (\text{DO} - 0,106) / 7,203 * \text{Fm}$$

Evaluación de los niveles de Acs específicos frente a Hsp65r

Mediante la metodología de ELISA se identificaron los niveles de IgG específicos frente a Hsp65r en sueros de bovinos categorizados como: infectados subclínicos, infectados clínicos, inmunizados con Hsp65r y controles negativos. Las placas fueron sensibilizadas con 2 µg de Hsp65r purificada (ver página 96) o del extracto de *E. coli* / hoyo. Se realizó la pre-adsorción de los sueros en medio líquido con *E. coli* con el fin de eliminar la reactividad cruzada utilizando la metodología descrita en el Anexo Técnico (página 183) y se estudiaron a una dilución de 1/50. Se empleó el anti-IgG bovino-HRP (KPL) diluido 1/5.000. Los resultados se expresan como DO obtenidas frente a Hsp65r menos DO obtenidas frente al extracto de *E. coli*. El VC se calculó sumando al promedio de las DO obtenidas en los sueros controles negativos, dos DE.

Objetivo IIb: Analizar el uso de la técnica de ELISA de isotipos de IgG específicos frente a PPA en sueros de bovinos naturalmente infectados

Los bovinos infectados en estadio subclínico no presentan signos clínicos, excretan poca cantidad y de manera intermitente de *Map* por MF y presentan bajos niveles de Acs específicos, por lo que se estudió la aplicación de la técnica de ELISA de isotipos de IgG específicos frente a PPA en sueros de bovinos provenientes de rodeos infectados con el fin de mejorar las metodologías diagnósticas disponibles en la actualidad. Para ello, se utilizaron sueros de 108 bovinos que se categorizaron como: infectados subclínicos, infectados clínicos y controles negativos. Además, se incluyó una nueva categoría de animales: “bovinos expuestos” (E) que correspondieron a aquellos bovinos provenientes de rodeos infectados con *Map* y que arrojaron resultados negativos al IS900 PCR de muestras de MF y leche. La metodología del ELISA utilizada fue similar a la previamente descrita. Las microplacas fueron sensibilizadas con 2 µg de PPA por hoyo y los sueros se pre-adsorbieron con *M. phlei* (Anexo Técnico, página 180).

Si bien los niveles de IgG1 e IgG2 séricas totales son similares (Butler, 1983), nuestros resultados (Capítulo II: páginas 101 - 103) muestran que los niveles de IgG1 específicos a

Map (principalmente en bovinos con paratuberculosis clínica) son superiores (al menos 100 veces mayores) a los de IgG2 e IgG3 *Map*-específicos. Por lo tanto, las diluciones de los sueros utilizadas en este experimento, se fijaron teniendo en cuenta estos resultados y ensayos preliminares con sueros de bovinos naturalmente infectados y controles. Los sueros se estudiaron en las siguientes diluciones: 1/5 para IgG2 e IgG3 y 1/100 para IgG total e IgG1. Se emplearon los siguiente anti-Acs: el anti-IgG bovino-HRP (KPL) diluido 1/5.000, el anti-IgG1 bovino-HRP (Bethyl) diluido 1/1.000, el anti-IgG2 bovino monoclonal (Sigma-Aldrich) diluido 1/10.000, el anti-IgG3r policlonal de conejo pre-adsorbido en medio líquido y sólido con *E. coli* diluido 1/500, el anti-IgG ratón-HRP (KPL) diluido 1/1.000 y el anti-IgG conejo-HRP (KPL) diluido 1/500.

Cada determinación se evaluó por duplicado y se llevaron a cabo al menos tres repeticiones independientes de cada ensayo. Los resultados se expresan en DO (valores de DO obtenidos para cada muestra menos las DO de los controles negativos, que fueron incluidos en cada placa) \pm DE.

Objetivo IIc: Caracterizar la respuesta inmune humoral inducida por la infección experimental con aislamientos locales de *Map* en terneros

Se infectaron terneros con dos aislamientos locales de *Map* a fin de estudiar la cinética de los isotipos de IgG específicos frente a distintos antígenos de *Map*.

Animales

6 terneros Holando-Argentino machos de entre 48 y 62 días de edad fueron infectados en los Boxes de Inmunología de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad de Buenos Aires. Los animales tuvieron 40 días de adaptación previa a la infección (Figura 13) y fueron divididos al azar en 3 grupos:

- Infectados con el aislamiento A (A, n = 2): caravanas n° 928 y 931.
- Infectados con el aislamiento C (C, n = 2): caravanas n° 930 y 932.
- Controles no infectados (CN, n = 2): caravanas n° 933 y 934.

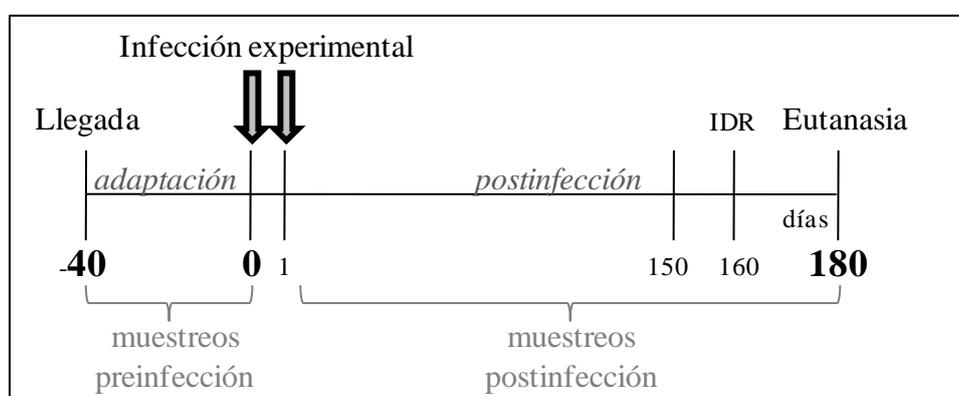


Figura 13. Diseño experimental. Línea del tiempo en la que se indican los distintos periodos u etapas del experimento.

Infección

Se utilizaron dos aislamientos provenientes de la provincia de Buenos Aires identificados como patrón A y patrón C mediante la técnica de RFLP (INTA-BALCARCE; Moreira y

col., 1999). Mientras que en nuestro laboratorio se realizó el análisis por MIRU-VNTR (Cochard y col., 2014) y ambos aislamientos correspondieron al INVM 1.

A partir de los *stocks* de *Map* (aislamientos A y C) almacenadas a -80°C (página 61), se descongelaron, incubaron a 37°C en 7H9 suplementado con piruvato y micobactina J durante 96 hs y se confirmó:

- la identidad por la tinción de Ziehl-Neelsen e IS900 PCR.
- la ausencia de contaminantes mediante el cultivo en Agar sangre.

Para realizar la infección, se siguieron las sugerencias realizadas por el Johnes` Disease Integrated Project Animal Model Standardization Committee (Hines y col., 2007; Hines, 2010). La dosis se cuantificó mediante el “método de peso húmedo”. La infección se realizó en cada box por separado, por vía oral (a través del sustituto lácteo) dos días consecutivos y consistió en 125 mg de *Map* peso húmedo por animal por día (Figura 14). Además, se cuantificaron las UFC por inóculo mediante cultivo en medio Herrold suplementado con huevo, piruvato y micobactina J. Los inóculos fueron desagregados mediante el pasaje en jeringa de tuberculina, diluidos seriadamente en base 10 y sembrados en el medio de cultivo. La lectura de las UFC se realizó a las 9 semanas de cultivo.



Figura 14. Infección experimental de terneros a través de la vía oral por el sustituto lácteo.

Los animales fueron mantenidos en boxes aislados durante 180 días postinfección y luego fueron sacrificados. Todo el experimento se llevó a cabo de acuerdo a las normas de bioética aprobadas por el CICUAL de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad de Buenos Aires.

Manejo de los animales

-*Manejo general*: la rutina de trabajo se inició siempre en el box control para luego acceder a los boxes infectados. Previo al ingreso y luego del egreso a los boxes se realizaron pediluvios con lavandina. Además, se utilizaron guantes, mamelucos y equipo de limpieza independientes para cada box.

-*Limpieza ambiental*: se utilizó cama de viruta o pasto durante el período de adaptación. La cama sucia fue removida diariamente mientras que, se limpiaron los boxes con lavandina y se repuso el total de la cama semanalmente. Luego de la infección experimental, los boxes se limpiaron diariamente con lavandina y semanalmente con Despadac (Laboratorios Calier SA, Barcelona, España).

-*Los terneros se vacunaron con*:

- Vacuna de Fiebre Aftosa (SENASA): se aplicaron dos dosis, la primera, a los 3 días previos a la salida del campo de origen y la segunda a los 22 días de adaptación.
- Vacunas Trivirus Neumovac Q (Sanidad Ganadera, Argentina) y Ganadera Clostridial (Sanidad Ganadera): se inocularon dos dosis, a los 28 días de la adaptación y a los 30 días postinfección.

Muestras y estudios

Se obtuvieron muestras de sangre, suero y MF de los terneros previo al desafío y durante 180 días postinfección. Las muestras de sangre con heparina al 1 % se procesaron dentro de las 8 hs de extracción, mientras que las de suero y de MF se almacenaron a -20°C hasta el momento de uso. Se realizaron los siguientes estudios:

- ✓ Evaluación clínica de los animales
- ✓ Cultivo de muestras de MF
- ✓ Identificación de respuesta inmune celular: producción de INF γ específico e intradermorreacción
- ✓ Cinética de respuesta inmune humoral

Evaluación clínica

Se realizó un seguimiento clínico de los animales a fin de conocer el efecto de la infección sobre la ganancia de peso de los terneros y la existencia de signos clínicos compatibles con paratuberculosis. Se midieron los perímetros torácicos (cm) utilizando cintas bovométricas para el ganado lechero a los 110 y 150 días postinfección. Estas cintas relacionan los perímetros torácicos (cm) con el peso del animal (Kg) según su condición corporal. Los datos se encuentran expresados como ganancia de peso promedio entre los días 110 (Kg_{110}) y 150 (Kg_{150}) postinfección ($Kg_{150} - Kg_{110}$) \pm DE por grupo.

Cultivo de muestras de MF

La excreción de *Map* fue evaluada el día 0 (previo a la infección) y los días 3, 30, 60, 110, 150 y 180 postinfección mediante el cultivo de las muestras de MF. Se cuantificaron las UFC excretadas / g de MF. Además, se confirmó la identidad de *Map* a partir de las colonias desarrolladas mediante IS900 PCR.

Inducción de la respuesta inmune celular

La respuesta inmune celular se evaluó mediante el estudio de la cinética de producción de INF γ por células periféricas estimuladas con distintos antígenos proteicos y la intradermorreacción con PPD a los 160 días postinfección.

Cinética de producción de INF γ específico

La producción de INF γ por células periféricas estimuladas con PPDa, PPDb, Hsp65r y p34r, o sin estimular se evaluó previamente a la infección y a los 30, 80 y 150 días postinfección. Las células de sangre periféricas (1,4 mL) se estimularon con 120 μ L de PPDa, PPDb, p34r, Hsp65r o sin estimular (con PBS). Luego de 24 hs de incubación a 37°C en 5 % CO₂, los sobrenadantes se analizaron por DuoSet ELISA Development kit (R&D Systems, Inc., Minneapolis, USA) a fin de determinar los niveles de INF γ (Anexo Técnico, página 183). Los datos se encuentran expresados como DO promedios \pm DE.

Intradermorreacción

A los 160 días postinfección, se inocularon por vía intradérmica 0,1 mL de PPDa y PPDb en la tabla del cuello según las especificaciones realizadas por SENASA (Res. N° 128/2012).

Se realizó la medición en el sitio de inoculación luego de la inoculación (t_0) y a las 72 hs (t_f). Los resultados de la IDR están expresados en $mm_{t_f} - mm_{t_0}$ para cada PPD inoculada (IDR_{PPDa} e IDR_{PPDb}).

Cinética de respuesta inmune humoral sistémica

Se estudiaron los niveles de IgG, IgG1 e IgG2 específicos frente a *Map* (bacteria entera inactivada por calor) o a las proteínas de PPA, Hsp65r y p34r por ELISA. Las placas fueron sensibilizadas con 0,5 DO₆₀₀ de *Map* ATCC 19698 (que corresponde a aproximadamente 9×10^{13} UFC / mL, según experimentos desarrollados en nuestro laboratorio) o 2 μ g de proteínas totales (PPA, Hsp65r o p34r) por hoyo. Se pre-adsorbieron los sueros con *M. phlei* (para PPA, Anexo Técnico, página 180) o con *E. coli* en medio líquido (para Hsp65r y p34r, Anexo Técnico, página 183). Las diluciones de los sueros utilizadas (Tabla 9) se determinaron a partir de experimentos previos (ver Capítulos II) o mediante ensayos preliminares con sueros de bovinos naturalmente infectados.

Antígeno	IgG	IgG1	IgG2
<i>Map</i>	1/100	1/100	1/50
PPA	1/100	1/100	1/5
Hsp65r	1/50	1/50	1/50
p34r	1/50	1/50	1/50

Tabla 9. Diluciones de las muestras de suero utilizadas para la evaluación de isotipos específicos frente a los distintos antígenos de *Map* evaluados por ELISA.

Se llevaron a cabo al menos dos repeticiones independientes de cada evaluación. Los resultados de *Map* y PPA están expresados como DO promedio (valores de DO obtenidos para las muestra menos las DO de los controles negativos, que fueron incluidos en cada placa) \pm DE. Mientras que los datos de Hsp65r y p34r indican las DO promedio corregidas: DO frente al antígeno - DO frente a extracto de *E. coli* \pm DE.

Los valores de corte se calcularon teniendo en cuenta el tiempo 0 de todos los terneros (previo a la infección) y de todos los tiempos estudiados de los controles negativos: VC = DO promedio + 2 * DE.

Objetivo III: Evaluar el efecto de los anticuerpos bovinos específicos frente a *Map* y sus proteínas, sobre la viabilidad bacteriana intracelular en un modelo de infección de macrófagos bovinos *in vitro*

Este objetivo indaga sobre el efecto de Acs purificados a partir de sueros de bovinos infectados naturalmente, inmunizados con Hsp65r o con p34r sobre la viabilidad intracelular de *Map* en un modelo de infección de macrófagos bovinos *in vitro*.

Anticuerpos

Los sueros evaluados se seleccionaron en función del volumen necesario para realizar los ensayos *in vitro* y del volumen disponible. Se estudiaron sueros de 2 bovinos de cada categoría: infectados clínicos (IC), inmunizados con Hsp65r (IHsp65), inmunizados con p34r (Ip34) y controles negativos (CN).

Caracterización de los sueros

Se identificaron los niveles de IgG específicos frente a *Map* ATCC 19698 (bacteria entera inactivada por calor), Hsp65r y p34r de los 8 sueros mediante la metodología de ELISA previamente descrita (Capítulos II y III). Brevemente, las placas fueron sensibilizadas con 0,5 DO₆₀₀ de *Map* o 2 µg de proteínas totales (Hsp65r y p34r) por hoyo. Se pre-adsorbieron los sueros con *E. coli* en medio líquido (para el estudio de Hsp65r y p34r, utilizando la metodología descrita en el Anexo Técnico, página 183) y se estudiaron a una dilución final de 1/100 (para *Map*) y 1/50 (para Hsp65r y p34r). Se llevaron a cabo al menos dos repeticiones independientes de cada evaluación. Los resultados de *Map* están expresados como DO promedio (valores de DO obtenidos para las muestras menos las DO de los controles negativos, que fueron incluidos en cada placa) ± DE. Mientras que los datos de Hsp65r y p34r indican las DO promedio corregidas: DO frente al antígeno - DO frente a extracto de *E. coli* ± DE. Los VC se calcularon sumando al promedio de las DO obtenidas en los sueros controles negativos, dos DE.

Purificación de los anticuerpos

Purificación de anticuerpos por precipitación salina

Los sueros de complementados fueron precipitados dos veces con una solución de sulfato de amonio sobresaturada (la primera al 44 % y la segunda al 40 %). La metodología utilizada se encuentra detallada en el Anexo Técnico (página 184). El rendimiento de la precipitación se evaluó por SDS-PAGE en geles de acrilamida al 12 %, electroforesis en acetato de celulosa y posterior densitometría (Densitometer CT-450, Citocon, Buenos Aires, Argentina). Los Acs aislados se almacenaron a -80°C hasta su uso.

Purificación de anticuerpos por afinidad a proteína G

Para purificar las IgG bovinas se trabajó con columnas comerciales de proteína G-sepharosa (Sigma-Aldrich). Se utilizaron 4 mg de gamma-globulinas (γ -globulinas, obtenidas por precipitación salina) por mL de columna de proteína G. En el Anexo Técnico se desarrolla exhaustivamente la metodología utilizada (página 184). El grado de eficiencia de la purificación se confirmó mediante SDS-PAGE en geles al 12 % de acrilamida. Aquellas fracciones con características similares fueron mezcladas, concentradas (Amicon® Ultra Centrifugal Filtres 30K; Millipore), filtradas por 0,22 μ m (Millex-GP, Millipore) y almacenadas a -80°C hasta su uso. Previo a su utilización en los experimentos de viabilidad, se estimó la concentración proteica de los Acs por la metodología descrita por Bradford (1976) y se confirmó la presencia de las bandas correspondientes a las cadenas pesadas (50 kDa) y livianas (25 kDa) de los Acs por SDS-PAGE. Además con la finalidad de corroborar la capacidad de reconocimiento antigénico, se evaluaron los Acs purificados mediante ELISA.

Estudio de la funcionalidad de los anticuerpos purificados

Para evaluar el papel de los Acs purificados se empleó la línea celular de macrófagos bovinos BoMac (Stabel y Stabel, 1995) y la cepa de *Map* ATCC 19698.

Pre-tratamiento de *Map* con Acs purificados

Map ATCC 19698 almacenadas a -80°C se descongelaron, centrifugaron (10.000 rpm, 30 min, 4°C) e incubaron en medio 7H9 durante 16 hs a 37°C en agitación. Luego, se desagregaron mediante la realización de 15 pasajes en jeringas de tuberculina y se diluyeron en medio RPMI 1640 (RPMI, Gibco, Invitrogen Corp.) sin suero de feto bovino (SFB). El pre-tratamiento consistió en incubar un volumen (Vol.) de *Map* a una concentración de $0,19 \pm 0,01 \text{ DO}_{600\text{nm}}$, que correspondió a $2,53 \pm 0,44 \times 10^6 \text{ UFC} / \text{mL}$, y un Vol. de Acs purificados a una concentración de 200 μg de Acs purificados / mL de RPMI con 5 % de SFB de complementado, durante 45 minutos a 37°C en agitación.

Evaluación de la viabilidad intracelular de *Map* en macrófagos bovinos

Se trabajó con una multiplicidad de infección (MOI) de 1:1 (de Vallière y col., 2005; Periasamy y col., 2013). Se infectaron 2×10^5 BoMac (pasaje n° 25) viables con 200 μL de cada pre-tratamiento Acs-*Map* (previamente desagregado) en placas de 24 hoyos Cellstar (GBO, Greiner Bio-One, Monroe, Carolina del Norte, USA), durante 2 hs (Zurbrick y col., 1987) a 37°C en estufa con 5 % de CO_2 . Las células infectadas se incubaron durante 72 hs (de Vallière y col., 2005; Woo y col., 2006; Weiss y Souza, 2008; Jolly y col., 2011). Cada pre-tratamiento (Acs-*Map*) se evaluó por duplicado: un hoyo para determinar la viabilidad de *Map* ingerida (t_0) y otro hoyo para analizar la viabilidad *Map* luego de 72 hs de infección (t_f). Los macrófagos se lisaron mediante el agregado de 1 mL de 0,2 % de SDS en cada hoyo. Y se realizó la titulación de los sobrenadantes de los hoyos de t_0 y t_f de la siguiente manera: se desagregaron los sobrenadantes, se realizaron diluciones seriadas en base 10 entre 1/10 y 1/1.000 y se sembraron 50 μL / hoyo en placas de 6 hoyos Cellstar (GBO) con medio 7H9 suplementado con micobactina J. La lectura de los cultivos se realizó a los 45 días. Los resultados se expresan como % de viabilidad para cada tratamiento: $\text{UFC } t_f / \text{UFC } t_0 * 100$. El experimento se realizó dos veces y los datos se expresan como promedio del porcentaje de viabilidad bacteriana por grupos $\pm \text{DE}$. La metodología utilizada se encuentra detallada en el Anexo Técnico (página 185).

Bloqueo del efecto de los Acs en la viabilidad intracelular de *Map*

Con el fin de corroborar si la modificación de la viabilidad intracelular de *Map* en macrófagos bovinos se debía a la presencia de Acs, se bloquearon los RFcs. La metodología fue similar a la descrita por Manca y col. (1991). Como bloqueante se utilizaron Acs purificados de un bovino control negativo agregados por calor (10 min a 62°C). Previo a la infección, se incubaron las células BoMac durante 90 min en estufa con 5 % de CO₂ con los Acs agregados a una concentración de 200 µg / hoyo en RPMI sin SFB, mientras que los hoyos sin bloqueo se incubaron en RPMI con 5 % de SFB. Luego, de retirar el medio de cultivo (con o sin bloqueante), se colocaron 200 µL / hoyo de cada pre-tratamiento Acs-*Map* previamente desagregado. La titulación se realizó similar al procedimiento descrito previamente y se calculó el porcentaje de viabilidad bacteriana para cada tratamiento bloqueado y sin bloquear.

Análisis Estadístico

Se compararon las categorías de animales para cada determinación. Y el nivel de significancia se marco como $p < 0,05$.

✓ Se utilizó el software Statistix® 8.0 (Tallahassee, Estados Unidos) para realizar el análisis de Varianza (ANOVA) de poblaciones múltiples; verificando previamente la homogeneidad de varianza y la normalidad de las variables en estudio. En los casos en que se detectaron diferencias estadísticamente significativas, se aplicó el Test de Tukey como post-ANOVA. En aquellos casos en los que no existió homogeneidad de varianzas, los datos fueron analizados por el Test de Kruskal-Wallis seguido de comparación de a pares. Los resultados, de las evaluaciones que se detallan a continuación, fueron transformados en logaritmos naturales previo a su evaluación estadística:

- Acs totales en muestras de suero y MF de bovinos naturalmente infectados (Capítulo I).

- Acs específicos frente a *Map*, *Hsp65r* y PPA en muestras de bovinos naturalmente infectados (Capítulo II).

- IDR y Acs específicos en sueros de terneros infectados experimentalmente (Capítulo III).

✓ Se utilizó el CurvMedCalc Software versión 12 (Mariakerke, Bélgica) para evaluar los rendimientos de IgG, IgG1 e IgG2/ELISA-PPA y construir las curvas Receiver-operating characteristic (ROC) de bovinos infectados (subclínicos y/o clínicos). La sensibilidad de cada técnica fue estimada como el % de muestras positivas de los grupos de bovinos infectados (subclínicos y/o clínicos). La especificidad de cada técnica fue calculada como el % de muestras negativas del grupo de bovinos controles negativos. Las curvas ROC fueron construidas como los puntos de sensibilidad vs. 100 menos especificidad para cada posible valor de corte o sea que grafican los verdaderos positivos vs. falsos positivos (Greiner y col., 2000; Huda y col., 2004). Se estimaron las áreas bajo las curvas de cada curva ROC (ABC) y se compararon por el método que describieron DeLong y col. (1988). Se trabajó con los valores de corte (para cada isotipo de IgG/ELISA-PPA) obtenidos a partir de las curvas ROC.

Capítulo 1

Efecto de la infección por *Map* en los niveles de anticuerpos totales en muestras de suero y MF de bovinos en distintos estadios de la patología

Resultados

A fin de identificar si la infección con *Map* afecta la producción de inmunoglobulinas totales en bovinos se estudiaron 8 bovinos que se clasificaron en cuatro grupos. De los 4 bovinos infectados con signos clínicos compatibles de paratuberculosis, se identificaron 2 con niveles de proteínas totales en suero inferiores al normal (6,2 g / dL), por lo que fueron clasificados como “infectados terminales”. En la Tabla 10 se muestran los grupos de bovinos estudiados.

Grupos	Caravanas	Procedencia	Signos clínicos	ELISA PPA	PCR MF y/o leche	Proteínas totales
Controles negativos (CN)	TC 476	-	-	-	-	7,1 6,5
Infectados subclínicos (ISC)	5224 5495	+ +	- -	sosp +	+ +	8,4 8,0
Infectados clínicos (IC)	O7 2651	+ +	+ +	+ +	+ +	6,5 8,0
Infectados Terminales (IT)	Ama 4205	+ +	+ +	+ sosp	+ +	5,0 4,3

Tabla 10. Grupos de bovinos estudiados. Los datos de procedencia, signos clínicos, ELISA y PCR están expresados como + (positivos), - (negativos) o sosp (sospechoso); mientras que los de proteínas totales en suero están informados en promedio de g / dL.

En estos animales se determinaron los niveles de Acs totales según la metodología descrita en materiales y métodos. Debido a los grandes desvíos y el bajo número de animales, en la mayoría de los casos, no se hallaron diferencias significativas entre los grupos

de bovinos estudiados mediante el análisis por ANOVA, sin embargo se detectaron ciertas tendencias.

Los resultados de los niveles totales de IgM se muestran en la Figura 15.

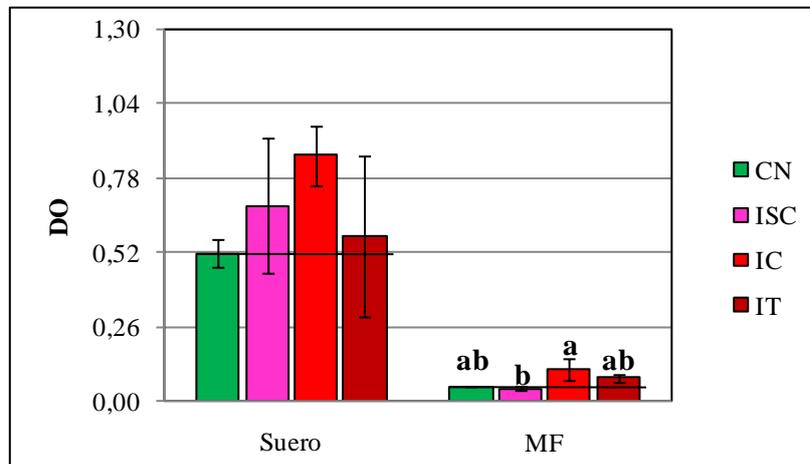


Figura 15. Niveles totales de IgM en muestras de suero y de materia fecal (MF) evaluados por ELISA. Las muestras fueron estudiadas 1/6.000 (suero) y 1 g / mL (MF). Los datos están expresados en densidades ópticas promedio (DO) \pm desvío estándar. Grupos: controles negativos (CN, n = 2), infectados subclínicos (ISC, n = 2), infectados clínicos (IC, n = 2) e infectados terminales (IT, n = 2). Las letras indican diferencias significativas entre grupos.

El estudio de IgM mostró incrementos en muestras de suero del grupo de bovinos infectados clínicos en relación a los controles. Se pudo detectar un incremento significativo de este isotipo en muestras de los bovinos infectados clínicos en relación a los subclínicos (Figura 15).

Los resultados obtenidos en la evaluación de IgG total se muestran en la Figura 16.

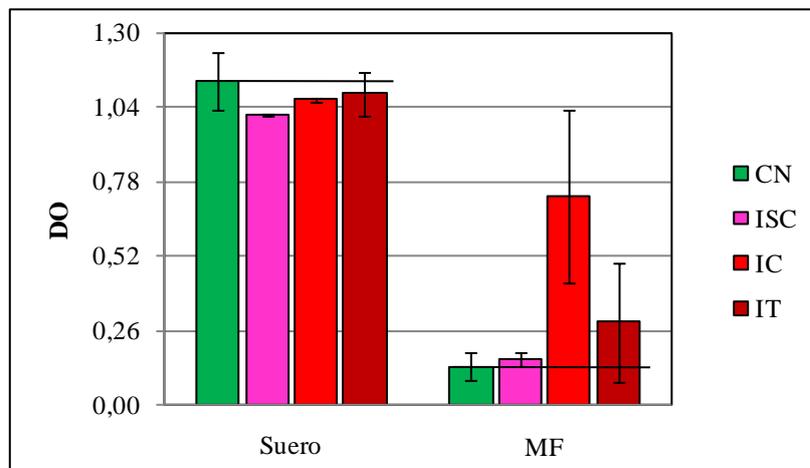


Figura 16. Niveles totales de IgG en muestras de suero y de materia fecal (MF) evaluados por ELISA. Las muestras fueron estudiadas 1/20.000 (suero) y 10 mg / mL (MF). Los datos están expresados en densidades ópticas promedio (DO) \pm desvío estándar. Grupos: controles negativos (CN, n = 2), infectados subclínicos (ISC, n = 2), infectados clínicos (IC, n = 2) e infectados terminales (IT, n = 2).

Los niveles de IgG en sueros fueron similares entre los grupos de bovinos estudiados pero se evidenció una tendencia a disminuir en las muestras provenientes de los bovinos infectados. Mientras que en el análisis de los niveles totales de IgG en muestras de MF, se detectaron incrementos en infectados clínicos y terminales (Figura 16).

Los resultados de IgA totales en muestras de suero y MF se muestran en la Figura 17.

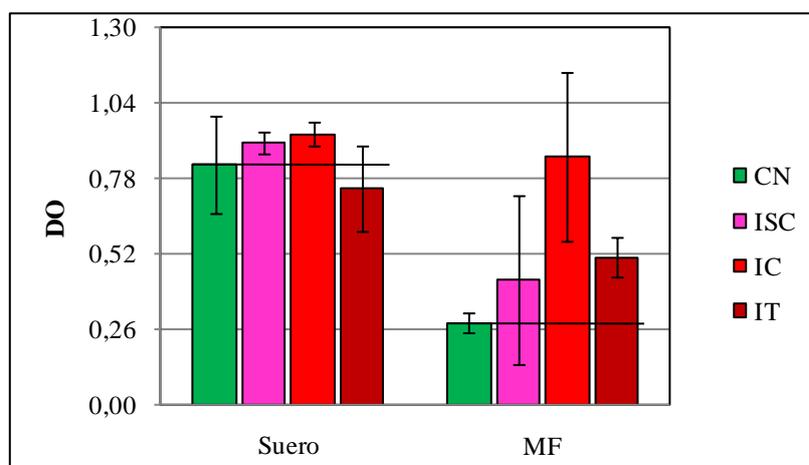


Figura 17. Niveles totales de IgA en muestras de suero y de materia fecal (MF) evaluados por ELISA. Las muestras fueron estudiadas 1/200 (suero) y 20 mg / mL (MF). Los datos están expresados en densidades ópticas promedio (DO) \pm desvío estándar. Grupos: controles negativos (CN, n = 2), infectados subclínicos (ISC, n = 2), infectados clínicos (IC, n = 2) e infectados terminales (IT, n = 2).

Los niveles de IgA en sueros fueron similares entre los grupos estudiados, sin embargo en bovinos infectados subclínicos y clínicos se mostraron levemente incrementados. El estudio de MF detectó aumentos en los grupos infectados clínicos y terminales.

Discusión

Este estudio identificó los niveles de isotipos de inmunoglobulinas totales en muestras de suero y MF de bovinos infectados con *Map* en diferentes estadios de la patología. Las grandes variaciones entre individuos del mismo grupo y el escaso número de animales dificultaron el análisis estadístico de los resultados, pero se pudieron observar ciertas diferencias entre grupos. Por ejemplo, en muestras de suero y materia fecal de bovinos infectados clínicos se detectaron incrementos de IgM, isotipo indicador de respuesta activa esperable en infecciones agudas o re-agudizaciones de infecciones crónicas. Por lo tanto, este aumento podría reflejar la re-estimulación de nuevos clones de LB como respuesta a la re-infección endógena por *Map*. Además, los niveles de IgM totales detectados en muestras de suero y MF podrían corresponder a Acs naturales. Estos Acs son producidos por LB1 ubicados principalmente en la cavidad peritoneal (Tizard, 2013) y podrían haber sido estimulados de forma inespecífica por la lesión intestinal producida por la patología. Los niveles de IgM en muestras de materia fecal fueron bajos en relación al suero en coincidencia con los datos publicados por Butler para la especie bovina en general (1983). El incremento de IgM detectado en muestras de MF de los bovinos infectados clínicos podría estar relacionado con el grado de lesión a nivel local, que permitiría el escape de estos Acs hacia la luz intestinal dado que estos animales también presentaron aumentos de este isotipo a nivel sérico.

La IgG se encontró levemente disminuida en sueros de los bovinos infectados similar a un estudio realizado en ovinos infectados experimentalmente (Begara-McGorum y col., 1998). Koets y col. (2001) estudiaron los niveles séricos totales de IgG1 e IgG2 en bovinos infectados con *Map*; su descripción es contradictoria con nuestros resultados, ya que identificaron incrementos en los niveles de IgG1 e IgG2 en sueros de infectados subclínicos. Esta diferencia podría deberse al mayor número de animales incluidos en el estudio, los isotipos evaluados así como también la metodología y reactivos utilizados.

Nuestros resultados muestran incrementos en los niveles de IgG e IgA en muestras de materia fecal de bovinos infectados clínicos y terminales. En contraposición, Begara-McGorum y col. (1998) no detectaron diferencias en las cantidades de IgA totales en muestras de MF mientras que los niveles de IgG, se hallaron descendidos en muestras de ovinos infectados experimentalmente con *Map*. Nuestro hallazgo podría estar indicando la

estimulación en la producción de Acs a nivel local (dado que son los isotipos que predominan en intestino; Butler, 1983) o el pasaje de Acs a partir de la circulación sistémica ya que se ha descrito que el incremento de la permeabilidad vascular en bovinos con paratuberculosis genera la pérdida de 39 g de proteínas plasmáticas a través de la materia fecal por día (Patterson y col., 1967). Si consideramos además que esta patología afecta a la absorción de aminoácidos a nivel intestinal (Patterson y Berrett, 1969), podrían en conjunto ser las causas responsables del balance proteico negativo así como el agravamiento abrupto que sufren los bovinos en este estadio de la paratuberculosis. En este sentido, Donat y col. (2014) describieron que bovinos positivos al cultivo de muestras de MF poseen niveles inferiores de proteínas séricas totales.

Conclusiones

Hemos podido detectar variaciones en los niveles de inmunoglobulinas en los bovinos infectados con *Map* dependiendo del estadio de la patología. Los animales con paratuberculosis clínica mostraron incrementos en los niveles de IgM en sueros y de IgM, IgG e IgA a nivel local (en muestras de materia fecal). Estos datos revelan la pérdida de proteínas de alta calidad (Igs detectadas en muestras de MF) que contribuirían a generar al estado de desnutrición característico de esta patología en los estadios terminales.

Nuestros hallazgos en el estudio de bovinos con paratuberculosis clínica rechazan la hipótesis planteada: “La infección con *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* disminuye los niveles totales de anticuerpos en bovinos”.

Capítulo II

Respuesta inmune humoral específica frente a *Map* y sus proteínas en bovinos naturalmente infectados en distintos estadios de la patología

Los estudios de la paratuberculosis muestran que la relación entre el huésped y el microorganismo es muy compleja. Numerosos mecanismos de la respuesta inmune en la paratuberculosis son aún desconocidos; los nuevos aportes al conocimiento de la respuesta inmune inducida por la infección por *Map* podrían tener implicancia para el desarrollo de metodologías diagnósticas así como de vacunas nuevas y exitosas.

Para cumplir con el objetivo general 2, se estudiaron los anticuerpos específicos frente a *Map* (bacteria entera) o sus proteínas en muestras de bovinos naturalmente infectados en distintos estadios de la paratuberculosis.

Resultados

Niveles de isotipos de inmunoglobulinas específicos frente a *Map* y Hsp65r en bovinos

Desarrollo de reactivos

Producción de IgG3r

Para lograr este objetivo, se produjo el patrón IgG3r dado que este Ac no se encuentra disponible comercialmente. Mediante la metodología descrita se logró la expresión y la purificación parcial de IgG3r (Figura 18). El proceso de purificación fue exitoso sin embargo se observaron pequeñas cantidades de otras bandas proteicas provenientes de la bacteria. Se produjeron aproximadamente 10 mg de IgG3r, la cual fue luego utilizada como proteína patrón para estudiar la cantidad de IgG3 en las muestras de suero y MF.

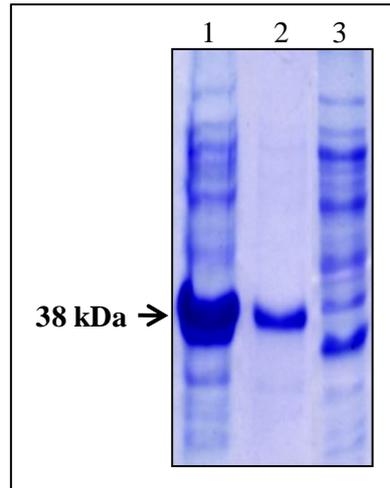


Figura 18. Expresión y purificación parcial de IgG3r. SDS-PAGE en gel de poliacrilamida al 12% teñido con 0,1 % azul de coomassie: calle 1: *E. coli* BL21 pLysS transformada con IgG3-pRSET A; calle 2: IgG3r parcialmente purificada por cromatografía de afinidad a níquel; calle 3: *E. coli* BL21 pLysS transformada con pRSET A sin inserto.

Producción de Hsp65r

Para poder evaluar la respuesta humoral inducida en la infección natural en bovinos frente a la Hsp65r, fue necesaria la producción de la proteína recombinante. La Hsp65r obtenida se identificó como una banda entre 28,9 y 34,5 kDa (Figura 19, calle 2), en coincidencia con el peso teórico esperado. Se obtuvieron aproximadamente 8 mg de Hsp65r parcialmente purificada, la cual se destinó a los ensayos de ELISA y a la inmunización de bovinos.

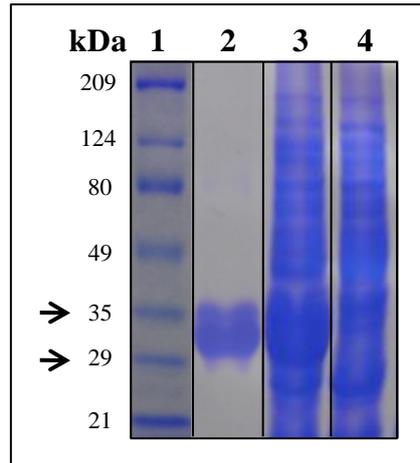


Figura 19. Expresión y purificación de Hsp65r. SDS-PAGE en gel de poliacrilamida al 12 % teñido con 0,1 % azul de coomassie. Calle 1: patrón de pesos moleculares pre-teñido (Bio-Rad) con fragmentos de 209, 124, 80, 49, 34,8, 28,9, 20,6, 7,1 kDa (último fragmento no visible); con flechas se marcan los patrones de 34,8 y 28,9 kDa; calle 2: Hsp65r parcialmente purificada; calle 3: *E. coli* BL21 pLysS transformada con Hsp65-pRSET; calle 4: *E. coli* BL21 pLysS transformada con pRSET A sin inserto.

Niveles de los isotipos de inmunoglobulinas específicos a *Map*

Animales

Se trabajó con muestras de bovinos naturalmente infectados con *Map* para evaluar los niveles de IgM, IgG, IgG1, IgG2, IgG3 e IgA específicos a la bacteria entera en sueros y SMF. Los grupos de animales se muestran en la Tabla 11.

Grupos	Caravanas	Procedencia	Signos clínicos	ELISA PPA	PCR MF y/o leche
	TC	-	-	-	-
CN n = 4	476	-	-	-	-
	483	-	-	-	-
	484	-	-	-	-
	7008	+	-	-	+
ISC n = 5	5495	+	-	+	+
	6652	+	-	-	+
	6669	+	-	-	+
	6873	+	-	sosp	+
	07	+	+	+	+
IC n = 6	2651	+	+	+	+
	6616	+	+	+	+
	Ama	+	+	+	+
	4205	+	+	sosp	+
	Sole 3	+	+	+	+

Tabla 11. Grupos de bovinos estudiados. Los datos están expresados como + (positivos), - (negativos), sosp: sospechoso. Grupos: controles negativos (CN, n = 4), infectados subclínicos (ISC, n = 5), infectados clínicos (IC, n = 6).

Niveles de IgM *Map*-específica

Los resultados del estudio de niveles de IgM *Map*-específicas en muestras de suero y sMF se muestran en la Figura 20. Los niveles fueron bajos (principalmente en sMF) y no se detectaron diferencias entre los grupos estudiados.

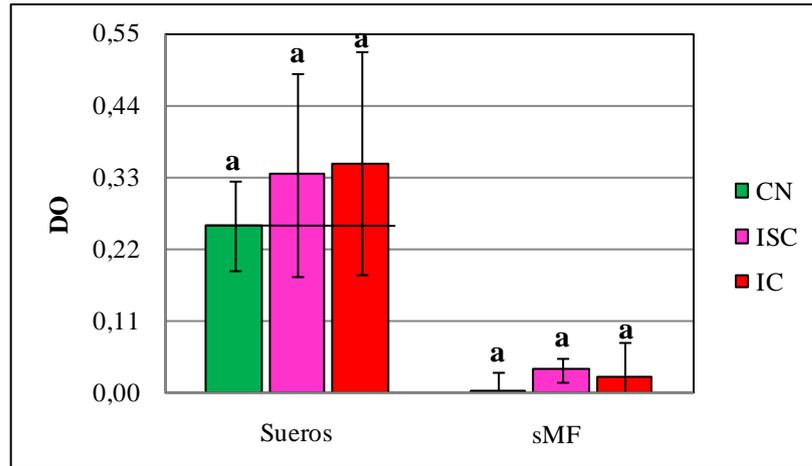


Figura 20. Niveles de IgM específicas a *Map* en muestras de suero y sobrenadante de muestras de materia fecal (sMF) evaluados por ELISA. Las muestras fueron estudiadas 1/10 (suero) y sin diluir (sMF). Los datos están expresados en densidades ópticas promedio (DO) \pm desvío estándar. Grupos: controles negativos (CN, n = 4), infectados subclínicos (ISC, n = 5) e infectados clínicos (IC, n = 6). Las letras indican diferencias significativas entre grupos.

Concentración de IgA *Map*-específica

Los niveles de IgA específicas a *Map* en muestras de suero y materia fecal se muestran en la Figura 21.

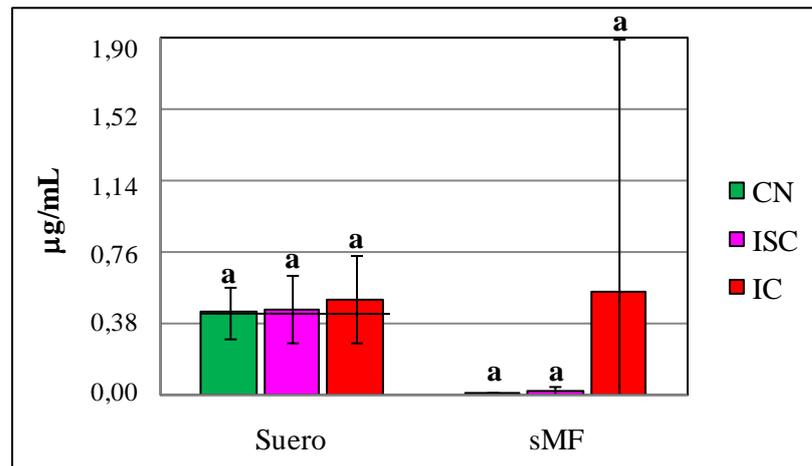


Figura 21. Niveles de IgA específicas a *Map* en muestras de suero y sobrenadante de muestras de materia fecal (sMF) evaluados por ELISA. Los datos están expresados en $\mu\text{g} / \text{mL}$ promedio \pm desvío estándar. Grupos: controles negativos (CN, n = 4), infectados subclínicos (ISC, n = 5) e infectados clínicos (IC, n = 6). Las letras indican diferencias significativas entre grupos.

El estudio de IgA en suero, no mostró diferencias entre los grupos de bovinos estudiados. En sMF, el hallazgo de IgA fue aislado y en muy baja concentración; sólo se detectó este isotipo en 3 de 11 de los bovinos infectados estudiados (dos correspondientes a la categoría ISC y uno a la IC): 0,06 $\mu\text{g} / \text{mL}$ (5495, ISC), 0,03 $\mu\text{g} / \text{mL}$ (6669, ISC) y destacándose un animal del grupo infectado clínico (07) que arrojó niveles de 3,29 $\mu\text{g} / \text{mL}$. El resto de los animales demostraron niveles basales (por debajo del límite de detección de la técnica: 0,02 $\mu\text{g} / \text{mL}$).

Niveles de IgG *Map*-específica

En la Figura 22 se grafican los datos de IgG específica a *Map* en muestras de suero y MF.

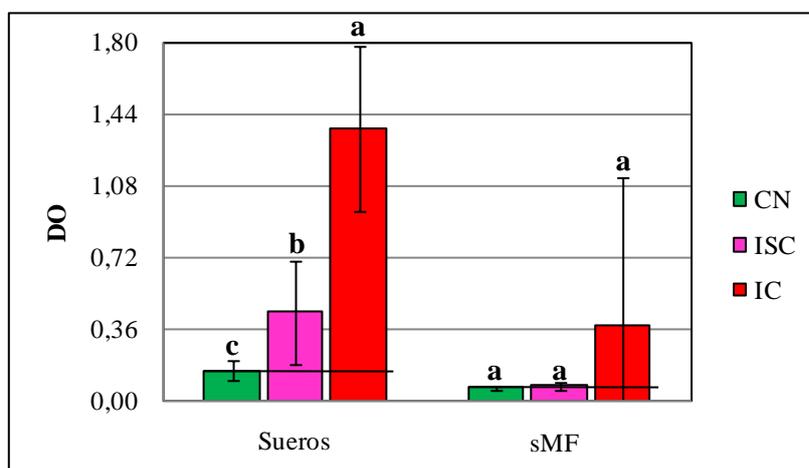


Figura 22. Niveles de IgG específicas a *Map* en muestras de suero y sobrenadantes de muestras de materia fecal (sMF) evaluados por ELISA. Las muestras fueron estudiadas 1/100 (suero) y sin diluir (sMF). Los datos están expresados en densidades ópticas promedio (DO) \pm desvío estándar. Grupos: controles negativos (CN, n = 4), infectados subclínicos (ISC, n = 5) e infectados clínicos (IC, n = 6). Las letras indican diferencias significativas entre grupos.

Se identificaron incrementos significativos ($p = 0,0001$) en los niveles de IgG *Map*-específica en muestras de suero de los bovinos infectados subclínicos y clínicos. El grupo infectado clínico mostró los mayores niveles ($1,367 \pm 0,419$ DO; Figura 22).

En sMF no se detectaron diferencias entre grupos (Figura 22). Similar a los resultados de IgA, los niveles de IgG fueron basales a excepción del animal 07 (IC), que mostró una DO de $1,912 \pm 0,016$.

Concentraciones de IgG1, IgG2 e IgG3 *Map*-específicas

Los resultados de las cantidades de IgG1 *Map*-específica en sueros y sMF se muestran en la Figura 23.

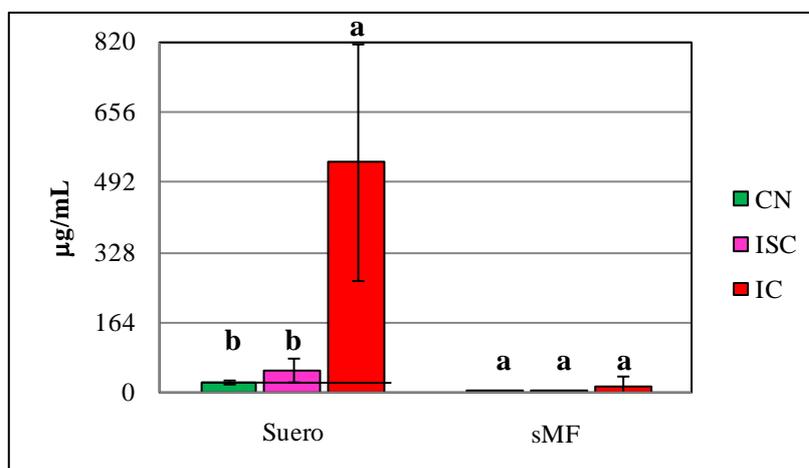


Figura 23. Niveles de IgG1 específicas a *Map* en muestras de suero y sobrenadantes de muestras de materia fecal (sMF) evaluados por ELISA. Los datos están expresados en $\mu\text{g} / \text{mL}$ promedio \pm desvío estándar. Grupos: controles negativos (CN, $n = 4$), infectados subclínicos (ISC, $n = 5$) e infectados clínicos (IC, $n = 6$). Las letras indican diferencias significativas entre grupos.

Se detectaron incrementos ($p < 0,0001$) de IgG1 en las muestras de suero correspondientes a los bovinos infectados clínicos. Mientras que, la cantidad de IgG1 *Map*-específica en sMF del bovino 07 (IC) fue de $60,75 \pm 8,25 \mu\text{g} / \text{mL}$, el resto de los animales demostraron niveles basales (Figura 23).

Las concentraciones de IgG2 *Map*-específica en sueros y sMF se muestran en la Figura 24.

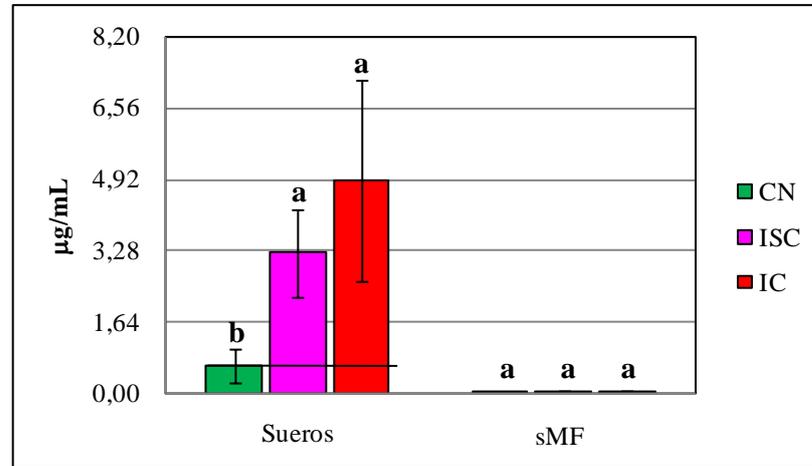


Figura 24. Niveles de IgG2 específicas a *Map* en muestras de suero y sobrenadantes de muestras de materia fecal (sMF) evaluados por ELISA. Los datos están expresados en µg / mL promedio ± desvío estándar. Grupos: controles negativos (CN, n = 4), infectados subclínicos (ISC, n = 5) e infectados clínicos (IC, n = 6). Las letras indican diferencias significativas entre grupos.

Se detectaron incrementos significativos ($p = 0,001$) de IgG2 en todas las muestras de suero de los bovinos infectados mientras que los niveles en sMF fueron bajos (Figura 24).

En la Figura 25 se muestran los datos de las cuantificaciones de IgG3 *Map*-específica en sueros y sMF.

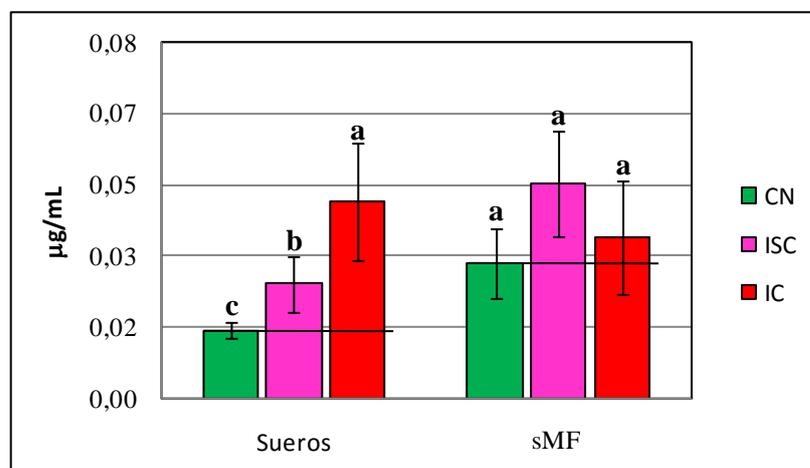


Figura 25. Niveles de IgG3 específicas a *Map* en muestras de suero y sobrenadantes de muestras de materia fecal (sMF) evaluados por ELISA. Los datos están expresados en $\mu\text{g} / \text{mL}$ promedio \pm desvío estándar. Grupos: controles negativos (CN, $n = 4$), infectados subclínicos (ISC, $n = 5$) e infectados clínicos (IC, $n = 6$). Las letras indican diferencias significativas entre grupos.

A pesar que la concentración de IgG3 específica a *Map* es baja, se detectaron incrementos significativos de IgG3 en sueros de ambos grupos de bovinos infectados, pudiendo diferenciarse los IC de los ISC. Las cantidades de IgG3 en sMF fueron altas en relación al suero. Si bien no se detectaron diferencias significativas entre grupos, el grupo infectado subclínico mostró los más altos valores de IgG3 ($0,049 \pm 0,012\mu\text{g} / \text{mL}$; Figura 25).

Niveles de anticuerpos específicos frente a Hsp65r

La necesidad de mejorar la identificación de bovinos infectados con *Map* principalmente en estadio subclínico amerita la búsqueda de antígenos para ser utilizados con fines diagnósticos. Las Hsp son consideradas antígenos inmunodominantes en las infecciones micobacterianas (Koets y col., 1999 y 2001; Afzal col., 2015). La Hsp65 fue la proteína seleccionada, ya que Koets y col. (1999 y 2001) identificaron que induce una respuesta inmune principalmente de tipo humoral.

Animales

Se estudiaron muestras de suero de bovinos naturalmente infectados con *Map* en distintos estadios de la patología (subclínicos y clínicos, Tabla 12). Como controles, se incorporaron sueros provenientes de bovinos negativos y sueros de bovinos inmunizados con Hsp65r (IHsp65).

Grupos	N	Procedencia	Signos clínicos	PCR MF y/o leche
Controles Negativos (CN)	18	-	-	-
Inmunizados con Hsp65r (IHsp65)	4	-	-	-
Infectados Subclínicos (ISC)	10	+	-	+
Infectados Clínicos (IC)	9	+	+	+

Tabla 12. Grupos de bovinos utilizados en este estudio. Los datos están expresados como + (positivos) o - (negativos).

Acs específicos a Hsp65r

Los resultados de DO detectados por ELISA se muestran en la Figura 26.

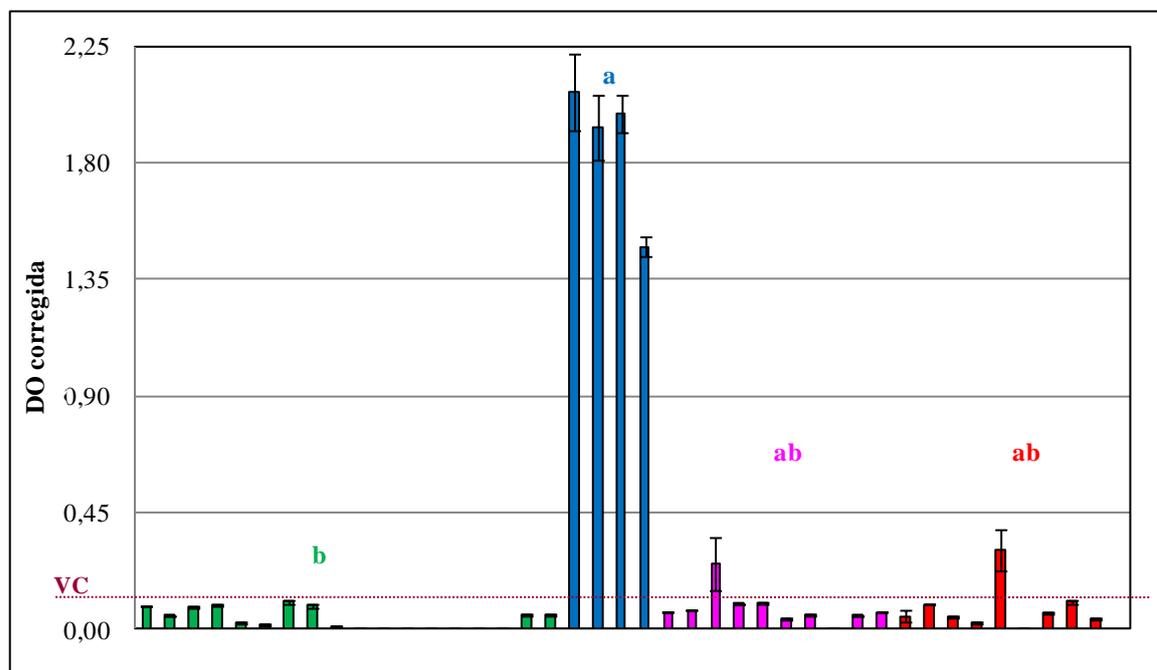


Figura 26. Anticuerpos específicos a Hsp65r en muestras de suero de bovinos evaluados por ELISA. Los sueros fueron pre-adsorbidos con *E. coli* y estudiados 1/50. Los datos están expresados en densidades ópticas (DO) promedio corregidas: DO frente a Hsp65r - DO frente a extracto de *E. coli* \pm desvío estándar. La línea punteada representa el valor de corte (VC, promedio de las DO obtenidas en los sueros controles negativos más dos DE): 0,122 DO. Grupos: controles negativos (barras verdes, n = 18), inmunizados con Hsp65r (barras azules, n = 4), infectados subclínicos (barras rosas, n = 10), infectados clínicos (barras rojas, n = 9). Las letras indican diferencias significativas entre los grupos.

Los bovinos inmunizados con Hsp65r mostraron altos niveles ($p = 0,001$) de IgG específica a la proteína recombinante. La reactividad por parte de los sueros de bovinos infectados fue baja: sólo mostraron DO superiores al valor de corte 1 de los 10 bovinos infectados subclínicos (10 %) y 1 de los 9 bovinos infectados clínicos (11 %; Figura 26). En base a que el porcentaje de animales detectados como positivos fue tan bajo, no se profundizó el estudio de isotipos específicos a Hsp65r.

El uso de la técnica de ELISA de isotipos de IgG específicos frente a PPA en sueros de bovinos naturalmente infectados

A partir del hallazgo de incrementos en los niveles de IgG, IgG2 e IgG3 específicas en sueros de bovinos naturalmente infectados en estadio subclínico, se evaluó la aplicación de la técnica de ELISA de isotipos de IgG específicos frente a PPA en sueros de bovinos provenientes de rodeos infectados con *Map*. PPA fue el antígeno utilizado debido a que es el recomendado por la OIE (2008) y es el más utilizado en el diagnóstico serológico a nivel mundial (Gilardoni y col., 2012; OIE, 2014).

Se trabajó con muestras de leche, suero y MF de 108 bovinos que fueron categorizados en: expuestos, infectados subclínicos, infectados clínicos y controles negativos (Tabla 13).

Grupos	N	Procedencia	Signos clínicos	PCR MF y/o leche
Controles Negativos (CN)	38	-	-	-
Expuestos (E)	30	+	-	-
Infectados Subclínicos (ISC)	26	+	-	+
Infectados Clínicos (IC)	14	+	+	+

Tabla 13. Grupos de bovinos. Los datos están expresados como + (positivos) o - (negativos).

Los resultados de IgG, IgG1 e IgG2/ELISA-PPA se muestran en la Figura 27.

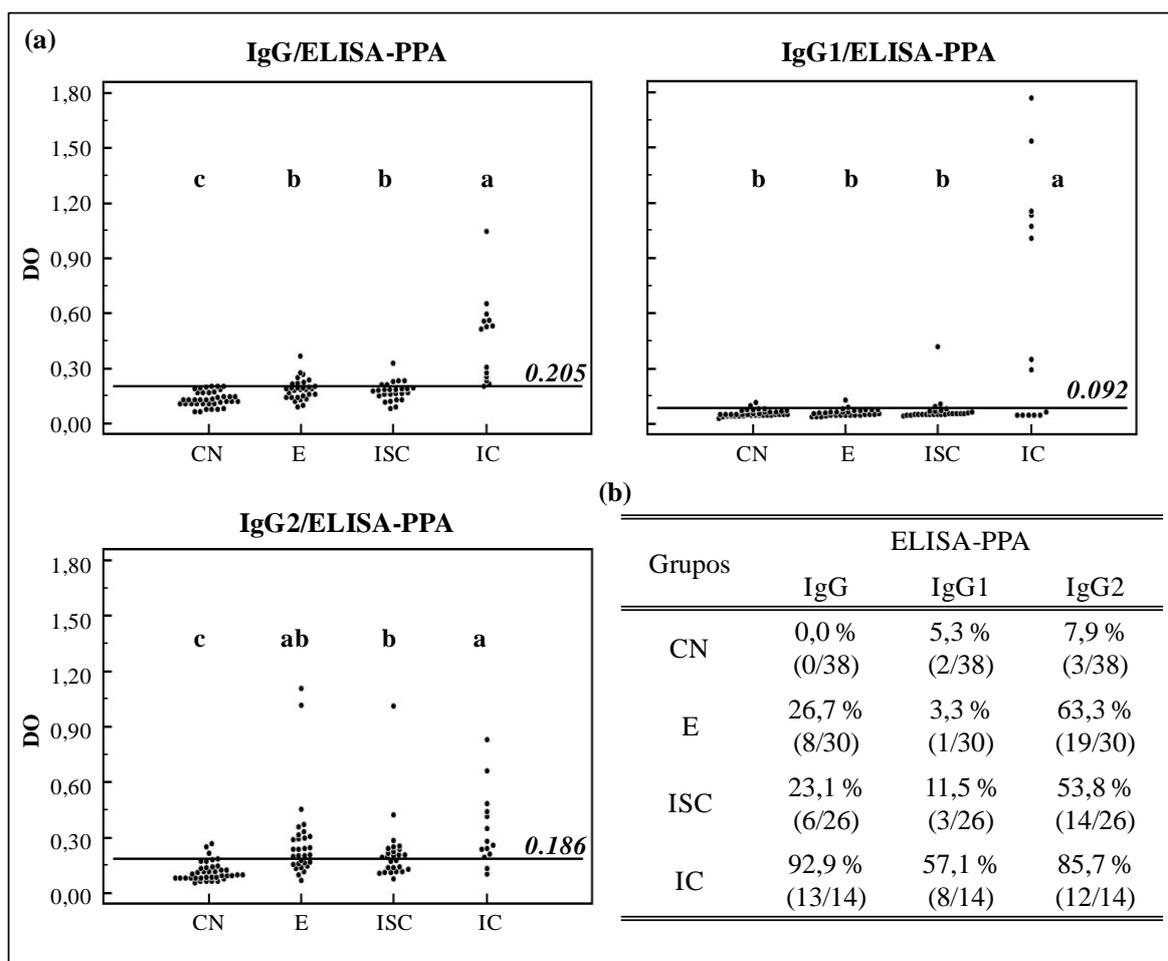


Figura 27. Resultados de los isotipos de IgG/ELISA-PPA. Gráficos de puntos de IgG, IgG1 e IgG2/ELISA-PPA (a): los resultados están representados como promedio de densidades ópticas (DO); las líneas y los números en *itálica* representan los valores de corte (VC, obtenidos a partir de las curvas ROC). Las letras indican diferencias significativas entre grupos. Positividad de IgG, IgG1 e IgG2/ELISA-PPA por grupo (b): porcentajes de positividad; entre paréntesis se indican números de animales positivos *vs.* números de animales totales por grupo. Grupos: controles negativos (CN, n = 38), expuestos (E, n = 30), infectados subclínicos (ISC, n = 26) e infectados clínicos (IC, n = 14).

Los niveles de IgG PPA-específica se encontraron aumentados ($p < 0,0001$) en suero de todos los grupos de bovinos provenientes de rodeos infectados con *Map* (expuestos, infectados subclínicos e infectados clínicos). El grupo de bovinos infectados clínicos mostró 92,9 % de positividad y alcanzó los valores de DO más altos. Mientras que, el grupo de infectados subclínico sólo expuso 23,1 % de positividad.

Al analizar los datos del IgG1/ELISA-PPA, sólo el grupo de bovinos infectados clínicos reveló incrementos en los niveles de este isotipo ($p = 0,002$). Sin embargo, el porcentaje de positividad detectado para este grupo fue del 57,1 %.

Los niveles de IgG2 específicos frente a PPA resultó significativamente ($p < 0,0001$) incrementado en todos los grupos provenientes de rodeos infectados con *Map* (expuestos, infectados subclínicos e infectados clínicos). Los porcentajes de positividad fueron de 53,8 y 85,7 para los grupos de bovinos infectados subclínicos e infectados clínicos, respectivamente.

El estudio de IgG3 específica frente a PPA en suero arrojó resultados muy bajos, lo cual imposibilitó su análisis. Los promedios de las DO obtenidos fueron: $0,019 \pm 0,017$ (bovinos infectados) y $0,005 \pm 0,006$ (controles negativos).

Las curvas ROC y el análisis de los ABC de los IgG, IgG1 e IgG2/ELISA-PPA de los grupos infectados subclínicos e infectados clínicos se muestran en la Figura 28.

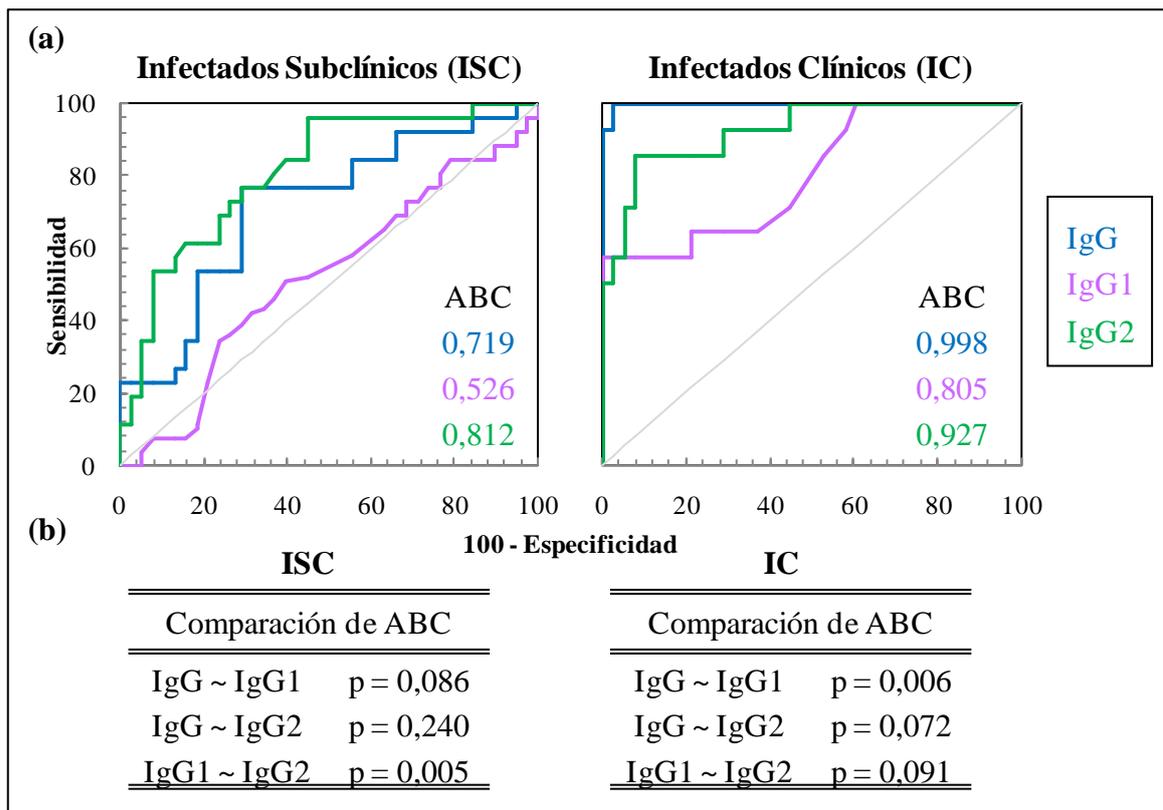


Figura 28. Rendimientos de isotipos de IgG/ELISA-PPA de bovinos infectados subclínicos (ISC) e infectados clínicos (IC). Curvas ROC y áreas bajo las curvas (ABC) para IgG (azul), IgG1 (violetas) e IgG2 (verdes)/ELISA-PPA (a). Análisis estadístico (comparación) entre dos ABC (b).

Los ABC fueron superiores para los infectados clínicos en relación a los obtenidos para los bovinos infectados subclínicos.

En la Tabla 14 se expresan los valores de especificidad y sensibilidad para los IgG, IgG1 e IgG2/ELISA-PPA.

ELISA PPA	Especificidad	Sensibilidad		
		Subclínicos	Clínicos	Total
IgG	100,0 %	23,1 %	92,9 %	47,5 %
IgG1	94,7 %	11,5 %	57,1 %	27,5 %
IgG2	92,1 %	53,8 %	85,7 %	65,0 %

Tabla 14. Especificidad y sensibilidad de isotipos de IgG/ELISA-PPA. La especificidad de cada técnica fue calculada como el % de bovinos negativos del grupo de controles negativos. La sensibilidad de cada técnica fue estimada como el % de bovinos positivos de los grupos de infectados con *Map* (subclínicos y/o clínicos).

El IgG/ELISA-PPA mostró la mayor especificidad (100 %) y sensibilidad para los infectados clínicos (92,9 %, Tabla 14), así como también, el más alto ABC (0,998, Figura 28). Sin embargo, esta prueba sólo detectó como positivos 6/26 (23,1 %) de los bovinos infectados subclínicos y 8/30 (26,7 %) de los expuestos (Figura 27b).

El IgG1/ELISA-PPA mostró bajos rendimientos (principalmente para el grupo de bovinos infectados subclínico) y una baja sensibilidad (27,5 % del total de bovinos infectados, Figura 28 y Tabla 14).

El IgG2/ELISA-PPA mostró una especificidad del 92,1 % (Tabla 14) y la mejor *performance* para los infectados subclínicos (ABC = 0,812, Figura 28) en comparación con los IgG/ELISA-PPA (ABC = 0,719) e IgG1/ELISA-PPA (ABC = 0,526). Este ELISA detectó al 53,8 % de los animales infectados subclínicos y 63,3 % de los expuestos (Figura 27b). Es de destacar que el IgG2/ELISA-PPA mostró la máxima sensibilidad (65,0 %, teniendo en cuenta todos los bovinos infectados; Tabla 14) y detectó 26/40 del total de los bovinos infectados, mientras que sólo 19/40 fueron identificados por el IgG/ELISA-PPA (Figura 27b).

Discusión

El estudio de los anticuerpos a nivel sistémico y local aporta datos para una comprensión más profunda de la inmunopatogenia de la paratuberculosis así como también para su aplicación en diagnóstico.

La identificación de los bovinos infectados con *Map* representa un desafío para los veterinarios, principalmente en los estadios tempranos de la paratuberculosis en los que no se manifiestan los signos clínicos y se excretan bacterias de manera intermitente. La detección indirecta de los animales infectados a través de la evaluación de Acs específicos constituye una estrategia práctica en relación al cultivo del agente infeccioso. Sin embargo, los niveles de Acs en sueros son bajos en el estadio subclínico (Nielsen y Toft, 2008), por lo que el estudio de isotipos de inmunoglobulinas o de nuevos antígenos podría mejorar las herramientas diagnósticas existentes.

A fin de arribar a un panorama general de la respuesta inmune humoral inducida en la infección natural por *Map* en bovinos, se decidió evaluar los isotipos específicos frente a la bacteria entera. Los niveles de IgM detectados fueron bajos y no se hallaron diferencias entre los grupos, en concordancia con trabajos publicados (Yokomizo y col., 1985; Koets y col., 2001; Mundo y col., 2008). Sin embargo, Abbas y Riemann (1988) informaron incrementos significativos de este isotipo con especificidad a PPA en muestras de suero de bovinos infectados con *Map*. Teniendo en cuenta el hallazgo de IgM total aumentada en sueros de bovinos con paratuberculosis clínica (Capítulo I) no así los niveles de IgM específicos a *Map*, los Acs naturales podrían ser los implicados en el incremento de IgM total. La lesión intestinal, que se genera en los estadios avanzados de la paratuberculosis, altera la barrera mucosa por lo que microorganismos comensales o alimentos podrían estimular a LB1. Estos linfocitos presentan un patrón de migración propio relacionado con las mucosas, y producen grandes cantidades de Acs naturales, y junto con los LB de la zona marginal del bazo son importantes como primera línea de defensa antibacteriana, ya que pueden responder al ingreso de patógenos y producir Acs sin requerir la colaboración con los LT. Dado que la IgM es una inmunoglobulina pentamérica que posee alta avidéz pero poca afinidad, hipotetizamos que reaccionaría con *Map* de manera cruzada. Posiblemente, ésta sea la causa de las diferencias entre los resultados presentados y los publicados por Abbas y Riemann (1988).

Los niveles de IgA sérica fueron similares entre los grupos de bovinos estudiados, en coincidencia con trabajos que describieron bajos niveles de IgA específica (Yokomizo y col., 1985; Abbas y Riemann, 1988) y detectable sólo en algunos animales (Abbas y Riemann, 1988; Koets y col., 2001).

Todos los bovinos infectados mostraron incrementados los niveles de IgG *Map*-específica en suero. Por lo tanto, este hallazgo en muestras séricas de bovinos infectados subclínicos indicaría que los Acs aparecen tempranamente en la infección natural por *Map*. En este sentido, trabajos publicados detectaron aumentos significativos de IgG específica frente a *Map* (bacteria entera) y/o PPA en sueros de bovinos infectados (Abbas y Riemann, 1988; Mundo y col., 2008). Además, los mayores niveles de IgG se identificaron en las muestras de los animales infectados clínicos.

La IgG1 *Map*-específica se detectó incrementada únicamente en sueros de los bovinos infectados en estadio clínico en concordancia con otros estudios que utilizaron diferentes antígenos: bacteria entera, PPA, PPDp, p34r y LAM (Yokomizo y col., 1985; Koets y col., 2001; Mundo y col., 2008; Jolly y col., 2011). Koets y col. (2001) también hallaron aumentos de IgG1 en sueros de bovinos infectados en estadio subclínico utilizando los antígenos Hsp65 y LAM.

Nuestros resultados muestran altos niveles de IgG2 específica a bacteria entera en sueros de todos los bovinos infectados, en coincidencia con trabajos previos que han descrito IgG2 específica frente a diversos antígenos de *Map* en sueros de bovinos con paratuberculosis clínica: bacteria entera, PPA y PPDp (Koets y col., 2001; Mundo y col., 2008). Mientras que, en otros experimentos con bovinos con paratuberculosis clínica no se hallaron aumentos específicos frente a PPA, Hsp, p34r y LAM (Yokomizo y col., 1985; Koets y col., 2001; Mundo y col., 2008).

En cuanto a los bovinos infectados subclínicos, nuestros resultados coinciden con el trabajo publicado por Koets y col. (2001), quienes identificaron incrementos de IgG2 específica a distintos antígenos de *Map* (PPDp, Hsp70 y LAM).

La producción IgG3r fue exitosa, sin embargo quedaron restos de otras proteínas del vector (*E. coli*). Por ello se desarrolló un método de pre-adsorción de los sueros con *E. coli* a fin de reducir/eliminar la reactividad frente a esta bacteria y poder utilizar IgG3r como patrón para cuantificar IgG3 en muestras bovinas. Existen pocos trabajos que hayan estudiado a la IgG3 bovina (Butler y col., 1987; Mundo y col., 2008). Nuestro grupo produjo

un suero de conejo anti-IgG3 bovina para poder realizar el estudio de este isotipo en muestras de suero de bovinos infectados con *Map*. En el presente trabajo, se identificó este isotipo con especificidad a *Map* en muestras de suero de todos los bovinos infectados. Estos resultados coinciden con estudios previos de nuestro grupo, en el que se detectó IgG3 específica a bacteria entera, PPA, y p34r en sueros de bovinos con paratuberculosis clínica (Mundo y col., 2008).

A partir de los resultados obtenidos, se puede señalar que el aumento de IgG específica en sueros de bovinos infectados clínicos se debe principalmente al isotipo IgG1 mientras que en los bovinos subclínicos, los isotipos IgG2 e IgG3 serían los isotipos más importantes. Además, estos datos concuerdan con los expresados por Estes y Brown (2002), quienes propusieron que en las respuestas inmunes de tipo T helper 1 (primera etapa de la patología, subclínica) predomina el isotipo IgG2, mientras que en las respuestas inmunes de tipo T helper 2 (estadio clínico) se caracterizan por el predominio de IgG1.

En el estudio de Acs totales en muestras de MF se identificaron incrementos de IgM, IgG e IgA en muestras de infectados clínicos, sin embargo al estudiar los isotipos específicos a la bacteria entera, los infectados subclínicos mostraron mayores niveles de IgG3 y de IgA (en 2/5 bovinos infectados subclínicos). El análisis de IgG3 mostró niveles levemente superiores en muestras de MF en relación a los del suero, lo que podría estar indicando que es un isotipo importante en mucosas. No existe mucha información al respecto, por lo que estudios de este isotipo en la mucosa intestinal deberían llevarse como para confirmar su importancia en la respuesta inmune en mucosas principalmente en la paratuberculosis. La alta reactividad de IgG3 hallada por los bovinos controles negativos podría corresponder al cruzamiento con otras micobacterias (dado que las muestras se estudiaron sin pre-adsorber con *M. phlei*).

La evaluación de las muestras de MF mostró a un animal altamente respondedor (IgA, IgG, IgG1 e IgG3) y correspondió al bovino caravana nº 07 (infectado clínico). Los isotipos IgG1 e IgA son los predominantes en la mucosa intestinal en bovinos, los que se podrían producirse a nivel local por células plasmáticas o podría, a partir de la circulación sanguínea, alcanzar la luz intestinal mediante un transporte selectivo (Butler, 1983; Kacskovics, 2004; Tizard, 2013). El intestino de este animal mostró además el típico aspecto cerebroide y lesiones histopatológicas avanzadas (Figura 29; Mundo, 2005), por lo que los altos niveles

de IgG1 detectados en sMF podrían estar indicando también que el grado de lesión en el tejido intestinal permitiría el escape de Acs al lumen.



Figura 29. Intestino y linfonódulo mesentérico del bovino infectado clínico caravana nº 07. Se observan las serosas edematizadas, linfangitis de los vasos de la serosa del intestino y del mesenterio, engrosamiento e hiperemia de la mucosa intestinal y adenitis del linfonódulo mesentérico (Mundo, 2005).

Este trabajo se desarrolló en búsqueda de mejorar el diagnóstico serológico de la paratuberculosis mediante la evaluación de otros antígenos. En este sentido, diversos autores plantearon la necesidad de la utilización de otros antígenos a fin de mejorar el diagnóstico (Eda y col., 2006; Speer y col., 2006; Scott y col., 2010; Mikkelsen y col., 2011). Las Hsp son antígenos conservados entre las micobacterias, otros procariotas y proteínas eucariotas. Muchos investigadores las consideran antígenos inmunodominantes en numerosos procesos patológicos (Zügel y Kauffman, 1999b; Koets y col., 1999 y 2001; Quintana y Cohen, 2011; Afzal col., 2015). Un trabajo demostró que LT de ovinos infectados con *Map* proliferan frente al estímulo con Hsp65 (Colston y col., 1994b). Además, estudios realizados en bovinos infectados naturalmente por *Map* detectaron que la Hsp65 induce a la respuesta humoral (Koets y col., 2001) como celular (Koets y col., 1999).

Durante el transcurso de esta tesis se desarrolló un ELISA para identificar Acs específicos frente a Hsp65r. Pero sólo se detectaron 2 de los 19 bovinos infectados con *Map* como reactivos (11 %). Los porcentajes de bovinos infectados que respondieron a la Hsp65r fueron menores a los descritos por otros autores; el-Zaatari y col. (1995) que identificaron como bovinos infectados positivos a la Hsp65 al 20 % (5/25) de los subclínicos y el 30 % (3/10) de los clínicos. Por su parte, Koets y col. (2001) hallaron incrementos en los niveles de IgG1 específicos frente a Hsp65 en sueros de bovinos infectados subclínicos. Estas diferencias podrían relacionarse con el tamaño de las proteínas utilizadas. El primer grupo trabajó con la Hsp65 entera mientras que el segundo lo hizo con una parte de la misma (Colston y col., 1994a) pero de mayor tamaño a la nuestra. La Hsp65r que produjimos corresponde a los nucleótidos desde 197 a 868 de la secuencia descrita por Colston y col. (1994a). Por lo que, podríamos pensar que los aminoácidos que faltan en nuestra proteína recombinante podrían ser los responsables de la pérdida en la detección de los animales infectados o que la proteína obtenida, por expresión en *E. coli*, es distinta a la Hsp65 nativa, por lo menos en lo que corresponde a epítopes conformacionales. Se describen problemas en el repliegamiento así como también ausencia de modificaciones postraduccionales en la producción de proteínas recombinantes en vectores de expresión procariota.

El hecho de detectar aumentos en los niveles de IgG, IgG2 e IgG3 *Map*-específicas en las muestras de suero provenientes de los animales en estadio subclínico es de gran valor ya que podría aportar para el desarrollo de nuevas herramientas para el diagnóstico precoz de esta patología. Se incorporó entonces la evaluación de la técnica de ELISA de isotipos de IgG específicos frente a PPA para su aplicación en el diagnóstico de paratuberculosis en bovinos. PPA fue el antígeno seleccionado debido a que es ampliamente utilizado a nivel mundial (OIE, 2014). Si bien el laboratorio Allied no informa cómo se producen los antígenos de PPA, diversos autores informan que corresponden a los antígenos intra-citoplasmáticos de *Map* y que se obtienen a partir de realizar la destrucción de la bacteria y la remoción de los restos de pared (Bannantine y col., 2002; Li y col., 2005; Bannantine y col., 2010).

Similar a los resultados discutidos previamente (IgG *Map*-específica), se detectaron incrementos en los niveles de IgG específicos frente a PPA en sueros de todos los bovinos infectados. Además, los mayores niveles los mostraron los bovinos infectados clínicos.

El aumento de IgG específicos frente a PPA en bovinos infectados clínicos fueron previamente descritos (Abbas y Riemann, 1988; Mundo y col., 2008) y constituye el

fundamento del diagnóstico serológico tradicional. Nuestros resultados muestran un IgG/ELISA-PPA con una especificidad del 100 %. Este dato está en concordancia con trabajos publicados por otros autores (Tabla 15, Sockett y col., 1992; Collins y col., 2005; Eda y col., 2006; Speer y col., 2006; Scott y col., 2010). Cuando evaluamos la sensibilidad, nuestros resultados muestran que este ELISA (IgG) fue la mejor de las metodologías estudiadas para identificar a los bovinos infectados en estadio clínico (92,9 %). En este sentido, se demostró que los ELISAs convencionales identifican principalmente a esta categoría de bovinos infectados (clínicos, Nielsen y Toft, 2008). En cuanto a la sensibilidad detectada, fue superior a la descrita en ELISAs comerciales (Tabla 15 y Revisión realizada por Nielsen y Toft, 2008) sin embargo, fue levemente inferior a los resultados publicados que utilizan el SELISA, el EVELISA y el EVA-ELISA (Tabla 15, Eda y col., 2006; Speer y col., 2006; Scott y col., 2010). Estas diferencias posiblemente se deban a la composición antigénica dado que estas técnicas utilizan antígenos obtenidos por tratamiento con solventes.

ELISA	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	Bovinos	Antígenos	Cita
Allied	66	95	ISC	ni	Sockett y col. (1992)
Paracheck	57	99	Exc	ni	
Idexx	28	95		ni	Collins y col. (2005)
Paracheck	28	100	Exc	ni	
Pourquier	28	100		ni	
Synbiotic	46	85		ni	
EVELISA	97	100	Exc	Ext _{ol}	Eda y col. (2006)
Biocor		-		ni	
SELISA	94	100	Exc	Sup	Speer y col. (2006)
IDEXX	26			ni	
EVA-ELISA	97	100	Exc	Ext _{ol}	Scott y col. (2010)
IDEXX	49	97		ni	

Tabla 15. Trabajos publicados que analizaron ELISAs aplicados al diagnóstico de paratuberculosis en bovinos naturalmente infectados. ELISAs comerciales: Allied (Allied Monitor Laboratories Inc., Fállete, Misuri, USA); Biocor (Biocor Animal Health, Nebraska, USA); Idexx (IDEXX Laboratories, Inc., Westbrook, USA); Parachek; Pourquier; Synbiotic (SERELISA ParaTB Ab Mono Indirect, Synbiotic Corp., California, USA). ELISAs desarrollados por investigadores y no disponibles comercialmente: SELISA, EVELISA y EVA-ELISA. Las Sensibilidad y Especificidad están expresadas en porcentaje (%). ISC: infectados subclínicos; Exc: excretores de *Map* por materia fecal; Sup: antígenos de superficie de *Map*; Ext_{ol}: antígenos obtenido por tratamiento con etanol; ni: no informada.

Si bien el isotipo IgG1 se halló como característico en muestras de suero de bovinos infectados clínicos, el IgG1/ELISA-PPA evaluado no mejoró la detección de esta categoría de animales en relación al IgG/ELISA-PPA.

Es de destacar que el IgG2/ELISA-PPA permitió identificar a la mayoría de los bovinos infectados (subclínicos y clínicos). Además, detectó mayor número de bovinos infectados subclínicos en comparación al IgG/ELISA-PPA (54 vs. 23 %). Estos resultados concuerdan con los obtenidos cuando utilizamos a la bacteria de *Map* entera como antígeno. El porcentaje de animales infectados subclínicos detectados por el IgG2/ELISA-PPA (54 %)

fue similar al informado por otro grupo de investigación de la Argentina que utiliza un IgG/ELISA-PPA (50 %, Paolicchi y col., 2003).

Varios investigadores demostraron que *M. phlei* es la bacteria que se debe utilizar para eliminar la reactividad cruzada generada por otras micobacterias (Yokomizo y col., 1985; Scott y col., 2010) y por ello se utilizó en la pre-adsorción de los sueros. Sin embargo, 3 bovinos del grupo control mostraron DO superiores al valor de corte de la técnica de IgG2/ELISA-PPA. Esto podría deberse a reactividad cruzada con la microbiota (falsos positivos) o a animales infectados que aun no estén excretando *Map* o que no la hayan excretado al momento en que se tomaron las muestras (falsos negativos, Collins y col., 2005; Nielsen, 2010). En este sentido, el cultivo de muestras de MF permite detectar una concentración bacteriana de al menos 100 UFC / g de muestra (Merkal, 1970). Entre los factores responsables de la baja sensibilidad se encuentra el tratamiento de las muestras con agentes antimicrobianos utilizados para disminuir los contaminantes en los cultivos, los cuales repercuten sobre la viabilidad, recuperación y crecimiento de las micobacterias (Whittington, 2010). Por lo tanto, la utilización de esta técnica para confirmar la ausencia de infección por *Map* en animales sería limitado (Collins y col., 2005). En este mismo sentido, Nilsen (2010) ha remarcado la importancia de estudiar a los animales eliminadores y no eliminadores de bacterias para evaluar técnicas inmuno-diagnósticas. A partir de esta observación hemos incorporado en nuestro estudio al grupo de animales expuestos, que se originaron de rodeos infectados con *Map*. Es de destacar que este grupo, a pesar de considerarlo, fue excluido en los análisis de especificidad y sensibilidad debido a que no se puede confirmar su infección por *Map* o su ausencia. Estudios diagnósticos como el cultivo de tejidos e histopatología, deberían realizarse sobre esta categoría de animales a fin confirmar si corresponden a bovinos infectados que no excretaron *Map* en el momento del muestreo (por lo que se los debería incluir en la categoría de animales infectados) o si son animales negativos (no infectados) que quizás poseen Acs inducidos por microorganismos ambientales. El IgG2/ELISA-PPA permitió detectar más animales positivos dentro del grupo de expuestos en relación a los otros isotipos evaluados (63 vs. 27 o 3 %, para IgG2, IgG e IgG1, respectivamente). Huda y col. (2004) también evaluaron a la categoría de bovinos expuestos pero identificaron al 11 % como positivos usando un IgG/ELISA-PPA.

La metodología y reactivos utilizados para estudiar los niveles de IgG3 específicos frente a PPA no permitieron identificar respuesta, posiblemente debido a que la sensibilidad de la técnica no permite detectar tan baja cantidad de IgG3 PPA-especifica en los sueros.

Conclusiones

Mediante el estudio de los isotipos específicos frente a *Map* se detectaron incrementos en los niveles de IgG sérica en todos los bovinos infectados. El isotipo IgG1 aumentó en los infectados clínicos mientras que IgG2 e IgG3 se detectaron como característicos del estadio subclínico. Asimismo, la detección de IgG2 específica frente a PPA mediante la técnica de ELISA mejoró el diagnóstico de animales infectados con *Map* en estadio subclínico. Por lo tanto, proponemos la combinación de IgG2/ELISA-PPA e IgG/ELISA-PPA para incrementar la identificación de rodeos con animales en diferentes estadios de la paratuberculosis.

La Hsp65 ha sido identificada como un antígeno inmunodominante en la paratuberculosis, sin embargo nuestros resultados muestran una baja reactividad frente a la proteína recombinante producida en nuestro laboratorio. Problemas conformacionales o la pérdida de epitopes B (presentes en la Hsp65 y no incluidos en el fragmento seleccionado, relacionados al sistema de expresión o por el pegado a la placa de ELISA) podrían ser los responsables.

Capítulo III

Repuesta inmune humoral inducida por la infección experimental con aislamientos locales de *Map* en terneros

Resultados

Los terneros son los más susceptibles a la infección por *Map* (Windsor y Whittington, 2009). Además, se ha demostrado que existe la transmisión entre terneros (Benedictus y col., 2008) y que las metodologías diagnósticas disponibles fallan en la detección de estos animales. En este trabajo de tesis, se estudiaron terneros desafiados en forma experimental con aislamientos locales de *Map*, a fin de mejorar el conocimiento de esta etapa de la infección subclínica.

Desarrollo de reactivos

Producción de p34r

El peso de la p34r obtenida fue de 20,6 - 28,9 kDa (Figura 30, calle 2) y coincidió con el peso esperado (26 kDa; Mundo y col., 2005). Se produjeron aproximadamente 7 mg totales de p34r que fue utilizada como antígeno.

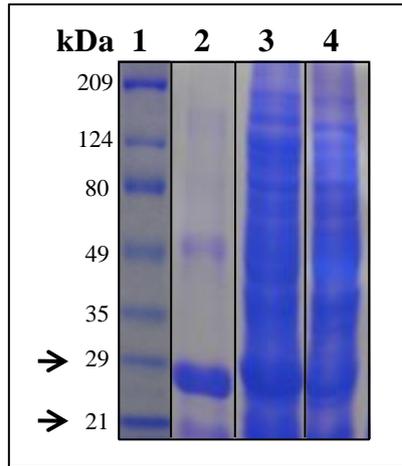


Figura 30. Expresión y purificación de p34r. SDS-PAGE en gel de poliacrilamida al 12 % teñido con 0,1 % azul de coomassie. Calle 1: patrón de pesos moleculares pre-teñido (Bio-Rad) con fragmentos de 209, 124, 80, 49, 34,8, 28,9, 20,6, 7,1 kDa (último fragmento no visible); con flechas se marcan los patrones de 28,9 y 20,6 kDa; calle 2: p34r parcialmente purificada; calle 3: *E. coli* BL21 pLysS transformada con p34-pRSET A; calle 4: *E. coli* BL21 pLysS transformada con pRSET A sin inserto.

Infección

La infección de los terneros con los aislamientos de A y C de *Map* se realizó por vía oral, dos días consecutivos y consistió en 125 mg de *Map* peso húmedo por animal por día. Cuando se corroboraron las dosis infectivas por recuento de UFC viables (Tabla 16), se detectaron diferencias entre las dosis utilizadas: hubo un decimal de diferencia en las UFC (en el análisis por día) entre los aislamientos.

Días	A	C
	UFC	UFC
0	$7,4 \times 10^9$	$2,2 \times 10^8$
1	$5,8 \times 10^9$	$3,08 \times 10^8$
Total	$13,2 \times 10^9$	$5,3 \times 10^8$

Tabla 16. Inóculos de los aislamientos A y C de *Map*. Los datos están expresados en unidades formadoras de colonias de *Map* viables / animal (UFC) por día o en total (por dos días).

Evaluación clínica

Los terneros del grupo infectado con el aislamiento A presentaron diarrea que se autolimitó sin tratamiento, entre los días 135 y 150 postinfección. Este cuadro de diarrea impactó sobre la ganancia de peso (Figura 31): el animal n° 928 perdió 12 kg de peso al comparar 150 vs. 110 días postinfección (177 y 189 Kg, respectivamente); mientras que el ternero n° 931 sólo incremento su peso en 15 kg. En contraposición, el resto de los terneros (grupos C y CN) ganaron entre 37 y 55 Kg. Por lo tanto, el crecimiento en promedio de los terneros del grupo A fue sólo del 3 % en relación al resto de los animales.

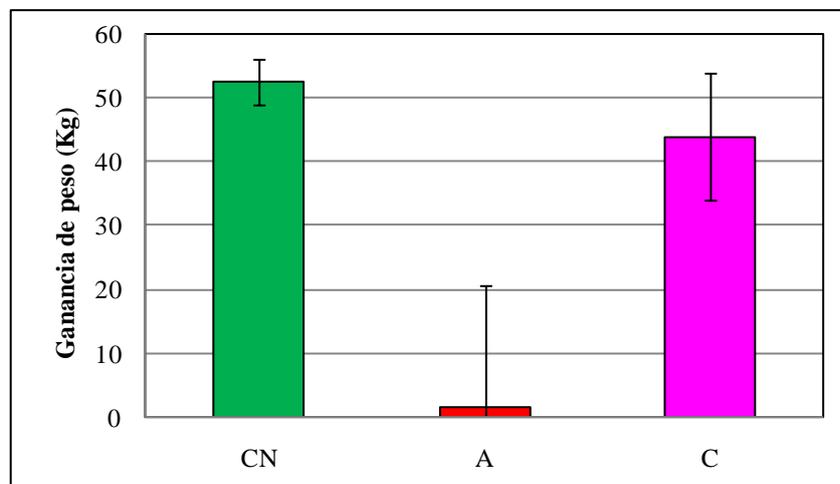


Figura 31. Impacto de la diarrea en la ganancia de peso entre los días 110 y 150 postinfección. Los datos están expresados en promedios de ganancia de peso (Kg) \pm desvío estándar por grupo a los 150 en relación a los 110 días postinfección ($Kg_{150} - Kg_{110}$). Grupos: controles negativos (CN, n = 2), infectados con A (A, n = 2) e infectados con C (C, n = 2).

Excreción de *Map* por MF

La tabla 17 muestra las UFC de *Map* excretadas / g de muestras de MF. No se aisló *Map* de ninguna MF previo a la infección (día 0) ni en el transcurso de todo el experimento de las muestras de MF provenientes de los terneros controles. Los aislamientos correspondientes al día 3 postinfección indican las bacterias que siguieron su trayecto por la vía digestiva sin penetrar el intestino (Hines y col., 2007). En el grupo C se detectaron mayores UFC de *Map* / g de MF a los 3 días postinfección (160 y 200 vs. 80 UFC / g, para C y A respectivamente). La excreción bacteriana por MF fue transitoria durante el experimento. Se detectó un pico de excreción a los 60 días postinfección, dado que se aislaron entre 40 y 740 UFC de *Map* /

g de MF en 3 de los 4 terneros infectados. Además, se aisló *Map* a partir de la muestra de MF del animal n° 928 (infectado con A) desde los 30 días postinfección y del ternero n° 930 hasta los 110 días postinfección. Esta técnica, no permitió detectar la excreción de *Map* por muestra de MF en el animal n° 931 (correspondiente al grupo A).

Grupo	Caravanas	Días postinfección						
		0	3	30	60	110	150	180
CN	933	0	0	0	0	0	0	0
	934	0	0	0	0	0	0	0
A	928	0	80	80	40	0	0	0
	931	0	80	0	0	0	0	0
C	930	0	160	0	740	40	0	0
	932	0	200	0	40	0	0	0

Tabla 17. Excreción de *Map* por materia fecal. Los datos están expresados en unidades formadoras de colonias de *Map* / g de muestra de MF / animal. Grupos: controles negativos (CN, n = 2), infectados con A (A, n = 2) e infectados con C (C, n = 2).

Inducción de respuesta inmune celular

Cinética de producción de INF γ específico

Se realizó la evaluación de la producción de INF γ en cultivos de sangre periférica estimulada con PPDa, PPD_b, Hsp65r y p34r, y sin estimular (Figura 32).

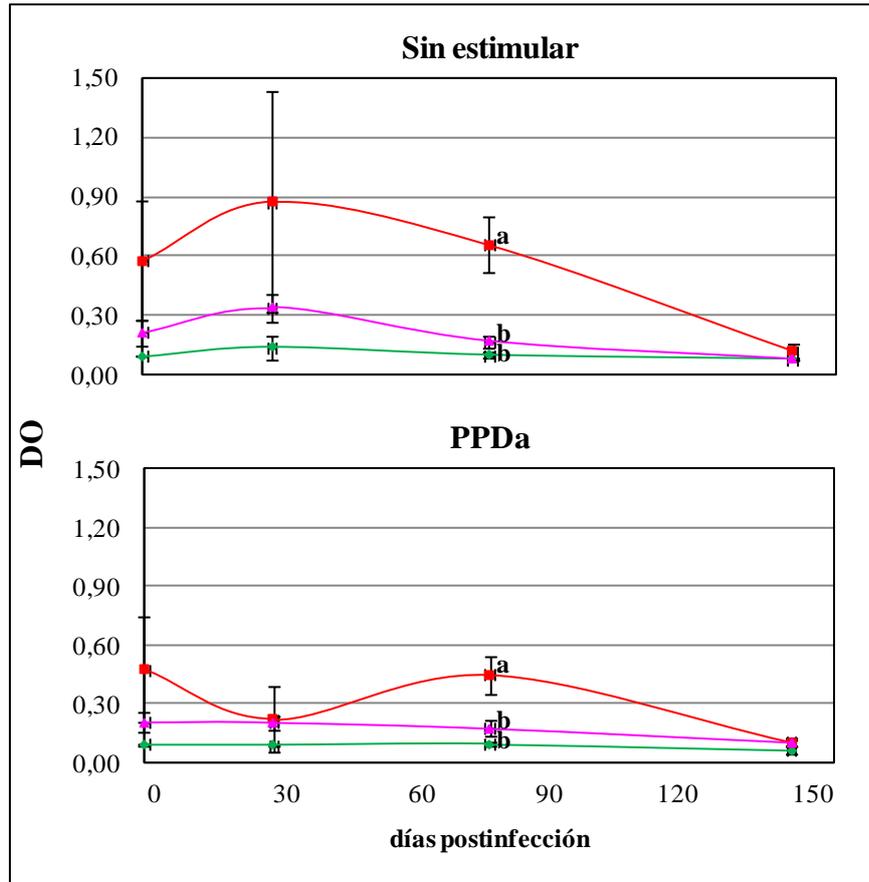


Figura 32. Cinética de producción de $INF\gamma$ por células periféricas estimuladas con PPDa o sin estimular. Los datos están expresados en promedios de densidad óptica (DO) \pm desvío estándar por grupo. Grupos: controles negativos (verde, n = 2), infectados con A (rojo, n=2) e infectados con C (rosa, n=2). Las letras indican diferencias significativas entre grupos.

La producción de $INF\gamma$ por células periféricas mostró variaciones individuales y en el tiempo. En general, las células sin estimular arrojaron niveles de $INF\gamma$ superiores a las estimuladas. A los 80 días postinfección, se hallaron incrementos significativos en los niveles de $INF\gamma$ producidos por células periféricas del grupo A sin estimular y estimuladas con PPDa (Figura 32). Los niveles de $INF\gamma$ inducidos con PPDb, Hsp65r y p34r fueron bajos (< 0,215 DO).

Intradermorreacción

A los 160 días postinfección, se realizó la intradermorreacción con PPDa y PPDb en la tabla del cuello. En la Figura 33 se muestra las reacciones detectadas a las 72 hs de inoculadas las PPDs.



Figura 33. Lectura de la intradermorreacción. En la imagen de la izquierda, se indica con flechas los granulomas reactivos frente a ambas PPDs. A la derecha se muestra la medición de un granuloma a las 72 hs de inoculada la PPD.

Se detectaron incrementos significativos ($p = 0,005$) en la intradermorreacción con PPDa en ambos grupos de terneros infectados experimentalmente (Figura 34). La respuesta a PPDb mostró reactividad en los terneros infectados, sin embargo, el tamaño del granuloma fue menor a la inducida con PPDa.

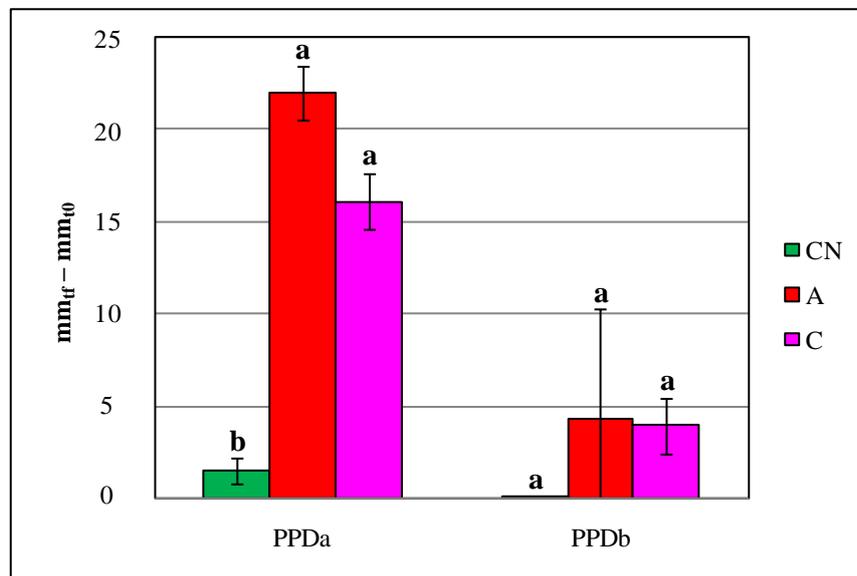


Figura 34. Intradermorreacción. Se inocularon 0,1 mL de PPDa y PPDb en la tabla del cuello. Los datos están expresados en promedios de mm_{tf} (72 hs postinoculación) - mm_{t0} (luego de inocular) \pm desvío estándar por grupo, para cada PPD. Grupos: controles negativos (verde, $n = 2$), infectados con A (rojo, $n = 2$) e infectados con C (rosa, $n = 2$). Las letras indican diferencias significativas entre grupos.

Cinética de respuesta inmune humoral

Se evaluó la inducción de los isotipos IgG, IgG1 e IgG2 específicos frente a *Map*, PPA, Hsp65r y p34r en las muestras de suero de los terneros infectados experimentalmente.

Reactividad frente a *Map*

Los resultados de los niveles de IgG, IgG1 e IgG2 específicos a *Map* se encuentran graficados en la Figura 35.

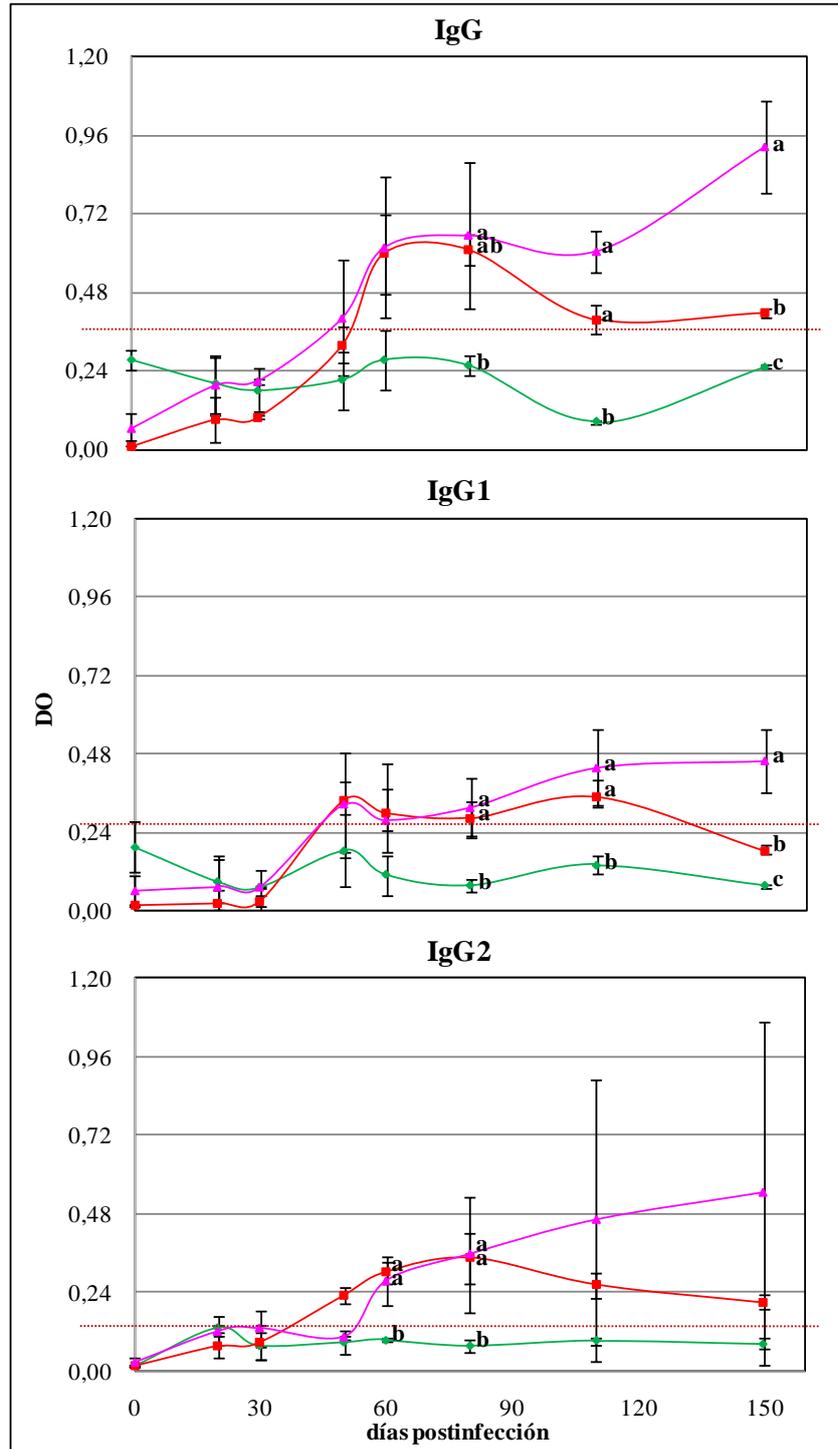


Figura 35. Cinética de los Acs específicos frente a *Map* en sueros de terneros experimentalmente infectados. Las muestras fueron estudiadas 1/100 (IgG e IgG1) y 1/50 (IgG2). Los datos están expresados en promedios de densidad óptica (DO) \pm desvío estándar (DE) por grupo. Grupos: controles negativos (verde, n = 2), infectados con A (rojo, n = 2) e infectados con C (rosa, n = 2). Las líneas representan los valores de corte (promedio de las DO obtenidas previo a la infección de todos los terneros y de todos los tiempos estudiados de los controles negativos, más dos DE): 0,385 DO (IgG); 0,265 DO (IgG1); 0,147 DO (IgG2). Las letras indican diferencias significativas entre grupos.

Los controles fueron siempre negativos (con DO por debajo de los VC). El estudio de IgG *Map*-específicas permitió la identificación de los terneros infectados desde los 60 días postinfección. Los niveles de IgG e IgG1 en sueros de los terneros infectados fueron significativamente superiores a los controles desde los 80 días postinfección. Se pudieron detectar además diferencias significativas en la respuesta inducida por los diferentes aislamientos: C mostró mayores niveles de IgG e IgG1 que A, siendo significativas ($p = 0,002$ y $0,003$, respectivamente) estas diferencias a los 150 días postinfección.

El estudio de los niveles de IgG2 *Map*-específicas permitió detectar la condición de infectado más tempranamente, ya que el grupo A mostró reactividad desde los 50 días postinfección y el grupo C a partir de los 60 días postinfección (Figura 35).

Reactividad frente a PPA

En la Figura 36 se grafican los resultados de IgG e IgG1 específicos a PPA.

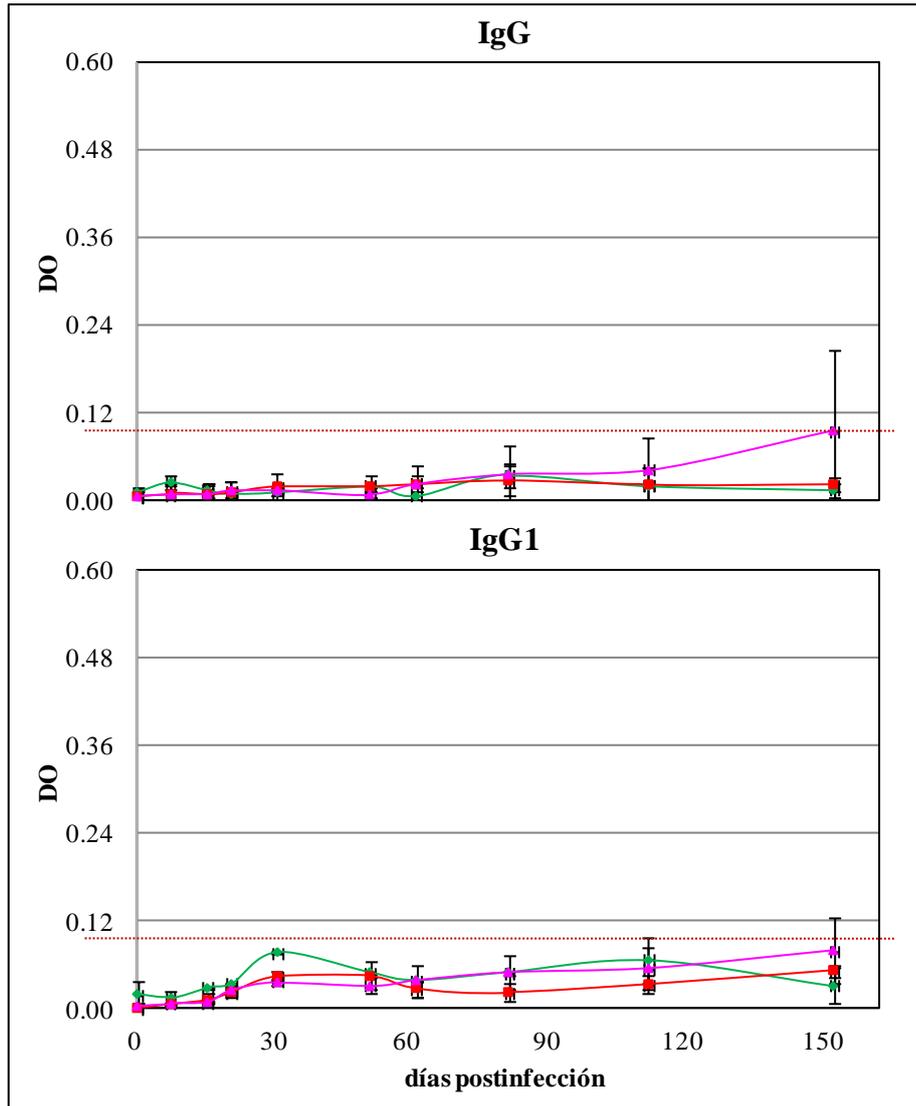


Figura 36. Cinética de de IgG e IgG1 específicos frente a PPA evaluados en sueros de terneros experimentalmente infectados con *Map*. Las muestras de suero fueron pre-adsorbidas con *M. phlei* y estudiadas 1/100. Los resultados están graficados como promedios de densidades ópticas (DO) \pm desvío estándar (DE) por grupo. Las líneas punteadas representan los valores de corte (promedio de las DO obtenidas previo a la infección de todos los terneros y de todos los tiempos estudiados de los controles negativos, más dos DE): 0,100 DO. Grupos: controles negativos (verde, n = 2), infectados con A (rojo, n = 2) e infectados con C (rosa, n = 2).

Los niveles de IgG e IgG1 PPA-específicos fueron bajos ($< 0,10$ de DO) durante todo el experimento, a excepción del ternero n° 930 a los 150 días postinfección (0,172 y 0,112 DO para IgG e IgG1, respectivamente; Figura 36).

Los niveles de IgG2 PPA-específicos se muestran en la Figura 37.

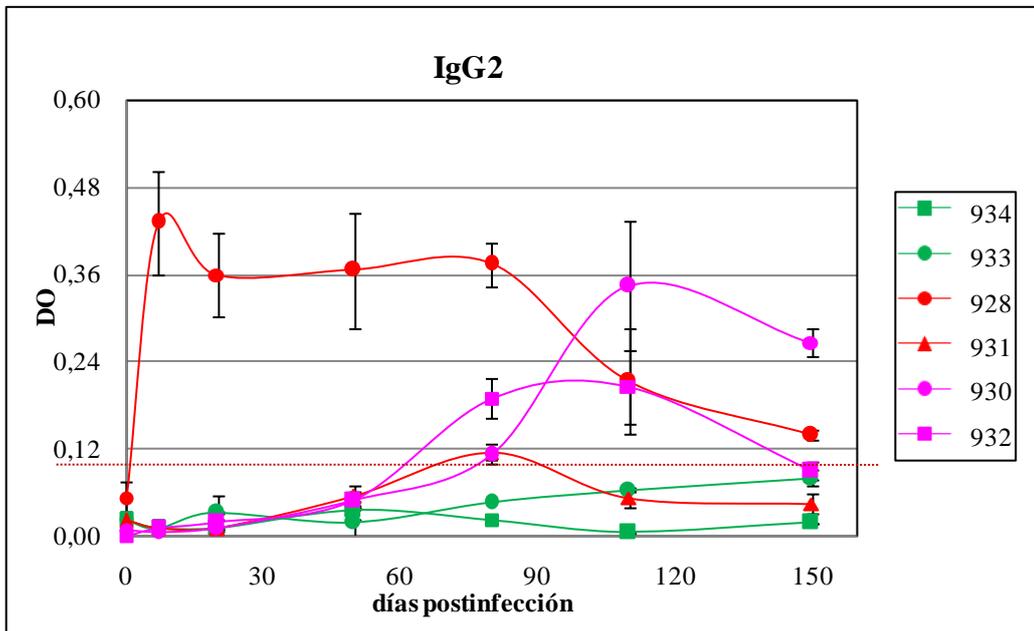


Figura 37. Cinética de IgG2 específicos frente a PPA evaluados en sueros de terneros experimentalmente infectados con *Map*. Las muestras de suero fueron pre-adsorbidas con *M. phlei* y estudiadas 1/5. Los resultados individuales de cada ternero están graficados como promedios de densidades ópticas (DO) \pm desvío estándar (DE). La línea punteada representa el valor de corte (promedio de las DO obtenidas previo a la infección de todos los terneros y de todos los tiempos estudiados de los controles negativos, más dos DE): 0,100 DO. Grupos: controles negativos (verde, n = 2), infectados con A (rojo, n = 2) e infectados con C (rosa, n = 2).

Si bien los niveles de IgG2 PPA-específica mostraron variaciones individuales, todos los terneros infectados dieron positivo al menos en algún punto durante el transcurso del experimento. El suero del ternero n° 928 (grupo A) mostró reactividad desde los 7 días postinfección y se mantuvo positivo durante todo el experimento. Mientras que, ambos terneros del grupo C, fueron positivos desde los 80 días postinfección (Figura 37).

Reactividad frente a Hsp65r

En la Figura 38 se expresan los datos de IgG, IgG1 e IgG2 Hsp65r-específicos.

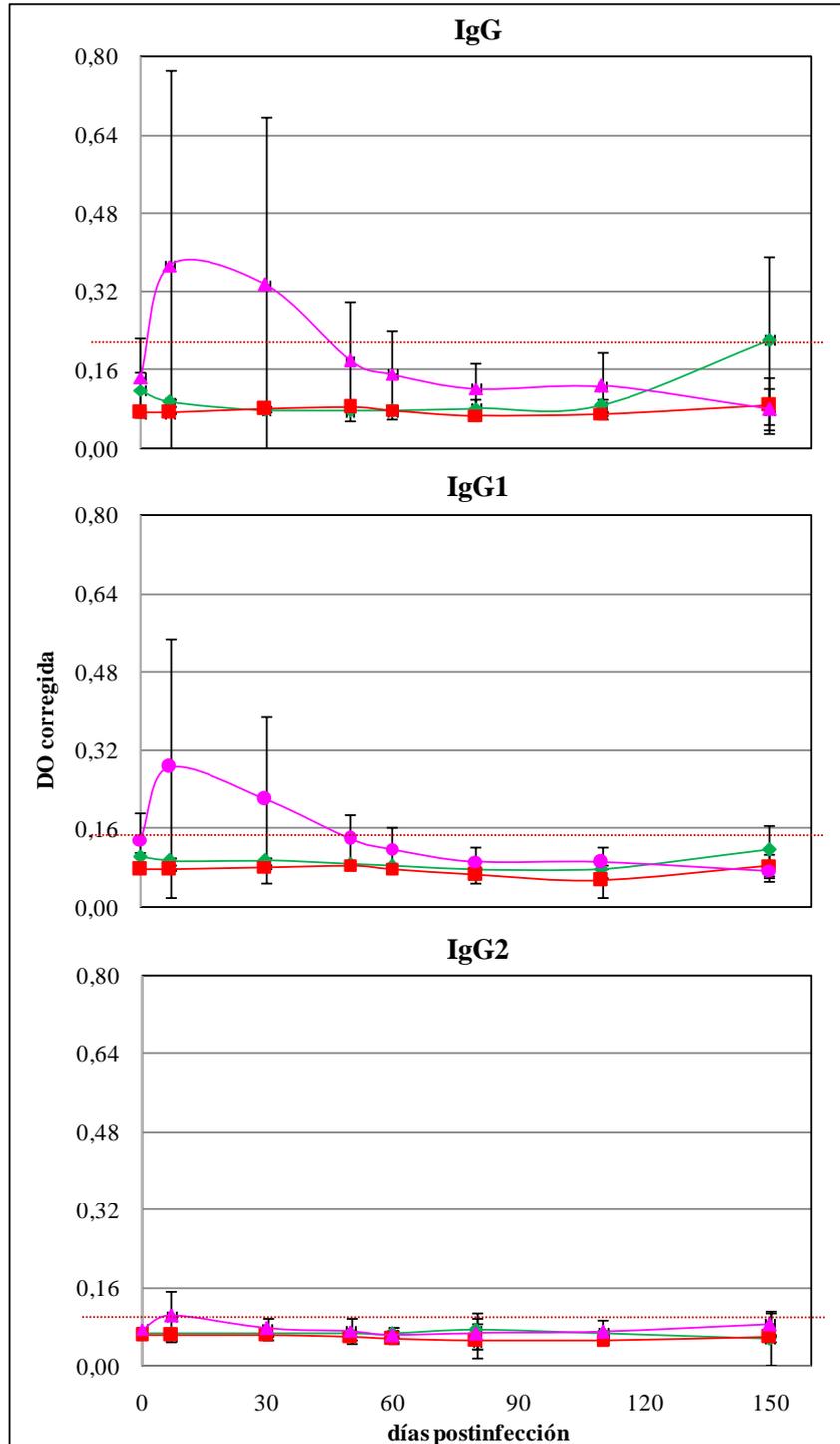


Figura 38. Cinética de los Acs específicos frente a Hsp65r en sueros de terneros experimentalmente infectados con *Map*. Las muestras fueron pre-adsorbidos con *E. coli* y estudiadas a una dilución de 1/50. Los datos están expresados en densidades ópticas (DO) promedio corregidas: DO frente a Hsp65r - DO frente a extracto de *E. coli* \pm desvío estándar (DE). Las líneas punteadas representan los valores de corte (promedio de las DO obtenidas previo a la infección de todos los terneros y de todos los tiempos estudiados de los controles negativos, más dos DE): 0,233 DO (IgG); 0,141 DO (IgG1); 0,100 DO (IgG2). Grupos: controles negativos (verde, n = 2), infectados con A (rojo, n = 2) e infectados con C (rosa, n = 2).

Los niveles de IgG, IgG1 e IgG2 Hsp65r-específicos fueron bajos. Un bovino control mostró valores por encima del VC de IgG, lo que podría deberse a reactividad cruzada con otras proteínas de shock térmico. Mientras que, de los terneros experimentalmente infectados, un animal del grupo C (caravana nº 930) mostró reactividad frente a Hsp65r con un pico de IgG e IgG1 entre los 7 y 50 días postinfección. Los valores de IgG2 fueron todos por debajo del valor de corte (Figura 38).

Reactividad frente a p34r

La reactividad frente a p34r se muestra en la Figura 39.

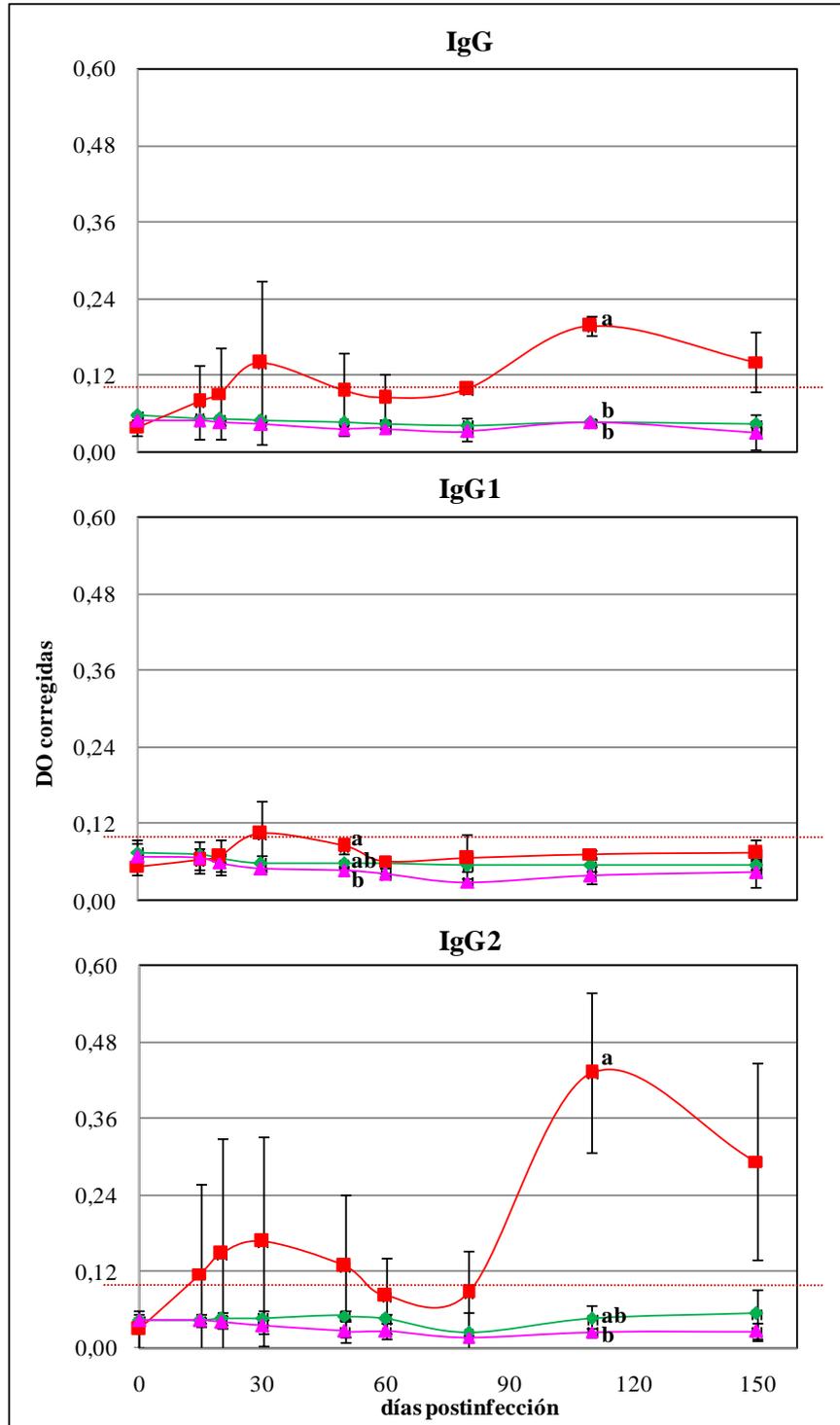


Figura 39. Cinética de los Abs específicos frente a p34r en sueros de terneros experimentalmente infectados con *Map*. Las muestras fueron pre-adsorbidos con *E. coli* y estudiadas a una dilución de 1/50. Los datos están expresados en densidades ópticas (DO) promedio corregidas: DO frente a p34r - DO frente a extracto de *E. coli* \pm desvío estándar (DE). Las líneas punteadas representan los valores de corte (promedio de las DO obtenidas previo a la infección de todos los terneros y de todos los tiempos estudiados de los controles negativos, más dos DE): 0,100 DO. Grupos: controles negativos (verde, n = 2), infectados con A (rojo, n = 2) e infectados con C (rosa, n = 2). Las letras indican diferencias significativas entre grupos.

p34r fue solamente reconocida por los sueros del grupo A, los cuales mostraron niveles de IgG e IgG2 por encima de los VCs, desde los 15 (ternero nº 931) y 110 (ternero nº 928) días postinfección. A los 110 días, se detectaron incrementos significativos en los niveles de IgG e IgG2 en el grupo A. Mientras que los niveles de IgG1 fueron bajos (Figura 39).

Discusión

El modelo de infección de terneros con *Map* permite evaluar la respuesta inmune temprana. Se seleccionó este modelo debido a que los terneros dentro de los primeros meses de vida representan la categoría de animales más susceptibles (Manning y Collins, 2001; Whittington, 2010). En este trabajo se estudiaron a los terneros infectados durante 180 días, este periodo es considerado parte del periodo de incubación en esta patología crónica dado que la manifestación clínica aparece en bovinos lecheros entre los 5 y 10 años (Manning y Collins, 2001).

Para realizar la infección experimental, se siguieron las sugerencias del Johne`s Disease Integrated Project Animal Model Standardization Committee (Hines y col., 2007; Hines, 2010), por lo que se realizó el desafío de los animales a través de la vía oral con 125 mg peso húmedo de *Map* durante dos días consecutivos. Al realizar la cuantificación de las UFC viables en los inóculos infectantes se hallaron diferencias en un decimal entre los aislamientos A y C de *Map*, similar al error previamente descrito por Hines y col. (2007).

El análisis de los cultivos de muestras de MF de los terneros experimentalmente infectados mostró que todos los animales desafiados excretaron bacterias a los 3 días postinfección. Estos aislamientos corresponden a los *Map* que continuaron su trayecto por la vía digestiva sin infectar (Hines y col., 2007). Y este procedimiento confirmó la viabilidad de los inóculos utilizados para la infección. Los animales del grupo C recibieron menor dosis de bacterias viables sin embargo mostraron mayor número de bacterias en muestras de MF a los 3 días postinfección, por lo que podríamos hipotetizar que ingresaron menor cantidad de bacterias en los animales del grupo C.

Se pudo aislar *Map* luego de los 3 días postinfección a partir de muestras de MF de los animales infectados experimentalmente a excepción del ternero n° 931. La baja sensibilidad del cultivo de MF (Merkal, 1970) podría ser el causa por la falta de detección de *Map* en muestras de MF del animal n° 931. Entre los factores responsables de dicha sensibilidad se encuentra el tratamiento de las muestras con agentes antimicrobianos utilizados para disminuir los contaminantes en los cultivos, los cuales repercuten sobre la viabilidad, recuperación y crecimiento de las micobacterias (Whittington, 2010). Además, los animales en estadio subclínico excretan pequeñas cantidades y en forma intermitente de *Map* por heces (Nielsen y Toft, 2008). Otros investigadores han informado cultivos de muestras de

MF negativos en ensayos de infección experimental utilizando diferentes dosis infectivas de *Map* (Tabla 18; Koo y col., 2004; Sweeney y col., 2006; Eisenberg y col., 2011). El resto de los terneros infectados experimentalmente (caravanas n° 928, 930 y 932) excretaron *Map* por MF entre los 30 y 110 días postinfección. En nuestro experimento, el pico de excreción de *Map* fue a los 60 días postinfección, en coincidencia con algunos trabajos que lo describen entre los 60 y 130 días postinfección (Koets y col., 2006; Santema y col., 2012; Subharat y col., 2012; Mortier y col., 2014a). Stabel y col. (2009) infectaron terneros con homogenato de mucosa de íleon de un animal adulto con paratuberculosis clínica o con la cepa K10 de *Map*, del primer grupo aislaron *Map* hasta los 120 días postinfección luego el hallazgo fue esporádico mientras que no detectaron *Map* en los terneros infectados con la cepa de laboratorio hasta los 360 días postinfección.

Infección	Días estudiados	N	Cita
2,5 X 10 ¹⁰ UFC / día durante 2 días*	42	6	Sweeney y col. (2006)
8 X 10 ⁵ UFC / día durante 3 días por 3 semanas [#]	84	12	Eisenberg y col. (2011)
1 X 10 ⁷ UFC / día durante 7 días*	504	3	Koo y col. (2004)

Tabla 18. Trabajos publicados de infección experimental en terneros con resultados negativos al cultivo de muestras de materia fecal. Las dosis infectivas están expresadas en unidades formadoras de colonias de *Map* / animal (UFC) por día. N = números de animales; * infección vía oral; [#] infección por partículas de polvo.

En nuestro ensayo, los animales infectados con el aislamiento A mostraron un episodio de diarrea entre los 135 y 150 días postinfección que se autolimitó sin tratamiento, *Map* podría no ser el agente causal ya que no se pudo aislar a la bacteria en muestras de MF de estos animales en coincidencia con la signología. Se describe que la diarrea producida por la patología (paratuberculosis) ocurre en los últimos estadios de la enfermedad asociada a lesiones granulomatosas intestinales que generan mala absorción de nutrientes y pérdida de proteínas (Patterson y col., 1967), la que evoluciona hacia la emaciación de los animales

afectados. Y los terneros que infectamos experimentalmente no mostraron lesiones macroscópicas intestinales a la necropsia (Ingratta y col., 2015).

Con respecto a la producción de INF γ por células periféricas, detectamos variaciones individuales a través del tiempo y entre individuos, similar a trabajos publicados (Koo y col., 2004; Olsen y col., 2005). Además, se hallaron altos niveles de INF γ producidos de forma espontánea por células periféricas. En este sentido, Koets y col. (2006) encontraron altas cantidades de células productoras de INF γ (sin estimular) evaluadas mediante la metodología de ELISPOT, principalmente durante los primeros tres meses de vida de terneros. Olsen y col. (2005) identificaron que las células NK de los bovinos sanos jóvenes son las responsables de la síntesis de INF γ inespecífico. Asimismo, este hallazgo sumado al hecho que los animales jóvenes tienen mayores cantidades de células NK en sangre periférica (Kulberg y col., 2004) justifican nuestros resultados e impactan sobre las técnicas que se utilizan para el diagnóstico de tuberculosis y paratuberculosis (que evalúan producción de INF γ inducido por PPD), por lo que se recomienda, no emplear estas técnicas diagnósticas en animales menores a dos años.

En nuestro experimento, hallamos aumentos en la producción de INF γ ($1,3 \pm 0,3$ ng / mL) por células periféricas de terneros infectados con el aislamiento A estimuladas con PPDa a los 80 días postinfección. Estos niveles coinciden con los descritos por Stabel y col. (2011a), quienes utilizaron *Map* sonificado como estímulo y la prueba comercial Bovigam; sin embargo en el trabajo citado, los niveles se incrementaron durante el transcurso del experimento (360 días). Otros autores que evaluaron cinéticas de producción de INF γ con la prueba comercial Bovigam informaron incrementos desde los 140 (Watkins y col., 2010) y 194 (Waters y col., 2003) días postinfección. Las diferencias entre los datos de trabajos publicados y los nuestros, podrían deberse al tipo de test utilizado así como también el aislamiento empleado en la infección. Subharat y col. (2012) informaron sólo un 35 % de los animales como positivos mediante la prueba de INF γ a los 90 días postinfección. En nuestro experimento, los animales infectados con el aislamiento C arrojaron niveles de INF γ bajos durante todo el ensayo.

Si bien se ha descrito reactividad cruzada entre PPDa y PPDb (Bezoz y col., 2012; Brito y col., 2014; OIE, 2014; Seva y col., 2014), mediante la evaluación de INF γ , sólo hemos detectado respuesta inducida por PPDa. Tampoco evidenciamos producción de INF γ inducida frente a Hsp65r. Por el contrario, un estudio realizado en terneros infectados

naturalmente con *Map* identificó incrementos en la producción de INF γ por células periféricas estimuladas con Hsp65 (Appanna y col., 2013). En el caso de p34r, fue identificada como inmunodominante para células B bovinas (de Kessel y col., 1993; Ostrowski y col., 2003; Mundo y col., 2008) y en nuestro experimento sólo detectamos respuesta inmune humoral.

Ambos grupos de terneros infectados experimentalmente mostraron reactividad por IDR. La respuesta celular inducida por PPDa *in vivo* y *ex vivo* (producción de INF γ) fue similar: mayor respuesta por el grupo de infectados con el aislamiento A. Se detectó reactividad a PPDb *in vivo*, lo que podrían deberse a reacciones cruzadas entre las micobacterias (Brito y col., 2014; OIE, 2014; Seva y col., 2014).

En neonatos se describe una baja respuesta inmune humoral posiblemente relacionado al bajo número de LB en circulación, a los niveles de corticoides neonatales y de hormonas maternas (Tizard, 2013). Sin embargo, en nuestro experimento, el estudio de Acs frente a la bacteria entera nos permitió identificar niveles de IgG a partir de los 60 días postinfección. Mientras que frente a PPA, los valores fueron negativos durante todo el ensayo. En trabajos publicados por otros investigadores que utilizaron el modelo de infección de terneros, los Acs difícilmente fueron identificados y en general en forma tardía (Tabla 19; página 139).

En esta tesis se evaluaron dos proteínas recombinantes de *Map* identificadas como inmunodominantes B. Los antígenos elegidos provienen de diferentes estructuras bacterianas: la Hsp65 se encuentra principalmente a nivel intracitoplasmático (Koo y col., 2004) y la p34 en la pared celular (de Kessel y col., 1993). Un sólo animal de los experimentalmente infectados mostró reactividad frente a Hsp65r y sólo en un momento de la cinética evaluada. Estos resultados aportarían más datos para confirmar nuestras sospechas enunciadas en la discusión correspondiente al Capítulo II (página 114); por lo que se sugiere que la Hsp65r obtenida no involucra a los epitopes B de la Hsp65 de *Map* o que la proteína obtenida es distinta a la Hsp65 nativa, la ausencia de modificaciones postraduccionales, problemas en el repliegamiento o la adsorción a la placa de ELISA podrían ser las responsables. Por otro lado, un bovino control negativo mostró reactividad por IgG a Hsp65r, lo que podría deberse a reactividad cruzada con proteínas de shock térmico de otros microorganismos (El-Zaatari y col., 1995).

Si bien p34 es inmunodominante para la respuesta humoral (de Kessel y col., 1993; Ostrowski y col., 2003; Mundo y col., 2008), fue solamente reconocida por anticuerpos del

grupo infectado con el aislamiento A. Estos resultados podrían deberse a: que no todos los animales respondan frente a esta proteína (carga genética), que no todos los aislamientos expresen esta proteína en superficie o que existan modificaciones en sus epitopes B.

Otros investigadores detectaron Acs tempranos (7 – 14 días postinfección) utilizando la metodología de Inmunoblot y el antígeno de *Map* sonicado (Waters y col., 2003; Stabel y col., 2011b).

En base a los hallazgos del estudio de isotipos de IgG en sueros de bovinos naturalmente infectados (Capítulo II), se evaluaron los isotipos específicos en sueros de terneros experimentalmente infectados. Los niveles de IgG1 e IgG2 específicos frente a *Map* se incrementaron a partir de los 50 días postinfección y en coincidencia con los datos obtenidos en el Capítulo II, IgG2 fue el primer isotipo que mostró aumentos significativos en relación a los controles (60 vs. 80 días postinfección, para IgG2 e IgG1 respectivamente). A nuestro entender, un sólo trabajo publicado estudió los isotipos de inmunoglobulinas específicas en sueros de terneros experimentalmente infectados con *Map* (Schillinger y col., 2013). En dicho experimento, realizaron la evaluación de los sueros pre-adsorbidos con *M. phlei* por la técnica de citometría de flujo, utilizando a la bacteria entera de *Map* como antígeno, e informaron incrementos de IgG1 a los 300 días postinfección en 2 de 12 animales mientras que no detectaron IgG2 específica hasta los 392 días postinfección.

Al utilizar PPA como antígeno, la identificación de IgG1 sérica, no permitió la diferenciación de los terneros desafiados mientras que el isotipo IgG2, a pesar de mostrar variaciones individuales, reveló una mejora en la detección de la infección temprana. Teniendo en cuenta que los terneros se encontraron durante todo el experimento en el estadio subclínico, nuestros resultados coincidirían con los publicados previamente por Koets y col. (2001), que estudiaron los niveles de IgG1 e IgG2 específicos frente a PPDp (antígenos de secreción) en muestras provenientes de bovinos naturalmente infectados y detectaron mayores niveles de IgG2 en subclínicos en relación a clínicos así como también incrementos de IgG1 en clínicos.

La Tabla 19 resume los datos publicados y obtenidos en el presente trabajo de tesis, acerca de la identificación de la infección de terneros desafiados con *Map* mediante la metodología de ELISA.

ELISA	Dosis y vía de infección	Positivos en cada día postinfección						Citas
		20	30	60	80	120	150	
Idexx	4X10 ⁶ UFC/día por 4 sem [#]	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	Waters y col. (2003)
	4X10 ⁶ UFC/día por 3 días*	-	-	-	1/3	-	-	Eisenberg y col. (2011)
	1X10 ⁹ UFC/sem por 3 sem*	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	Subharat y col. (2012)
	5X10 ⁷ UFC/día por 2 días*	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	Mortier y col. (2014b)
	5X10 ⁹ UFC/día por 2 días*	0/5	0/5	0/5	0/5	2/5	2/5	
Herdchek	1X10 ⁷ UFC/día por 7 días*	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	Koo y col. (2004)
	1X10 ¹¹ UFC/día por 14 días*	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	Stabel y col. (2011b)
	2,6X10 ¹² UFC/7 días por 21 días*	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	
Parachek	1X10 ⁷ UFC/día por 7 días*	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	Koo y col. (2004)
Pourquier	1,8X10 ⁴ UFC totales*	0/10	-	-	-	0/10	-	Koets y col. (2006)
LAM	4X10 ⁶ UFC/día por 4 sem [#]	0/3	0/3	0/3	0/3	1/3	3/3	Waters y col. (2003)
		-	1/3	0/3	-	0/3	-	Eda y col. (2006)
EVELISA	1X10 ¹¹ UFC/día por 14 días*	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	Stabel y col. (2011b)
	2,6X10 ¹² UFC/7 días por 21 día*	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	
SELISA	4X10 ⁶ UFC/día por 4 sem [#]	-	0/3	0/3	-	0/3	-	Speer y col. (2006)
Map-IgG		0/4	0/4	4/4	4/4	3/4	4/4	Resultados presentados en la presente tesis
Map-IgG1		0/4	0/4	2/4	2/4	4/4	2/4	
Map-IgG2	3,4 X 10 ⁹ UFC / día durante 2 días vía oral	1/4	1/4	4/4	4/4	4/4	4/4	
PPA-IgG		0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	1/4	
PPA-IgG1		0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	1/4	
PPA-IgG2		1/4	1/4	1/4	4/4	3/4	2/4	

Tabla 19. Resultados de ELISAs de terneros desafiados con *Map*. Los datos están expresados como número de terneros positivos al ELISA / total de terneros infectados experimentalmente en días postinfección. Las dosis infectivas se informan en unidades formadoras de colonias de *Map* / animal (UFC), por vía oral (*) o intratonsilar (#). ELISAs comerciales: Herdcheck y Idexx (IDEXX Laboratories, Inc., Westbrook, USA); Parachek (CSL Veterinary, Parkville, Australia); Pourquier (Instituto Pourquier, Montpellier, Francia). ELISAs no disponibles comercialmente: EVELISA; LAM (lipoarabinomanano), SELISA; *Map* (cepa ATCC 19698, bacteria entera inactivada por calor), PPA (antígeno protoplasmático de *Map*).

Observando los resultados de la Tabla 19, podemos remarcar que la evaluación de IgG2 específica (*Map* y PPA) por ELISA permitió detectar en forma temprana (20 días) la infección en 1 de los 4 terneros experimentalmente infectados. Además, la respuesta por IgG2 específica frente a *Map* (bacteria entera) detectó al 100 % de los animales infectados a partir del día 60 postinfección. Por lo tanto, podríamos sostener que existen otros antígenos que componen la bacteria que deberían ser identificados para mejorar el diagnóstico de bovinos jóvenes.

En cuanto a Hsp65r, sólo se detectó reactividad en el suero de un animal infectado (caravana n° 930, grupo C), que mostró una respuesta temprana y predominante por el isotipo IgG1. En este sentido y en coincidencia con Koets y col. (2001), que describieron niveles altos de IgG1 y basales de IgG2 específicos a esta proteína en sueros de animales naturalmente infectados en estadio subclínico.

p34r fue reconocida por el isotipo IgG2 de sueros de terneros infectados con el aislamiento A. Mundo y col. (2008) describieron reactividad de sueros de bovinos naturalmente infectados con *Map* frente a p34r por IgG1, esta diferencia podría deberse a que en ese trabajo se evaluaron sueros de bovinos con paratuberculosis clínica.

En la Tabla 20 se muestran las diferencias halladas entre los grupos de terneros experimentalmente infectados con los dos aislamientos de *Map* estudiados.

Grupos Experimentales	Dosis infectiva	Presencia de diarrea	Excreción de <i>Map</i> por MF	Respuesta inmune celular			Respuesta inmune humoral		
				INF γ	IDR	<i>Map</i>	PPA	Hsp65r	p34r
A	>	d (135-150 dpi) < peso	< +: 1/2	d >	> +: 2/2	< +: 2/2	IgG2: +: 1/2 (7 dpi) +: 2/2 (80 dpi)	nd	IgG2 +: 2/2
C	<	nd	> +: 2/2	nd	< +: 2/2	> +: 2/2	IgG2: +: 2/2 (80 dpi)	IgG1: +: 1/2	nd

Tabla 20. Diferencias detectadas entre los Grupos Experimentales. A: terneros infectados con el aislamiento de *Map* A (n = 2); C: terneros infectados con el aislamiento de *Map* C (n = 2). Resultados comparados correspondientes a los descriptos en el presente Capítulo. Los datos están expresados como > (mayor) o < (menor) en comparación al otro grupo; + (positivos); número de animales + / el total de animales por grupo; d (detectable); nd (no detectable); IgG1 o IgG2 según isotipo que predominante en el estudio de respuesta inmune humoral específica. Producción de interferón gamma (INF γ); intradermorreacción (IDR); *Map* (bacteria entera inactivada por calor); antígeno protoplasmático de paratuberculosis (PPA); proteína de shock térmico de 65kDa recombinante (Hsp65r); proteína p34 carboxi-terminal recombinante (p34r); días postinfección (dpi).

Los terneros infectados con el aislamiento C produjeron mayores cantidades de IgG, IgG1 e IgG2 específicas frente a *Map* en relación a los terneros infectados con el aislamiento A. La respuesta celular se comportó a la inversa: mayor respuesta en terneros infectados con el aislamiento A en relación a los infectados con el aislamiento C. Estos datos demuestran que la inducción de la respuesta inmune varía según el aislamiento de *Map* implicado.

Conclusiones

La respuesta inmune humoral fue inducida tempranamente por la infección experimental de *Map* en el modelo de terneros evaluado. Detectamos un pico de excreción fecal de *Map* a los 60 días postinfección, luego del cual los animales resultaron negativos al cultivo. La evaluación de la producción de INF γ por células periféricas mostró altos niveles producidos de forma espontánea.

Con respecto a los antígenos incluidos en la evaluación, hallamos de baja a nula respuesta (celular y humoral) frente a Hsp65r, lo que indica que la proteína recombinante evaluada no involucra a los epitopes B ni T o que la proteína obtenida es distinta a la Hsp65 nativa. La p34 sólo detectó a un grupo de bovinos infectados (A). Por lo que no se recomienda utilizar estos antígenos con fines diagnósticos.

El diagnóstico serológico tradicional (ELISA-PPA que utiliza un anti-IgG) no reconoció la infección en los terneros desafiados al menos hasta los 150 días postinfección. Mientras que, la incorporación de anticuerpos anti-isotipos (IgG2) permitió identificar al 100 % de los animales infectados dentro de los 150 días postinfección.

Los resultados del presente Capítulo sumados a los del Capítulo II aprueban la segunda hipótesis “El estudio de anticuerpos específicos permite mejorar el diagnóstico tradicional de la paratuberculosis bovina”. La evaluación del isotipo IgG2 específico frente a la bacteria entera de *Map* o PPA mejora la identificación de animales infectados con *Map* en estadio subclínico.

Capítulo IV

Efecto de anticuerpos bovinos específicos frente a *Map* y sus proteínas, sobre la viabilidad bacteriana intracelular en un modelo de infección de macrófagos bovinos *in vitro*

Se demostró que los Acs juegan un papel importante en la respuesta inmune frente a patógenos intracelulares (Igietseme y col., 2004; Williams y col., 2004; Glatman-Freedman, 2006; Abebe y Bjune, 2009). Nuestro grupo trabaja desde hace varios años en la evaluación del papel de Acs específicos en un modelo de infección de macrófagos bovinos *in vitro*. Los hallazgos principales fueron que:

- Los Acs específicos frente a p34r aumentan la asociación de *Map*-macrófago bovino e inducen la activación celular y por lo tanto la formación del granuloma (Mundo y col., 2008).
- Los Acs específicos frente a LAM incrementan la asociación de *Map*-macrófago bovino y afectan la sobrevivencia de *Map* (Jolly y col., 2011).

En este Capítulo se propuso estudiar si los Acs dirigidos contra proteínas de *Map* producen el mismo efecto que el detectado con Acs anti-LAM en la viabilidad intracelular de la bacteria.

Resultados

Anticuerpos

Caracterización de los sueros

Se trabajó con sueros provenientes de bovinos naturalmente infectados con *Map* en estadio clínico (IC), inmunizados con Hsp65r (IHsp65), inmunizados con p34r (Ip34) y controles negativos (CN). Estos sueros seleccionados fueron caracterizados por su reactividad frente a *Map* (bacteria entera), Hsp65r y p34r. Los resultados se muestran en la Figura 40.

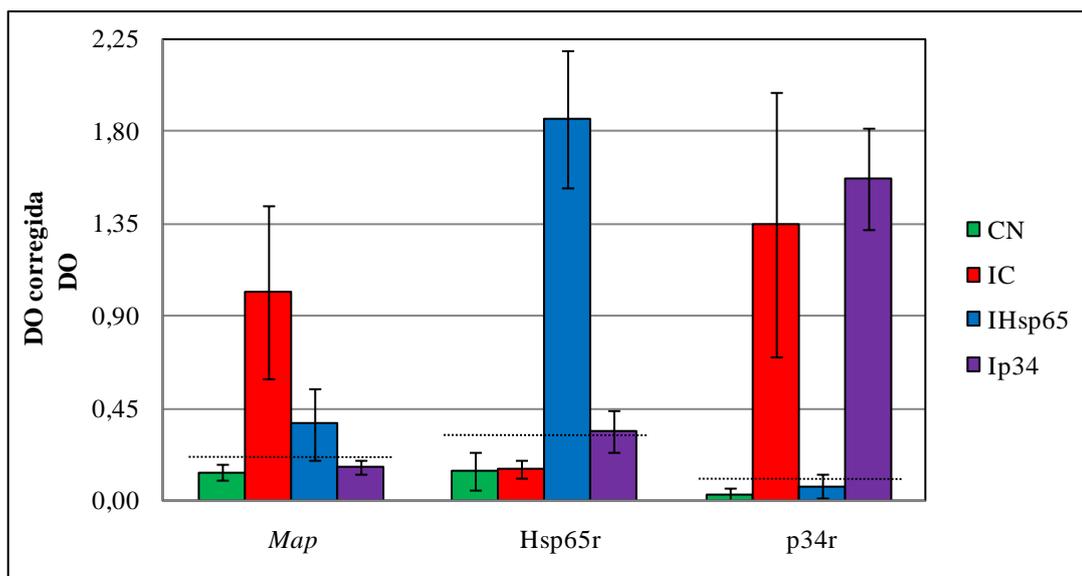


Figura 40. Caracterización mediante la técnica de ELISA de los sueros bovinos (utilizados en ensayos *in vitro*). Niveles de IgG específicos frente a *Map* ATCC 19698 (bacteria entera inactivada por calor): sueros evaluados 1/100; datos expresados en densidades ópticas promedio (DO) \pm desvío estándar (DE). Niveles de IgG específicos frente a Hsp65r y p34r: sueros evaluados 1/50; datos expresados en DO corregidas: DO frente al antígeno - DO frente al extracto de *E. coli* \pm DE. Grupos (n = 2, cada uno): controles negativos (CN, verdes), infectados clínicos (IC, rojos), inmunizados con Hsp65r (IHsp65, azules), inmunizados con p34r (Ip34, violetas). Las líneas punteadas indican los valores de corte (promedio de las DO de los sueros controles negativos más dos DE): para *Map*: 0,212; para Hsp65r: 0,323; para p34r: 0,086.

Mediante el uso de la técnica de ELISA y utilizando *Map* inactivado por calor, se detectaron altos niveles de IgG en sueros de los bovinos infectados naturalmente. Un bovino inmunizado con Hsp65r mostró reactividad frente a *Map*. Mientras que sólo se hallaron Acs específicos frente a Hsp65r en los sueros de los bovinos inmunizados con dicha proteína. Los sueros provenientes de bovinos naturalmente infectados no reconocieron a la Hsp65r. Se identificaron Acs específicos frente a p34r tanto en los sueros de los animales inmunizados con dicha proteína como en los infectados clínicos.

Purificación de los anticuerpos

Con el objetivo de poder trabajar con las moléculas de Acs y eliminar el efecto de otras proteínas del suero, se procedió a la purificación de las IgG.

Purificación de los anticuerpos por precipitación salina

En la Figura 41 se muestra la electroforesis y densitometría de uno de los sueros y Acs parcialmente purificados por precipitación salina, a modo de ejemplo representativo.

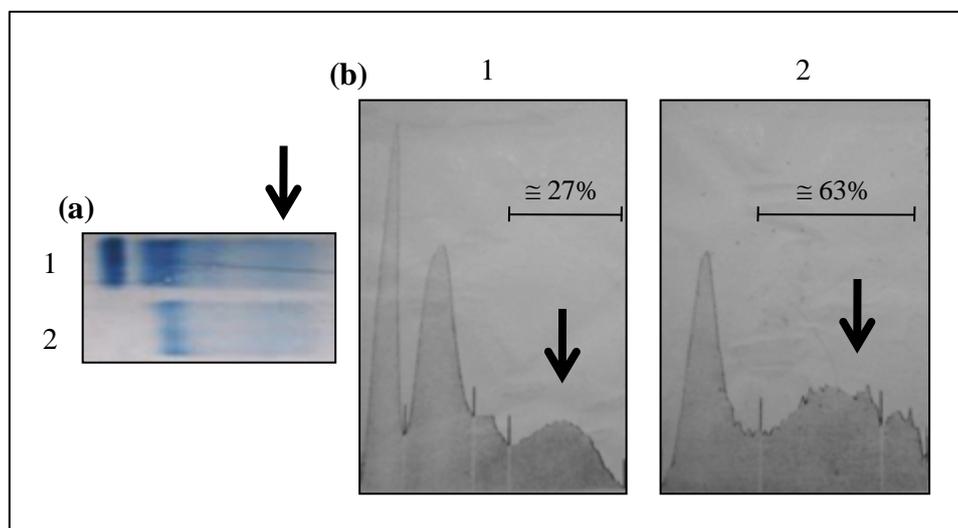


Figura 41. Electroforesis en acetato de celulosa (a) y densitometría (b) del suero (1) y de los anticuerpos parcialmente purificados por precipitación salina (2). Con flecha se indica las fracciones de γ -globulinas. El promedio de la concentración relativa de la fracción de γ -globulinas obtenido fue de 27 y 63 % para el suero y los anticuerpos parcialmente purificados, respectivamente.

La metodología utilizada permitió eliminar a la albumina. La concentración relativa de la fracción de γ -globulinas aumentó en promedio de $26,78 \pm 6,87$ % a $62,68 \pm 8,17$ % luego del tratamiento con el sulfato de amonio. Las fracciones proteicas obtenidas mostraron dos picos: uno correspondiente a las α 1-globulinas y otro a las γ -globulinas. En el análisis de los Acs parcialmente purificados mediante SDS-PAGE (calles 1, Figura 42), se observaron numerosas bandas proteicas contaminantes, sin embargo predominaron los Acs (bandas de 25 y 50 kDa) en todos los casos. A fin de eliminar esas proteínas séricas contaminantes, se realizó la purificación de los Acs por afinidad a la proteína G.

Purificación de los anticuerpos por afinidad a la proteína G

A partir de 9 mg de γ -globulinas purificadas por precipitación salina de cada suero, se obtuvieron en promedio $1,83 \pm 0,21$ mg de Acs purificados por afinidad a proteína G. En la Figura 42 se muestran los SDS-PAGE de los Acs purificados (calles 2), en los cuales se

observan dos bandas predominantes coincidentes con los pesos moleculares de las cadenas livianas (25 kDa) y pesadas (50 kDa) de los Acs. El protocolo empleado permitió purificar los Acs con alta pureza.

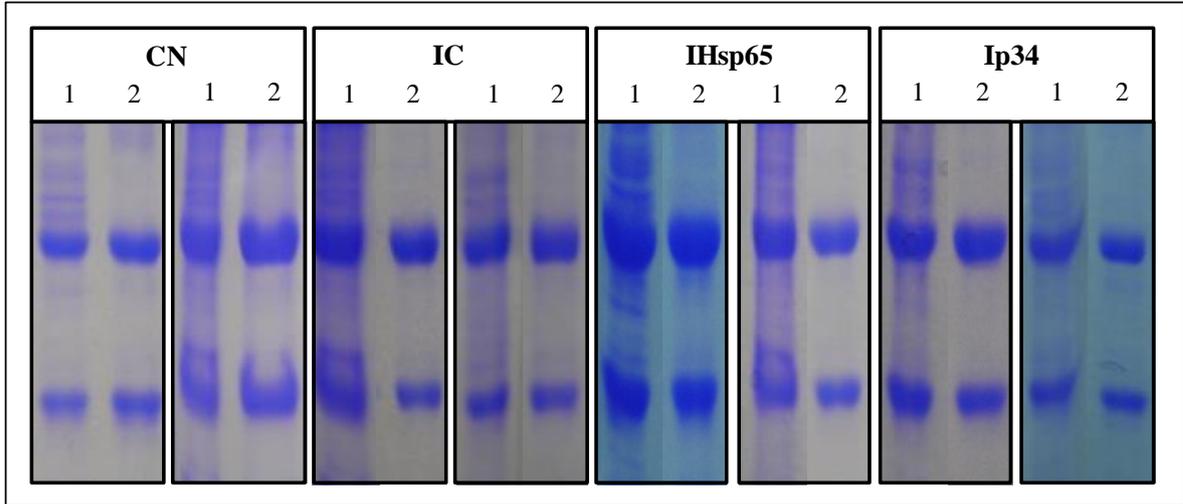


Figura 42. SDS-PAGE, en geles de poliacrilamida al 12 % SDS-PAGE teñido con 0,1 % azul de coomassie, de los anticuerpos parcialmente purificados por precipitación salina (1) y de los purificados por afinidad a proteína G (2). Grupos: controles negativos (CN, n = 2), infectados clínicos (IC, n = 2), inmunizados con Hsp65r (IHsp65, n = 2), inmunizados con p34r (Ip34, n = 2).

Previo a la evaluación de la funcionalidad de los Acs, se confirmó mediante ELISA (utilizando *Map*, Hsp65r y p34r) la capacidad de reconocimiento antigénico de los Acs purificados. En todos los casos hubo una reactividad de al menos 0,62 DO, a excepción de los negativos que arrojaron valores $\leq 0,11$ de DO.

Estudio de la funcionalidad de los anticuerpos purificados

Se evaluó la funcionalidad de los Acs purificados en la viabilidad de *Map* a las 72 hs postinfección de macrófagos bovinos (línea BoMac, Figura 43a). Se trabajó con una multiplicidad de infección (MOI) de 1:1. Los recuentos de UFC de *Map* se realizaron a una dilución de 1/100 (Figura 43b).

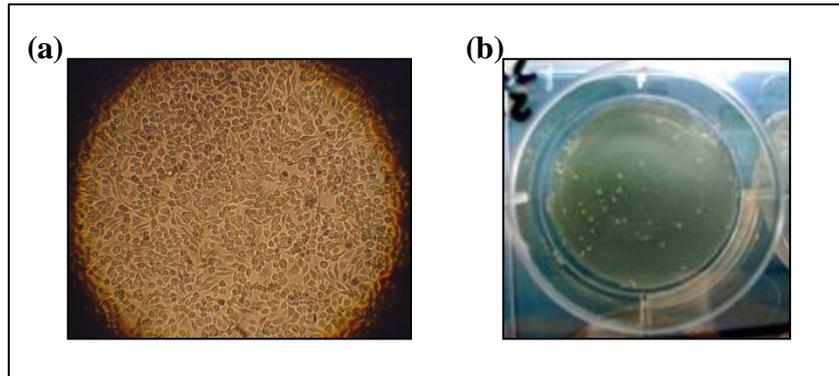


Figura 43. Ensayo de funcionalidad de anticuerpos. BoMac infectadas 100X (a); Titulación de *Map* en placa de 6 hoyos con medio 7H9 suplementado con micobactina J (b).

Los Acs purificados de cada suero bovino fueron evaluados en forma individual en este modelo de infección de macrófagos bovinos *in vitro*. Los resultados obtenidos de los ensayos de viabilidad bacteriana a las 72 hs postinfección de los macrófagos bovinos se muestran en la Figura 44.

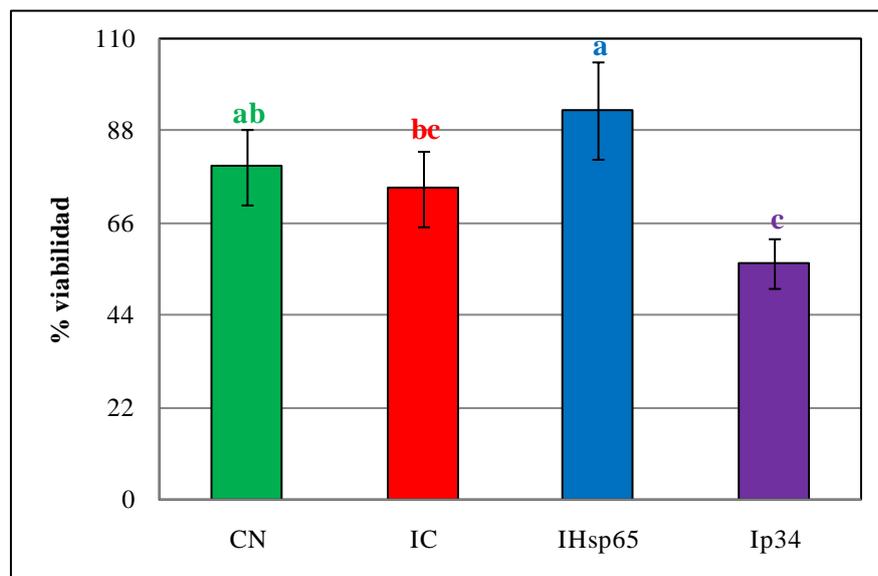


Figura 44. Viabilidad intracelular de *Map* pre-tratado con anticuerpos de bovinos de diferente origen y especificidad. Los resultados están expresados como promedios \pm desvíos estándares del % de viabilidad: $UFC_{t_f} / UFC_{t_0} * 100$. Grupos: controles negativos (CN, n = 2), infectados clínicos (IC, n = 2), inmunizados con Hsp65r (IHsp65, n = 2), inmunizados con p34r (Ip34, n = 2). Las letras indican diferencias significativas entre los grupos.

Las bacterias pre-tratadas con Acs provenientes de bovinos negativos mostraron una viabilidad del 80 %. A pesar de disminuir al 74 % la viabilidad bacteriana cuando se realizó el pre-tratamiento con Acs provenientes de bovinos infectados con *Map*, las diferencias no fueron significativas con los controles. Por otro lado, las bacterias que fueron pre-tratadas con Acs de bovinos inmunizados con Hsp65r, arrojaron valores superiores de viabilidad (93 %) en relación a los controles negativos.

Sólo el pre-tratamiento realizado con Acs provenientes de animales inmunizados con p34r (Ip34), disminuyó significativamente ($p = 0,001$) la viabilidad de *Map* (56 %; Figura 44).

Con el objetivo de confirmar que el efecto observado correspondía a la pre-incubación de los Acs y que el ingreso de *Map* era a través del RFc, se llevaron a cabo ensayos en los que previo a la infección, se incubaron los macrófagos con Acs agregados para bloquear los RFc de superficie (Manca y col., 1991). Los resultados se muestran en la Figura 45. El efecto de los Acs anti-p34r se revirtió cuando se bloqueó el RFc sobre los macrófagos (viabilidad: 56 % sin bloquear vs. 90 % bloqueado). Mientras que, no se detectaron variaciones en el resto de los tratamientos.

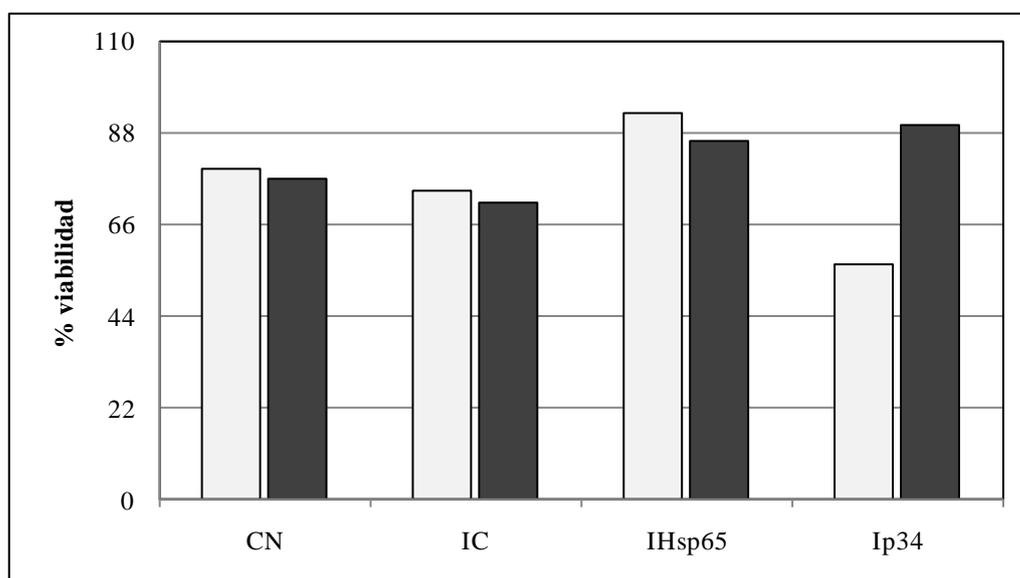


Figura 45. Bloqueo del efecto de los anticuerpos bovinos de distinto origen en la viabilidad intracelular de *Map*. Los resultados están expresados como promedios del % de viabilidad: $\text{UFC}_{t_f} / \text{UFC}_{t_0} * 100$. Barras grises claras: efecto de los anticuerpos; barras grises oscuras: bloqueo del receptor para Fc de Acs. Grupos: controles negativos (CN, $n = 2$), infectados clínicos (IC, $n = 2$), inmunizados con Hsp65r (IHsp65, $n = 2$), inmunizados con p34r (Ip34, $n = 2$).

Discusión

Las proteínas de shock térmico son consideradas antígenos citoplasmáticos en su mayoría. Sin embargo, Santema y col. (2011) describieron a la Hsp de 70 kDa como parte de la pared celular de *Map*. En nuestro experimento, los Acs de un bovino inmunizado con Hsp65r reaccionó frente a *Map* por ELISA. Este resultado podría indicar el reconocimiento de la Hsp65r en la superficie bacteriana. La inactivación por calor de las bacterias (utilizadas como antígeno en el ELISA) podrían alterar la conformación antigénica de la p34 nativa, y de esta manera, explicaría la ausencia en la reactividad (frente a *Map*) por los sueros de los bovinos inmunizados con p34r. Más aún, en estudios previos se demostró que sueros de bovinos inmunizados con p34r tenían Acs específicos frente a *Map* bacteria entera por ELISA utilizando bacterias no inactivadas por calor (Mundo y col., 2008).

La p34r fue reconocida por sueros de bovinos inmunizados con dicha proteína y de bovinos naturalmente infectados con *Map*. Estos resultados son similares a los descriptos por otros autores (de Kessel y col., 1993; Mundo y col., 2008). Estos datos confirmarían que la p34 es una proteína que estimula la respuesta inmune humoral en bovinos infectados naturalmente (de Kessel y col., 1993; Mundo y col., 2008). Además, el fragmento clonado corresponde al extremo carboxi-terminal de la p34 nativa y en él se describió la presencia de epitopes B (Ostrowski y col., 2003).

En relación a la precipitación salina de los Acs, se sabe que el porcentaje de sulfato de amonio adecuado a emplear varía de acuerdo a la especie animal (Harlow y Lane, 1988). Para el bovino, no se ha establecido aún el porcentaje más efectivo para la separación de las γ -globulinas del resto de las proteínas plasmáticas. Considerando que en esta especie el 50 % de las proteínas circulantes son albúminas (Butler, 1983), el porcentaje de sulfato de amonio a emplear debería permitir la precipitación de las γ -globulinas manteniendo a la albumina en solución. El protocolo de precipitación salina empleado permitió reducir la presencia de albumina a niveles indetectables por electroforesis. La utilización de la proteína G permitió purificar los Acs con alta pureza manteniendo la capacidad de reconocer al Ag. Sin embargo, la eficiencia de la purificación fue baja dado que en promedio sólo el 20 % (1,83 de 9 mg) de las proteínas de la fracción de γ -globulinas fueron purificadas por esta metodología.

Si bien el mejor sistema para estudiar la fagocitosis y viabilidad de *Map* es mediante la utilización de macrófagos del tracto digestivo, este no es un modelo práctico. El uso de líneas celulares aporta además de simpleza, la ventaja de eliminar las diferencias entre donantes de macrófagos. Trabajos publicados indicaron resultados contradictorios a cerca de la capacidad fagocítica de la línea celular BoMac; a saber, Stabel y Stabel (1995) describieron que esta línea celular presenta buena capacidad fagocítica y la recomiendan para ser utilizada en ensayos *in vitro*. Por otro lado, Woo y col. (2006) indicaron menor capacidad de ingestión de *Map* por las células BoMac en relación a macrófagos bovinos. Estudios previos de nuestro grupo pudieron corroborar la capacidad fagocítica y de activación de la línea BoMac (Mundo y col., 2008; Jolly y col., 2011).

Son pocos los trabajos que estudiaron el efecto de Acs purificados en la interacción de *Map*-macrófago (Mundo y col., 2008; Jolly y col., 2011). La mayoría de los estudios realizados por otros grupos de investigación han evaluado sueros enteros o inactivados por calor (Zurbrick y Czuprinski, 1987; Hostetter y col., 2005).

Periasamy y col. (2013) describieron niveles normales de apoptosis y necrosis en macrófagos infectados con *Map* utilizando una MOI de 1:1 y sugirieron que *Map* se encuentra, a esa MOI, en un ambiente óptimo para sobrevivir y replicarse. Mientras que, utilizando MOI mayores, detectaron aumentos en los niveles de apoptosis (MOI 1:10 y 1:50) y necrosis (MOI 1:50). Bannantine y Stabel (2002) también hallaron necrosis de macrófagos infectados con *Map* a un MOI de 1:30. Teniendo en cuenta estos datos, se decidió trabajar con una MOI de 1:1, similar al trabajo realizado por de Vallière y col. (2005).

En el presente trabajo de tesis se detectó una viabilidad intracelular de la cepa ATCC de *Map* del 80 % cuando se realizó el pre-tratamiento con Acs provenientes de bovinos controles negativos mientras que Jolly y col. (2011) describieron una viabilidad bacteriana de aproximadamente 135 % utilizando la cepa bovina K10 de *Map* y una MOI de 1:10. Además, se ha señalado una menor resistencia (o mayor sensibilidad) de la cepa ATCC 19698 a los mecanismos bactericidas de la línea BoMac en relación a la cepa K10 de *Map* (Jolly, 2011), lo que podría estar indicando una menor virulencia en la cepa ATCC 19698 de *Map* en el modelo de infección utilizado.

Teniendo en cuenta que el pre-tratamiento de *Map* con Acs provenientes de bovinos inmunizados con Hsp65r no mostró diferencias con respecto al control negativo, se podría

inferir que Acs dirigidos contra dicha proteína recombinante no poseen un efecto en este sistema de evaluación *in vitro*.

El efecto de los Acs provenientes de bovinos naturalmente infectados en la viabilidad intracelular de *Map* fue similar a los de bovinos controles negativos. En contraposición, Jolly y col. (2011) hallaron disminuciones en la viabilidad de *Map* (utilizando una MOI de 1:10) de aproximadamente en 41 % por la utilización de Acs purificados de bovinos naturalmente infectados en relación a los controles negativos.

Otros autores también describieron disminuciones en las UFC de micobacterias cuando se encontraban pre-tratadas con sueros enteros de personas vacunadas con BCG (de Vallière y col., 2005) o con sueros inactivados por calor provenientes de bovinos naturalmente infectados (Hostetter y col., 2005).

Nuestro grupo ha descrito que Acs específicos frente a p34r incrementan la asociación de *Map*-macrófago bovino y la activación celular del macrófago (Mundo y col., 2008). En el presente trabajo, detectamos que Acs purificados a partir de sueros de bovinos inmunizados con p34r reducen significativamente la viabilidad intracelular de *Map* y que los RFcs estarían involucrados. Este efecto podría deberse a la activación del estallido respiratorio o a la producción de citoquinas pro-inflamatorias (Yamamoto y Johnston, 1984; Stein y col., 1991; Scholl y col., 1992; Jolly y col., 2014) o por la inducción de la maduración del fagolisosoma (Triverdi col., 2006).

Conclusiones

En las condiciones evaluadas durante el desarrollo de esta tesis, no se ha podido detectar efectos sobre la viabilidad bacteriana de los Acs provenientes de bovinos infectados naturalmente ni de los inmunizados con Hsp65r. Mientras que, los anticuerpos de bovinos inmunizados con p34r mostraron un efecto inhibitorio sobre la viabilidad de *Map* intracelular en este modelo. Este hallazgo aporta nuevas evidencias que sostienen que los anticuerpos poseen un papel activo en la infección *in vitro* y justifican la continuación de su análisis en modelos de infección y protección en la especie bovina.

Discusión General

La relación entre el bovino (huésped) y *Map* es compleja. Numerosos mecanismos de la respuesta inmune en la paratuberculosis son aún desconocidos. Los nuevos aportes al conocimiento de la respuesta inmune humoral no sólo permiten una comprensión más profunda de la inmunopatogenia de la paratuberculosis, sino que también podrían tener implicancia para el desarrollo de metodologías diagnósticas.

El objetivo del trabajo fue caracterizar los anticuerpos bovinos totales y específicos frente a *Map* y sus proteínas, e identificar su efecto en la viabilidad bacteriana.

La paratuberculosis bovina genera lesiones intestinales que produce disminuciones de las proteínas séricas totales (Donat y col., 2014). Sin embargo, hallamos aumentos en los niveles totales de IgM en sueros de bovinos infectados en estadio clínico. Los Acs naturales podrían estar implicados en este incremento dado que la lesión intestinal (generada en los estadios avanzados de la paratuberculosis) altera la barrera mucosa y microorganismos comensales o alimentos podrían estimular a LB1 (Tizard, 2013). En las muestras de materia fecal de los infectados clínicos, se hallaron aumentos en todos los isotipos (IgM, IgG e IgA) totales. Éstos podrían provenir de la circulación sistémica ya que se ha descrito que el incremento de la permeabilidad vascular en bovinos con paratuberculosis genera la pérdida de 39 g de proteínas plasmáticas a través de la materia fecal por día (Patterson y col., 1967).

Todos los bovinos infectados de manera natural presentaron IgG sérica específica frente a *Map* en coincidencia con los datos publicados por Abbas y Riemann (1988) y Mundo y col. (2008).

El isotipo IgG1 *Map*-específico se detectó incrementado únicamente en muestras de suero de los bovinos infectados en estadio clínico en concordancia con otros estudios (Yokomizo y col., 1985; Koets y col., 2001; Mundo y col., 2008; Jolly y col., 2011).

Todos los bovinos naturalmente infectados muestran altos niveles de IgG2 específica en sueros. Resultados similares fueron descritos en bovinos con paratuberculosis subclínica (Koets y col., 2001). Mientras que, los datos publicaron para los bovinos infectados clínicos son diversos (Yokomizo y col., 1985; Koets y col., 2001; Mundo y col., 2008).

La IgG3 específica frente a la bacteria entera se halló aumentada en los sueros de todos los bovinos infectados naturalmente. Estudios previos de nuestro grupo describieron incrementos de este isotipo en bovinos con paratuberculosis clínica (Mundo y col., 2008).

A partir de los resultados obtenidos, se puede señalar que el aumento de IgG específica en sueros de bovinos infectados clínicos se debe principalmente al isotipo IgG1 mientras

que, en los bovinos subclínicos, los isotipos IgG2 e IgG3 son los isotipos más importantes. Estos datos concuerdan con los expresados por Estes y Brown (2002), quienes propusieron que en las respuestas inmunes de tipo T helper 1 (primera etapa de la patología, subclínica) predomina el isotipo IgG2, mientras que en las respuestas inmunes de tipo T helper 2 (estadio clínico) se caracterizan por el predominio de IgG1.

La Hsp65 es identificada como un antígeno inmunodominante en la paratuberculosis (Colston y col., 1994b; Koets y col., 1999 y 2001). Sin embargo, nuestros resultados muestran una baja reactividad frente a la proteína recombinante producida en nuestro laboratorio por los sueros de bovinos infectados de manera natural y experimental. Problemas conformacionales o la pérdida de epitopes B (presentes en la Hsp65 y no incluidos en el fragmento seleccionado, relacionados al sistema de expresión o por el pegado a la placa de ELISA) podrían ser los responsables.

El IgG/ELISA-PPA mostró una especificidad del 100 %. Los datos publicados por otros autores también informan especificidades altas (Sockett y col., 1992; Collins y col., 2005; Eda y col., 2006; Speer y col., 2006; Scott y col., 2010). Esta metodología fue la mejor de las estudiadas para identificar a los bovinos infectados en estadio clínico, similar a lo detallado por Nielsen y Toft (2008). En cuanto a la sensibilidad detectada, fue superior a la de los ELISAs comerciales (Nielsen y Toft, 2008) y levemente inferior a los datos publicados de los SELISA, EVELISA y EVA-ELISA (Eda y col., 2006; Speer y col., 2006; Scott y col., 2010).

Es de destacar que el IgG2/ELISA-PPA permitió identificar a la mayoría de los bovinos infectados (subclínicos y clínicos). Además, detectó mayor número de bovinos infectados subclínicos en comparación al IgG/ELISA-PPA (54 vs. 23 % para IgG2 e IgG/ELISA-PPA, respectivamente). Por lo tanto, proponemos la combinación de IgG2/ELISA-PPA e IgG/ELISA-PPA para incrementar la identificación de rodeos con animales en diferentes estadios de la paratuberculosis.

A pesar de que se describe una baja respuesta inmune humoral en neonatos (Tizard, 2013), en el ensayo *in vivo*, se comenzó a detectar IgG específica frente a la bacteria entera a partir de los 60 días postinfección. Más aun, el isotipo IgG2 fue el primer isotipo que mostró aumentos significativos. Mientras que, Schillinger y col. (2013) no hallaron IgG2 específica, evaluado por citometría de flujo, hasta los 392 días postinfección (duración del ensayo).

El diagnóstico serológico tradicional (IgG/ELISA-PPA) no reconoció la infección en los terneros desafiados. En coincidencia con trabajos publicados, que utilizaron el modelo de infección de terneros, los Acs difícilmente fueron identificados y en general en forma tardía (ver Tabla 19). Mientras que, la incorporación de anticuerpos anti-IgG2 permitió detectar al 100 % de los animales infectados dentro de los 150 días postinfección. Además, la respuesta por IgG2 específica frente a *Map* (bacteria entera) detectó al 100 % de los animales infectados a partir del día 60 postinfección. Por lo tanto, podríamos sostener que existen otros antígenos que componen la bacteria que deberían ser identificados para mejorar el diagnóstico de bovinos jóvenes.

El uso de dos aislamientos demuestra que p34 no resulta un buen candidato para la identificación de la infección debido a que fue solamente reconocida por anticuerpos del grupo infectado con el aislamiento A. A pesar que es descripta como inmunodominante para la respuesta humoral (de Kessel y col., 1993; Ostrowski y col., 2003; Mundo y col., 2008).

Los anticuerpos de bovinos inmunizados con p34r inhiben la viabilidad intracelular de *Map* en el modelo utilizado. Otros autores también describieron disminuciones en las UFC de micobacterias cuando las mismas se encontraban pre-tratadas con sueros específicos enteros o inactivados por calor (de Vallière y col., 2005; Hostetter y col., 2005). Además, nuestro grupo detectó que Acs específicos frente a p34r incrementan la asociación de *Map*-macrófago bovino y la activación celular del macrófago (Mundo y col., 2008). Este hallazgo aporta nuevas evidencias que sostienen que los anticuerpos poseen un papel activo en la infección *in vitro* y justifican la continuación de su análisis en modelos de infección y protección en la especie bovina.

A partir de los resultados obtenidos se acepta la hipótesis general. La caracterización de los anticuerpos realizada permitió hallar parte del efecto de esta patología en la especie bovina y mejorar las herramientas de diagnóstico dado que la identificación de la respuesta inmune humoral constituye una metodología de fácil aplicación. La función de la respuesta inmune humoral contra bacterias intracelulares ha sido muy cuestionada. Este trabajo demuestra que los anticuerpos poseen un papel activo en la fagocitosis.

Conclusiones Generales

Los datos obtenidos de la presente tesis permiten sostener que:

- ✓ La paratuberculosis bovina afecta los niveles de isotipos de inmunoglobulinas totales en muestras de suero y materia fecal, según el estadio. Los animales con paratuberculosis clínica presentan incrementos en los niveles de IgM sérica así como de IgM, IgG e IgA a nivel local.

- ✓ La infección natural con *Map* en bovinos induce niveles de isotipos de inmunoglobulinas específicos variables según el antígeno, el estadio de la patología y la muestra estudiada. Todos los bovinos infectados presentan incrementos en los niveles de IgG específica a *Map*. El isotipo IgG1 es el responsable de este aumento en los infectados clínicos mientras que IgG2 e IgG3 son los característicos en sueros de los bovinos subclínicos.

- ✓ El estudio del isotipo IgG2 específico frente a PPA mejora la identificación de animales infectados con *Map* en estadio subclínico; en consecuencia, la combinación IgG2/ELISA-PPA e IgG/ELISA-PPA permite incrementar la detección de animales en diferentes estadios de la paratuberculosis en rodeos.

- ✓ La evaluación de otros antígenos para el diagnóstico como la Hsp65r muestra una baja reactividad frente a la proteína recombinante producida en nuestro laboratorio. Problemas conformacionales o la pérdida de epitopes B y T (presentes en la Hsp65 y no incluidos en el fragmento seleccionado) podrían ser los responsables.

- ✓ En el modelo de infección experimental de terneros:
 - ❖ se identifica una respuesta temprana por anticuerpos frente a *Map*.
 - ❖ se detecta al 100 % de los animales mediante la evaluación del isotipo IgG2.
 - ❖ se evidencian anticuerpos específicos frente a p34r sólo en los sueros de los terneros infectados experimentalmente con el aislamiento A.

✓ Los anticuerpos específicos frente a p34r inhiben la viabilidad intracelular de *Map* en el modelo de infección de macrófagos bovinos *in vitro* utilizado. Además, el receptor para Fc de los Acs está implicado. Estos resultados avalan la hipótesis que “Los anticuerpos bovinos inducidos por infección o inmunización con proteínas específicas disminuyen la viabilidad intracelular del *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*”.

Bibliografía

- Abbas B; Riemann HP. 1988. IgG, IgM and IgA in the serum of cattle naturally infected with *Mycobacterium paratuberculosis*. *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases*. 11 (3-4): 171-5.
- Abebe F; Bjune G. 2009. The protective role of antibody responses during *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Clinical and Experimental Immunology*. 157 (2): 235–43.
- Abendaño N; Sevilla IA; Prieto JM; Garrido JM; Juste RA; Alonso-Hearn M. 2013. *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* isolates from sheep and goats show reduced persistence in bovine macrophages than cattle, bison, deer and wild boar strains regardless of genotype. *Vet. Microbiol*. 163 (3-4): 325-34.
- Abendaño N; Tyukalova L; Barandika JF; Balseiro A; Sevilla IA; Garrido JM; Juste RA; Alonso-Hearn M. 2014. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolates induce *in vitro* granuloma formation and show successful survival phenotype, common anti-inflammatory and antiapoptotic responses within ovine macrophages regardless of genotype or host of origin. *PLoS One*. 9 (8): e104238.
- Aboagye G; Rowe MT. 2011. Occurrence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in raw water and water treatment operations for the production of potable water. *Water Res*. 45 (11): 3271-8.
- Afzal M; Khurshid S; Khalid R; Paracha RZ; Khan IH; Akhtar MW. 2015. Fusion of selected regions of mycobacterial antigens for enhancing sensitivity in serodiagnosis of tuberculosis. *J. Microbiol. Methods*. 115: 104-11.
- Appana G; Das D; Veerasami M; Senthilkumar RL; Durishetty M; Ramalakshmi B; Bahekar V; Mukherjee F; Chandran D; Kumar PU; Sesikeran B; Srinivasan VA. 2013. Antemortem and postmortem examinations of the cattle calf naturally infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Eur. J. Microbiol. Immunol. (Bp)*. 3 (4): 241-51.
- 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: 209–17.
- Bang B. 1906. Chronische pseudotuberkulöse Darmentzündung beim Rinde. *Berliner Tierärztliche Wochenschrift*. 50: 759–63.
- Bannantine JP; Stabel JR. 2002. Killing of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* within macrophages. *BMC. Microbiol*. 2:2.
- Bannantine JP; Paustian ML; Kapur V; Eda S. 2010. Section 10: Proteome and antigens of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. En: Behr MA y Collins DM (eds.), *Paratuberculosis: Organism, Disease, Control* (94-108). CAB International. Acceso: <http://www.cabi.org/>

- Bannantine JP; Bermudez LE. 2013. No holes barred: invasion of the intestinal mucosa by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Infect. Immun.* 81: 3960–5.
- Bannantine JP; Li L; Mwangi M; Cote R; Raygoza Garay JA; Kapur V. 2014. Complete genome sequence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, isolated from human breast milk. *Genome Announc.* 2 (1); e01252-13.
- Barkema HW; Hesselink JW; McKenna SLB; Benedictus G; Groenendaal H. 2010. Section 2: Global Prevalence and Economics of Infection with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Ruminants. En: Behr MA y Collins DM (eds.), *Paratuberculosis: Organism, Disease, Control* (10-21). CAB International. Acceso: <http://www.cabi.org/>
- Bastida F; Juste RA. 2011. Paratuberculosis control: a review with a focus on vaccination. *Journal of Immune Based Therapies and Vaccines.* 9 (8): 1-17.
- Begara-McGorum I; 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 (3): 265-87.
- Benedictus G; Dijkhuizen AA; Stelwagen J. 1987. Economic losses to farms due to paratuberculosis in cattle. *Tijdschrift voor Diergeneeskunde.* 110, 310–9.
- Benedictus A; Mitchell RM; Linde-Widmann M; Sweeney R; Fyock T; Schukken YH; Whitlock RH. 2008. Transmission parameters of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infections in a dairy herd going through a control program. *Prev. Vet. Med.* 83 (3-4): 215-27.
- Berghaus LJ; Corbeil LB; Berghaus RD; Kalina WV; Kimball RA; Gershwin LJ. 2006. Effects of dual vaccination for bovine *respiratory syncytial virus* and *Haemophilus somnus* on immune responses. *Vaccine.* 24 (33-34): 6018-27.
- Bezoz J; Alvarez J; Romero B; Aranaz A; Juan LD. 2012. Tuberculosis in goats: assessment of current *in vivo* cell-mediated and antibody-based diagnostic assays. *Vet. J.* 191 (2): 161-5.
- Billman-Jacobe H; Carrigan M; Cockram F; Corner LA; Gill IJ; Hill JF; Jessep T; Milner AR; Wood PR. 1992. A comparison of the interferon gamma assay with the absorbed ELISA for the diagnosis of Johne's disease in cattle. *Vet. J.* 69 (2): 25-8.
- Bölske G; Herthnek D. 2010. Section 23: Diagnosis of Paratuberculosis by PCR. En: Behr MA y Collins DM (eds.), *Paratuberculosis: Organism, Disease, Control* (267-83). CAB International. Acceso: <http://www.cabi.org/>
- Boysen P; Gunnes G; Pende D; Valheim M; Storset AK. 2008. Natural killer cells in lymph nodes of healthy calves express CD16 and show both cytotoxic and cytokine-producing properties. *Dev. Comp. Immunol.* 32 (7): 773-83.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry.* 72 (1-2): 248–54.

- Brennan PJ; Crick DC. 2007. The cell-wall core of *Mycobacterium tuberculosis* in the context of drug discovery. *Curr. Top. Med. Chem.* 7 (5): 475-88.
- Brito BP; Aly SS; Anderson RJ; Fossler CP; Garry FB; Gardner IA. 2014. Association between caudal fold tuberculin test responses and results of an ELISA for *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* and mycobacterial culture of feces in tuberculosis-free dairy herds. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 244 (5): 582-7.
- Buergelt CD; Hall C; McEntee K; Duncan JR. 1978. Pathological evaluation of paratuberculosis in naturally infected cattle. *Veterinary Pathology.* 15: 196-207.
- Butler JE. 1983. Bovine immunoglobulins: an augmented review. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 4 (1-2): 43-152.
- Butler JE. 1986. Biochemistry and biology of ruminant immunoglobulin. En: Pandey R (ed.), *Veterinary Microbiology: Molecular and Clinical Perspectives (1-53)*, Vol. 2. *Prog. Vet. Microbiol. Immun.* Karger, Basel, Suiza.
- Butler JE; Heyermann H; Frenyo LV; Kiernan J. 1987. The heterogeneity of bovine IgG2. II. The identification of IgG2b. *Immunol.Lett.* 16 (1): 31-8.
- Butler JE; Kehrlí MEJ. 2005. Immunoglobulins and immunocytes in the mammary gland and its secretion. En: Mestecky J; Bienenstock J; Lamm M; Strober W; McGhee J; Mayer L (eds.), *Mucosal Immunology (1763-93)*. III Edición. Academic Press. Burlington, Massachusetts, USA
- Castellanos E; de Juan L; Domínguez L; Aranaz A. 2012. Progress in molecular typing of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Res. Vet. Sci.* 92 (2): 169-79.
- Cervenak J; Kacs Kovics I. 2009. The neonatal Fc receptor plays a crucial role in the metabolism of IgG in livestock animals. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 128 (1-3): 171-7.
- Chattha KS; Firth MA; Hodgins DC; Shewen PE. 2010. Variation in expression of membrane IgM, CD21 (CR2) and CD32 (FcγRIIB) on bovine lymphocytes with age: a longitudinal study. *Dev. Comp. Immunol.* 34 (5): 510-7.
- Chiodini RJ; Van Kruiningen HJ; Merkal RS. 1984a. Ruminant paratuberculosis (Johne's disease): the current status and future prospects. *Cornell Vet.* 74 (3): 218-62.
- Chiodini RJ; Van Kruiningen HJ; Thayer WR; Merkal RS; Coutu JA. 1984b. Possible role of mycobacteria in inflammatory bowel disease. I. An unclassified *Mycobacterium* species isolated from patients with Crohn's disease. *Dig. Dis. Sci.* 29 (12): 1073-9.
- Chiodini RJ. 1989. Crohn's disease and the mycobacterioses: a review and comparison of two disease entities. *Clin. Microbiol. Rev.* 2 (1): 90-117.
- Chiodini RJ. 1993. Abolish *Mycobacterium paratuberculosis* Strain 18. *J. Clin. Microbiol.* 31: 1956-7.
- Chiodini RJ. 1996. Immunology: resistance to paratuberculosis. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 12 (2): 313-43.

- Chiodini RJ; Hermon-Taylor J. 1993. The thermal resistance of *Mycobacterium paratuberculosis* in raw milk under conditions simulating pasteurization. *J. Vet. Diagn. Invest.* 5 (4): 629-31.
- Cirone K; Huberman Y; Morsella C; Méndez L; Jorge M; Paolicchi F. 2013. Growth of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, *Escherichia coli*, and *Salmonella Enteritidis* during Preparation and Storage of Yogurt. *ISRN. Microbiol.* 2013; 247018.
- Clarke CJ. 1997. The pathology and pathogenesis of paratuberculosis in ruminants and other species. *Journal of Comparative Pathology.* 116 (3): 217–61.
- Cochard T; Branger M; Thibault V; Biet F. 2014. A Web tool for analysis the genotyping of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* strains and other MAC members. XII International Colloquium on Paratuberculosis (233). Parma, Italia.
- Cohen IR. 1991. Autoimmunity to chaperonins in the pathogenesis of arthritis and diabetes. *Annu. Rev. Immunol.* 9: 567-89.
- Colavecchia SB; Jolly A; Fernández B; Fontanals AM; Fernández E; Mundo SL. 2012. Effect of lipoarabinomannan from *Mycobacterium avium* subsp. *avium* in Freund's incomplete adjuvant on the immune response of cattle. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 45(2):139-46.
- Collins DM; Gabric DM; De Lisle GW. 1989. Identification of a repetitive DNA sequence specific to *Mycobacterium paratuberculosis*. *FEMS Microbiology Letters.* 60 (2): 175–8.
- Collins DM; Gabric DM; de Lisle GW. 1990. Identification of two groups of *Mycobacterium paratuberculosis* strains by restriction endonuclease analysis and DNA hybridization. *J. Clin. Microbiol.* 28 (7): 1591-6.
- Collins DM; Stephens DM; de Lisle GW. 1993. Comparison of polymerase chain reaction test and faecal culture for detecting *Mycobacterium paratuberculosis* in bovine faeces. *Vet. Microbiol.* 36: 289–99.
- Collins MT; Wells SJ; Petrini KR; Collins JE; Schultz RD; Whitlock RH. 2005. Evaluation of five antibody detection tests for diagnosis of bovine paratuberculosis. *Clin. Diag. Lab. Immunol.* 12 (6): 685–92.
- Colston A; McConnell I; Bujdoso R. 1994a. Cloning and expression in *Escherichia coli* of DNA encoding a 60 kDa stress protein of *Mycobacterium paratuberculosis*, the causative agent of Johne's disease. *Microbiology.* 140 (12): 3329-36.
- Colston A; McConnell I; Bujdoso R. 1994b. A role for the 65-kDa stress protein in the cellular immune response to *M. paratuberculosis* infection in sheep. IV International Colloquium on Paratuberculosis. Cambridge, Reino Unido.
- Connelley TK; Longhi C; Burrells A; Degnan K; Hope J; Allan AJ; Hammond JA; Storset AK; Morrison WI. 2014. NKp46+ CD3+ cells: a novel nonconventional T cell subset in cattle exhibiting both NK cell and T cell features. *J. Immunol.* 192 (8): 3868-80.

- Corripio-Miyar Y; Hope J; McInnes CJ; Wattedgedera SR; Jensen K; Pang Y; Entrican G; Glass EJ. 2015. Phenotypic and functional analysis of monocyte populations in cattle peripheral blood identifies a subset with high endocytic and allogeneic T-cell stimulatory capacity. *Vet. Res.* 46 (1): 112.
- Coussens PM; Sipkovsky S; Murphy B; Roussey J; Colvin CJ. 2012 . Regulatory T cells in cattle and their potential role in bovine paratuberculosis. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 35 (3): 233-9.
- Cousins DV; Whittington R; Marsh I; Masters A; Evans RJ; Kluver P. 1999. *Mycobacteria* distinct from *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolated from the faeces of ruminants possess IS900-like sequences detectable by IS900 polymerase chain reaction: implications for diagnosis. *Molecular and Cellular Probes.* 13, 431–42.
- de Almeida DE; Colvin CJ; Coussens PM. 2008. Antigen-specific regulatory T cells in bovine paratuberculosis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 125 (3-4): 234-45.
- 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. *Appl. Environ. Microbiol.* 72 (9): 5927–32.
- De Kesel M; Gilot P; Misonne MC; Coene M; Cocito C. 1993. Cloning and expression of portions of the 34-kilodalton-protein gene of *Mycobacterium paratuberculosis*: its application to serological analysis of Johne's disease. *J. Clin. Microbiol.* 31 (4): 947-54.
- de Vallière S; Abate G; Blazevic A; Heuertz RM; Hoft DF. 2005. Enhancement of innate and cell-mediated immunity by antimycobacterial antibodies. *Infect. Immun.* 73 (10): 6711-20.
- DeLong R; DeLong DM; Clarke-Pearson DL. 1988. Comparing the areas under two or more correlated receiver operating characteristic curves: a nonparametric approach. *Biometrics.* 44 (3): 837-45.
- Diéguez FJ; Arnaiz I; Sanjuán ML; Vilar MJ; Yus E. 2008. Management practices associated with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection and the effects of the infection on dairy herds. *Vet. Rec.* 10; 162 (19): 614-7.
- Donat K; Erhardt G; Soschinka A; Brandt HR. 2014. Decreased serum protein associated with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* shedding in German Holstein cows. *Vet. Rec.* 174 (16): 408.
- Dudemaine PL; Fecteau G; Lessard M; Labrecque O; Roy JP; Bissonnette N. 2014. Increased blood-circulating interferon- γ , interleukin-17, and osteopontin levels in bovine paratuberculosis. *J. Dairy Sci.* 97 (6): 3382-93.

- Dundee L; Grant IR; Ball HJ; Rowe MT. 2001. Comparative evaluation of four decontamination protocols for the isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from milk. *Letters Applied Microbiol.* 33: 173-7.
- Eda S; Bannantine JP; Waters WR; Mori Y; Whitlock RH; Scott MC; Speer CA. 2006. A Highly sensitive and subspecies-specific surface antigen Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for diagnosis of Johne's Disease. *Clin. Vaccine Immunol.* 13 (8): 837-44.
- Eisenberg SW; Koets AP; Nielen M; Heederik D; Mortier R; De Buck J; Orsel K. 2011. Intestinal infection following aerosol challenge of calves with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Vet. Res.* 42: 117.
- Ellis TN; Beaman BL. 2004. Interferon-gamma activation of polymorpho-nuclear neutrophil function. *Immunology.* 112 (1): 2-12.
- el-Zaatari FA; Naser SA; Engstrand L; Burch PE; Hachem CY; Whipple DL; Graham DY. 1995. Nucleotide sequence analysis and seroreactivities of the 65K heat shock protein from *Mycobacterium paratuberculosis*. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2 (6): 657-64.
- Englund S; Bölske G; Johansson KE. 2002. An IS900-like sequence found in a *Mycobacterium* sp. other than *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 209: 267-71.
- Estes M; Brown WC. 2002. Type 1 and type 2 responses in regulation of Ig isotype expression in cattle. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 90 (1-2): 1-10.
- Fecteau ME; Whitlock RH. 2010. Section 14: Paratuberculosis in cattle. En: Behr MA y Collins DM (eds.), *Paratuberculosis: Organism, Disease, Control* (144-56). CAB International. Acceso: <http://www.cabi.org/>
- 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.
- Fernández-Silva JA; Abdulmawjood A; Akineden Ö; Bülte M. 2012. Genotypes of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from South American countries determined by two methods based on genomic repetitive sequences. *Trop. Anim. Health Prod.* 44 (6): 1123-6.
- Fleischmann RD; Dodson RJ; Haft DH; Merkel JS, Nelson WC; Fraser CM. 2014. *Mycobacterium avium* 104, complete genome.I (Gene Bank Accession CP000479). The Institute for Genomic Research, 9712 Medical Center Dr, Rockville, MD 20850, USA
- Foley-Thomas EM; Whipple DL; Bermudez LE; Barletta RG. 1995. Phage infection, transfection and transformation of *Mycobacterium avium* complex and *Mycobacterium paratuberculosis*. *Microbiology.* 141 (5): 1173-81.

- Ganusov VV; Klinkenberg D; Bakker D; Koets AP. 2015. Evaluating contribution of the cellular and humoral immune responses to the control of shedding of *Mycobacterium avium* spp. *paratuberculosis* in cattle. *Vet. Res.* 46: 62.
- Gershwin LJ. 2009. Bovine immunoglobulin E. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 132 (1): 2-6.
- Giese SB; Ahrens P. 2000 . Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk from clinically affected cows by PCR and culture. *Vet. Microbiol.* 77 (3-4): 291-7.
- Gilardoni LR; Paolicchi FA; Mundo SL. 2012. Bovine Paratuberculosis: a review of advantages and disadvantages of the different diagnostic tests. *Rev. Argent. Microbiol.* 44 (3): 201-15.
- Gilardoni LR; Fernández B; Morsella C; Mendez L; Jar AM; Paolicchi FA; Mundo SL. En prensa. *Mycobacterium paratuberculosis* detection in cow's milk in Argentina by immunomagnetic separation-PCR. *Braz. J. Microbiol.*
- Gilot P; De Kesel M; Machtelinckx L; Coene M; Cocito C. 1993. Isolation and sequencing of the gene coding for an antigenic 34-kilodalton protein of *Mycobacterium paratuberculosis*. *J. Bacteriol.* 175 (15): 4930-5.
- Gioffré A; 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.* 46 (2): 557-64.
- Glatman-Freedman A. 2006. The role of antibody-mediated immunity in defense against *Mycobacterium tuberculosis*: advances toward a novel vaccine strategy. *Tuberculosis (Edinb).* 86 (3-4): 191-7.
- González J; Geijo MV; García-Pariente C; Verna A; Corpa JM; Reyes LE; Ferreras MC; Juste RA; García Marín JF; Pérez V. 2005. Histopathological classification of lesions associated with natural paratuberculosis infection in cattle. *J. Comp. Pathol.* 133 (2-3): 184-96.
- Grant IR; Ball HJ; Neill SD; Rowe MT. 1996. Inactivation of *Mycobacterium paratuberculosis* in cows' milk at pasteurization temperatures. *Appl. Environ. Microbiol.* 62 (2): 631-6.
- Grant IR; Ball HJ; Rowe MT. 1998. Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from milk by immunomagnetic separation. *Appl. Environ. Microbiol.* 64 (9): 3153-8.
- Grant IR; Pope CM; O'Riordan LM; Ball HJ; Rowe MT. 2000. Improved detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk by immunomagnetic PCR. *Vet. Microbiol.* 77 (3-4): 369-78.
- Green EP; Tizard ML; Moss MT; Thompson J; Winterbourne DJ; McFadden JJ; Hermon-Taylor J. 1989. Sequence and characteristics of IS900, an insertion element identified in a human Crohn's disease isolate of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Nucleic Acids Res.* 17 (22): 9063-73.
- Greiner M; Pfeiffer D; Smith RD. 2000. Principles and practical application of the receiver-operating characteristic analysis for diagnostic test. *Preventive Veterinary Medicine.* 45 (1-2): 23-41.

- Haist V; Seehusen F; Moser I; Hotzel H; Deschl U; Baumgärtner W; Wohlsein P. 2008. *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* infection in 2 pet dogs, Germany. *Emerg. Infect. Dis.* 14 (6): 988-90.
- Harlow E; Lane D. 1988. Chapter 8: Storing and purifying antibodies. En: *Antibodies, a Laboratory Manual* (298-9). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York, USA.
- Harris NB; Barletta RG. 2001. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in *Veterinary Medicine*. *Clin. Microbiol. Rev.* 14 (3): 489-512.
- Hines ME 2nd; Stabel JR; Sweeney RW; Griffin F; Talaat AM; Bakker D; Benedictus G; Davis WC; de Lisle GW; Gardner IA; Juste RA; Kapur V; Koets A; McNair J; Pruitt G; Whitlock RH. 2007. Experimental challenge models for Johne's disease: a review and proposed international guidelines. *Vet. Microbiol.* 122 (3-4): 197-222.
- Hines II ME. 2010. Section 19: Experimental ruminant models of paratuberculosis. En: Behr MA y Collins DM (eds.), *Paratuberculosis: Organism, Disease, Control* (201-22). CAB International. Acceso: <http://www.cabi.org/>.
- Hoek A; Rutten VP; Kool J; Arkesteijn GJ; Bouwstra RJ; Van Rhijn I; Koets AP. 2009. Subpopulations of bovine WC1 (+) gammadelta T cells rather than CD4 (+) CD25 (high) Foxp3(+) T cells act as immune regulatory cells *ex vivo*. *Vet. Res.* 40 (1): 6.
- Hostetter J; Steadham E; Haynes J; Bailey T; Cheville N. 2003. Phagosomal maturation and intracellular survival of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in J774 cells. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases.* 26 (4): 269-83.
- Hostetter JM; Kagan R; Steadham E. 2005. Opsonization effects on *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* macrophage interactions. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology.* 12 (6): 793-6.
- Huda A; Jungersen G; Lind P. 2004. Longitudinal study of interferon-gamma, serum antibody and milk antibody responses in cattle infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Veterinary Microbiology.* 104 (1-2): 43-53.
- Hutchings MR; Stevenson K; Greig A; Davidson RS; Marion G; Judge J. 2010. Section 18: Wildlife by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. En: Behr MA y Collins DM (eds.), *Paratuberculosis: Organism, Disease, Control* (188-200). CAB International. Acceso: <http://www.cabi.org/>
- Igietseme JU; Eko FO; He Q; Black CM. 2004. Antibody regulation of T-cell immunity: implications for vaccine strategies against intracellular pathogens. *Expert Review of Vaccines.* 3 (1): 23-34.
- INDEC (Instituto Nacional de Estadística y Censos). 2008. Censo Nacional Agropecuario 2008. Ministerio de Economía y Finanzas públicas, República Argentina. Acceso: http://www.indec.gov.ar/nivel4_default.asp?id_tema_1=3&id_tema_2=8&id_tema_3=87.
- Ingratta GG; Colavecchia S; Fernandez B; Jolly A; FortunyM; Minatel L; Paolicchi F; Mundo SL. 2015. Intradermal reaction, bacterial load and pathological findings in calves experimentally infected with

- Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolates from Argentina. XI Congress of the Latin American Association of Immunology (ALAI). Medellín, Colombia.
- Janagama HK; Jeong KI; Kapur V; Coussens P; Sreevatsan S. 2006. Cytokine responses of bovine macrophages to diverse clinical *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* strains. BMC Microbiol. 6: 10.
- Johne HA; Frothingham L. 1895. Ein eigenthümlicher Fall von Tuberculose beim Rind [A peculiar case of tuberculosis in a cow]. Deutsche Zeitschrift für Tiermedizin und vergleichende Pathologie. 21: 438–55.
- Johnson-Ifearulundu YJ; Kaneene JB; Sprecher DJ; Gardiner JC; Lloyd JW. 2000. The effect of subclinical *Mycobacterium paratuberculosis* infection on days open in Michigan, USA, dairy cows. Prev. Vet. Med. 46 (3): 171-81.
- Joller N; Weber SS; Müller AJ; Spörri R; Selchow P; Sander P; Hilbi H; Oxenius A. 2010. Antibodies protect against intracellular bacteria by Fc receptor-mediated lysosomal targeting. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 107 (47): 20441-6.
- Jolly. 2011. Anticuerpos bovinos frente a componentes glicolipídicos de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: su efecto en la interacción micobacteria-macrófago. Tesis inédita de maestría en Biotecnología. Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Argentina.
- Jolly A; Colavecchia SB; Fernández B; Fernández E; Mundo SL. 2011. Antibodies induced by lipoarabinomannan in bovines: characterization and effects on the interaction between *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and macrophages *in vitro*. Vet. Med. Int. 2011; 258479.
- Jolly A; Stempler A; Ingratta G; Fortuny ML; Álvarez G; Gutiérrez B; Aranda MV; Brinkyer J; Hajos S; Mundo S. 2014. La presencia de anticuerpos específicos modula la respuesta temprana a la infección en un modelo bovino intestinal de paratuberculosis. VII Jornadas de la Asociación Argentina de Inmunología Veterinaria (28). Buenos Aires, Argentina.
- Jubb TF; Sergeant ES; Callinan AP; Galvin J. 2004. Estimate of the sensitivity of an ELISA used to detect Johne's disease in Victorian dairy cattle herds. Aust. Vet. J. 82 (9): 569-73.
- Kabara E; Coussens PM. 2012 Infection of Primary Bovine Macrophages with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* suppresses host cell apoptosis. Front. Microbiol. 3: 215.
- Kacs Kovics I. 2004. Fc receptors in livestock species. Vet. Immunol. Immunopathol. 102 (4): 351-62.
- Kalis CH; Barkema HW; Hesselink JW; van Maanen C; Collins MT. 2002. Evaluation of two absorbed enzyme-linked immunosorbent assays and a complement fixation test as replacements for fecal culture in the detection of cows shedding *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. J. Vet. Diagn. Invest. 14 (3): 219-24.

- 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 (1-2): 73-86.
- Khol JL; Kralik P; Slana I; Beran V; Aurich C; Baumgartner W; Pavlik I. 2010. Consecutive excretion of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in semen of a breeding bull compared to the distribution in feces, tissue and blood by IS900 and F57 quantitative real-time PCR and culture examinations. *J. Vet. Med. Sci.* 72 (10): 1283-8.
- Kirkpatrick BW. 2010. Section 6: Genetics of host susceptibility to paratuberculosis. En: Behr MA y Collins DM (eds.), *Paratuberculosis: Organism, Disease, Control* (50-9). CAB International. Acceso: <http://www.cabi.org/>
- Knight KL; Suter M; Becker RS. 1988. Genetic engineering of bovine Ig. Construction and characterization of hapten-binding bovine/murine chimeric IgE, IgA, IgG1, IgG2, and IgG3 molecules. *J. Immunol.* 140 (10): 3654-9.
- Koets AP; Rutten VP; Hoek A; Bakker D; van Zijderveld F; Müller KE; van Eden W. 1999. Heat-shock protein-specific T-cell responses in various stages of bovine paratuberculosis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 70 (1-2): 105-15.
- Koets AP; Rutten VP; De Boer M; Bakker D; Valentin-Weigand P; Van Eden W. 2001. Differential changes in heat shock protein-, lipoarabinomannan-, and purified protein derivative-specific immunoglobulin G1 and G2 isotype responses during bovine *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection. *Infect. Immun.* 69 (3): 1492-8.
- Koets A; Rutten V; Hoek A; van Mil F; Müller K; Bakker D; 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 (7): 3856-64.
- Koets A; Hoek A; Langelaar M; Overdijk M; Santema W; Franken P; Eden Wv; Rutten V. 2006. Mycobacterial 70 kD heat-shock protein is an effective subunit vaccine against bovine paratuberculosis. *Vaccine.* 24 (14): 2550-9.
- Koets AP; Eda S; Sreevatsan S. 2015. The within host dynamics of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* infection in cattle: where time and place matter. *Vet. Res.* 46: 61.
- Koo HC; Park YH; Hamilton MJ; Barrington GM; Davies CJ; Kim JB; Dahl JL; Waters WR; Davis WC. 2004. Analysis of the immune response to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in experimentally infected calves. *Infect. Immun.* 72 (12): 6870-83.
- Koti M; Kataeva G; Kaushik AK. 2010. Novel atypical nucleotide insertions specifically at VH-DH junction generate exceptionally long CDR3H in cattle antibodies. *Mol. Immunol.* 47 (11-12): 2119-28.

- Kruze J; Monti G; Schulze F; Mella A; Leiva S. 2013. Herd-level prevalence of *Map* infection in dairy herds of southern Chile determined by culture of environmental fecal samples and bulk-tank milk qPCR. *Prev. Vet. Med.* 111 (3-4): 319-24.
- Kulberg S; Boysen P; Storset AK. 2004. Reference values for relative numbers of natural killer cells in cattle blood. *Dev. Comp. Immunol.* 28 (9): 941-8.
- Lascelles AK. 1979. The immune system on the ruminant mammary gland and its role in the control of mastitis. *J. Dairy Sci.* 62 (1): 154-67.
- Lei L; Plattner BL; Hostetter JM. 2008. Live *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and a killed-bacterium vaccine induce distinct subcutaneous granulomas, with unique cellular and cytokine profiles. *Clin. Vaccine Immunol.* 15 (5): 783-93.
- Li L; Bannantine JP; Zhang Q; Amonsin A; May BJ; Alt D; Banerji N; Kanjilal S; Kapur V. 2005. The complete genome sequence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 102 (35): 12344-9.
- Liverani E; Scaioli E; Cardamone C; Dal Monte P; Belluzzi A. 2014. *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in the etiology of Crohn's disease, cause or epiphenomenon? *World J. Gastroenterol.* 20 (36): 13060-70.
- Lombard JE; Garry FB; McCluskey BJ; Wagner BA. 2005. Risk of removal and effects on milk production associated with paratuberculosis status in dairy cows. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 227 (12): 1975-81.
- Mackintosh CG; Griffin JF. 2010. Section 17: Paratuberculosis in deer, camelids and other ruminants. En: Behr MA y Collins DM (eds.), *Paratuberculosis: Organism, Disease, Control* (179-87). CAB International. Acceso: <http://www.cabi.org/>
- Maeda S; Hsu LC; Liu H; Bankston LA; Iimura M; Kagnoff MF; Eckmann L; Karin M. 2005. Nod2 mutation in Crohn's disease potentiates NF-kappaB activity and IL-1beta processing. *Science.* 307 (5710): 734-8.
- Magnano G; Schneider M; Carranza A; Bérnago E; Henriquez MB; Giraud JA. 2002. Evaluación serológica de paratuberculosis en el sudoeste de la provincia de Córdoba, Argentina. *Vet. Arg.* 11: 741-6.
- Manca F; Fenoglio D; Pira GL; Kunkl A; Celada F. 1991. Effect of antigen/antibody ratio on macrophage uptake, processing, and presentation to T cells of antigen complexed with polyclonal antibodies. *Journal of Experimental Medicine.* 173 (1): 37-48.
- Manning EJB; Collins MT. 2001. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: pathogen, pathogenesis and diagnosis. *Revue. Scientifique et Technique. OIE.* 20, 133-50.

- Manning EJB; Collins MT. 2010a. Section 1: History of paratuberculosis. En: Behr MA y Collins DM (eds.), Paratuberculosis: Organism, Disease, Control (1-9). CAB International. Acceso: <http://www.cabi.org/>
- Manning EJB; Collins MT. 2010b. Section 3: Epidemiology of paratuberculosis. En: Behr MA y Collins DM (eds.), Paratuberculosis: Organism, Disease, Control (22-8). CAB International. Acceso: <http://www.cabi.org/>
- Marsh I; Whittington R; Cousins D. 1999. PCR-restriction endonuclease analysis for identification and strain typing of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and *Mycobacterium avium* subsp. *avium* based on polymorphisms in IS1311. Mol. Cell Probes. 13 (2): 115-26.
- Martinis Mercado DS; Cicuta ME; Boehringer SI; Morsella C; Paolocchi F. 2014. La Paratuberculosis y los bovinos lecheros de la provincia de Corrientes. Acceso: <http://www.unne.edu.ar/unnevieja/Web/cyt/cyt/2002/04-Veterinarias/V-059.pdf>.
- Merck. 2010. The Veterinary Manual. X Edición. White house Station, N.J: Merck & Co. Acceso: <http://www.merckmanuals.com/professional>
- Merkal RS. 1984. Paratuberculosis: advances in cultural, serologic, and vaccination methods. J. Am. Vet. Med. Assoc. 184 (8): 939-43.
- Merkal RS. 1970. Diagnostic methods for detection of paratuberculosis (Johne`s disease). Proc. LXXIV Ann.Mtg. US Anim. Hlth. Ass. 74: 620-3.
- Mikkelsen H; Aagaard C; Nielsen SS; Jungersen G. 2011. Review of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* antigen candidates with diagnostic potential. Vet. Microbiol. 152 (1-2): 1-20.
- MINCYT (Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva de la Nación Argentina). 2013. Plan Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación “Argentina Innovadora 2020”. Acceso: http://www.argentinainnovadora2020.mincyt.gov.ar/?page_id=192.
- Mobiüs P; Hotzel H; Rassbach A; Köhler H. 2008. Comparison of 13 single-round and nested PCR assays targeting IS900, ISMav2, f57, and locus 255 for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. Vet. Microbiol. 126: 323–4.
- Momotani E; Whipple DL; Thiermann AB; Cheville NF. 1988. Role of M cells and macrophages in the entrance of *Mycobacterium paratuberculosis* into domes of ileal Peyer’s patches in calves. Vet. Pathol. 25: 131–7.
- Moreira AR; Paolicchi F; Morsella C; Zumarraga M; Cataldi A; Fabiana B; Alicia A; Piet O; van Soolingen D; Isabel RM. 1999. Distribution of IS900 restriction fragment length polymorphism types among animal *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolates from Argentina and Europe. Vet. Microbiol. 70: 251–9.
- Mortier RA; Barkema HW; Orsel K; Wolf R; De Buck J. 2014a. Shedding patterns of dairy calves experimentally infected with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. Vet. Res. 45:71.

- Mortier RA; Barkema HW; Negron ME; Orsel K; Wolf R; De Buck J. 2014b. Antibody response early after experimental infection with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in dairy calves. *J. Dairy Sci.* 97 (9): 5558-65.
- Morton HC. 2005. IgA Fc receptors in cattle and horses. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 108 (1-2): 139-43.
- Mundo SL. 2005. Respuesta Inmune en bovinos frente a *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis*. Tesis inédita de doctorado, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Argentina.
- Mundo SL; Fontanals AM; García M; Durrieu M; Álvarez E; Gentilini ER; Hajos SE. 2008. Bovine IgG1 antibodies against *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* protein p34-cx improve association of bacteria and macrophages. *Vet. Res.* 39 (1): 6.
- Mundo SL; Gilardoni LR; Hoffman FJ; Lopez OJ. 2013. Rapid and sensitive method to identify *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in cow's milk by DNA methylase genotyping. *Appl. Environ. Microbiol.* 79 (5): 1612-8.
- Muta T; Kurosaki T; Misulovin Z; Sanchez M; Nussenzweig MC; Ravetch JV. 1994. A 13-amino-acid motif in the cytoplasmic domain of Fc gamma RIIB modulates B-cell receptorsignalling. *Nature.* 368: 70-3.
- Nagabhushanam V; Praszkie J; Cheers C. 2001. Molecular and immunological characterization of *Mycobacterium avium* 65 kDa heat shock protein (Hsp65). *Immunol. Cell Biol.* 79 (5): 454-61.
- NAHMS (National Animal Health Monitoring System). 1997. Part III: Economic impact of Johne's Disease. USDA:APHIS:VS, CEAH, National Animal Health Monitoring System. Fort Collins, CO. #N245.1097. Acceso: https://www.aphis.usda.gov/animal_health/nahms/dairy/downloads/dairy96/Dairy96_dr_Johnes.pdf
- NAHMS (National Animal Health Monitoring System). 2007. Part I: Reference of dairy health and management in the United States. USDA: APHIS: VS, CEAH, Fort Collins, Colorado. Acceso: https://www.aphis.usda.gov/animal_health/nahms/dairy/downloads/dairy07/Dairy07_is_Johnes.pdf
- Nielsen SS; Nielsen KK; Huda A; Condron R; Collins MT. 2001. Diagnostic techniques for paratuberculosis. *Bulletin of the International Dairy Federation.* 362, 5-17.
- Nielsen SS; Toft N. 2008. Ante mortem diagnosis of paratuberculosis: a review of accuracies of ELISA, interferon-gamma assay and fecal culture techniques. *Vet. Microbiol.* 129 (3-4): 217-35.
- Nielsen SS. 2009. Programmes on paratuberculosis in Europe. X International Colloquium on Paratuberculosis (101-8). Minneapolis, USA.
- Nielsen SS; Toft N. 2009. A review of prevalences of paratuberculosis in farmed animals in Europe. *Prev. Vet. Med.* 88 (1): 1-14.

- Nielsen SS. 2010. Section 24: Immune-based diagnosis of paratuberculosis. En: Behr MA y Collins DM (eds.), Paratuberculosis: Organism, Disease, Control (284-93). CAB International. Acceso: <http://www.cabi.org/>
- IE. 2008. Capítulo 2.1.11: Paratuberculosis (Enfermedad de Johne). Manual de la OIE sobre animales terrestres 2008.
- OIE. 2014. Chapter 2.1.11: Paratuberculosis (Johne's disease). OIE Terrestrial Manual 2014.
- OIE. 2015. Mapa de distribución de la paratuberculosis. Acceso: http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Diseaseinformation/Diseasedistributionmap/index/newlang/es.
- Olsen I; Boysen P; Kulberg S; Hope JC; Jungersen G; Storset AK. 2005. Bovine NK cells can produce gamma interferon in response to the secreted mycobacterial proteins ESAT-6 and MPP14 but not in response to MPB70. *Infect. Immun.* 73 (9): 5628–35.
- Ostrowski M; Mundo SL; Harris NB; Barletta RG; Lopez OJ. 2003. B-cell epitopes in the immunodominant p34 antigen of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* recognized by antibodies from infected cattle. *Scand. J. Immunol.* 58 (5): 511-21.
- Ott SL; Wells SJ; Wagner BA. 1999 Herd-level economic losses associated with Johne's disease on US dairy operations. *Prev. Vet. Med.* 40 (3-4): 179-92.
- Pant SD; Verschoor CP; Schenkel FS; You Q; Kelton DF; Karrow NA. 2014. Bovine CLEC7A genetic variants and their association with seropositivity in Johne's disease ELISA. *Gene.* 537 (2): 302-7.
- Paolicchi FA; Zumárraga MJ; Gioffré A; Zamorano P; Morsella C; Verna A; Cataldi A; Alito A; Romano M. 2003. Application of different methods for the diagnosis of Paratuberculosis in dairy cattle herds in Argentina. *Journal of Veterinary Medical.* 50 (1): 20-6. 2003.
- Paolicchi FA. 2004. Paratuberculosis: aspectos clínico-patológicos y su impacto en la producción (Parte1). XXXII Jornadas Uruguayas de Buiatría (127). Paysandú, Uruguay.
- Paolicchi F; Cirone K; Morsella C; Gioffré A. 2012 First isolation of *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* from commercial pasteurized milk in Argentina. *Braz. J. Microbiol.* 43 (3): 1034-7.
- Passucci JA; Traversa MJ; De Hagen J; Jorge MC; Schettino DM; Sanz HE. 2007. Análisis económico del saneamiento de paratuberculosis en un rodeo de cría bovina. *Revista Argentina de Producción Animal.* 27 (supl. 1): 337-8.
- Patterson DSP; Allen WM; Lloyd MK. 1967. Clinical Johne's disease as a protein losing enteropathy. *Veterinary Record.* 81: 717-8.
- Patterson DS; Berrett S. 1969. Malabsorption in Johne's disease in cattle: an *in-vitro* study of L-histidine uptake by isolated intestinal tissue preparations. *J. Med. Microbiol.* 2 (3): 327-34.

- Pavlík I; Bejcková L; Pavlas M; Rozsypalová Z; Kosková S. 1995. Characterization by restriction endonuclease analysis and DNA hybridization using IS900 of bovine, ovine, caprine and human dependent strains of *Mycobacterium paratuberculosis* isolated in various localities. *Vet. Microbiol.* 45 (4): 311-8.
- Pavlik I; Horvathova A; Dvorska L; Bartl 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 (1-2): 155-67.
- Periasamy S; Tripathi BN; Singh N. 2013. Mechanisms of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* induced apoptosis and necrosis in bovine macrophages. *Vet Microbiol.* 165 (3-4): 392-401.
- Pithua P; Godden SM; Wells SJ; Oakes MJ. 2009. Efficacy of feeding plasma-derived commercial colostrum replacer for the prevention of transmission of *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* in Holstein calves. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 234 (9): 1167-76.
- Plattner BL; Huffman EL; Hostetter JM. 2012. Gamma-delta T-cell responses during subcutaneous *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* challenge in sensitized or naive calves using matrix biopolymers. *Vet. Pathol.* 50 (4): 630-7.
- Poupart P; Coene M; Van Heuverswyn H; Cocito C. 1993. Preparation of a specific RNA probe for detection of *Mycobacterium paratuberculosis* and diagnosis of Johne's disease. *J. Clin. Microbiol.* 31 (6): 1601-5.
- Pribylova R; Slana I; Cech S; Kralova A; Pavlik I. 2013. *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* Detected in the reproductive tract of cows from an infected herd. *Reprod. Domest. Anim.* 48 (5): 790-4.
- Quintana FJ; Cohen IR. 2011. The HSP60 immune system network. *Trends Immunol.* 32 (2): 89-95.
- Rabbani H; Brown WR; Butler JE; Hammarström L. 1997. Polymorphism of the IGHG3 gene in cattle. *Immunogenetics.* 46 (4): 326-31.
- Reid E; Juleff N; Gubbins S; Prentice H; Seago J; Charleston B. 2011. Bovine plasmacytoid dendritic cells are the major source of type I interferon in response to *foot-and-mouth disease virus in vitro* and *in vivo*. *J. Virol.* 85 (9): 4297-308.
- Rindi L; Garzelli C. 2014. Genetic diversity and phylogeny of *Mycobacterium avium*. *Infect. Genet.Evol.* 21: 375-83.
- Rhodes G; Richardson H; Hermon-Taylor J; Weightman A; Higham A; Pickup R. 2014. *Mycobacterium avium* Subspecies *paratuberculosis*: Human exposure through environmental and domestic aerosols. *Pathogens.* 3 (3): 577-95.

- Robinson L; Windsor M; McLaughlin K; Hope J; Jackson T; Charleston B. 2011. *Foot-and-mouth disease virus* exhibits an altered tropism in the presence of specific immunoglobulins, enabling productive infection and killing of dendritic cells. *J. Virol.* 85 (5): 2212-23.
- Rodriguez-Lazaro D; D'Agostino M; Pla M; Cook N. 2004. Construction strategy for an internal amplification control for real-time diagnostic assays using nucleic acid sequence based amplification: development and clinical application. *J. Clin. Microbiol.* 42: 5832-6.
- Romano MI; Amadio A; Bigi F; Klepp L; Etchechoury I; Llana MN; Morsella C; Paolicchi F; Pavlik I; Bartos M; Leão SC; Cataldi A. 2005. Further analysis of VNTR and MIRU in the genome of *Mycobacterium avium* complex, and application to molecular epidemiology of isolates from South America. *Vet. Microbiol.* 110 (3-4): 221-37.
- Sakaguchi K; Yokota H; Miyasho T; Maeda N; Nakamura K; Onaga T; Koiwa M; Matsuda K; Okamoto M; Hirayama K; Taniyama H. 2013. Polymeric immunoglobulin receptor expression and local immunoglobulin A production in bovine sublingual, submandibular and parotid salivary glands. *Vet. J.* 197 (2): 291-6.
- Sambrook M; Fritsch EF; Maniatis T. 1989. *Molecular cloning, a laboratory manual*. II Edición. Editorial Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York, USA.
- Santema W; van Kooten P; Hoek A; Leeflang M; Overdijk M; Rutten V; Koets A. 2011. Hsp70 vaccination-induced antibodies recognize B cell epitopes in the cell wall of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Vaccine.* 29 (7): 1364-73.
- Santema WJ; Poot J; Segers RP; Van den Hoff DJ; Rutten VP; Koets AP. 2012. Early infection dynamics after experimental challenge with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in calves reveal limited calf-to-calf transmission and no impact of Hsp70 vaccination. *Vaccine.* 30 (49): 7032-9.
- Schillinger S; Bridger PS; Bulun H; Fischer M; Akineden O; Seeger T; Barth S; Henrich M; Doll K; Bülte M; Menge C; Bauerfeind R. 2013. Flow cytometric detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*-specific antibodies in experimentally infected and naturally exposed calves. *Clin. Vaccine Immunol.* 20 (9): 1457-65.
- Scholl PR; Ahern D; Geha RS. 1992. Protein tyrosine phosphorylation induced via the IgG receptors Fc gamma R1 and Fc gamma R2 in the human monocytic cell line THP-1. *J. Immunol.* 149 (5): 1751-7.
- Scott MC; Bannantine JP; Kaneko Y; Branscum AJ; Whitlock RH; Mori Y; Speer CA; Eda S. 2010. Absorbed EVELISA: A diagnostic test with improved specificity for Johne's Disease in cattle. *Foodborne Pathog. Dis.* 7 (11): 1291-6.

- Secott TE; Lin TL; Wu CC. 2004. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* fibronectin attachment protein facilitates M-cell targeting and invasion through a fibronectin bridge with host integrins. *Infect. Immun.* 72 (7): 3724-32.
- SENASA (Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria). 2012. Plan Nacional de Control y Erradicación de la Tuberculosis Bovina en la República Argentina. Res. 128/2012 Acceso: <http://www.senasa.gov.ar/contenido.php?to=n&in=1526&io=20050>.
- Sergeant E; Keatinge N; Allan D; Citer L. 2012. The Australian beef industry – Prevalence of bovine Johne's disease and the impact of seedstock producers on its spread. *Animal Health Australia*. Acceso: http://www.animalhealthaustralia.com.au/programs/jd/jd_home.cfm.
- Seva J; Sanes JM; Ramis G; Mas A; Quereda JJ; Villarreal-Ramos B; Villar D; Pallares FJ. 2014. Evaluation of the single cervical skin test and interferon gamma responses to detect *Mycobacterium bovis* infected cattle in a herd co-infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Vet. Microbiol.* 171 (1-2): 139-46.
- Shankar H; Singh SV; Singh PK; Singh AV; Sohal JS; Greenstein RJ. 2010. Presence, characterization, and genotype profiles of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* from unpasteurized individual and pooled milk, commercial pasteurized milk, and milk products in India by culture, PCR, and PCR-REA methods. *Int. J. Infect. Dis.* 14 (2): e121-6.
- Sharma BS; Abo-Ismael MK; Schenkel FS; You Q; Verschoor CP; Pant SD; Karrow NA. 2015. Association of TLR4 polymorphisms with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection status in Canadian Holsteins. *Anim. Genet.* 46 (5): 560-5.
- Singh SV; Kumar N; Singh SN; Bhattacharya T; Sohal JS; Singh PK; Singh AV; Singh B; Chaubey KK; Gupta S; Sharma N; Kumar S; Raghava GP. 2013. Genome Sequence of the "Indian Bison Type" Biotype of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* Strain S5. *Genome Announc.* 1 (1): e00005-13.
- Skellet E. 1807. A practical treatise on the parturition of the cow, or the extraction of the calf, and on the diseases of neat cattle in general; with the most approved methods of treatment, and best forms of prescription adapted to veterinary practice. Sherwood, Nely and Jones, London.
- Socket DC; Conrad TA; Thomas CB; Collins MT. 1992. Evaluation of four serological tests for bovine paratuberculosis. *J. Clin. Microbiol.* 30 (5): 1134-9.
- Speer CA; Scott MC; Bannantine JP; Waters WR; Mori Y; Whitlock RH; Eda S. 2006. A novel enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infections (Johne's Disease) in cattle. *Clin. Vaccine Immunol.* 13 (5): 535-40.
- Stabel JR; Stabel TJ. 1995. Immortalization and characterization of bovine peritoneal macrophages transfected with SV40 plasmid DNA. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 45 (3-4): 211-20.

- Stabel JR. 2000. Transitions in immune responses to *Mycobacterium paratuberculosis*. *Vet. Microbiol.* 77 (3-4): 465-73.
- Stabel JR; Palmer MV; Harris B; Plattner B; Hostetter J; Robbe-Austerman S. 2009. Pathogenesis of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in neonatal calves after oral or intraperitoneal experimental infection. *Vet. Microbiol.* 136 (3-4): 306-13.
- Stabel JR; Robbe-Austerman S. 2011a. Early immune markers associated with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in a neonatal calf model. *Clin. Vaccine Immunol.* 18 (3): 393-405.
- Stabel JR; Bannantine JP; Eda S; Robbe-Austerman S. 2011b. Induction of B cell responses upon experimental infection of neonatal calves with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Clin. Vaccine Immunol.* 18 (7): 1139-49.
- Steevels TA; Meyaard L. 2011. Immune inhibitory receptors: essential regulators of phagocyte function. *Eur. J. Immunol.* 41 (3): 575-87.
- Stein M; Gordon S. 1991. Regulation of tumor necrosis factor (TNF) release by murine peritoneal macrophages: role of cell stimulation and specific phagocytic plasma membrane receptors. *Eur. J. Immunol.* 21 (2): 431-7.
- Stevenson K. 2010. Section 12: Comparative differences between strains of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. En: Behr MA y Collins DM (eds.), *Paratuberculosis: Organism, Disease, Control* (126-37). CAB International. Acceso: <http://www.cabi.org/>
- 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.
- Subharat S; Shu D; Wedlock DN; Price-Carter M; de Lisle GW; Luo D; Collins DM; Buddle BM. 2012. Immune responses associated with progression and control of infection in calves experimentally challenged with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 149: 225-36.
- Sweeney RW; Whitlock RH; Rosenberger AE. 1992. *Mycobacterium paratuberculosis* cultured from milk and supramammary lymph nodes of infected asymptomatic cows. *J. Clin. Microbiol.* 30: 166-71.
- Sweeney RW; Whitlock RH; Buckley CL; Spencer PA. 1995. Evaluation of a commercial enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of paratuberculosis in dairy cattle. *J. Vet. Diagn. Invest.* 7 (4): 488-93.
- Sweeney RW. 1996. Transmission of paratuberculosis. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 12 (2): 305-12.
- Sweeney RW; Uzonna J; Whitlock RH; Habecker PL; Chilton P; Scott P. 2006. Tissue predilection sites and effect of dose on *Mycobacterium avium* subs. *paratuberculosis* organism recovery in a short-term bovine experimental oral infection model. *Res. Vet. Sci.* 80 (3): 253-9.

- Sweeney RW. 2011. Pathogenesis of paratuberculosis. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 27 (3): 537-46
- Sweeney RW; Collins MT; Koets AP; McGuirk SM; Roussel AJ. 2012. Paratuberculosis (Johne's Disease) in Cattle and Other Susceptible Species. *J. Vet. Intern. Med.* 26: 1239–50.
- Sweeney R; Gardner I; Hines Li ME; Anderson R; Byrem T; Collins M; Glaser A; Hovingh E; Jones L; Wells S; Whitlock B. 2014. Comparison of 3 fecal culture, 2 fecal PCR, 2 serum ELISA, and milk ELISA for diagnosis of paratuberculosis in US dairy cattle. XII International Colloquium on Paratuberculosis (106). Parma, Italia.
- Taddei R; Barbieri I; Pacciarini ML; Losini I; Cammi G; Belletti GL; Arrigoni N. 2005. An IS900-like sequence in *Mycobacterium porcinum* strains isolated from bovine bulk milk: implications for diagnosis. VIII International Colloquium on Paratuberculosis (431-7). Copenhagen, Dinamarca.
- Tavorpanich S; Muñoz-Zanzi CA; Wells SJ; Raizman EA; Carpenter TE; Johnson WO; Gardner IA. 2008. Simulation model for evaluation of testing strategies for detection of paratuberculosis in midwestern US dairy herds. *Prev. Vet. Med.* 83 (1): 65-82.
- Taylor TK; Wilks CR; McQueen DS. 1981. Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from the milk of cows with Johne's disease. *Vet. Rec.* 109: 532-3.
- Teitelbaum R; Glatman-Freedman A; Chen B; Robbins JB; Unanue E; Casadevall A; Bloom BR. 1998. A mAb recognizing a surface antigen of *Mycobacterium tuberculosis* enhances host survival. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95 (26): 15688-93.
- Thibault VC; Grayon M; Boschirolu ML; Hubbans C; Overduin P; Stevenson K; Gutierrez MC; Supply P; Biet F. 2007. New variable-number tandem-repeat markers for typing *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and *M. avium* strains: comparison with IS900 and IS1245 restriction fragment length polymorphism typing. *J. Clin. Microbiol.* 45(8): 2404-10.
- Thirunavukkarasu S; de Silva K; Whittington RJ; Plain KM. 2013. *In vivo* and *in vitro* expression pattern of Toll-like receptors in *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 156 (1-2): 20-31.
- Tizard IR. 2013. *Veterinary Immunology*. IX Edición. Editorial Saunders, ELSEVIER, St. Louis, USA. Páginas: 568. ISBN: 978-1-4557-0362-3.
- Trivedi V; Zhang SC; Castoreno AB; Stockinger W; Shieh EC; Vyas JM; Frickel EM; Nohturfft A. 2006. Immunoglobulin G signaling activates lysosome/phagosome docking. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 103 (48): 18226-31.
- Turenne CY; Semret M; Cousins DV; Collins DM; Behr MA. 2006. Sequencing of hsp65 distinguishes among subsets of the *Mycobacterium avium* complex. *J. Clin. Microbiol.* 44 (2): 433-40.

- Turenne CY; Alexander DC. 2010. Section 7: *Mycobacterium avium* Complex. En: Behr MA y Collins DM (eds.), Paratuberculosis: Organism, Disease, Control (60-72). CAB International. Acceso: <http://www.cabi.org/>
- Twort F; Ingram GLY. 1912. A method for isolating and cultivating the *Mycobacterium enteritidis chronicae pseudotuberculosis bovis*, Johne, and some experiments on the preparation of a diagnostic vaccine for pseudotuberculosis enteritis of bovines. Proceedings of the Royal Society, Series B. 84: 517-42.
- Uchiya K; Takahashi H; Yagi T; Moriyama M; Inagaki T; Ichikawa K; Nakagawa T; Nikai T; Ogawa K. 2013. Comparative genome analysis of *Mycobacterium avium* revealed genetic diversity in strains that cause pulmonary and disseminated disease. PLoS One. 8 (8); e71831.
- Vázquez P; Ruiz-Larrañaga O; Garrido JM; Iriondo M; Manzano C; Agirre M; Estonba A; Juste RA. 2014. Genetic association analysis of paratuberculosis forms in holstein-friesian cattle. Vet. Med. Int. 2014; 321327.
- Verna A; Garcia Pariente C; Muñoz M; Moreno O; Garcia Marin J; Romano M; Paolicchi F; Perez V. 2007. Variation in the immuno-pathological responses of lambs after experimental infection with different strains of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. Zoonoses Public. Health. 54 (6-7): 243-52.
- Vidarsson G; Stemerding AM; Stapleton NM; Spliethoff SE; Janssen H; Rebers FE; de Haas M; van de Winkel JG. 2006. FcRn: an IgG receptor on phagocytes with a novel role in phagocytosis. Blood. 108 (10): 3573-9.
- Villamar Manrique S. Paratuberculosis: estudio de las proteínas de la leche bovina y su impacto en los parámetros de producción lechera. Tesis inédita de maestría en producción en animal. Facultad de Agronomía y Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad de Buenos Aires, Argentina. Presentada en Junio de 2015, en evaluación.
- Waddell LA; Rajic´ A; Stärk KDC; Mcewen SA. 2015. The zoonotic potential of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*: a systematic review and meta-analyses of the evidence. Epidemiol. Infect. 1-23.
- 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 (4): 1593-8.
- 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 (9): 5130-8.

- Watkins C; Schock A; May L; Denham S; Sales J; Welch L; Sharp JM; Stevenson K. 2010. Assessing virulence of vaccine strains of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in a calf model. *Vet. Microbiol.* 146 (1-2): 63-9.
- Watson DL. 1976. The effect of cytophilic IgG2 on phagocytosis by ovine polymorphonuclear leucocytes. *Immunology.* 31 (2): 159-65.
- Watson JL; Jackson KA; King DP; Stott JL. 2000. Molecular cloning and sequencing of the low-affinity IgE receptor (CD23) for horse and cattle. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 73 (3-4): 323-9.
- Weber MF. 2006. Risk management of paratuberculosis in dairy herds. *Ir. Vet. J.* 59 (10): 555-61.
- Weiss DJ; Souza CD. 2008. Review paper: modulation of mononuclear phagocyte function by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Vet. Pathol.* 45 (6): 829-41.
- Wells SJ; Godden SM; Lindeman CJ; Collins JE. 2003. Evaluation of bacteriologic culture of individual and pooled fecal samples for detection of *Mycobacterium paratuberculosis* in dairy cattle herds. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 223 (7): 1022-5.
- Whitlock RH. 1992. Diarrhea in cattle. En: Anderson NV (ed.), *Veterinary Gastroenterology* (783), II Edición. Lea & Febiger, Filadelfia, USA.
- Whitlock RH; Wells SJ; Sweeney RW; Van Tiem J. 2000. ELISA and fecal culture for paratuberculosis (Johne's disease): sensitivity and specificity of each method. *Vet. Microbiol.* 77 (3-4): 387-98.
- Whitlock RH. 2009. Johne's disease. En: Smith BP (ed.), *Large Animal Internal Medicine* (881-7), IV Edición. Mosby Elsevier, St Louis, USA.
- Whittington RJ; Marshall DJ; Nicholls PJ; Marsh IB; Reddacliff LA. 2004. Survival and dormancy of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in the environment. *Appl. Environ Microbiol.* 70 (5): 2989-3004.
- Whittington RJ; Marsh IB; Reddacliff LA. 2005. Survival of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in dam water and sediment. *Appl. Environ. Microbiol.* 71 (9): 5304-8.
- Whittington RJ; Windsor PA. 2009. In utero infection of cattle with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: A critical review and meta-analysis. *Vet. J.* 179 (1): 60-9.
- Whittington R. 2010. Section 22: Cultivation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. En: Behr MA y Collins DM (eds.), *Paratuberculosis: Organism, Disease, Control* (244-67). CAB International. Acceso: <http://www.cabi.org/>
- Williams A; Reljic R; Naylor I; Clark SO; Falero-Diaz G; Singh M; Challacombe S; Marsh PD; Ivanyi J. 2004. Passive protection with immunoglobulin A antibodies against tuberculous early infection of the lungs. *Immunology.* 111 (3): 328-33.
- Windsor PA; Whittington RJ. 2010. Evidence for age susceptibility of cattle to Johne's disease. *Vet. J.* 184 (1): 37-44.

- Woo SR; Sotos J; Hart AP; Barletta RG; Czuprynski CJ. 2006. Bovine monocytes and a macrophage cell line differ in their ability to phagocytose and support the intracellular survival of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 110 (1-2): 109-20.
- Xu B; Wang J; Zhang M; Wang P; Wei Z; Sun Y; Tao Q; Ren L; Hu X; Guo Y; Fei J; Zhang L; Li N; Zhao Y. 2012. Expressional analysis of immunoglobulin D in cattle (*Bos taurus*), a large domesticated ungulate. *PLoS One.* 7 (9): e44719.
- Yamamoto K; Johnston Jr. RB. 1984. Dissociation of phagocytosis from stimulation of the oxidative metabolic burst in macrophages. *Journal of Experimental Medicine.* 159 (2): 405-16.
- Yokomizo Y; Yugi H; Merkal RS. 1985. A method for avoiding false-positive reactions in an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the diagnosis of bovine paratuberculosis. *Nihon Juigaku Zasshi.* 47 (1): 111-9.
- Zhang G; Young JR; Tregaskes CR; Howard CJ. 1994. Cattle Fc gamma RII: molecular cloning and ligand specificity. *Immunogenetics.* 39: 423-7.
- Zügel U; Kaufmann SH. 1999a. Role of heat shock proteins in protection from and pathogenesis of infectious diseases. *Clin. Microbiol. Rev.* 12 (1): 19-39.
- Zügel U; Kaufmann SH. 1999b. Immune response against heat shock proteins in infectious diseases. *Immunobiology.* 201 (1): 22-35.
- Zurbrick BG; Czuprynski CJ. 1987. Ingestion and intracellular growth of *Mycobacterium paratuberculosis* within bovine blood monocytes and monocyte-derived macrophages. *Infection and Immunity.* 55 (7): 1588-93.

Anexos

Anexo Técnico

A- Producción de proteínas recombinantes

Expresión de proteínas recombinantes

Se trabajó con *E. coli* BL21 pLysS transformadas con el plásmido pRSET A (pRSETA, Invitrogen Corp.) modificado o no. Teniendo en cuenta que el plásmido pRSET A otorga resistencia a antibióticos (ampicilina y cloranfenicol), se realizó la selección de las bacterias que hayan incorporado el plásmido mediante el cultivo, durante 16 hs a 37°C, en medio Luria-Bertani (LB, 1 % Triptona; 0,5 % Extracto de levadura; 1 % de NaCl; 1,5 % Agar; PH = 7) suplementado con 50 mg/mL ampicilina. Al día siguiente, una colonia fue aislada de la placa LB e inoculada en 3 mL de medio SOB (2 % Triptona; 0,5 % Extracto de levadura; 0,05 % NaCl; 0,0186 % KCl; 0,20 % MgCl₂; PH = 7) suplementado con 50 mg/mL ampicilina y 10 µg/mL cloranfenicol, se incubó durante 16 hs a 37°C en agitación. Posteriormente, se realizó la amplificación a 20 mL de SOB sin antibióticos y se incubaron a 37°C en agitación hasta obtener la fase logarítmica de crecimiento (aproximadamente 0,6 DO_{600nm}). En este momento se amplificó a 250 mL de SOB sin antibióticos. Una vez que volvió a alcanzar 0,6 DO_{600nm} aproximadamente, se estimuló la producción de la proteína recombinante con 1mM isopropil-beta-D-tiogalactopranósido (IPTG) mediante incubación durante 18 hs a 37°C en agitación. Dado que las proteínas recombinantes se encontraron en cuerpos de inclusión, el pellet de bacterias obtenido (mediante centrifugación) fue tratado con la solución de pegado desnaturalizante (5 mM imidazol; 0,5 M NaCl; 20 mM Tris (PH = 6,8); 6 M Urea), la cual contiene urea que rompe las membranas bacterianas y solubiliza las proteínas. Para descartar restos celulares, se realizó una centrifugación a 4.000 rpm durante 30min a 4°C. La expresión de las proteínas recombinantes se confirmó mediante el estudio del sobrenadante obtenido por SDS-PAGE en geles de acrilamida al 12 %. Las corridas se llevaron a cabo en una cuba de electroforesis vertical (Mini Protean® II Cell, Bio-Rad, Hercules, California, USA). Las bandas de proteínas se visualizaron por tinción 0,01 % azul de coomassie R-250 (FLUKA, Suiza).

Purificación parcial de proteínas recombinantes

Las proteínas recombinantes tienen una cola de seis histidinas (incorporada por el plásmido comercial pRSET A), que permiten realizar la purificación por cromatografías de afinidad a níquel. Para ello, se utilizó la resina His*Bind® Resin (Novagen), la cual fue cargada (dos veces) con 4 volúmenes (Vol.) de 50 mM de NiSO₄, equilibrada con 5 Vol. de solución de pegado desnaturizante y colocada en el soporte cromatográfico. Luego, se agregó el sobrenadante de las bacterias tratadas con la solución de pegado desnaturizante. Se realizó un lavado con 8 Vol. de solución de pegado desnaturizante. Al agregar 4 Vol. de solución de elución (150 mM imidazol; 0,5 M NaCl; 20 mM Tris (PH = 6,8); 6 M Urea), se cosecharon las proteínas recombinantes fraccionadas de a 1 mL. Luego de confirmar la purificación por SDS-PAGE, se diluyeron las fracciones purificadas obtenidas hasta 200 µg/mL, se dializaron en 0,5 M NaCl y 20 mM Tris (PH = 6,8) a fin de quitar el imidazol y la urea, se concentraron mediante la utilización del Amicon®Ultra Centrifugal Filtres 10K que filtra componentes menores a 10 kDa (Millipore) y se almacenaron a -80°C hasta el momento de utilización. La concentración proteica de las proteínas recombinantes se determinó por Bradford (1976).

B- ELISA-PPA

Se desarrolló el ELISA diagnóstico de paratuberculosis (ELISA-PPA) que estudia los niveles de IgG específicos frente a PPA en sueros. Con la finalidad de eliminar reactividad cruzada (generada por otras micobacterias), se realizó la pre-adsorción de los sueros a evaluar con *M. phlei*: se diluyeron los sueros 1/5 en 1 de densidad óptica (DO) analizado a 600 nm (DO_{600nm}) de *M. phlei* en PBS y se incubaron durante 1 h a 37°C en agitación seguido de 16 hs a 4°C. Las muestras fueron luego centrifugadas a 10.000 rpm durante 30 min a 4°C y se procedió al estudio del sobrenadante.

Las microplacas de 96 hoyos Greiner Microlon (GBO) fueron sensibilizadas con 2 µg/hoyo de PPA (Allied Monitor) en 50 µL de solución de pegado (carbonato/bicarbonato 0,05M; PH = 9,6), durante 16 hs a 4°C. Luego de cada incubación se realizaron 3 lavados con 100 µL de solución de lavado (0,05 % Tween 20 en PBS). Los hoyos fueron incubados durante 1 h a 37°C con 100 µL de solución de bloqueo (10 % leche en polvo descremada (Svelty, Nestle, Buenos Aires, Argentina) en PBS). Posterior al lavado, se incubaron 50 µL de los sueros pre-adsorbidos a una dilución final de 1/100 en solución diluyente (5 % leche

en PBS) durante 1 h a 37°C. Luego, se incubaron 50 µL del anti-IgG bovino (KPL) marcado con peroxidasa diluido 1/5.000 en solución diluyente. Finalmente, se incubaron, aproximadamente 6 min a temperatura ambiente, 50 µL de la solución de revelado: 1 mg ortophenilendiamina (OPD, Sigma-Aldrich) y 0,54 µL H₂O₂ 100 Vol., por mL de 0,05 M citrato fosfato (Sigma-Aldrich). La reacción se frenó con 50 µL de 1 M H₂SO₄. La lectura se realizó en el espectrofotómetro OpsysMR (Dynex Technologies, Chantilly, Virginia, USA) a 490 nm.

El valor de corte (VC) se estableció mediante la utilización de 15 sueros controles negativos (sueros provenientes de rodeos libres de *Map*) y se calculó sumando al promedio de las densidades ópticas, dos desvíos estándares. Según las condiciones establecidas en nuestro laboratorio, se establecieron los VC para el ELISA-PPA en: 0,199 DO (VC) o 0,298 (correspondiente a 1,5 veces el VC: VC de sospechosos, VC_{sosp}). A partir de estos datos, los animales fueron clasificados como (Figura 46):

- positivos, con DO promedio mayores o igual a 0,298
- sospechosos, con DO promedio entre 0,199 y 0,297
- negativos, con DO promedio menores a 0,198

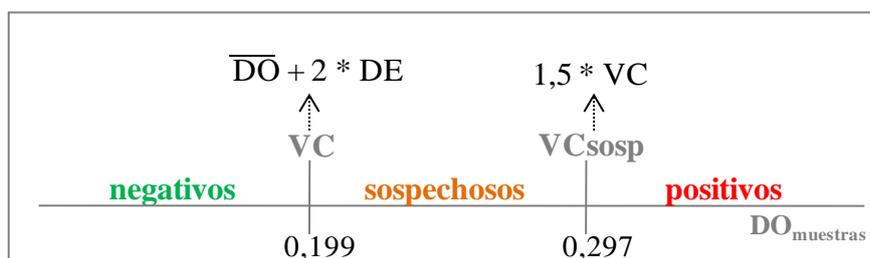


Figura 46. Clasificación de los animales mediante el diagnóstico serológico (ELISA-PPA). Según la densidad óptica (DO) obtenida a partir de la evaluación del suero, el resultado fue considerado como: negativo, sospechoso o positivo. VC: valor de corte; VC_{sosp}: valor de corte de sospechosos; DE: desvío estándar.

C- Cultivos de muestras de materia fecal

Se homogenizaron 2 g de MF en 35 – 40 mL de agua destilada estéril y se incubaron durante 1 h (30 min en agitación y 30 min estático). Luego, se incubaron 5 mL del sobrenadante con 25 mL de 0,9 % de HPC (Sigma-Aldrich) durante 24 hs a temperatura ambiente. Los pellets obtenidos, mediante centrifugación a 3.000 rpm durante 15 min, se

resuspendieron en 2 mL de agua destilada estéril con 200 µg de anfotericina B (Sigma-Aldrich). Se sembraron 100 µL de muestra en tubos con medio Herrold en pico de flauta. Cada muestra se estudió por duplicado. La lectura de los medios se realizó cada 15 días, durante 24 semanas, a fin de identificar la presencia de UFC.

Composición del medio Herrold (OIE, 2014): 0,9 % peptona; 0,45 % NaCl; 0,27 % extracto de carne vacuna; 2,7 % v/v glicerol; 0,41 % piruvato de sodio (Sigma-Aldrich); 1,53 % Agar; 0,0102 % verde de malaquita oxálica; 2 mg/L micobactina J (Allied Monitor); 100 mg ampicilina; 50 mg cloranfenicol (Droguería Saporiti, Buenos Aires, Argentina); 50 mg anfotericina B (Sigma-Aldrich); 6 yemas de huevo; PH = 7,5.

D- Captación de *Map* a partir de muestras de leche

Las muestras de leche fueron analizadas según la metodología previamente desarrollada en el laboratorio (Gilardoni y col., en prensa). Brevemente, se sensibilizaron $3,65 \times 10^8$ perlas imantadas conjugadas con anti-IgG de ratón (New England Biolabs) con 10 µg de Acs específicos a *Map* desarrollados en nuestro laboratorio, durante 1 h a 4°C en agitación. 10 mL de leche se incubaron con 1 0µL de las perlas imantadas sensibilizadas con Acs durante 1 h a 4°C en constante agitación. Las perlas se captaron de la leche mediante la utilización de una gradilla magnética por 10 min. Luego se realizaron 3 lavados con PBS y el pellet se diluyó en 1mL de PBS.

E- IS900 PCR

Se confirmó la identidad de *Map* mediante el estudio de la inserción IS900 (característica de *Map*) por PCR (Mundo y col., 2013). Para ello, una UFC desarrollada a partir del cultivo de MF fue diluida en 50 µL de en agua destilada y 5 0µL de las perlas imantadas captadas de la leche fueron incubados a 100°C durante 15 min. Se trabajó con el primer IS1 (Mundo y col., 2013) que amplifica una secuencia corta de ADN del inserto IS900:155 pb de longitud correspondiente a los nucleótidos 1129 - 1283: IS1 directo (5' ACC CGC TGC GAG AGC AAT CGC TGC 3') e IS1 reverso (5' ACG TCG GCG TGG TCG TCT GCT GGG 3'). La mezcla utilizada para el PCR fue: 0,2 mM de cada nucleótido dATP, dCTP, dGTP, dTTP, 0,2 µg de cada cebador IS1F/IS1R, 0,5 unidades de Taq polimerasa (Invitrogen Corp., Brasil) y 3 mM de Mg en el buffer comercial. El programa utilizado consistió en una desnaturalización inicial de 97°C durante 3 min y 35 ciclos de desnaturalización a 94°C

durante 30 seg, apareamiento a 65°C durante 30 seg, extensión a 72°C durante 30 seg. Las amplificaciones se realizaron en el termociclador PTC-100TM Programmable Thermal Controller (MJ Research, Waltham, Massachusetts, USA). La lectura se realizó mediante electroforesis en geles de agarosa al 2 %, los cuales fueron teñidos con bromuro de etidio y leídos en el transiluminador de luz ultravioleta Foto/UV[®]Z (Fotodyne Incorporated, Hartland, USA). Se utilizaron *Map* ATCC 19698 y *M. phlei* ATCC 11758 como cepas de referencia positiva y negativa respectivamente.

F- Metodología para pre-adsorber sueros con *E. coli*

Este procedimiento se aplicó con el fin de eliminar reactividad cruzada con proteínas de *E. coli*. La pre-adsorción en medio líquido se realizó de la siguiente manera: los sueros fueron diluidos 1/50 en 2 DO_{600nm} *E. coli* controles negativas en PBS e incubados a 4°C (3hs en agitación y 16 hs de manera estática). Luego de centrifugar las muestras a 10.000 rpm durante 30 min a 4°C, se obtuvieron los sueros pre-adsorbidos en medio líquido diluidos 1/50.

En el caso de la pre-adsorción del suero anti-IgG3r, se realizó además una pre-adsorción en medio sólido: se sensibilizaron microplacas con 100 µL del extracto de *E. coli* (200 µg/mL) diluido en solución de pegado. Luego de realizar 3 lavados con 200 µL de solución de lavado, se colocaron 200 µL de solución bloqueante. Finalmente, se colocaron 50 µL del suero pre-adsorbido en medio líquido. Se incubó en agitación durante 1 h a 37°C. Luego, se aspiró el sobrenadante, obteniendo de esta manera los suero de conejo anti-IgG3r 1/50 pre-adsorbido en medio líquido y sólido.

G- Evaluación de la producción INF γ por células periféricas

Las muestras se procesaron dentro de las primeras 8 hs de obtenidas. Se colocaron 1,4 mL de sangre con 1 % de heparina en placas de 24 hoyos Cellstar (GBO) y se estimularon las células con 120 µL de PPDa (60 µg), PPDb (60 µg), p34 (30 µg), Hsp65 (30 µg) o sin estimular (con PBS). Luego de 24 hs de incubación a 37°C en 5 % CO₂, se aspiraron los sobrenadantes y se evaluaron por DuoSet ELISA Development kit (R&D). Las microplacas fueron sensibilizadas con 0,2 µg de anti-INF γ monoclonal en PBS durante 16 hs a 25°C. Luego de bloquear los hoyos durante 2 hs a 25°C con 5 % Tween 20 en PBS, se incubaron 100 µL de los sobrenadantes a estudiar o el INF γ patrón (entre 0,16 y 2,5 ng / mL), durante

16 hs a 4°C. Se utilizaron 0,04 µg de anti-IFN γ marcado con biotina y 1/100 de estreptavidina conjugada con peroxidasa. Los datos se encuentran expresados como DO promedios \pm DE.

H- Purificación de anticuerpos

Purificación de anticuerpos por precipitación salina

Se deplementaron los sueros (56°C durante 30 min) y diluyeron 1/10 en PBS. Luego, se agregó lentamente una solución de sulfato de amonio sobresaturada (hasta alcanzar el 44 % de concentración final). Se incubó durante 1 h a 25°C y 2 hs a 4°C en agitación. Se resuspendió el pellet obtenido mediante centrifugación, en PBS (en la mitad del Vol. inicial de suero) y se realizó la segunda precipitación con solución de sulfato de amonio sobresaturada hasta alcanzar el 40% de concentración final. Los pellets se resuspendieron en PBS (al mismo Vol. inicial) y se dializaron en PBS. El rendimiento de la precipitación se evaluó por SDS-PAGE en geles de acrilamida al 12 %, electroforesis en acetato de celulosa y posterior densitometría (Densitometer CT-450, Citocon, Buenos Aires, Argentina). Las muestra se almacenaron hasta su uso a -80°C.

Purificación de anticuerpos por afinidad a proteína G

Un Vol. de columna de proteína G-sepharosa (Sigma-Aldrich) colocada en el soporte cromatográfico fue lavada dos veces: primero con 3 Vol. de PBS y a continuación con 3 Vol. de solución de pegado (20mM Na₂HPO₄; 20mM NaH₂PO₄; 2,7mM KCl; 137mM NaCl; PH = 6,6). Luego, se incubó la columna durante 20 min, con 3 Vol. de cada muestra diluida en solución de pegado: 4 mg de γ -globulinas (obtenidas por precipitación salina). Posteriormente, se realizó un lavado con 10 Vol. de solución de pegado, se agregaron 12 Vol. de solución de elución (0,1 M Glicina; PH = 3) y se recolectaron los eluidos en fracciones de a 1mL en tubos eppendorf que contenían 25 µL de solución de neutralización (1 M Tris; PH = 9). Se confirmó la purificación por SDS-PAGE en geles al 12 % de acrilamida y se colocaron al menos 3 µg de proteína/calle.

I- Evaluación del papel de anticuerpos específicos en la viabilidad intracelular de *Map* en macrófagos bovinos

Se cultivaron 2×10^5 BoMac (pasaje n° 25) viables/hoyo en 1 mL RPMI con 5 % de SFB, 100 UI/mL penicilina y 1 mg/mL estreptomicina, en placas de 24 hoyos Cellstar durante 16hs a 37°C en estufa con 5 % de CO₂. Posteriormente, se retiró el medio de cultivo y se colocaron 200 µL/hoyo de cada pre-tratamiento (Acs-*Map*) previamente desagregado ($2,53 \times 10^5$ UFC de *Map* / hoyo). Cada pre-tratamiento se realizó por duplicado: un hoyo para determinar la viabilidad de *Map* ingerida (t_0) y otro hoyo para la viabilidad de *Map* luego de 72 hs (t_f). Se incubaron las células-Acs-*Map* a 37°C durante 2 hs para permitir la infección. Luego de realizar dos lavados con 1 mL PBS atemperado a fin de quitar los *Map* que no fueron ingeridos, se procedió a lisar los macrófagos correspondientes a los hoyos de t_0 con 1 mL de 0,2 % SDS. Mientras que, los hoyos correspondientes a los t_f fueron tratados durante 2 hs con 1 mL de RPMI 5 % SFB y 50µg/mL gentamicina (Sigma-Aldrich) en estufa a 37°C con 5 % de CO₂. Luego, se cultivaron las células en RPMI 5% SFB sin antibióticos, renovándose cada 24 hs. A las 72 hs posteriores a la incorporación de Acs-*Map*, se lisaron los macrófagos de la misma manera que los hoyos del t_0 . Para realizar la titulación, los sobrenadantes obtenidos (de los hoyos de t_0 y t_f) fueron mantenidos a 4°C, desagregados y diluidos en PBS en base 10 entre las diluciones 1/10 a 1/10.000 y se sembraron 50 µL/hoyo en placas de 6 hoyos Cellstar (GBO) con medio 7H9 suplementado con micobactina J. La viabilidad bacteriana se evaluó a los 45 días de cultivo. Los resultados se expresan como el % de viabilidad para cada tratamiento: $\text{UFC } t_f / \text{UFC } t_0 * 100$.

Anexo Estadístico

Capítulo I: Efecto de la infección por *Map* en los niveles de anticuerpos totales en muestras de suero y MF de bovinos en distintos estadios de la patología

Niveles totales de IgM en suero

One-Way AOV for: CN IC ICT ISC

Source	DF	SS	MS	F	P
Between	3	0.33135	0.11045	1.10	0.4475
Within	4	0.40306	0.10077		
Total	7	0.73441			

Grand Mean -0.4618 CV -68.74

	Chi-Sq	DF	P
Bartlett's Test of Equal Variances	4.04	3	0.2567
Cochran's Q	0.6510		
Largest Var / Smallest Var	377.26		

Component of variance for between groups 0.00484
Effective cell size 2.0

Variable	Mean
CN	-0.6745
IC	-0.1527
ICT	-0.6107
ISC	-0.4094
Observations per Mean	2
Standard Error of a Mean	0.2245
Std Error (Diff of 2 Means)	0.3174

Niveles totales de IgM en sMF

One-Way AOV for: CN IC ICT ISC

Source	DF	SS	MS	F	P
Between	3	0.94298	0.31433	7.93	0.0369
Within	4	0.15845	0.03961		
Total	7	1.10143			

Grand Mean -2.6986 CV -7.38

	Chi-Sq	DF	P
Bartlett's Test of Equal Variances	2.54	3	0.4686
Cochran's Q	0.7551		
Largest Var / Smallest Var	70.475		

Component of variance for between groups 0.13736
Effective cell size 2.0

Variable	Mean
CN	-2.9666
IC	-2.2324
ICT	-2.5126
ISC	-3.0829
Observations per Mean	2
Standard Error of a Mean	0.1407
Std Error (Diff of 2 Means)	0.1990

Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test

Variable	Mean	Homogeneous Groups
IC	-2.2324	A
ICT	-2.5126	AB
CN	-2.9666	AB
ISC	-3.0829	B

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.1990
 Critical Q Value 5.760 Critical Value for Comparison 0.8106

Niveles totales de IgG en suero

One-Way AOV for: CN ISC IC ICT

Source	DF	SS	MS	F	P
Between	3	0.00979	0.00326	2.35	0.2139
Within	4	0.00556	0.00139		
Total	7	0.01536			

Grand Mean 0.0688 CV 54.20

Chi-Sq DF P
 Bartlett's Test of Equal Variances 6.20 3 0.1022
 Cochran's Q 0.9014
 Largest Var / Smallest Var 1148.8

Component of variance for between groups 9.373E-04
 Effective cell size 2.0

Variable Mean

CN 0.1110
 ISC 0.0154
 IC 0.0644
 IT 0.0845
 Observations per Mean 2
 Standard Error of a Mean 0.0264
 Std Error (Diff of 2 Means) 0.0373

Niveles totales de IgG en sMF

One-Way AOV for: CN IC ICT ISC

Source	DF	SS	MS	F	P
Between	3	3.26892	1.08964	5.12	0.0742
Within	4	0.85084	0.21271		
Total	7	4.11977			

Grand Mean -1.4016 CV -32.91

Chi-Sq DF P
 Bartlett's Test of Equal Variances 4.51 3 0.2117
 Cochran's Q 0.7553
 Largest Var / Smallest Var 488.51

Component of variance for between groups 0.43847
 Effective cell size 2.0

Variable Mean

CN -1.9918
 IC -0.3616
 ICT -1.3993
 ISC -1.8538
 Observations per Mean 2
 Standard Error of a Mean 0.3261
 Std Error (Diff of 2 Means) 0.4612

Niveles totales de IgA en suero

One-Way AOV for: CN ISC IC IT

Source	DF	SS	MS	F	P
Between	3	0.06626	0.02209	1.04	0.4657
Within	4	0.08501	0.02125		
Total	7	0.15126			

Grand Mean -0.1659 CV -87.85

Chi-Sq DF P
 Bartlett's Test of Equal Variances 2.59 3 0.4589
 Cochran's Q 0.4886

Largest Var / Smallest Var 24.313

Component of variance for between groups 4.169E-04
 Effective cell size 2.0

Variable	Mean
CN	-0.1970
ISC	-0.0980
IC	-0.0685
IT	-0.3003
Observations per Mean	2
Standard Error of a Mean	0.1031
Std Error (Diff of 2 Means)	0.1458

Niveles totales de IgA en sMF

One-Way AOV for: CN ISC IC IT

Source	DF	SS	MS	F	P
Between	3	1.27652	0.42551	2.45	0.2037
Within	4	0.69561	0.17390		
Total	7	1.97213			

Grand Mean -0.7751 CV -53.80

	Chi-Sq	DF	P
Bartlett's Test of Equal Variances	2.74	3	0.4327
Cochran's Q	0.7810		
Largest Var / Smallest Var	32.686		

Component of variance for between groups 0.12580
 Effective cell size 2.0

Variable	Mean
CN	-1.2675
ISC	-0.9683
IC	-0.1839
IT	-0.6807
Observations per Mean	2
Standard Error of a Mean	0.2949

Capítulo II: Respuesta inmune humoral específica frente a *Map* y sus proteínas, en bovinos naturalmente infectados en distintos estadios de la patología

Niveles de isotipos de inmunoglobulinas específicos frente a *Map* en muestras de suero y materia fecal

Niveles de IgM específicas a *Map* en muestras de suero

One-Way AOV for: CN IC ISC

Source	DF	SS	MS	F	P
Between	2	0.19221	0.09611	0.57	0.5779
Within	12	2.00843	0.16737		
Total	14	2.20064			

Grand Mean -1.2147 CV -33.68

	Chi-Sq	DF	P
Bartlett's Test of Equal Variances	0.89	2	0.6418
Cochran's Q	0.5175		
Largest Var / Smallest Var	3.0126		

Component of variance for between groups -0.01445

Effective cell size 4.9

Variable	N	Mean	SE
CN	4	-1.3938	0.2046
IC	6	-1.1135	0.1670
ISC	5	-1.1928	0.1830

Niveles de IgM específicas a *Map* en sMF

One-Way AOV for: CN IC ISC

Source	DF	SS	MS	F	P
Between	2	28.320	14.1598	1.58	0.2469
Within	12	107.863	8.9886		
Total	14	136.183			

Grand Mean -5.1669 CV -58.02

	Chi-Sq	DF	P
Bartlett's Test of Equal Variances	8.77	2	0.0125
Cochran's Q	0.6007		
Largest Var / Smallest Var	46.012		

Component of variance for between groups 1.04821
Effective cell size 4.9

Variable	N	Mean	SE
CN	4	-7.0838	1.4990
IC	6	-5.2618	1.2240
ISC	5	-3.5196	1.3408

Kruskal-Wallis One-Way Nonparametric AOV

Variable	Mean Rank	Sample Size
CN	5.4	4
IC	8.5	6
ISC	9.5	5
Total	8.0	15

Kruskal-Wallis Statistic 2.0228
P-Value, Using Chi-Squared Approximation 0.3637

Parametric AOV Applied to Ranks

Source	DF	SS	MS	F	P
Between	2	40.313	20.1563	1.01	0.3921
Within	12	238.688	19.8906		
Total	14	279.000			

Niveles de IgA específicas a *Map* en muestras de suero

One-Way AOV for: CN IC ISC

Source	DF	SS	MS	F	P
Between	2	0.06042	0.03021	0.15	0.8600
Within	12	2.37451	0.19788		
Total	14	2.43493			

Grand Mean 6.0908 CV 7.30

	Chi-Sq	DF	P
Bartlett's Test of Equal Variances	1.19	2	0.5514
Cochran's Q	0.5464		
Largest Var / Smallest Var	3.6203		

Component of variance for between groups -0.03399
Effective cell size 4.9

Variable	N	Mean	SE
CN	4	6.0525	0.2224
IC	6	6.1677	0.1816

ISC 5 6.0291 0.1989

Niveles de IgG específicas a *Map* en muestras de suero

One-Way AOV for: CN IC ISC

Source	DF	SS	MS	F	P
Between	2	12.4948	6.24742	23.3	0.0001
Within	12	3.2115	0.26762		
Total	14	15.7063			

Grand Mean -0.7510 CV -68.89

	Chi-Sq	DF	P
Bartlett's Test of Equal Variances	3.29	2	0.1929
Cochran's Q	0.6799		
Largest Var / Smallest Var	5.9618		

Component of variance for between groups 1.21212
Effective cell size 4.9

Variable	N	Mean	SE
CN	4	-1.9606	0.2587
IC	6	0.2737	0.2112
ISC	5	-1.0129	0.2314

Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test

Variable	Mean	Homogeneous Groups
IC	0.2737	A
ISC	-1.0129	B
CN	-1.9606	C

Alpha 0.05
Critical Q Value 3.783

Niveles de IgG específicas a *Map* en sMF

One-Way AOV for: CN IC ISC

Source	DF	SS	MS	F	P
Between	2	0.9884	0.49421	0.57	0.5816
Within	12	10.4567	0.87139		
Total	14	11.4451			

Grand Mean -2.5208 CV -37.03

	Chi-Sq	DF	P
Bartlett's Test of Equal Variances	13.8	2	0.0010
Cochran's Q	0.9374		
Largest Var / Smallest Var	100.16		

Component of variance for between groups -0.07646
Effective cell size 4.9

Variable	N	Mean	SE
CN	4	-2.7872	0.4667
IC	6	-2.2105	0.3811
ISC	5	-2.6800	0.4175

Kruskal-Wallis One-Way Nonparametric AOV

Variable	Mean Rank	Sample Size
CN	5.8	4
IC	8.3	6
ISC	9.4	5
Total	8.0	15

Kruskal-Wallis Statistic 1.5358
P-Value, Using Chi-Squared Approximation 0.4640

Parametric AOV Applied to Ranks

Source	DF	SS	MS	F	P
Between	2	30.717	15.3583	0.74	0.4980
Within	12	249.283	20.7736		
Total	14	280.000			

Total number of values that were tied 0
 Max. diff. allowed between ties 0.00001

Niveles de IgG1 específicas a *Map* en muestras de suero

One-Way AOV for: CN IC ISC

Source	DF	SS	MS	F	P
Between	2	27.6645	13.8322	53.7	0.0000
Within	12	3.0912	0.2576		
Total	14	30.7557			

Grand Mean 4.5521 CV 11.15

	Chi-Sq	DF	P
Bartlett's Test of Equal Variances	3.06	2	0.2165
Cochran's Q	0.5971		
Largest Var / Smallest Var	9.6574		

Component of variance for between groups 2.75162
 Effective cell size 4.9

Variable	N	Mean	SE
C	4	3.0807	0.2538
IC	6	6.1831	0.2072
ISC	5	3.7720	0.2270

Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test

Variable	Mean	Homogeneous Groups
IC	6.1831	A
ISC	3.7720	B
CN	3.0807	B

Alpha 0.05
 Critical Q Value 3.783

Niveles de IgG1 específicas a *Map* en sMF

One-Way AOV for: CN IC ISC

Source	DF	SS	MS	F	P
Between	2	2.8310	1.41548	1.01	0.3940
Within	12	16.8602	1.40502		
Total	14	19.6912			

Grand Mean -0.1591 CV -745.02

	Chi-Sq	DF	P
Bartlett's Test of Equal Variances	25.5	2	0.0000
Cochran's Q	0.9920		
Largest Var / Smallest Var	451.51		

Component of variance for between groups 0.00212
 Effective cell size 4.9

Variable	N	Mean	SE
CN	4	-0.5442	0.5927
IC	6	0.3723	0.4839
ISC	5	-0.4887	0.5301

Kruskal-Wallis One-Way Nonparametric AOV

Variable	Mean Rank	Sample Size
CN	4.5	4
IC	11.2	6

ISC 7.0 5
 Total 8.0 15
 Kruskal-Wallis Statistic 5.7083
 P-Value, Using Chi-Squared Approximation 0.0576

Parametric AOV Applied to Ranks

Source	DF	SS	MS	F	P
Between	2	114.167	57.0833	4.13	0.0432
Within	12	165.833	13.8194		
Total	14	280.000			

Total number of values that were tied 0
 Max. diff. allowed between ties 0.00001

Kruskal-Wallis All-Pairwise Comparisons Test

Variable	Mean	Homogeneous Groups
IC	11.167	A
ISC	7.0000	A
C	4.5000	A

Alpha 0.05
 Critical Z Value 2.394

Niveles de IgG2 específicas a *Map* en muestras de suero

One-Way AOV for: CN IC ISC

Source	DF	SS	MS	F	P
Between	2	12.9305	6.46525	14.6	0.0006
Within	12	5.3217	0.44348		
Total	14	18.2522			

Grand Mean 0.7613 CV 87.47

Bartlett's Test of Equal Variances Chi-Sq 4.03 DF 2 P 0.1332
 Cochran's Q 0.7216
 Largest Var / Smallest Var 9.8117

Component of variance for between groups 1.22063
 Effective cell size 4.9

Variable	N	Mean	SE
CN	4	-0.7591	0.3330
IC	6	1.4701	0.2719
ISC	5	1.1271	0.2978

Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test

Variable	Mean	Homogeneous Groups
IC	1.4701	A
ISC	1.1271	A
CN	-0.7591	B

Alpha 0.05
 Critical Q Value 3.783

Niveles de IgG2 específicas a *Map* en sMF

One-Way AOV for: CN IC ISC

Source	DF	SS	MS	F	P
Between	2	0.89938	0.44969	1.40	0.2830
Within	12	3.84108	0.32009		
Total	14	4.74047			

Grand Mean -3.8623 CV -14.65

Bartlett's Test of Equal Variances Chi-Sq 0.63 DF 2 P 0.7297
 Cochran's Q 0.4333
 Largest Var / Smallest Var 2.4417

Component of variance for between groups 0.02627
 Effective cell size 4.9

Variable	N	Mean	SE
CN	4	-4.2586	0.2829
IC	6	-3.6613	0.2310
ISC	5	-3.7863	0.2530

Niveles de IgG3 específicas a *Map* en muestras de suero

One-Way AOV for: IC ISC CN

Source	DF	SS	MS	F	P
Between	2	2.62063	1.31032	21.3	0.0001
Within	12	0.73655	0.06138		
Total	14	3.35718			

Grand Mean -1.2839 CV -19.30

	Chi-Sq	DF	P
Bartlett's Test of Equal Variances	2.05	2	0.3590
Cochran's Q	0.5402		
Largest Var / Smallest Var	5.7649		

Component of variance for between groups 0.25316
 Effective cell size 4.9

Variable	N	Mean	SE
IC	6	-0.8316	0.1011
ISC	5	-1.3596	0.1108
CN	4	-1.8679	0.1239

Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test

Variable	Mean	Homogeneous Groups
IC	-0.8316	A
ISC	-1.3596	B
CN	-1.8679	C

Alpha 0.05
 Critical Q Value 3.783

Niveles de IgG3 específicas a *Map* en sMF

One-Way AOV for: IC ISC CN

Source	DF	SS	MS	F	P
Between	2	0.51457	0.25729	2.23	0.1496
Within	12	1.38152	0.11513		
Total	14	1.89609			

Grand Mean -0.9858 CV -34.42

	Chi-Sq	DF	P
Bartlett's Test of Equal Variances	0.54	2	0.7632
Cochran's Q	0.4867		
Largest Var / Smallest Var	1.9610		

Component of variance for between groups 0.02882
 Effective cell size 4.9

Variable	N	Mean	SE
IC	6	-1.0526	0.1385
ISC	5	-0.7368	0.1517
CN	4	-1.1967	0.1697

Niveles de anticuerpos específicos frente a Hsp65r

One-Way AOV for: C CN HSP SC

Source	DF	SS	MS	F	P
Between	3	96.285	32.0948	6.21	0.0016
Within	37	191.220	5.1681		
Total	40	287.504			

Grand Mean -3.5524 CV -63.99

	Chi-Sq	DF	P
Bartlett's Test of Equal Variances	12.7	3	0.0053
Cochran's Q	0.3880		
Largest Var / Smallest Var	266.37		

Component of variance for between groups 2.85516
Effective cell size 9.4

Variable	N	Mean	SE
C	9	-3.3925	0.7578
CN	18	-4.7410	0.5358
HSP	4	0.6175	1.1367
SC	10	-3.2248	0.7189

Kruskal-Wallis One-Way Nonparametric AOV

Variable	Mean Rank	Sample Size
C	21.0	9
CN	15.6	18
HSP	39.5	4
SC	23.3	10
Total	21.0	41

Kruskal-Wallis Statistic 13.5596
P-Value, Using Chi-Squared Approximation 0.0036

Parametric AOV Applied to Ranks

Source	DF	SS	MS	F	P
Between	3	1944.62	648.207	6.33	0.0014
Within	37	3791.88	102.483		
Total	40	5736.50			

Total number of values that were tied 9
Max. diff. allowed between ties 0.00001

Cases Included 41 Missing Cases 31

Kruskal-Wallis All-Pairwise Comparisons Test

Variable	Mean	Homogeneous Groups
HSP	39.500	A
SC	23.300	AB
C	21.000	AB
CN	15.611	B

Alpha 0.05
Critical Z Value 2.638

El uso de la técnica de ELISA de isotipos de IgG específicos frente a PPA en sueros de bovinos naturalmente infectados

IgG

One-Way AOV for: IC CN E ISC

Source	DF	SS	MS	F	P
Between	3	2.65908	0.88636	41.0	0.0000
Within	104	2.24999	0.02163		
Total	107	4.90907			

Grand Mean -0.7594 CV -19.37

	Chi-Sq	DF	P
Bartlett's Test of Equal Variances	6.83	3	0.0774
Cochran's Q	0.4706		
Largest Var / Smallest Var	2.8275		
Component of variance for between groups	0.03316		
Effective cell size	26.1		

Variable	N	Mean	SE
IC	14	-0.3844	0.0393
CN	38	-0.8920	0.0239
E	30	-0.7453	0.0269
ISC	26	-0.7840	0.0288

Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test

Variable	Mean	Homogeneous Groups
IC	-0.3844	A
E	-0.7453	B
ISC	-0.7840	B
CN	-0.8920	C

Alpha 0.05
Critical Q Value 3.693

IgG1

One-Way AOV for: IC CN E ISC

Source	DF	SS	MS	F	P
Between	3	5.5304	1.84346	25.5	0.0000
Within	104	7.5124	0.07223		
Total	107	13.0428			

Grand Mean -1.1524 CV -23.32

	Chi-Sq	DF	P
Bartlett's Test of Equal Variances	100.0	3	0.0000
Cochran's Q	0.8642		
Largest Var / Smallest Var	33.936		
Component of variance for between groups	0.06793		
Effective cell size	26.1		

Variable	N	Mean	SE
LogC	14	-0.5665	0.0718
LogHC	38	-1.2513	0.0436
LogNon	30	-1.2336	0.0491
LogSC	26	-1.2295	0.0527

Kruskal-Wallis One-Way Nonparametric AOV

Variable	Mean Rank	Sample Size
IC	82.9	14
CN	49.9	38
E	53.5	30
ISC	47.0	26
Total	54.5	108

Kruskal-Wallis Statistic 13.8912
P-Value, Using Chi-Squared Approximation 0.0031

Parametric AOV Applied to Ranks

Source	DF	SS	MS	F	P
Between	3	13605	4534.93	5.17	0.0023
Within	104	91189	876.81		
Total	107	104794			

Total number of values that were tied 79
Max. diff. allowed between ties 0.00001

Cases Included 108 Missing Cases 44

Kruskal-Wallis All-Pairwise Comparisons Test

Variable	Mean	Homogeneous Groups
IC	82.929	A
E	53.533	B
CN	49.934	B
ISC	46.981	B

Alpha 0.05
Critical Z Value 2.638

IgG2

One-Way AOV for: IC CN E ISC

Source	DF	SS	MS	F	P
Between	3	2.83578	0.94526	19.7	0.0000
Within	104	4.99986	0.04808		
Total	107	7.83564			

Grand Mean -0.7596 CV -28.86

	Chi-Sq	DF	P
Bartlett's Test of Equal Variances	6.38	3	0.0944
Cochran's Q	0.3199		
Largest Var / Smallest Var	2.3259		

Component of variance for between groups 0.03441
Effective cell size 26.1

Variable	N	Mean	SE
IC	14	-0.5274	0.0586
CN	38	-0.9646	0.0356
E	30	-0.6361	0.0400
ISC	26	-0.7276	0.0430

Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test

Variable	Mean	Homogeneous Groups
IC	-0.5274	A
E	-0.6361	AB
ISC	-0.7276	B
CN	-0.9646	C

Alpha 0.05
Critical Q Value 3.693

Curvas ROC

Bovinos Infectados Subclínicos

Sample size		64
Positive group :	Diagnosis = 1	26
Negative group :	Diagnosis = 0	38

	AUC	SE ^a	95% CI ^b
IgG	0,719	0,0667	0,592 to 0,824
IgG1	0,526	0,0753	0,398 to 0,653
IgG2	0,812	0,0544	0,695 to 0,899

^a DeLong et al., 1988

^b Binomial exact

Pairwise comparison of ROC curves

IgG ~ IgG1	
Difference between areas	0,192
Standard Error ^c	0,112
95% Confidence Interval	-0,0271 to 0,412
z statistic	1,718
Significance level	P = 0,0858
IgG ~ IgG2	
Difference between areas	0,0931
Standard Error ^c	0,0793
95% Confidence Interval	-0,0623 to 0,249
z statistic	1,174
Significance level	P = 0,2402
IgG1 ~ IgG2	
Difference between areas	0,285
Standard Error ^c	0,101
95% Confidence Interval	0,0872 to 0,484
z statistic	2,822
Significance level	P = 0,0048

^c DeLong et al., 1988

Bovinos Infectados Clínicos

Sample size		52
Positive group :	Diagnosis = 1	14
Negative group :	Diagnosis = 0	38

	AUC	SE ^a	95% CI ^b
IgG	0,998	0,00315	0,928 to 1,000
IgG1	0,805	0,0715	0,671 to 0,901
IgG2	0,927	0,0398	0,819 to 0,981

^a Hanley & McNeil, 1982

^b Binomial exact

Pairwise comparison of ROC curves

IgG ~ IgG1	
Difference between areas	0,194
Standard Error ^c	0,0701
95% Confidence Interval	0,0562 to 0,331
z statistic	2,762
Significance level	P = 0,0057
IgG ~ IgG2	
Difference between areas	0,0714
Standard Error ^c	0,0397
95% Confidence Interval	-0,00642 to 0,149
z statistic	1,798
Significance level	P = 0,0721
IgG1 ~ IgG2	
Difference between areas	0,122
Standard Error ^c	0,0724
95% Confidence Interval	-0,0196 to 0,264
z statistic	1,688
Significance level	P = 0,0913

^c Hanley & McNeil, 1983

Capítulo III: Respuesta inmune humoral inducida por la infección experimental con aislamientos locales de *Map* en terneros

Ganancia de peso

One-Way AOV for: A C CN

Source	DF	SS	MS	F	P
Between	2	2986.33	1493.17	9.43	0.0508
Within	3	475.00	158.33		
Total	5	3461.33			

Grand Mean 32.667 CV 38.52

	Chi-Sq	DF	P
Bartlett's Test of Equal Variances	1.51	2	0.4694
Cochran's Q	0.7674		
Largest Var / Smallest Var	29.160		

Component of variance for between groups 667.417
Effective cell size 2.0

Variable	Mean
A	1.500
C	44.000
CN	52.500
Observations per Mean	2
Standard Error of a Mean	8.8976
Std Error (Diff of 2 Means)	12.583

Cinética de producción de INF γ específico por células periféricas

Sin estimular

Tiempo 0

One-Way AOV for V. dep by V. categ

Source	DF	SS	MS	F	P
V cat	2	0.25225	0.12612	4.15	0.1367
Error	3	0.09114	0.03038		
Total	5	0.34338			

Grand Mean 0.2965 CV 58.78

	Chi-Sq	DF	P
Bartlett's Test of Equal Variances	8.21	2	0.0165
Cochran's Q	0.9494		
Largest Var / Smallest Var	173056		

Component of variance for between groups 0.04787
Effective cell size 2.0

V001	Mean
A	0.5780
C	0.2160
CN	0.0955
Observations per Mean	2
Standard Error of a Mean	0.1232
Std Error (Diff of 2 Means)	0.1743

Kruskal-Wallis One-Way Nonparametric AOV for V. dep by V. categ

	Mean Rank	Sample Size
A	5.5	2
C	3.5	2
CN	1.5	2
Total	3.5	6

Kruskal-Wallis Statistic 4.5714
P-Value, Using Chi-Squared Approximation 0.1017

Parametric AOV Applied to Ranks

Source	DF	SS	MS	F	P
Between	2	16.0000	8.00000	16.0	0.0251
Within	3	1.5000	0.50000		
Total	5	17.5000			

Total number of values that were tied 0
 Max. diff. allowed between ties 0.00001

Cases Included 6 Missing Cases 0

Kruskal-Wallis All-Pairwise Comparisons Test of V. dep by V. categ

V categ	Mean	Homogeneous Groups
A	5.5000	A
C	3.5000	A
CN	1.5000	A

Alpha 0.05
 Critical Z Value 2.394 Critical Value for Comparison 4.4787

30 días postinfección

One-Way AOV for V. dep by V. categ

Source	DF	SS	MS	F	P
V categ	2	0.58286	0.29143	2.75	0.2099
Error	3	0.31830	0.10610		
Total	5	0.90116			

Grand Mean 0.4517 CV 72.12

	Chi-Sq	DF	P
Bartlett's Test of Equal Variances	3.71	2	0.1562
Cochran's Q	0.9729		
Largest Var / Smallest Var	85.726		

Component of variance for between groups 0.09267
 Effective cell size 2.0

Mean

A 0.8765
 C 0.3410
 CN 0.1375
 Observations per Mean 2
 Standard Error of a Mean 0.2303
 Std Error (Diff of 2 Means) 0.3257

80 días postinfección

One-Way AOV for V. dep by V. categ

Source	DF	SS	MS	F	P
V categ	2	0.37338	0.18669	26.5	0.0124
Error	3	0.02113	0.00704		
Total	5	0.39451			

Grand Mean 0.3097 CV 27.10

	Chi-Sq	DF	P
Bartlett's Test of Equal Variances	3.57	2	0.1676
Cochran's Q	0.9657		
Largest Var / Smallest Var	113.03		

Component of variance for between groups 0.08982
 Effective cell size 2.0

Mean

A 0.6600

C 0.1705
 CN 0.0985
 Observations per Mean 2
 Standard Error of a Mean 0.0593
 Std Error (Diff of 2 Means) 0.0839

Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of V. dep by V. categ

	Mean	Homogeneous Groups
A	0.6600	A
C	0.1705	B
CN	0.0985	B

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.0839
 Critical Q Value 5.909 Critical Value for Comparison 0.3506

150 días postinfección

One-Way AOV for V. dep by V. categ

Source	DF	SS	MS	F	P
V categ	2	0.00179	8.927E-04	1.44	0.3642
Error	3	0.00186	6.193E-04		
Total	5	0.00364			

Grand Mean 0.0957 CV 26.01

	Chi-Sq	DF	P
Bartlett's Test of Equal Variances	4.01	2	0.1343
Cochran's Q	0.9688		
Largest Var / Smallest Var	225.00		

Component of variance for between groups 1.367E-04
 Effective cell size 2.0

Mean
 A 0.1200
 C 0.0850
 CN 0.0820
 Observations per Mean 2
 Standard Error of a Mean 0.0176
 Std Error (Diff of 2 Means) 0.0249

Estimuladas con PPDA

Tiempo 0

One-Way AOV for for V. dep by V. categ

Source	DF	SS	MS	F	P
V categ	2	0.15621	0.07811	3.12	0.1849
Error	3	0.07508	0.02503		
Total	5	0.23129			

Grand Mean 0.2598 CV 60.88

	Chi-Sq	DF	P
Bartlett's Test of Equal Variances	5.17	2	0.0752
Cochran's Q	0.9667		
Largest Var / Smallest Var	1451.6		

Component of variance for between groups 0.02654
 Effective cell size 2.0

Mean
 A 0.4785
 C 0.2070
 CN 0.0940
 Observations per Mean 2
 Standard Error of a Mean 0.1119
 Std Error (Diff of 2 Means) 0.1582

30 días postinfección

One-Way AOV for for V. dep by V. categ

Source	DF	SS	MS	F	P
V categ	2	0.02053	0.01026	1.06	0.4479
Error	3	0.02898	0.00966		
Total	5	0.04951			

Grand Mean 0.1732 CV 56.76

	Chi-Sq	DF	P
Bartlett's Test of Equal Variances	4.99	2	0.0827
Cochran's Q	0.9527		
Largest Var / Smallest Var	1534.0		

Component of variance for between groups 3.012E-04
Effective cell size 2.0

Mean	
A	0.2225
C	0.2060
CN	0.0910
Observations per Mean	2
Standard Error of a Mean	0.0695
Std Error (Diff of 2 Means)	0.0983

80 días postinfección

One-Way AOV for for V. dep by V. categ

Source	DF	SS	MS	F	P
V categ	2	0.13760	0.06880	18.8	0.0201
Error	3	0.01097	0.00366		
Total	5	0.14858			

Grand Mean 0.2420 CV 24.99

	Chi-Sq	DF	P
Bartlett's Test of Equal Variances	2.54	2	0.2804
Cochran's Q	0.8183		
Largest Var / Smallest Var	124.69		

Component of variance for between groups 0.03257
Effective cell size 2.0

Mean	
A	0.4510
C	0.1780
CN	0.0970
Observations per Mean	2
Standard Error of a Mean	0.0428
Std Error (Diff of 2 Means)	0.0605

Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of V. dep by V. categ

Mean Homogeneous Groups

A	0.4510	A
C	0.1780	B
CN	0.0970	B

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.0605
Critical Q Value 5.909 Critical Value for Comparison 0.2527

150 días postinfección

One-Way AOV for V. dep by V. categ

Source	DF	SS	MS	F	P
V categ	2	0.00180	9.007E-04	2.33	0.2455
Error	3	0.00116	3.873E-04		
Total	5	0.00296			

Grand Mean 0.0903 CV 21.79

	Chi-Sq	DF	P
Bartlett's Test of Equal Variances	0.16	2	0.9228
Cochran's Q	0.4406		
Largest Var / Smallest Var	2.5600		

Component of variance for between groups 2.567E-04
 Effective cell size 2.0

Mean

A	0.1000
C	0.1050
CN	0.0660

Observations per Mean 2
 Standard Error of a Mean 0.0139
 Std Error (Diff of 2 Means) 0.0197

Intradermorreacción con PPDa

One-Way AOV for V. dep by V. categ

Source	DF	SS	MS	F	P
V categ	2	9.01945	4.50973	53.3	0.0045
Error	3	0.25373	0.08458		
Total	5	9.27318			

Grand Mean -0.2316 CV -125.59

	Chi-Sq	DF	P
Bartlett's Test of Equal Variances	2.89	2	0.2358
Cochran's Q	0.9468		
Largest Var / Smallest Var	58.055		

Component of variance for between groups 2.21257
 Effective cell size 2.0

Mean

A	0.7874
C	0.4739
CN	-1.9560

Observations per Mean 2
 Standard Error of a Mean 0.2056
 Std Error (Diff of 2 Means) 0.2908

Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of V. dep by V. categ

Mean	Homogeneous Groups
A 0.7874	A
C 0.4739	A
CN -1.9560	B

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.2908
 Critical Q Value 5.909 Critical Value for Comparison 1.2151

Intradermorreacción con PPDb

One-Way AOV for V. dep by V. categ

Source	DF	SS	MS	F	P
V categ	2	47.8001	23.9000	1.71	0.3192
Error	3	41.8843	13.9614		
Total	5	89.6844			

Grand Mean -4.5201 CV -82.66

	Chi-Sq	DF	P
Bartlett's Test of Equal Variances	4.31	2	0.1160
Cochran's Q	0.9773		
Largest Var / Smallest Var	243.50		

Component of variance for between groups 4.96930

Effective cell size 2.0

V001 Mean

A -4.6864
 C -0.9831
 CN -7.8908
 Observations per Mean 2
 Standard Error of a Mean 2.6421
 Std Error (Diff of 2 Means) 3.7365

Anticuerpos específicos frente a *Map* en sueros de terneros experimentalmente infectados

IgG

Tiempo 0

One-Way AOV for: A C CN

Source	DF	SS	MS	F	P
Between	2	28.0273	14.0137	2.67	0.2155
Within	3	15.7264	5.2421		
Total	5	43.7537			

Grand Mean -3.5826 CV -63.91

	Chi-Sq	DF	P
Bartlett's Test of Equal Variances	4.80	2	0.0909
Cochran's Q	0.9477		
Largest Var / Smallest Var	1277.5		

Component of variance for between groups 4.38578
 Effective cell size 2.0

Variable Mean

A -6.4805
 C -2.9751
 CN -1.2921
 Observations per Mean 2
 Standard Error of a Mean 1.6190
 Std Error (Diff of 2 Means) 2.2896

20 días postinfección

One-Way AOV for: A C CN

Source	DF	SS	MS	F	P
Between	2	1.02161	0.51081	1.42	0.3685
Within	3	1.08032	0.36011		
Total	5	2.10193			

Grand Mean -1.9652 CV -30.54

	Chi-Sq	DF	P
Bartlett's Test of Equal Variances	0.33	2	0.8479
Cochran's Q	0.6124		
Largest Var / Smallest Var	3.2174		

Component of variance for between groups 0.07535
 Effective cell size 2.0

Variable Mean

A -2.5484
 C -1.6910
 CN -1.6562
 Observations per Mean 2
 Standard Error of a Mean 0.4243
 Std Error (Diff of 2 Means) 0.6001

30 días postinfección

One-Way AOV for: A C CN

Source	DF	SS	MS	F	P
Between	2	0.61403	0.30702	6.34	0.0836
Within	3	0.14518	0.04839		
Total	5	0.75921			

Grand Mean -1.8757 CV -11.73

	Chi-Sq	DF	P
Bartlett's Test of Equal Variances	3.50	2	0.1736
Cochran's Q	0.9649		
Largest Var / Smallest Var	101.09		

Component of variance for between groups 0.12931
Effective cell size 2.0

Variable Mean

A	-2.3161
C	-1.5658
CN	-1.7453
Observations per Mean	2
Standard Error of a Mean	0.1556
Std Error (Diff of 2 Means)	0.2200

50 días postinfección

One-Way AOV for: A C CN

Source	DF	SS	MS	F	P
Between	2	0.43385	0.21693	1.55	0.3457
Within	3	0.42108	0.14036		
Total	5	0.85494			

Grand Mean -1.2385 CV -30.25

	Chi-Sq	DF	P
Bartlett's Test of Equal Variances	0.60	2	0.7413
Cochran's Q	0.4870		
Largest Var / Smallest Var	6.6940		

Component of variance for between groups 0.03828
Effective cell size 2.0

Variable Mean

A	-1.1510
C	-0.9617
CN	-1.6027
Observations per Mean	2
Standard Error of a Mean	0.2649
Std Error (Diff of 2 Means)	0.3746

60 días postinfección

One-Way AOV for: A C CN

Source	DF	SS	MS	F	P
Between	2	0.86197	0.43099	4.57	0.1229
Within	3	0.28305	0.09435		
Total	5	1.14502			

Grand Mean -0.7875 CV -39.01

	Chi-Sq	DF	P
Bartlett's Test of Equal Variances	0.21	2	0.8982
Cochran's Q	0.4509		
Largest Var / Smallest Var	2.9770		

Component of variance for between groups 0.16832
Effective cell size 2.0

Variable	Mean
A	-0.5269
C	-0.5120
CN	-1.3234
Observations per Mean	2
Standard Error of a Mean	0.2172
Std Error (Diff of 2 Means)	0.3072

80 días postinfección

One-Way AOV for: A C CN

Source	DF	SS	MS	F	P
Between	2	1.04852	0.52426	11.1	0.0409
Within	3	0.14115	0.04705		
Total	5	1.18966			

Grand Mean -0.7704 CV -28.15

	Chi-Sq	DF	P
Bartlett's Test of Equal Variances	1.63	2	0.4430
Cochran's Q	0.8607		
Largest Var / Smallest Var	20.421		

Component of variance for between groups 0.23860
Effective cell size 2.0

Variable	Mean
A	-0.4954
C	-0.4547
CN	-1.3611
Observations per Mean	2
Standard Error of a Mean	0.1534
Std Error (Diff of 2 Means)	0.2169

Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test

Variable	Mean	Homogeneous Groups
C	-0.4547	A
A	-0.4954	AB
CN	-1.3611	B

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.2169
Critical Q Value 5.909 Critical Value for Comparison 0.9063

110 días postinfección

One-Way AOV for: A C CN

Source	DF	SS	MS	F	P
Between	2	4.35538	2.17769	214	0.0006
Within	3	0.03058	0.01019		
Total	5	4.38596			

Grand Mean -1.3047 CV -7.74

	Chi-Sq	DF	P
Bartlett's Test of Equal Variances	0.05	2	0.9746
Cochran's Q	0.3866		
Largest Var / Smallest Var	1.6445		

Component of variance for between groups 1.08375
Effective cell size 2.0

Variable	Mean
A	-0.9255
C	-0.5038
CN	-2.4847
Observations per Mean	2
Standard Error of a Mean	0.0714
Std Error (Diff of 2 Means)	0.1010

Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test

Variable	Mean	Homogeneous Groups
C	-0.5038	A
A	-0.9255	A
CN	-2.4847	B

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.1010
 Critical Q Value 5.909 Critical Value for Comparison 0.4218

150 días postinfección

One-Way AOV for: A C CN

Source	DF	SS	MS	F	P
Between	2	1.69076	0.84538	102	0.0018
Within	3	0.02493	0.00831		
Total	5	1.71569			

Grand Mean -0.7770 CV -11.73

Chi-Sq DF P
 Bartlett's Test of Equal Variances 2.79 2 0.2474
 Cochran's Q 0.9429
 Largest Var / Smallest Var 53.809

Component of variance for between groups 0.41853
 Effective cell size 2.0

Variable Mean

A -0.8767
 C -0.0827
 CN -1.3715
 Observations per Mean 2
 Standard Error of a Mean 0.0645
 Std Error (Diff of 2 Means) 0.0912

Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test

Variable	Mean	Homogeneous Groups
C	-0.0827	A
A	-0.8767	B
CN	-1.3715	C

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.0912
 Critical Q Value 5.909 Critical Value for Comparison 0.3809

IgG1

Tiempo 0

One-Way AOV for V. dep by V. categ

Source	DF	SS	MS	F	P
V categ	2	5.90304	2.95152	8.46	0.0585
Error	3	1.04722	0.34907		
Total	5	6.95027			

Grand Mean -2.9490 CV -20.03

Chi-Sq DF P
 Bartlett's Test of Equal Variances 1.98 2 0.3712
 Cochran's Q 0.8221
 Largest Var / Smallest Var 51.798

Component of variance for between groups 1.30122
 Effective cell size 2.0

Mean

A -4.1085
 C -3.0530
 CN -1.6856
 Observations per Mean 2
 Standard Error of a Mean 0.4178

Std Error (Diff of 2 Means) 0.5908

20 días postinfección

One-Way AOV for V. dep by V. categ

Source	DF	SS	MS	F	P
V categ	2	24.1877	12.0939	0.86	0.5059
Error	3	42.0609	14.0203		
Total	5	66.2486			

Grand Mean -4.4429 CV -84.28

	Chi-Sq	DF	P
Bartlett's Test of Equal Variances	2.15	2	0.3412
Cochran's Q	0.8703		
Largest Var / Smallest Var	51.552		

Component of variance for between groups -0.96322
Effective cell size 2.0

Mean

A -7.2347
C -3.4957
CN -2.5983
Observations per Mean 2
Standard Error of a Mean 2.6477
Std Error (Diff of 2 Means) 3.7444

30 días postinfección

One-Way AOV for V. dep by V. categ

Source	DF	SS	MS	F	P
V categ	2	1.35287	0.67644	1.44	0.3637
Error	3	1.40564	0.46855		
Total	5	2.75852			

Grand Mean -3.1002 CV -22.08

	Chi-Sq	DF	P
Bartlett's Test of Equal Variances	3.55	2	0.1699
Cochran's Q	0.5794		
Largest Var / Smallest Var	637.41		

Component of variance for between groups 0.10394
Effective cell size 2.0

Mean

A -3.7620
C -2.6704
CN -2.8684
Observations per Mean 2
Standard Error of a Mean 0.4840
Std Error (Diff of 2 Means) 0.6845

50 días postinfección

One-Way AOV for V. dep by V. categ

Source	DF	SS	MS	F	P
V categ	2	0.56395	0.28198	1.20	0.4142
Error	3	0.70534	0.23511		
Total	5	1.26930			

Grand Mean -1.3598 CV -35.66

	Chi-Sq	DF	P
Bartlett's Test of Equal Variances	0.90	2	0.6365
Cochran's Q	0.5744		
Largest Var / Smallest Var	12.473		

Component of variance for between groups 0.02343
Effective cell size 2.0

Mean
 A -1.0950
 C -1.1948
 CN -1.7895
 Observations per Mean 2
 Standard Error of a Mean 0.3429
 Std Error (Diff of 2 Means) 0.4849

60 días postinfección

One-Way AOV for V. dep by V. categ

Source	DF	SS	MS	F	P
V categ	2	1.34886	0.67443	2.59	0.2219
Error	3	0.78040	0.26013		
Total	5	2.12927			

Grand Mean -1.6411 CV -31.08

	Chi-Sq	DF	P
Bartlett's Test of Equal Variances	0.17	2	0.9204
Cochran's Q	0.4399		
Largest Var / Smallest Var	2.5917		

Component of variance for between groups 0.20715
 Effective cell size 2.0

Mean
 A -1.2917
 C -1.3201
 CN -2.3114
 Observations per Mean 2
 Standard Error of a Mean 0.3606
 Std Error (Diff of 2 Means) 0.5100

80 días postinfección

One-Way AOV for V. dep by V. categ

Source	DF	SS	MS	F	P
V categ	2	2.38966	1.19483	19.4	0.0192
Error	3	0.18439	0.06146		
Total	5	2.57405			

Grand Mean -1.6676 CV -14.87

	Chi-Sq	DF	P
Bartlett's Test of Equal Variances	0.15	2	0.9291
Cochran's Q	0.4560		
Largest Var / Smallest Var	2.5206		

Component of variance for between groups 0.56668
 Effective cell size 2.0

Mean
 A -1.2733
 C -1.1713
 CN -2.5581
 Observations per Mean 2
 Standard Error of a Mean 0.1753
 Std Error (Diff of 2 Means) 0.2479

Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of V002 by V001

	Mean	Homogeneous Groups
C	-1.1713	A
A	-1.2733	A
CN	-2.5581	B

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.2479
 Critical Q Value 5.909 Critical Value for Comparison 1.0359

110 días postinfección

One-Way AOV for V. dep by V. categ

Source	DF	SS	MS	F	P
V categ	2	1.43592	0.71796	15.4	0.0264
Error	3	0.13964	0.04655		
Total	5	1.57557			

Grand Mean -1.2962 CV -16.65

	Chi-Sq	DF	P
Bartlett's Test of Equal Variances	0.24	2	0.8876
Cochran's Q	0.5293		
Largest Var / Smallest Var	3.3249		

Component of variance for between groups 0.33571
Effective cell size 2.0

Mean

A -1.0625
C -0.8491
CN -1.9770
Observations per Mean 2
Standard Error of a Mean 0.1526
Std Error (Diff of 2 Means) 0.2157

Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of V002 by V001

Mean	Homogeneous Groups
C -0.8491	A
A -1.0625	A
CN -1.9770	B

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.2157
Critical Q Value 5.909 Critical Value for Comparison 0.9015

150 días postinfección

One-Way AOV for V. dep by V. categ

Source	DF	SS	MS	F	P
V categ	2	3.25731	1.62866	73.7	0.0028
Error	3	0.06630	0.02210		
Total	5	3.32362			

Grand Mean -1.7046 CV -8.72

	Chi-Sq	DF	P
Bartlett's Test of Equal Variances	1.22	2	0.5420
Cochran's Q	0.7011		
Largest Var / Smallest Var	20.624		

Component of variance for between groups 0.80328
Effective cell size 2.0

Mean

A -1.7234
C -0.7930
CN -2.5975
Observations per Mean 2
Standard Error of a Mean 0.1051
Std Error (Diff of 2 Means) 0.1487

Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of V. dep by V. categ

Mean	Homogeneous Groups
C -0.7930	A
A -1.7234	B
CN -2.5975	C

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.1487
Critical Q Value 5.909 Critical Value for Comparison 0.6212

IgG2

Tiempo 0

One-Way AOV for V. dep by V. categ

Source	DF	SS	MS	F	P
V categ	2	0.28636	0.14318	1.62	0.3334
Error	3	0.26520	0.08840		
Total	5	0.55156			

Grand Mean -4.0474 CV -7.35

	Chi-Sq	DF	P
Bartlett's Test of Equal Variances	3.12	2	0.2100
Cochran's Q	0.9456		
Largest Var / Smallest Var	98.216		

Component of variance for between groups 0.02739
Effective cell size 2.0

Mean

A	-4.2693
C	-3.7503
CN	-4.1226
Observations per Mean	2
Standard Error of a Mean	0.2102
Std Error (Diff of 2 Means)	0.2973

20 días postinfección

One-Way AOV for V. dep by V. categ

Source	DF	SS	MS	F	P
V categ	2	0.45069	0.22535	1.81	0.3055
Error	3	0.37412	0.12471		
Total	5	0.82481			

Grand Mean -2.2833 CV -15.47

	Chi-Sq	DF	P
Bartlett's Test of Equal Variances	1.47	2	0.4803
Cochran's Q	0.5778		
Largest Var / Smallest Var	30.223		

Component of variance for between groups 0.05032
Effective cell size 2.0

Mean

A	-2.6670
C	-2.1389
CN	-2.0439
Observations per Mean	2
Standard Error of a Mean	0.2497
Std Error (Diff of 2 Means)	0.3531

30 días postinfección

One-Way AOV for V. dep by V. categ

Source	DF	SS	MS	F	P
V categ	2	0.37224	0.18612	0.59	0.6092
Error	3	0.95068	0.31689		
Total	5	1.32292			

Grand Mean -2.4414 CV -23.06

	Chi-Sq	DF	P
Bartlett's Test of Equal Variances	0.12	2	0.9437
Cochran's Q	0.4761		
Largest Var / Smallest Var	2.2802		

Component of variance for between groups -0.06538
Effective cell size 2.0

Mean
 A -2.5713
 C -2.0929
 CN -2.6600
 Observations per Mean 2
 Standard Error of a Mean 0.3981
 Std Error (Diff of 2 Means) 0.5629

50 días postinfección

One-Way AOV for V. dep by V. categ

Source	DF	SS	MS	F	P
V categ	2	1.16557	0.58278	9.67	0.0492
Error	3	0.18086	0.06029		
Total	5	1.34643			

Grand Mean -2.0773 CV -11.82

	Chi-Sq	DF	P
Bartlett's Test of Equal Variances	2.37	2	0.3052
Cochran's Q	0.9120		
Largest Var / Smallest Var	47.683		

Component of variance for between groups 0.26125
 Effective cell size 2.0

Mean
 A -1.4652
 C -2.2812
 CN -2.4854
 Observations per Mean 2
 Standard Error of a Mean 0.1736
 Std Error (Diff of 2 Means) 0.2455

Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of V002 by V001

V001 Mean Homogeneous Groups

A -1.4652 A
 C -2.2812 A
 CN -2.4854 A

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.2455
 Critical Q Value 5.909 Critical Value for Comparison 1.0259
 There are no significant pairwise differences among the means.

60 días postinfección

One-Way AOV for V. dep by V. categ

Source	DF	SS	MS	F	P
V categ	2	1.61141	0.80570	25.7	0.0130
Error	3	0.09409	0.03136		
Total	5	1.70549			

Grand Mean -1.6277 CV -10.88

	Chi-Sq	DF	P
Bartlett's Test of Equal Variances	1.29	2	0.5237
Cochran's Q	0.8155		
Largest Var / Smallest Var	15.239		

Component of variance for between groups 0.38717
 Effective cell size 2.0

Mean
 A -1.2071
 C -1.3183
 CN -2.3578
 Observations per Mean 2
 Standard Error of a Mean 0.1252

Std Error (Diff of 2 Means) 0.1771

Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of V. dep by V. categ

	Mean	Homogeneous Groups
A	-1.2071	A
C	-1.3183	A
CN	-2.3578	B

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.1771
 Critical Q Value 5.909 Critical Value for Comparison 0.7400

80 días postinfección

One-Way AOV for V. dep by V. categ

Source	DF	SS	MS	F	P
V categ	2	3.10900	1.55450	11.8	0.0378
Error	3	0.39494	0.13165		
Total	5	3.50394			

Grand Mean -1.5998 CV -22.68

	Chi-Sq	DF	P
Bartlett's Test of Equal Variances	0.57	2	0.7528
Cochran's Q	0.6891		
Largest Var / Smallest Var	5.1768		

Component of variance for between groups 0.71143
 Effective cell size 2.0

Mean

A -1.0809
 C -1.1008
 CN -2.6178
 Observations per Mean 2
 Standard Error of a Mean 0.2566
 Std Error (Diff of 2 Means) 0.3628

Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of V. dep by V. categ

	Mean	Homogeneous Groups
A	-1.0809	A
C	-1.1008	A
CN	-2.6178	B

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.3628
 Critical Q Value 5.909 Critical Value for Comparison 1.5160

110 días postinfección

One-Way AOV for V. dep by V. categ

Source	DF	SS	MS	F	P
V catg	2	2.00804	1.00402	2.28	0.2497
Error	3	1.31971	0.43990		
Total	5	3.32776			

Grand Mean -1.6086 CV -41.23

	Chi-Sq	DF	P
Bartlett's Test of Equal Variances	3.82	2	0.1480
Cochran's Q	0.9743		
Largest Var / Smallest Var	105.84		

Component of variance for between groups 0.28206
 Effective cell size 2.0

Mean

A -1.3458
 C -1.0690
 CN -2.4110

Observations per Mean 2
 Standard Error of a Mean 0.4690
 Std Error (Diff of 2 Means) 0.6633

150 días postinfección

One-Way AOV for V. dep by V. categ

Source	DF	SS	MS	F	P
V categ	2	2.49319	1.24659	2.60	0.2217
Error	3	1.44086	0.48029		
Total	5	3.93405			

Grand Mean -1.6597 CV -41.76

	Chi-Sq	DF	P
Bartlett's Test of Equal Variances	3.70	2	0.1571
Cochran's Q	0.9688		
Largest Var / Smallest Var	124.50		

Component of variance for between groups 0.38315
 Effective cell size 2.0

Mean

A -1.5599
 C -0.9248
 CN -2.4943
 Observations per Mean 2
 Standard Error of a Mean 0.4900
 Std Error (Diff of 2 Means) 0.6930

Anticuerpos específicos frente a PPA en sueros de terneros experimentalmente infectados con *Map*

IgG2

Tiempo 0

One-Way AOV for V. dep by V. categ

Source	DF	SS	MS	F	P
V categ	2	6.65164	3.32582	3.81	0.1501
Error	3	2.61854	0.87285		
Total	5	9.27018			

Grand Mean -4.4048 CV -21.21

At least one group variance is near zero,
 variance-equality tests cannot be computed.

Component of variance for between groups 1.22649
 Effective cell size 2.0

Mean

A -3.4343
 c -5.8680
 CN -3.9120
 Observations per Mean 2
 Standard Error of a Mean 0.6606
 Std Error (Diff of 2 Means) 0.9343

7 días postinfección

One-Way AOV for V. dep by V. categ

Source	DF	SS	MS	F	P
V categ	2	6.3193	3.15964	1.24	0.4047
Error	3	7.6333	2.54443		
Total	5	13.9526			

Grand Mean -4.1372 CV -38.56

	Chi-Sq	DF	P
Bartlett's Test of Equal Variances	4.73	2	0.0939

Cochran's Q 0.9272
 Largest Var / Smallest Var 1558.3

Component of variance for between groups 0.30761
 Effective cell size 2.0

Mean

A -2.7240
 c -5.1301
 CN -4.5575
 Observations per Mean 2
 Standard Error of a Mean 1.1279
 Std Error (Diff of 2 Means) 1.5951

20 días postinfección

One-Way AOV for V. dep by V. categ

Source	DF	SS	MS	F	P
V categ	2	2.56225	1.28113	0.53	0.6341
Error	3	7.21904	2.40635		
Total	5	9.78129			

Grand Mean -3.7242 CV -41.65

Bartlett's Test of Equal Variances Chi-Sq 2.11 DF 2 P 0.3480
 Cochran's Q 0.8871
 Largest Var / Smallest Var 40.899

Component of variance for between groups -0.56261
 Effective cell size 2.0

Mean

A -2.8157
 c -4.3254
 CN -4.0315
 Observations per Mean 2
 Standard Error of a Mean 1.0969
 Std Error (Diff of 2 Means) 1.5512

50 días postinfección

One-Way AOV for V. dep by V. categ

Source	DF	SS	MS	F	P
V categ	2	3.14238	1.57119	2.27	0.2510
Error	3	2.07717	0.69239		
Total	5	5.21956			

Grand Mean -2.9085 CV -28.61

Bartlett's Test of Equal Variances Chi-Sq 6.57 DF 2 P 0.0374
 Cochran's Q 0.8794
 Largest Var / Smallest Var 33319

Component of variance for between groups 0.43940
 Effective cell size 2.0

Mean

A -1.9631
 c -3.0418
 CN -3.7207
 Observations per Mean 2
 Standard Error of a Mean 0.5884
 Std Error (Diff of 2 Means) 0.8321

Kruskal-Wallis One-Way Nonparametric AOV for V. dep by V. categ

Mean Sample

	Rank	Size
A	5.5	2
c	3.5	2
CN	1.5	2
Total	3.5	6

Kruskal-Wallis Statistic 4.5714
P-Value, Using Chi-Squared Approximation 0.1017

Parametric AOV Applied to Ranks

Source	DF	SS	MS	F	P
Between	2	16.0000	8.00000	16.0	0.0251
Within	3	1.5000	0.50000		
Total	5	17.5000			

Total number of values that were tied 0
Max. diff. allowed between ties 0.00001

Cases Included 6 Missing Cases 0

Kruskal-Wallis All-Pairwise Comparisons Test of V002 by V001

V001 Mean Homogeneous Groups

A	5.5000	A
c	3.5000	A
CN	1.5000	A

Alpha 0.05
Critical Z Value 2.394 Critical Value for Comparison 4.4787

80 días postinfección

One-Way AOV for V. dep by V. categ

Source	DF	SS	MS	F	P
V categ	2	3.93879	1.96940	5.25	0.1047
Error	3	1.12526	0.37509		
Total	5	5.06406			

Grand Mean -2.3200 CV -26.40

Bartlett's Test of Equal Variances Chi-Sq 0.46 DF 2 P 0.7953
Cochran's Q 0.6335
Largest Var / Smallest Var 5.0758

Component of variance for between groups 0.79715
Effective cell size 2.0

Mean

A -1.5812
c -1.9310
CN -3.4479

Observations per Mean 2
Standard Error of a Mean 0.4331
Std Error (Diff of 2 Means) 0.6124

110 días postinfección

One-Way AOV for V. dep by V. categ

Source	DF	SS	MS	F	P
V categ	2	7.9538	3.97691	2.63	0.2190
Error	3	4.5395	1.51318		
Total	5	12.4934			

Grand Mean -2.5585 CV -48.08

Bartlett's Test of Equal Variances Chi-Sq 1.42 DF 2 P 0.4918
Cochran's Q 0.7532
Largest Var / Smallest Var 25.916

Component of variance for between groups 1.23187
 Effective cell size 2.0

Mean

A -2.2534
 c -1.3259
 CN -4.0962
 Observations per Mean 2
 Standard Error of a Mean 0.8698
 Std Error (Diff of 2 Means) 1.2301

150 días postinfección

One-Way AOV for V. dep by V. categ

Source	DF	SS	MS	F	P
V categ	2	2.05485	1.02743	1.25	0.4021
Error	3	2.45876	0.81959		
Total	5	4.51361			

Grand Mean -2.5759 CV -35.15

	Chi-Sq	DF	P
Bartlett's Test of Equal Variances	0.10	2	0.9516
Cochran's Q	0.4839		
Largest Var / Smallest Var	2.0021		

Component of variance for between groups 0.10392
 Effective cell size 2.0

Mean

A -2.5541
 c -1.8703
 CN -3.3033
 Observations per Mean 2
 Standard Error of a Mean 0.6402
 Std Error (Diff of 2 Means) 0.9053

Anticuerpos específicos frente a Hsp65r en sueros de terneros experimentalmente infectados con *Map*

IgG

Tiempo 0

One-Way AOV for V. dep by V. categ

Source	DF	SS	MS	F	P
V categ	2	0.38578	0.19289	1.29	0.3934
Error	3	0.44717	0.14906		
Total	5	0.83295			

Grand Mean -2.2550 CV -17.12

	Chi-Sq	DF	P
Bartlett's Test of Equal Variances	2.85	2	0.2404
Cochran's Q	0.7512		
Largest Var / Smallest Var	229.81		

Component of variance for between groups 0.02192
 Effective cell size 2.0

Mean

A -2.6041
 C -2.0093
 CN -2.1516
 Observations per Mean 2
 Standard Error of a Mean 0.2730
 Std Error (Diff of 2 Means) 0.3861

50 días postinfección

One-Way AOV for V. dep by V. categ

Source	DF	SS	MS	F	P
V categ	2	0.58787	0.29393	1.58	0.3401
Error	3	0.55860	0.18620		
Total	5	1.14647			

Grand Mean -2.2898 CV -18.84

	Chi-Sq	DF	P
Bartlett's Test of Equal Variances	6.74	2	0.0343
Cochran's Q	0.9850		
Largest Var / Smallest Var	6609.3		

Component of variance for between groups 0.05387
Effective cell size 2.0

Mean

A -2.4613
C -1.8506
CN -2.5575
Observations per Mean 2
Standard Error of a Mean 0.3051
Std Error (Diff of 2 Means) 0.4315

Kruskal-Wallis One-Way Nonparametric AOV for V. dep by V. categ

	Mean Rank	Sample Size
A	3.5	2
C	5.5	2
CN	1.5	2
Total	3.5	6

Kruskal-Wallis Statistic 4.5714
P-Value, Using Chi-Squared Approximation 0.1017

Parametric AOV Applied to Ranks

Source	DF	SS	MS	F	P
Between	2	16.0000	8.00000	16.0	0.0251
Within	3	1.5000	0.50000		
Total	5	17.5000			

Total number of values that were tied 0
Max. diff. allowed between ties 0.00001

Cases Included 6 Missing Cases 0

Kruskal-Wallis All-Pairwise Comparisons Test of V. dep by V. categ

	Mean	Homogeneous Groups
C	5.5000	A
A	3.5000	A
CN	1.5000	A

Alpha 0.05
Critical Z Value 2.394 Critical Value for Comparison 4.4787

80 días postinfección

One-Way AOV for V. dep by V. categ

Source	DF	SS	MS	F	P
V categ	2	0.30266	0.15133	1.91	0.2921
Error	3	0.23806	0.07935		
Total	5	0.54071			

Grand Mean -2.4395 CV -11.55

Chi-Sq DF P

Bartlett's Test of Equal Variances 1.73 2 0.4209
 Cochran's Q 0.7717
 Largest Var / Smallest Var 41.040

Component of variance for between groups 0.03599
 Effective cell size 2.0

Mean

A -2.6784
 C -2.1388
 CN -2.5013
 Observations per Mean 2
 Standard Error of a Mean 0.1992
 Std Error (Diff of 2 Means) 0.2817

150 días postinfección

One-Way AOV for V. dep by V. categ

Source	DF	SS	MS	F	P
V categ	2	0.99979	0.49990	0.98	0.4696
Error	3	1.52620	0.50873		
Total	5	2.52599			

Grand Mean -2.2631 CV -31.52

Bartlett's Test of Equal Variances Chi-Sq 0.15 DF 2 P 0.9264
 Cochran's Q 0.4977
 Largest Var / Smallest Var 2.5807

Component of variance for between groups -0.00442
 Effective cell size 2.0

Mean

A -2.5300
 C -2.5729
 CN -1.6863
 Observations per Mean 2
 Standard Error of a Mean 0.5043
 Std Error (Diff of 2 Means) 0.7133

IgG1

Tiempo 0

One-Way AOV for V. dep by V. categ

Source	DF	SS	MS	F	P
V categ	2	0.29931	0.14965	2.38	0.2407
Error	3	0.18889	0.06296		
Total	5	0.48820			

Grand Mean -2.2862 CV -10.98

Bartlett's Test of Equal Variances Chi-Sq 2.54 DF 2 P 0.2813
 Cochran's Q 0.9198
 Largest Var / Smallest Var 57.169

Component of variance for between groups 0.04335
 Effective cell size 2.0

Mean

A -2.5647
 C -2.0179
 CN -2.2761
 Observations per Mean 2
 Standard Error of a Mean 0.1774
 Std Error (Diff of 2 Means) 0.2509

50 días postinfección

One-Way AOV for V. dep by V. categ

Source	DF	SS	MS	F	P
V categ	2	0.24429	0.12214	2.43	0.2358
Error	3	0.15080	0.05027		
Total	5	0.39509			

Grand Mean -2.2918 CV -9.78

	Chi-Sq	DF	P
Bartlett's Test of Equal Variances	3.25	2	0.1970
Cochran's Q	0.9416		
Largest Var / Smallest Var	134.30		

Component of variance for between groups 0.03594
Effective cell size 2.0

Mean

A -2.4421
C -2.0066
CN -2.4267
Observations per Mean 2
Standard Error of a Mean 0.1585
Std Error (Diff of 2 Means) 0.2242

80 días postinfección

One-Way AOV for V. dep by V. categ

Source	DF	SS	MS	F	P
V categ	2	0.10440	0.05220	0.93	0.4855
Error	3	0.16870	0.05623		
Total	5	0.27311			

Grand Mean -2.5468 CV -9.31

	Chi-Sq	DF	P
Bartlett's Test of Equal Variances	1.00	2	0.6065
Cochran's Q	0.5647		
Largest Var / Smallest Var	14.464		

Component of variance for between groups -0.00202
Effective cell size 2.0

Mean

A -2.7086
C -2.3854
CN -2.5463
Observations per Mean 2
Standard Error of a Mean 0.1677
Std Error (Diff of 2 Means) 0.2371

150 días postinfección

One-Way AOV for V. dep by V. categ

Source	DF	SS	MS	F	P
V categ	2	0.16755	0.08378	0.67	0.5756
Error	3	0.37644	0.12548		
Total	5	0.54399			

Grand Mean -2.4221 CV -14.62

	Chi-Sq	DF	P
Bartlett's Test of Equal Variances	0.24	2	0.8886
Cochran's Q	0.5697		
Largest Var / Smallest Var	2.7564		

Component of variance for between groups -0.02085
Effective cell size 2.0

Mean

A -2.4685
 C -2.5996
 CN -2.1983
 Observations per Mean 2
 Standard Error of a Mean 0.2505
 Std Error (Diff of 2 Means) 0.3542

IgG2

Tiempo 0

One-Way AOV for V. dep by V. categ

Source	DF	SS	MS	F	P
V categ	2	0.03578	0.01789	2.89	0.1996
Error	3	0.01856	0.00619		
Total	5	0.05434			

Grand Mean -2.7051 CV -2.91

	Chi-Sq	DF	P
Bartlett's Test of Equal Variances	0.37	2	0.8304
Cochran's Q	0.5606		
Largest Var / Smallest Var	4.6161		

Component of variance for between groups 0.00585
 Effective cell size 2.0

Mean

A -2.7752
 C -2.5975
 CN -2.7426
 Observations per Mean 2
 Standard Error of a Mean 0.0556
 Std Error (Diff of 2 Means) 0.0787

50 días postinfección

One-Way AOV for V. dep by V. categ

Source	DF	SS	MS	F	P
V categ	2	0.02469	0.01234	0.23	0.8064
Error	3	0.16000	0.05333		
Total	5	0.18468			

Grand Mean -2.7378 CV -8.44

	Chi-Sq	DF	P
Bartlett's Test of Equal Variances	1.70	2	0.4283
Cochran's Q	0.8579		
Largest Var / Smallest Var	24.730		

Component of variance for between groups -0.02049
 Effective cell size 2.0

Mean

A -2.8261
 C -2.6755
 CN -2.7119
 Observations per Mean 2
 Standard Error of a Mean 0.1633
 Std Error (Diff of 2 Means) 0.2309

80 días postinfección

One-Way AOV for V. dep by V. categ

Source	DF	SS	MS	F	P
V categ	2	0.20139	0.10069	0.26	0.7852
Error	3	1.15098	0.38366		
Total	5	1.35237			

Grand Mean -2.8680 CV -21.60
 Chi-Sq DF P
 Bartlett's Test of Equal Variances 0.14 2 0.9302
 Cochran's Q 0.5181
 Largest Var / Smallest Var 2.2194
 Component of variance for between groups -0.14148
 Effective cell size 2.0

Mean
 A -3.1230
 C -2.7800
 CN -2.7010
 Observations per Mean 2
 Standard Error of a Mean 0.4380
 Std Error (Diff of 2 Means) 0.6194

150 días postinfección

One-Way AOV for V. dep by V. categ

Source	DF	SS	MS	F	P
V categ	2	0.44099	0.22049	0.46	0.6677
Error	3	1.42697	0.47566		
Total	5	1.86796			

Grand Mean -2.8480 CV -24.22
 Chi-Sq DF P
 Bartlett's Test of Equal Variances 2.72 2 0.2568
 Cochran's Q 0.9254
 Largest Var / Smallest Var 72.682
 Component of variance for between groups -0.12758
 Effective cell size 2.0

Mean
 A -3.1508
 C -2.4929
 CN -2.9004
 Observations per Mean 2
 Standard Error of a Mean 0.4877
 Std Error (Diff of 2 Means) 0.6897

Anticuerpos específicos frente a p34r en sueros de terneros experimentalmente infectados con *Map*

IgG

Tiempo 0

One-Way AOV for V. dep by V. categ

Source	DF	SS	MS	F	P
V categ	2	0.14843	0.07421	1.86	0.2982
Error	3	0.11966	0.03989		
Total	5	0.26809			

Grand Mean -3.0198 CV -6.61
 Chi-Sq DF P
 Bartlett's Test of Equal Variances 0.92 2 0.6307
 Cochran's Q 0.7586
 Largest Var / Smallest Var 9.5123
 Component of variance for between groups 0.01716
 Effective cell size 2.0

Mean
 A -3.2290
 C -2.9808
 CN -2.8497

Observations per Mean 2
 Standard Error of a Mean 0.1412
 Std Error (Diff of 2 Means) 0.1997

50 días postinfección

One-Way AOV for V. dep by V. categ

Source	DF	SS	MS	F	P
V categ	2	0.83000	0.41500	2.63	0.2190
Error	3	0.47368	0.15789		
Total	5	1.30368			

Grand Mean -2.9316 CV -13.55

	Chi-Sq	DF	P
Bartlett's Test of Equal Variances	2.69	2	0.2606
Cochran's Q	0.8793		
Largest Var / Smallest Var	114.87		

Component of variance for between groups 0.12855
 Effective cell size 2.0

Mean

A -2.4260
 C -3.3102
 CN -3.0585
 Observations per Mean 2
 Standard Error of a Mean 0.2810
 Std Error (Diff of 2 Means) 0.3974

80 días postinfección

One-Way AOV for V. dep by V. categ

Source	DF	SS	MS	F	P
V categ	2	1.44179	0.72089	7.96	0.0631
Error	3	0.27163	0.09054		
Total	5	1.71342			

Grand Mean -2.9758 CV -10.11

	Chi-Sq	DF	P
Bartlett's Test of Equal Variances	1.64	2	0.4405
Cochran's Q	0.7207		
Largest Var / Smallest Var	39.086		

Component of variance for between groups 0.31518
 Effective cell size 2.0

Mean

A -2.3038
 C -3.4594
 CN -3.1642
 Observations per Mean 2
 Standard Error of a Mean 0.2128
 Std Error (Diff of 2 Means) 0.3009

110 días postinfección

One-Way AOV for V. dep by V. categ

Source	DF	SS	MS	F	P
V categ	2	2.75391	1.37696	133	0.0012
Error	3	0.03106	0.01035		
Total	5	2.78498			

Grand Mean -2.5765 CV -3.95

	Chi-Sq	DF	P
Bartlett's Test of Equal Variances	0.15	2	0.9262
Cochran's Q	0.4686		
Largest Var / Smallest Var	2.5963		

Component of variance for between groups 0.68330
 Effective cell size 2.0

Mean
 A -1.6184
 C -3.0612
 CN -3.0497
 Observations per Mean 2
 Standard Error of a Mean 0.0720
 Std Error (Diff of 2 Means) 0.1018

Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of V002 by V001

V categ Mean Homogeneous Groups

A	-1.6184	A
CN	-3.0497	B
C	-3.0612	B

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.1018
 Critical Q Value 5.909 Critical Value for Comparison 0.4252

150 días postinfección

One-Way AOV for V. dep by V. categ

Source	DF	SS	MS	F	P
V categ	2	3.06670	1.53335	3.94	0.1449
Error	3	1.16819	0.38940		
Total	5	4.23489			

Grand Mean -2.9350 CV -21.26

	Chi-Sq	DF	P
Bartlett's Test of Equal Variances	2.76	2	0.2514
Cochran's Q	0.8961		
Largest Var / Smallest Var	112.24		

Component of variance for between groups 0.57198
 Effective cell size 2.0

Mean
 A -1.9797
 C -3.6994
 CN -3.1259
 Observations per Mean 2
 Standard Error of a Mean 0.4412
 Std Error (Diff of 2 Means) 0.6240

IgG1

Tiempo 0

One-Way AOV for V. dep by V. categ

Source	DF	SS	MS	F	P
V categ	2	0.11061	0.05530	0.81	0.5223
Error	3	0.20409	0.06803		
Total	5	0.31470			

Grand Mean -2.7371 CV -9.53

	Chi-Sq	DF	P
Bartlett's Test of Equal Variances	2.53	2	0.2816
Cochran's Q	0.8399		
Largest Var / Smallest Var	113.09		

Component of variance for between groups -0.00636
 Effective cell size 2.0

Mean
 A -2.9099
 C -2.7232

CN -2.5782
 Observations per Mean 2
 Standard Error of a Mean 0.1844
 Std Error (Diff of 2 Means) 0.2608

50 días postinfección

One-Way AOV for V. dep by V. categ

Source	DF	SS	MS	F	P
V cate	2	0.37191	0.18596	14.1	0.0299
Error	3	0.03965	0.01322		
Total	5	0.41156			

Grand Mean -2.7940 CV -4.11

	Chi-Sq	DF	P
Bartlett's Test of Equal Variances	0.16	2	0.9250
Cochran's Q	0.4754		
Largest Var / Smallest Var	2.6265		

Component of variance for between groups 0.08637
 Effective cell size 2.0

Mean

A -2.4685
 C -3.0730
 CN -2.8405
 Observations per Mean 2
 Standard Error of a Mean 0.0813
 Std Error (Diff of 2 Means) 0.1150

Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of V. dep by V. categ

Mean	Homogeneous Groups
A -2.4685	A
CN -2.8405	AB
C -3.0730	B

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.1150
 Critical Q Value 5.909 Critical Value for Comparison 0.4804

80 días postinfección

One-Way AOV for V. dep by V. categ

Source	DF	SS	MS	F	P
V categ	2	0.66150	0.33075	2.48	0.2316
Error	3	0.40051	0.13350		
Total	5	1.06201			

Grand Mean -3.0707 CV -11.90

	Chi-Sq	DF	P
Bartlett's Test of Equal Variances	1.19	2	0.5514
Cochran's Q	0.8128		
Largest Var / Smallest Var	11.758		

Component of variance for between groups 0.09862
 Effective cell size 2.0

Mean

A -2.7786
 C -3.5351
 CN -2.8983
 Observations per Mean 2
 Standard Error of a Mean 0.2584
 Std Error (Diff of 2 Means) 0.3654

150 días postinfección

One-Way AOV for V. dep by V. categ

Source	DF	SS	MS	F	P
V categ	2	0.32104	0.16052	1.34	0.3838
Error	3	0.35924	0.11975		
Total	5	0.68028			

Grand Mean -2.8881 CV -11.98

	Chi-Sq	DF	P
Bartlett's Test of Equal Variances	1.26	2	0.5317
Cochran's Q	0.7357		
Largest Var / Smallest Var	20.744		

Component of variance for between groups 0.02039
Effective cell size 2.0

Mean

A -2.6107
C -3.1769
CN -2.8767
Observations per Mean 2
Standard Error of a Mean 0.2447
Std Error (Diff of 2 Means) 0.3460

IgG2

Tiempo 0

One-Way AOV for V. dep by V. categ

Source	DF	SS	MS	F	P
V categ	2	0.62658	0.31329	0.62	0.5961
Error	3	1.52123	0.50708		
Total	5	2.14781			

Grand Mean -3.4011 CV -20.94

	Chi-Sq	DF	P
Bartlett's Test of Equal Variances	3.97	2	0.1372
Cochran's Q	0.9552		
Largest Var / Smallest Var	319.92		

Component of variance for between groups -0.09689
Effective cell size 2.0

Mean

A -3.8582
C -3.1712
CN -3.1741
Observations per Mean 2
Standard Error of a Mean 0.5035
Std Error (Diff of 2 Means) 0.7121

15 días postinfección

One-Way AOV for V. dep by V. categ

Source	DF	SS	MS	F	P
V categ	2	0.12531	0.06265	0.05	0.9503
Error	3	3.62520	1.20840		
Total	5	3.75051			

Grand Mean -3.0705 CV -35.80

	Chi-Sq	DF	P
Bartlett's Test of Equal Variances	5.16	2	0.0759
Cochran's Q	0.9812		
Largest Var / Smallest Var	783.14		

Component of variance for between groups -0.57287
Effective cell size 2.0

Mean
 A -2.8661
 C -3.1712
 CN -3.1741
 Observations per Mean 2
 Standard Error of a Mean 0.7773
 Std Error (Diff of 2 Means) 1.0993

20 días postinfección

One-Way AOV for V. dep by V. categ

Source	DF	SS	MS	F	P
V categ	2	0.41346	0.20673	0.18	0.8452
Error	3	3.48530	1.16177		
Total	5	3.89876			

Grand Mean -2.9698 CV -36.29

	Chi-Sq	DF	P
Bartlett's Test of Equal Variances	6.20	2	0.0450
Cochran's Q	0.9855		
Largest Var / Smallest Var	2885.9		

Component of variance for between groups -0.47752
 Effective cell size 2.0

Mean
 A -2.6015
 C -3.1945
 CN -3.1133
 Observations per Mean 2
 Standard Error of a Mean 0.7622
 Std Error (Diff of 2 Means) 1.0779

Kruskal-Wallis One-Way Nonparametric AOV for V. dep by V. categ

	Mean Rank	Sample Size
A	3.5	2
C	3.5	2
CN	3.5	2
Total	3.5	6

Kruskal-Wallis Statistic 0.0000
 P-Value, Using Chi-Squared Approximation 1.0000

Parametric AOV Applied to Ranks

Source	DF	SS	MS	F	P
Between	2	0.00000	0.00000	0.00	1.0000
Within	3	17.5000	5.83333		
Total	5	17.5000			

Total number of values that were tied 0
 Max. diff. allowed between ties 0.00001

30 días postinfección

One-Way AOV for V. dep by V. categ

Source	DF	SS	MS	F	P
V CATEG	2	1.71419	0.85709	1.63	0.3314
Error	3	1.57535	0.52512		
Total	5	3.28954			

Grand Mean -2.8621 CV -25.32

	Chi-Sq	DF	P
Bartlett's Test of Equal Variances	3.00	2	0.2227
Cochran's Q	0.9537		
Largest Var / Smallest Var	53.772		

Component of variance for between groups 0.16599
 Effective cell size 2.0

Mean
 A -2.1290
 C -3.3884
 CN -3.0688
 Observations per Mean 2
 Standard Error of a Mean 0.5124
 Std Error (Diff of 2 Means) 0.7246

50 días postinfección

One-Way AOV for V. dep by V. categ

Source	DF	SS	MS	F	P
V CATEG	2	1.88637	0.94318	2.48	0.2310
Error	3	1.13883	0.37961		
Total	5	3.02520			

Grand Mean -2.9920 CV -20.59

Bartlett's Test of Equal Variances Chi-Sq 2.30 DF 2 P 0.3159
 Cochran's Q 0.9115
 Largest Var / Smallest Var 41.696

Component of variance for between groups 0.28179
 Effective cell size 2.0

Mean
 A -2.2955
 C -3.6685
 CN -3.0120
 Observations per Mean 2
 Standard Error of a Mean 0.4357
 Std Error (Diff of 2 Means) 0.6161

60 días postinfección

One-Way AOV for V. dep by V. categ

Source	DF	SS	MS	F	P
V CATEG	2	1.04476	0.52238	2.05	0.2752
Error	3	0.76626	0.25542		
Total	5	1.81101			

Grand Mean -3.1472 CV -16.06

Bartlett's Test of Equal Variances Chi-Sq 1.57 DF 2 P 0.4570
 Cochran's Q 0.8234
 Largest Var / Smallest Var 25.341

Component of variance for between groups 0.13348
 Effective cell size 2.0

Mean
 A -2.6572
 C -3.6770
 CN -3.1073
 Observations per Mean 2
 Standard Error of a Mean 0.3574
 Std Error (Diff of 2 Means) 0.5054

80 días postinfección

One-Way AOV for V. dep by V. categ

Source	DF	SS	MS	F	P
V CATEG	2	24.8262	12.4131	0.71	0.5589
Error	3	52.4040	17.4680		
Total	5	77.2301			

Grand Mean -5.4162 CV -77.17

	Chi-Sq	DF	P
Bartlett's Test of Equal Variances	1.66	2	0.4368
Cochran's Q	0.6263		
Largest Var / Smallest Var	41.573		

Component of variance for between groups -2.52746
Effective cell size 2.0

Mean

A	-2.6419
C	-7.4621
CN	-6.1447
Observations per Mean	2
Standard Error of a Mean	2.9553
Std Error (Diff of 2 Means)	4.1795

110 días postinfección

One-Way AOV for V. dep by V. categ

Source	DF	SS	MS	F	P
V CATEG	2	10.3702	5.18511	10.8	0.0425
Error	3	1.4393	0.47977		
Total	5	11.8095			

Grand Mean -2.6622 CV -26.02

	Chi-Sq	DF	P
Bartlett's Test of Equal Variances	1.08	2	0.5821
Cochran's Q	0.7730		
Largest Var / Smallest Var	12.851		

Component of variance for between groups 2.35267
Effective cell size 2.0

Mean

A	-0.8620
C	-3.9647
CN	-3.1600
Observations per Mean	2
Standard Error of a Mean	0.4898
Std Error (Diff of 2 Means)	0.6927

Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of V. dep by V. categ

V categ Mean Homogeneous Groups

A	-0.8620	A
CN	-3.1600	AB
C	-3.9647	B

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.6927
Critical Q Value 5.909 Critical Value for Comparison 2.8941

150 días postinfección

One-Way AOV for V. dep by V. categ

Source	DF	SS	MS	F	P
V categ	2	8.1067	4.05333	4.14	0.1371
Error	3	2.9361	0.97870		
Total	5	11.0428			

Grand Mean -2.8353 CV -34.89
 Chi-Sq DF P
 Bartlett's Test of Equal Variances 0.60 2 0.7392
 Cochran's Q 0.6760
 Largest Var / Smallest Var 6.4958

Component of variance for between groups 1.53732
 Effective cell size 2.0

Mean
 A -1.3047
 C -4.1198
 CN -3.0815
 Observations per Mean 2
 Standard Error of a Mean 0.6995
 Std Error (Diff of 2 Means) 0.9893

Capítulo IV: Efecto de anticuerpos bovinos específicos sobre la viabilidad intracelular de *Map* en un modelo de infección de macrófagos bovinos *in vitro*

One-Way AOV for: CN IC IHSP65 IP34

Source	DF	SS	MS	F	P
Between	3	2757.54	919.179	11.0	0.0007
Within	13	1086.70	83.592		
Total	16	3844.24			

Grand Mean 75.696 CV 12.08
 Chi-Sq DF P
 Bartlett's Test of Equal Variances 1.01 3 0.7977
 Cochran's Q 0.4005
 Largest Var / Smallest Var 3.5755

Component of variance for between groups 197.291
 Effective cell size 4.2

Variable	N	Mean	SE
CN	4	79.539	4.5714
IC	5	74.289	4.0888
IHSP65	4	92.957	4.5714
IP34	4	56.352	4.5714

Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test

Variable	Mean	Homogeneous Groups
IHSP65	92.957	A
CN	79.539	AB
IC	74.289	BC
IP34	56.352	C

Alpha 0.05
 Critical Q Value 4.151